



Universidad de Oviedo

**Departamento de Química Orgánica e Inorgánica**

**Programa de Doctorado “Síntesis y Reactividad  
Química”**

**Diseño de procesos multicatalíticos  
altamente selectivos en sistemas  
propargílicos. Estudio de la  
combinación de catalizadores de  
oro(I) y enzimas**

**Sergio González Granda**

**Tesis Doctoral, 2022**





Universidad de Oviedo

**Departamento de Química Orgánica e Inorgánica**

**Programa de Doctorado “Síntesis y Reactividad  
Química”**

**Diseño de procesos multicatalíticos  
altamente selectivos en sistemas  
propargílicos. Estudio de la  
combinación de catalizadores de  
oro(I) y enzimas**

**Sergio González Granda**

Memoria para optar al grado de Doctor en Química

2022



Universidad de Oviedo

## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Diseño de procesos multicatalíticos altamente selectivos en sistemas propargílicos. Estudio de la combinación de catalizadores de oro(I) y enzimas	Inglés: Design of highly selective multicatalytic processes on propargylic systems. Study of the combination of gold(I) catalysts and enzymes
2.- Autor	
Nombre: Sergio González Granda	
Programa de Doctorado: Síntesis y reactividad química	
Órgano responsable: Centro Internacional de Posgrado	

### RESUMEN (en español)

En esta Tesis Doctoral se aborda la combinación de dos metodologías catalíticas como son el empleo de enzimas y especies metálicas como aceleradores de reacciones químicas. Por un lado, la biocatálisis se ha consolidado como una estrategia eficiente para la síntesis selectiva de distintos tipos de compuestos orgánicos bajo condiciones suaves de reacción, mientras que la catálisis metálica ha sido ampliamente estudiada para la obtención de moléculas complejas gracias a su capacidad para formar y activar enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo. Así, se estudiarán las posibilidades que presentan distintos sistemas propargílicos como alcoholes, ésteres, amidas o haloalquinos en una memoria dividida en una introducción general, y dos bloques claramente diferenciados que se describen a continuación.

En la Introducción de esta Tesis Doctoral se muestra una perspectiva histórica de la biocatálisis, así como de los distintos tipos de reactividad que son capaces de llevar a cabo las enzimas, prestando especial atención a su aplicabilidad sintética. Además, se desglosan las características particulares que presentan las especies de oro(I) para actuar como catalizadores de un gran número de reacciones, y las ventajas que exhibe el desarrollo de procesos *one-pot* basados en la combinación de distintos tipos de enzimas, así como de especies metálicas y enzimas.

El primer bloque de esta Tesis Doctoral (Capítulo 1) se centra en el desarrollo de un sistema multienzimático para llevar a cabo la desracemización de alcoholes propargílicos racémicos mediante la combinación del sistema oxidativo formado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el agente radicalario TEMPO, con una alcohol deshidrogenasa. Los resultados de esta investigación se encuentran recogidos en el trabajo titulado "*Laccase-mediated oxidations of propargylic alcohols. Application in the deracemization of 1-arylprop-2-yn-1-ols in combination with alcohol dehydrogenases*" (*ChemCatChem* 2020, 12, 520-527).

El segundo bloque (Capítulos del 2 al 5) aborda la combinación de catalizadores de oro(I) con distintos tipos de enzimas para desarrollar procesos *one-pot* que permitan sintetizar compuestos orgánicos ópticamente activos. Este bloque, a su vez se subdivide en dos partes, en función de la



Universidad de Oviedo

reacción catalizada por la especie metálica, bien el reagrupamiento de Meyer-Schuster en los Capítulos 2 y 3 usando alcohol deshidrogenasas o transaminasas, respectivamente, para la síntesis de alcoholes o aminas alílicas ópticamente activos, o bien la hidratación de alquinos en los Capítulos 4 y 5 para la síntesis de clorohidrinas y derivados de efedrina, respectivamente.

Los resultados de estas investigaciones se recogen en:

- Capítulo 2: “*Alcohol dehydrogenases and N-heterocyclic carbene gold(I) catalysts: Design of a chemoenzymatic cascade towards optically active  $\beta,\beta$ -disubstituted allylic alcohols*” (*Angewandte Chemie International Edition* **2021**, 60, 13945-13951).
- Capítulo 3: “*Merging gold(I) catalysis with amine transaminases in cascade catalysis: Chemoenzymatic transformation of propargylic alcohols into enantioenriched allylic amines*” recientemente aceptado en la revista *Advanced Synthesis & Catalysis* **2022**, 364, doi.org/10.1002/adsc.202200777.
- Capítulo 4: “*Unmasking the hidden carbonyl group using gold(I) catalysts and alcohol dehydrogenases: Design of a thermodynamically-driven cascade toward optically active halohydrins*” (*ACS Catalysis* **2022**, 12, 2552-2560).
- Capítulo 5: “*Gold and biocatalysis for the stereodivergent synthesis of nor(pseudo)ephedrine derivatives: Cascade design toward amino alcohols, diols, and diamines*” enviado para su posible publicación en *Nature Catalysis* (manuscrito nº 22108036).

#### RESUMEN (en Inglés)

This Doctoral Thesis deals with the combination of two catalytic methodologies such as the use of enzymes and metal species as accelerators of chemical reactions. On one hand, biocatalysis has been consolidated as an efficient strategy for the selective synthesis of different types of organic compounds under mild reaction conditions, while metal catalysis has been widely studied to obtain complex molecules due to its ability to create and activate carbon-carbon or carbon-heteroatom bonds. Therefore, the possibilities presented by different propargylic systems such as alcohols, esters, amides or haloalkynes in this field will be studied in this work composed of a general introduction, and two clearly differentiated blocks, which will be next summarized.

In the Introduction section of this Doctoral Thesis, a historical perspective of biocatalysis is shown, as well as the different types of reactivity which enzymes can carry out, focusing on their synthetic applicability. In addition, the characteristics of gold(I) species will be discussed as catalysts of a large number of reactions, and the advantages to develop one-pot processes focused on the combination of different types of enzymes, as well as metal species and enzymes.

The first block of this Doctoral Thesis (Chapter 1) refers to the development of a multi-enzymatic system to carry out the deracemization of racemic propargylic alcohols by combining the oxidative system formed by *Trametes versicolor* laccase and the radical agent TEMPO, with an alcohol dehydrogenase. The results of this research work are reported in the paper entitled



Universidad de Oviedo

“Laccase-mediated oxidations of propargylic alcohols. Application in the deracemization of 1-arylprop-2-yn-1-ols in combination with alcohol dehydrogenases” (*ChemCatChem* **2020**, *12*, 520-527).

The second block (Chapters 2 to 5) is focused on the combination of gold(I) catalysts with different types of enzymes to develop one-pot processes to synthesize optically active organic compounds. This block is subdivided into two parts, depending on the reaction catalyzed by the metal species, either the Meyer-Schuster rearrangement in Chapters 2 and 3 using alcohol dehydrogenases or transaminases, respectively, for the synthesis of optically active allylic alcohols and amines, or the alkyne hydration reaction in Chapters 4 and 5 for the synthesis of chlorohydrins and ephedrine derivatives, respectively.

The results of these researches have been collected in:

- Chapter 2: “Alcohol dehydrogenases and N-heterocyclic carbene gold(I) catalysts: Design of a chemoenzymatic cascade towards optically active  $\beta,\beta$ -disubstituted allylic alcohols” (*Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60*, 13945-13951).
- Chapter 3: “Merging gold(I) catalysis with amine transaminases in cascade catalysis: Chemoenzymatic transformation of propargylic alcohols into enantioenriched allylic amines” recently accepted in *Advanced Synthesis & Catalysis* **2022**, *364*, doi.org/10.1002/adsc.202200777.
- Chapter 4: “Unmasking the hidden carbonyl group using gold(I) catalysts and alcohol deshydrogenases: Design of a thermodynamically-driven cascade toward optically active halohydrins” (*ACS Catalysis* **2022**, *12*, 2552-2560).
- Chapter 5: “Gold and biocatalysis for the stereodivergent synthesis of nor(pseudo)ephedrine derivatives: Cascade design toward amino alcohols, diols, and diamines” recently submitted to *Nature Catalysis* (manuscript ID: 22108036).
- 

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN SÍNTESIS Y REACTIVIDAD QUÍMICA**







## *Abreviaturas y Acrónimos*



*Abreviaturas y acrónimos*

<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
<sup>19</sup> F-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de flúor
2-Me-THF	2-Metiltetrahidrofurano
2-PrOH	2-Propanol
ABTS	Sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3- <i>ethylbenzothiazolidine-6-sulfónico</i> ) ( <i>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt)</i> )
ABNO	Radical 9-azabicyclo[3.3.1]nonano <i>N</i> -oxilo ( <i>9-Azabicyclo[3.3.1]nonane N-oxyl, free radical</i> )
Ac	Acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADH	Alcohol deshidrogenasa ( <i>Alcohol dehydrogenase</i> )
ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>
ADH-T	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter</i> sp.
AlaDH	Alanina deshidrogenasa ( <i>Alanine dehydrogenase</i> )
AmDH	Amino deshidrogenasa ( <i>Amine dehydrogenase</i> )
ArRmut11	Variante de la transaminasa ( <i>R</i> )-selectiva de <i>Athrobacter</i> sp. con 11 ciclos evolutivos
ArRTA	Transaminasa de <i>Arthrobacter</i> sp.
ArSTA	Transaminasa de <i>Arthrobacter citreus</i>
Asp	Aspartato
ATA	Amino transaminasa
ATP	Adenosín-5'-trifosfato ( <i>Adenosine-5'-triphosphate</i> )
AtTA	Transaminasa de <i>Aspergillus terreus</i>
BrettPhos	2-(Diciclohexilfosfino)-3,6-dimetoxi-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenilo
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B

## Abreviaturas y acrónimos

CAR	Ácido carboxílico reductasa ( <i>Carboxylic Acid Reductase</i> )
CG	Cromatografía de gases
conv.	Conversión
Cys	Cisteína
CvTA	Transaminasa de <i>Chromobacterium violaceum</i>
DKR	Resolución cinética dinámica ( <i>Dynamic Kinetic Resolution</i> )
DMAP	4-( <i>N,N</i> -Dimetilamino)piridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Comisión Enzimática ( <i>Enzyme Commission</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ed</i>	Exceso diastereomérico
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
equiv.	Equivalente
ERED	Alqueno reductasa ( <i>Ene-reductase</i> )
Et	Etilo
Et <sub>2</sub> O	Éter diétilico
FAD	Flavín adenín dinucleótido ( <i>Flavin adenine dinucleotide</i> )
FDH	Formiato deshidrogenasa
FMN	Flavín mononucleótido
GDH	Glucosa deshidrogenasa ( <i>Glucose dehydrogenase</i> )
Glu	Glutamato
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<i>i</i>	<i>iso</i>

Abreviaturas y acrónimos

IMes	1,3-Bis(2,4,6-trimetilfenil)-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -imidazol-2-ilideno
IPr	1,3-Bis-(2,6-diisopropilfenil)-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -imidazol-2-ilideno
IR	Espectroscopia Infrarroja
IRED	Imino reductasa ( <i>Imine Reductase</i> )
ItBu	1,3-Bis- <i>tert</i> -butil-2,3-dihidro-2 <i>H</i> -imidazol-2-ilideno
JohnPhos	(2'-Bifenil)di- <i>tert</i> -butilfosfina
KR	Resolución cinética ( <i>Kynetic Resolution</i> )
KRED	Cetorreductasa ( <i>Ketoreductase</i> )
<i>Lb</i> ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa ( <i>Lactate dehydrogenase</i> )
Led	Diodo emisor de luz ( <i>Light-emitting diode</i> )
Lipasa PS Amano SD	Lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i> inmovilizada sobre diatomita
<i>Lk</i> ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus kefir</i>
LMS	Sistema lacasa-mediador ( <i>Laccase-mediator system</i> )
<i>LTv</i>	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>
Lys	Lisina ( <i>Lysine</i> )
MAO	Monoamino oxidasa ( <i>Monoamine oxidase</i> )
MAO-N D5	Variante evolucionada de la monoamino oxidasa de <i>Aspergillus niger</i>
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MOPS	Ácido 3-( <i>N</i> -morfolino)-propano sulfónico

Abreviaturas y acrónimos

NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducido ( <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate) reduced form</i> )
NHC	Carbeno N-heterocíclico
NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión bis(trifluorometanosulfonil)imida
OMe	Metóxido
PLP	Piridoxal 5'-fosfato ( <i>Pyridoxal 5'-phosphate</i> )
PMP	Piridoxamina 5'-fosfato ( <i>Pyridoxamine 5'-phosphate</i> )
ppm	Partes por millón
RasADH	Alcohol deshidrogenasas de <i>Ralstonia</i> sp.
rd	Radio diastereomérico
Rdto.	Rendimiento
RedAm	Aminasa reductiva ( <i>Reductive aminase</i> )
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SAM	S-Adenosil-L-metionina
Ser	Serina
SyADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Sphingobium yanoikuyae</i>
TA	Amino transaminasa
TBME	<i>tert</i> -Butil metil éter
TEMPO	Radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidin- <i>N</i> -oxilo (2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical)
TeSADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
THF	Tetrahidrofurano
Tyr	Tirosina ( <i>Tyrosine</i> )
U	Unidad enzimática
VfTA	Transaminasa de <i>Vibrio fluvialis</i>

# *Índice*





	<i>Índice</i>
<b>Introducción</b>	1
0.1 Catálisis	3
0.2 Biocatálisis	4
0.2.1 <i>Tipos de enzimas y clasificación enzimática</i>	8
0.2.2 <i>Procesos estereoselectivos enzimáticos en síntesis orgánica</i>	9
0.2.2.1 <i>Ejemplos de reacciones catalizadas por enzimas</i>	11
0.2.2.2 <i>Formación de enlaces C-C o C-X mediante métodos biocatalíticos</i>	13
0.2.3 <i>Biocatálisis aplicada a gran escala</i>	16
0.3 Catálisis metálica	18
0.3.1 <i>Catálisis de oro</i>	18
0.3.1.1 <i>Estados de oxidación del oro</i>	20
0.3.1.2 <i>Estructura de los catalizadores de Au(I)</i>	21
0.3.1.3 <i>Ligandos empleados en catálisis de Au(I)</i>	22
0.3.1.4 <i>Efecto del contraíón en la catálisis de Au(I)</i>	24
0.3.1.5 <i>Activación carbofílica catalizada por complejos de oro</i>	25
0.4 <i>Procesos multicatalíticos: Cascadas y aproximaciones secuenciales</i>	29
0.4.1 <i>Procesos multienzimáticos</i>	32
0.4.2 <i>Procesos multicatalíticos fotoenzimáticos</i>	34
0.4.3 <i>Procesos multicatalíticos metal-enzima</i>	35
<b>Objetivos generales</b>	39

## Índice

<b>Bloque I.</b> Desarrollo de procesos multienzimáticos sobre alcoholes propargílicos	43
<b>Capítulo 1.</b> Desracemización de alcoholes propargílicos mediante la combinación de lacasas y alcohol deshidrogenasas	45
<b>Introducción</b>	47
I.1 Desracemización: Concepto y tipos	49
I.2 Oxidorreductasas	51
I.2.1 <i>Oxidasas</i>	52
I.2.1.1 <i>Lacasas</i>	53
I.2.1.2 <i>Lacasa de Trametes versicolor</i>	56
I.2.1.3 <i>Sistemas Lacasa-Mediador (LMS, laccase-mediator systems)</i>	56
I.2.2 <i>Alcohol deshidrogenasas (ADHs)</i>	59
I.2.2.1 <i>Sistemas de regeneración del cofactor</i>	60
I.2.2.2 <i>Selectividad de las ADHs</i>	62
I.2.2.3 <i>Tipos de ADHs</i>	63
I.2.2.4 <i>ADHs en síntesis orgánica</i>	66
<b>Antecedentes</b>	69
I.3 Oxidación de alcoholes propargílicos	71
I.3.1 <i>Oxidación de alcoholes propargílicos mediante métodos no enzimáticos</i>	72
I.3.2 <i>Oxidación de alcohol propargílicos mediante métodos (quimio)enzimáticos</i>	73
I.4 Obtención de alcoholes propargílicos ópticamente activos mediante la reducción estereoselectiva de cetonas propargílicas	75
I.4.1 <i>Reducción de cetonas propargílicas empleando métodos no enzimáticos</i>	75

I.4.2 Reducción de cetonas propargílicas empleando métodos enzimáticos	76
I.5 Desracemización enzimática de alcoholes propargílicos	77
<b>Resultados y discusión</b>	81
1.1 Estudio y optimización de la reacción de oxidación de alcoholes propargílicos derivados de 1-arylprop-2-yn-1-oles	83
1.2 Estudio y optimización de la reacción de biorreducción de las cetonas propargílicas <b>2a-n</b>	84
1.3 Estudio y optimización del proceso de desracemización quimioenzimática de los alcoholes propargílicos	85
<b>Artículo de investigación</b>	89
<b>Bloque II.</b> Diseño de procesos multicatalíticos basados en la combinación de especies de Au(I) y enzimas	99
<b>Parte I.</b> Procesos en cascada mediante la combinación del reagrupamiento de Meyer-Schuster catalizado por especies de Au(I) y enzimas	101
<b>Introducción</b>	103
II.1 Procesos one-pot metal-enzima	105
II.1.1 <i>Perspectiva histórica</i>	107
II.1.2 <i>Procesos one-pot oro-enzima</i>	110
II.2 Transaminasas	113
II.2.1 <i>Mecanismo de reacción</i>	116
II.2.2 <i>Termodinámica de la reacción de biotransaminación</i>	117
II.2.3 <i>Transaminasas en síntesis orgánica</i>	122
<b>Antecedentes</b>	125
II.3 Sistemas alílicos: Importancia de alcoholes y aminas alílicos	127

## Índice

II.4 Reagrupamiento de Meyer-Schuster de alcoholes propargílicos	128
II.4.1 <i>Reagrupamiento de Meyer-Schuster catalizado por especies de Au(I)</i>	131
<b>Capítulo 2.</b> Combinación del reagrupamiento de Meyer-Schuster y alcohol deshidrogenasas para la síntesis de alcoholes alílicos ópticamente activos	135
<b>Resultados y discusión</b>	137
2.1 Estudio y optimización del reagrupamiento de Meyer-Schuster de alcoholes propargílicos empleando catalizadores de Au(I)	140
2.2 Estudio del proceso de biorreducción de la cetona ( <i>E</i> )- <b>4a</b> empleando ADHs	141
2.3 Estudio y optimización del proceso en cascada concurrente para la obtención de los alcoholes alílicos ópticamente activos	141
<b>Artículo de investigación</b>	145
<b>Capítulo 3.</b> Combinación del reagrupamiento de Meyer-Schuster y transaminasas para la síntesis de aminas alílicas ópticamente activas	155
<b>Resultados y discusión</b>	157
3.1 Estudio del reagrupamiento de Meyer-Schuster de alcoholes propargílicos empleando catalizadores de Au(I)	159
3.2 Estudio de la reacción de biotransaminación de la cetona <b>2a</b>	161
3.3 Estudio del proceso en cascada para la síntesis de ( <i>E</i> )- <b>3a</b>	162
3.4 Estudio y optimización del proceso secuencial para la síntesis de las aminas alílicas ( <i>E</i> )- <b>3a-h</b>	162
<b>Artículo de investigación</b>	165

<b>Parte II.</b> Procesos en cascada basados en la combinación de reacciones de hidratación de alquinos catalizadas por especies de Au(I) y enzimas	177
<b>Introducción</b>	179
II.5 Reacciones de hidratación de alquinos	181
II.5.1 <i>Hidratación de alquinos catalizada por especies de Ru</i>	183
II.5.2 <i>Hidratación de alquinos catalizada por especies de Au</i>	184
II.6 Haloalquinos: Estructura y reactividad	187
II.6.1 <i>Reacciones de hidratación de haloalquinos</i>	188
II.7 Procesos concurrentes combinando reacciones de hidratación catalizadas por Au(I) y procesos enzimáticos	190
<b>Antecedentes</b>	195
II.8 Síntesis de halohidrinas ópticamente activas	197
II.9 Efedrinas y derivados	202
II.10 Síntesis de efedrinas y derivados	203
<b>Capítulo 4.</b> Síntesis de halohidrinas ópticamente activas a partir de haloalquinos mediante un proceso en cascada de hidratación y biorreducción	209
<b>Resultados y discusión</b>	211
4.1 Estudio y optimización de la reacción de hidratación de haloalquinos catalizada por especies de Au(I)	214
4.2 Estudio del proceso de biorreducción de la $\alpha$ -clorometil cetona <b>2a</b>	215
4.3 Diseño y optimización de una aproximación en cascada para la síntesis estereoselectiva de las halohidrinas <b>3a-I</b>	216
4.4 Diseño de un proceso one-pot para la síntesis estereoselectiva del epóxido <b>4a</b>	217

## Índice

<b>Artículo de investigación</b>	219
<b>Capítulo 5.</b> Síntesis quimioenzimática de 1,2-aminoalcoholes, 1,2-dioles y 1,2-diaminas derivados de efedrinas mediante la combinación de catalizadores de Au(I) y enzimas	231
<b>Resultados y discusión</b>	233
5.1 Optimización de la reacción de hidratación del éster propargílico <b>1</b>	236
5.2 Estudio del proceso de biotransaminación del cetoester <b>3</b>	236
5.3 Diseño y optimización del proceso secuencial para la síntesis del 1,2-aminoalcohol <b>5b</b>	237
5.4 Estudio del proceso de biorreducción del cetoester <b>3</b>	237
5.5 Diseño y optimización del proceso en cascada concurrente para la síntesis del diol <b>6b</b>	238
5.6 Optimización de la reacción de hidratación de la amida propargílica <b>2</b>	239
5.7 Estudio del proceso de biorreducción de la cetoamida <b>4</b>	239
5.8 Diseño de un proceso secuencial para la síntesis del 1,2-aminoalcohol (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )- <b>7a</b>	241
5.9 Estudio del proceso de biotransaminación de la cetoamida <b>4</b>	241
5.10 Diseño y estudio del proceso secuencial para la síntesis de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )- <b>8b</b>	241
<b>Artículo de investigación</b>	245
<b>Conclusiones generales</b>	279
<b>Parte experimental</b>	281
E.1 Catalizadores, reactivos y disolventes	283

*Índice*

E.2 Técnicas de análisis	285
E.3 Procedimientos experimentales y caracterización de compuestos orgánicos	286



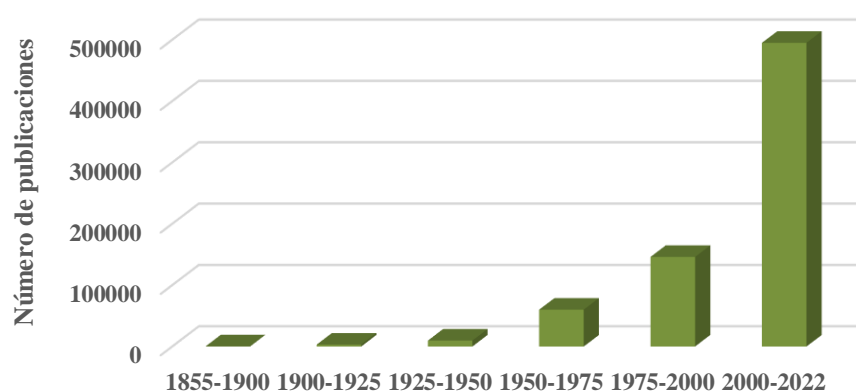


# *Introducción*



### 0.1 Catálisis

Hoy en día, la catálisis está considerada como una de las disciplinas más importante en química orgánica, y sobre la que se fundamentan la gran parte de las investigaciones científicas actuales, como se muestra en la Figura 1. El término *catálisis* fue propuesto por primera vez en el año 1835 por el químico de origen sueco Jacob Berzelius y posteriormente matizado por Wilhelm Ostwald. Así, se definió como “la aceleración de las reacciones químicas lentas mediante la presencia de materiales extraños”, considerando por tanto a un *catalizador* como “una sustancia que acelera una reacción química sin afectar al equilibrio de esta”.<sup>1</sup> Hoy en día se acepta un término más generalista de dicha definición, entendiendo estas sustancias como aquellas que *modifican* la velocidad de un proceso químico, debido a la existencia de los catalizadores negativos o inhibidores.



**Figura 1.** Evolución del número de publicaciones científicas sobre catálisis desde 1855 a la actualidad recogidas en SciFinder (13-06-2022).

<sup>1</sup> W. Ostwald, *Z. Phys. Chem.* **1894**, *15*, 705-706.

## Introducción

El estudio de la catálisis y de los procesos catalíticos desde su inicio hasta los tiempos actuales ha experimentado un auge exponencial, suponiendo grandes avances para la humanidad. Un ejemplo de ello es el proceso industrial Haber-Bosch, mediante el cual se transforman nitrógeno e hidrógeno gaseosos en amoníaco, gracias a la presencia de un catalizador de hierro. Teniendo en cuenta que la industria del amoníaco es imprescindible para la producción de fertilizantes y, por tanto, de alimentos, se puede considerar este como uno de los grandes descubrimientos de la química.<sup>2</sup> Hoy en día, la catálisis juega un papel fundamental en la vida y el desarrollo humano, ya que se estima que cerca del 85% de los productos elaborados en la industria química se producen a través de procesos catalíticos.<sup>3</sup>

Dentro de la catálisis se pueden distinguir varios tipos dependiendo de la naturaleza del catalizador, como la *organocatálisis*, la cual emplea moléculas orgánicas pequeñas como catalizadores, la *fotocatálisis*, cuyo fundamento es la excitación de las moléculas orgánicas mediante el empleo de luz, la *catálisis metálica*, que se fundamenta en el empleo de metales o complejos metálicos como catalizadores de reacción y la *biocatálisis*, que se basa en el empleo de enzimas como aceleradores de los procesos químicos. Estos dos últimos tipos de catálisis, tanto la metálica como la enzimática, son el eje central de esta Tesis Doctoral, y sus principales características y aplicaciones serán presentadas de manera resumida en sucesivas secciones.

### 0.2 Biocatálisis

La biocatálisis es la disciplina que estudia el uso de biocatalizadores o enzimas, ya sean aisladas o formando parte de células enteras, como aceleradores de reacciones químicas. Históricamente las enzimas han sido empleadas desde hace miles de años para producir la fermentación alcohólica, siendo posible así obtener vino o cerveza. A pesar de ello, no fue hasta el año 1848 cuando comenzaron a estudiarse estos procesos mediados por enzimas. En este año, Louis Pasteur realizó con éxito la resolución cinética del ácido tartárico mediante el uso del hongo *Penicillium glaucum*.<sup>4</sup> Sin embargo, la consolidación de la biocatálisis no llega hasta el año 1985, cuando Zaks y Klibanov descubrieron que algunas enzimas eran capaces

---

<sup>2</sup> S. Chen, S. Perathoner, C. Ampelli, G. Centi, *Stud. Surf. Sci. Catal.* **2019**, 178, 31-46.

<sup>3</sup> J. Hagen, "Homogeneously Catalyzed Industrial Processes" en *Industrial Catalysis: A Practical Approach*. 3ª Ed. Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2015**, cap. 3.

<sup>4</sup> L. Pasteur, *Ann. Chim. Phys.* **1848**, 24, 442-459.

de catalizar transformaciones en disolventes orgánicos en lugar de los tradicionales medios acuosos.<sup>5</sup> Este descubrimiento supuso una revolución en el campo de la biocatálisis desde un punto de vista sintético, ya que la posibilidad de trabajar en medios orgánicos elimina una serie de problemas asociados tradicionalmente a la catálisis enzimática en agua como la, generalmente, baja solubilidad de los compuestos orgánicos, o la aparición de reacciones indeseadas que compiten con la reacción principal.

Las enzimas han sido consideradas catalizadores privilegiados debido a las elevadas selectividades que son capaces de inducir en los procesos que aceleran; siendo estos elevados niveles de selectividad una característica intrínseca a la naturaleza tridimensional de las enzimas.<sup>6</sup> De esta manera, los biocatalizadores pueden presentar *quimioselectividad* (capacidad de modificar un determinado grupo funcional dejando inalterados otros presentes en la misma molécula con similar reactividad), *regioselectividad* (capacidad para distinguir entre grupos funcionales idénticos situados en distintas partes de una molécula, si bien también puede considerarse como la reactividad preferente de diferentes posiciones situadas en grupos funcionales como alquenos, alquinos o epóxidos, etc) y *estereoselectividad* (capacidad de discriminar entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica o de obtener un solo diastereoisómero cuando el acceso a varios es posible).

Hoy en día, la biocatálisis está considerada como una metodología sostenible, puesto que las enzimas son capaces de trabajar bajo condiciones suaves de reacción (temperatura y presión), son biodegradables, y pueden ser reutilizadas cuando han sido previamente inmovilizadas.<sup>7</sup> En este aspecto, la gran mayoría de procesos biocatalíticos encajan en las directrices de lo que se conoce como *Química Sostenible* o *Química Verde*.<sup>8</sup> Este concepto fue definido por la Agencia de Protección Ambiental estadounidense como “el diseño de productos químicos y procesos que reducen o eliminan el uso o la generación de sustancias peligrosas”.<sup>9</sup>

---

<sup>5</sup> A. Zaks, A. M. Klivanov, *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.

<sup>6</sup> D. Ringe, G. A. Petsko, *Science* **2008**, *320*, 1428-1429.

<sup>7</sup> R. G. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801-838.

<sup>8</sup> (a) P. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Nueva York (EE. UU.), **1998**, p. 30; (b) P. Domínguez de María, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, *31*, 100514.

<sup>9</sup> P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452-1461.

## Introducción

Así, la Química Verde estableció los 12 principios que cualquier proceso químico debe cumplir para ser considerado sostenible.<sup>8,10</sup>

Para cuantificar la sostenibilidad de un proceso sintético ha sido necesario definir varios parámetros. Entre ellos destaca el factor-E, el cual fue propuesto por el profesor Sheldon en 1991 y es una de las métricas más populares para clasificar un proceso como sostenible. Este factor medioambiental se determina como la cantidad de desechos generados (en kg), por kg de producto deseado.<sup>11</sup> Más recientemente, este parámetro ha sido evolucionado al factor-E<sup>+</sup> en el cual se tiene en cuenta la contribución de la energía desechada como emisiones de CO<sub>2</sub> u otros gases de efecto invernadero.<sup>12</sup>

A pesar de sus amplias ventajas, la biocatálisis también presenta varias limitaciones como la presencia de un cofactor caro para el correcto funcionamiento de varios tipos de enzimas con el fin de catalizar una determinada transformación, o la dependencia de unas condiciones suaves de reacción ya que temperaturas elevadas o pHs extremos pueden desnaturalizar las proteínas, a no ser que se empleen enzimas extremófilas.<sup>13</sup> Además, pueden sufrir procesos de inhibición ya sean debidos a la presencia de un determinado sustrato o producto, así como de un medio de reacción no natural. Por último y aunque sea contradictorio, su mayor ventaja es a su vez su mayor limitación, ya que la elevada especificidad con la que actúa una enzima hace que solo puedan actuar eficazmente sobre un número reducido de sustratos y con una determinada selectividad.

A pesar de las desventajas que presentan las enzimas, estas se han ido solventando gracias a los avances en distintas técnicas, como la inmovilización enzimática,<sup>14</sup> lo que ha permitido que varias clases de enzimas, no solo las hidrolasas, puedan ser empleadas en disolventes orgánicos, lo que facilita su recuperación y

---

<sup>10</sup> H. C. Erythropel et al. *Green Chem.* **2018**, *20*, 1929-1961.

<sup>11</sup> R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2017**, *19*, 18-43.

<sup>12</sup> F. Tieves, F. Tonin, E. Fernández-Fueyo, J. M. Robbins, B. Bommarius, A. S. Bommarius, M. Alcalde, F. Hollmann, *Tetrahedron* **2019**, *75*, 1311-1314.

<sup>13</sup> (a) D. C. Demirjian, F. Morís-Varas, C. S. Cassidy, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 144-151; (b) J. A. Littlechild, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 161.

<sup>14</sup> (a) V. Stepankova, S. Bidmanova, T. Koudelakova, Z. Prokop, R. Chaloupkova, J. Damborsky, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2823-2836; (b) R. A. Sheldon, A. Basso, D. Brady, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 5850-5862.

reciclaje.<sup>15</sup> Sin embargo, la verdadera revolución en el campo de la biocatálisis ha sido debida a la evolución dirigida.<sup>16</sup> Esta técnica se fundamenta en la generación aleatoria de conjuntos (librerías) de enzimas mutantes, que presentan modificaciones en la secuencia de aminoácidos de su estructura. Posteriormente, estas variantes se someten a diversas rondas de mutación hasta alcanzar el biocatalizador con una actividad o selectividad altamente mejorada en comparación con la proteína natural.<sup>17</sup> El objetivo de esta técnica es generar nuevas enzimas que sean capaces de aceptar sustratos diferentes a los naturales, mostrar una mayor estabilidad frente a la temperatura o el pH del medio de reacción, aumentar tanto la eficiencia catalítica como la tolerancia de los catalizadores naturales frente a disolventes orgánicos, o el desarrollo de nuevas reactividades desconocidas hasta la fecha en la naturaleza.<sup>18</sup> Debido a la importancia de esta técnica y a las novedosas contribuciones de Frances H. Arnold al desarrollo de la misma, la investigadora estadounidense fue galardonada con el premio Nobel de Química en el año 2018.<sup>19</sup>

En los últimos años la aplicación de métodos computacionales han sido claves en el diseño racional de nuevos biocatalizadores. En este ámbito, una poderosa herramienta consiste en la combinación de la mutagénesis aleatoria junto con métodos estadísticos, de manera que es posible construir modelos matemáticos de la secuencia y la función de una determinada proteína. De esta forma, se pueden producir nuevas enzimas con mayor actividad, abordando modificaciones en la proteína tanto en el centro activo como en posiciones distales de la misma.<sup>20</sup>

Por tanto, las mejoras experimentadas gracias a los continuos avances en la inmovilización enzimática, evolución dirigida, herramientas bioinformáticas y secuenciación del ADN,<sup>21</sup> han permitido que las biotransformaciones se hayan

---

<sup>15</sup> M. P. Thompson, S. R. Derrington, R. S. Heath, J. L. Porter, J. Mangas-Sánchez, P. N. Devine, M. D. Truppo, N. J. Turner, *Tetrahedron* **2019**, *75*, 327-334.

<sup>16</sup> (a) M. J. Dougherty, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 486-491; (b) M. Packer, D. Liu, *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 379-394; (c) F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 4143-4148.

<sup>17</sup> (a) M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548; (b) G. Qu, A. Li, C. G. Acevedo-Rocha, Z. Sun, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 13204-13231; (c) Y. Wang, P. Xue, M. Cao, T. Yu, S. T. Lane, H. Zhao, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 12384-12444.

<sup>18</sup> (a) O. Kuchner, F. H. Arnold, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 523-530; (b) C. Zeymer, D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 131-157; (c) K. Chen, F. H. Arnold, *Nat. Catal.* **2020**, *3*, 203-213; (d) D. C. Miller, S. V. Athavale, F. H. Arnold, *Nat. Synth.* **2022**, *1*, 18-23.

<sup>19</sup> F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14420-14426.

<sup>20</sup> (a) A. Romero-Rivera, M. Garcia-Borràs, S. Osuna, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 284-297; (b) S. Osuna, *Comput. Mol. Sci.* **2020**, *11*, e1502.

<sup>21</sup> R. A. Sheldon, D. Brady, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 8032-8052.

## Introducción

implementado en la industria química,<sup>22</sup> siendo hoy en día consideradas herramientas útiles y versátiles para poder funcionalizar y modificar muy diversos tipos de moléculas.<sup>23</sup>

### 0.2.1 Tipos de enzimas y clasificación enzimática

Las enzimas se clasifican en función de las reacciones que catalizan, lo cual ha permitido agruparlas en 6 grandes familias, descubriendo en el año 2018 una séptima clase, como son las translocasas, aunque no han mostrado actividad catalítica alguna, ya que solo transportan moléculas a través de membranas celulares.<sup>24</sup> Cada enzima está designada por un código numérico de cuatro dígitos y precedido de las letras EC, acrónimo de la Comisión Enzimática (Tabla 1):<sup>25</sup>

**Tabla 1.** Clasificación de las enzimas en función de la reacción que catalizan.

Código	Familia	Tipo de reacción
EC 1	Oxidorreductasas	Oxidación, reducción y procesos de oxigenación
EC 2	Transferasas	Transferencia de grupos alquilo, amino, cetona...
EC 3	Hidrolasas	Hidrólisis de esteres, péptidos, glicósidos...
EC 4	Liasas	Adición de moléculas a enlaces C=C, C=O, C=N...
EC 5	Isomerasas	Procesos de isomerización, racemización...
EC 6	Ligasas	Formación de enlaces C-O, C-N, C-S y C-P
EC 7	Translocasas	Transporte de sustancias intermembranas

En esta Tesis Doctoral se han empleado principalmente enzimas pertenecientes al grupo EC 1, oxidorreductasas, en concreto lacasas y alcohol deshidrogenasas (ADHs), y enzimas pertenecientes al grupo EC 2, transferasas, en este caso amino transaminasas (ATAs). La descripción de cada tipo de enzima

<sup>22</sup> (a) B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187-193; (b) J. L. Porter, R. A. Rusli, D. L. Ollis, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 197-203; (c) E. M. M. Abdelraheem, H. Busch, U. Hanefeld, F. Tonin, *React. Chem. Eng.* **2019**, *4*, 1878-1894.

<sup>23</sup> (a) S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 88-119; (b) D. L. Hughes, *Org. Process Res. Dev.* **2022**, *26*, 1878-1899.

<sup>24</sup> (a) S. Balaji, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2021**, 1-24; (b) <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>.

<sup>25</sup> K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry. A textbook*, 7ª Ed. Springer, Berlín (Alemania), **2017**.



empleada se describirá en detalle en las introducciones de los Bloques I y II de esta Tesis Doctoral.

### 0.2.2 Procesos estereoselectivos enzimáticos en síntesis orgánica

La naturaleza y sus catalizadores, las enzimas, han sido responsables de la biosíntesis eficiente y selectiva de todos los compuestos esenciales para la vida durante millones de años. Sin embargo, tradicionalmente la biocatálisis ha sido poco empleada en síntesis orgánica, muy posiblemente por desconocimiento o por carecer los laboratorios más convencionales de determinado equipamiento requerido. Ha sido posiblemente desde el inicio de los años 2000 donde la biocatálisis ha ido ganando mayor número de adeptos hasta convertirse actualmente en una metodología consolidada y recurrentemente empleada.<sup>26</sup> Su elevada selectividad no ha pasado inadvertida para la industria farmacéutica, ya que los enantiómeros de un compuesto bioactivo pueden provocar distintas reacciones y efectos biológicos,<sup>27</sup> por lo que cada día es más necesario el diseño de rutas sintéticas estereopreferentes que permitan obtener la molécula de interés como un solo enantiómero.

Los primeros ejemplos de procesos biocatalíticos estereoselectivos aplicados en síntesis orgánica fueron las resoluciones cinéticas (KRs, *Kinetic Resolutions*).<sup>28</sup> Esta metodología se fundamenta en la distinta velocidad de reacción que presentan los enantiómeros de una mezcla racémica cuando interaccionan con un catalizador quiral. Esto a su vez presenta una limitación, y es que solo es posible obtener un 50% de rendimiento máximo teórico del producto enantiopuro aplicando esta estrategia (Esquema 1, a). Históricamente, para desarrollar estos procesos se han empleado fundamentalmente las lipasas debido a su capacidad para trabajar en disolventes orgánicos, a la gran variedad de sustratos que son capaces de transformar y a la no dependencia de un cofactor para desarrollar su actividad catalítica.<sup>29</sup> Sin

---

<sup>26</sup> (a) C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605; (b) C. M. Heckmann, F. Paradisi, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 6082-6102; (c) C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 55-71.

<sup>27</sup> A. Ballard, S. Narduolo, H. O. Ahmed, N. I. Keimer, N. Assad, D. A. Crosgrave, N. J. Buurma, A. G. Leach, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 3661-3687.

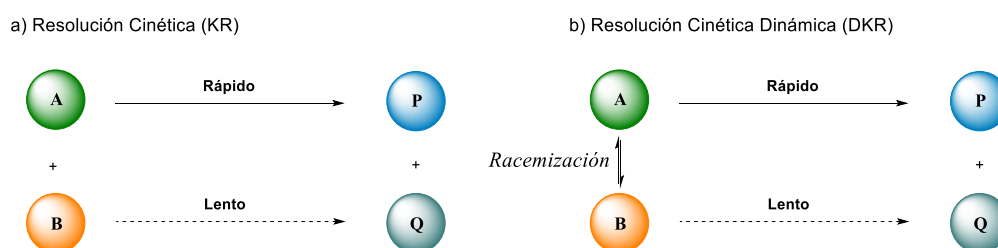
<sup>28</sup> M. Ahmed, T. Kelly, A. Ghanem, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6781-6802.

<sup>29</sup> A. de Miranda, L. S. M. Miranda, R. O. M. A. de Souza, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 372-393.

## Introducción

embargo, también existen varios ejemplos de resoluciones cinéticas catalizadas por otros tipos de enzimas como las ADHs y ATAs, entre otras.<sup>30</sup>

Con el fin de solventar la limitación asociada al máximo rendimiento teórico anteriormente comentado, se desarrollaron las resoluciones cinéticas dinámicas (DKR, Esquema 1, b).<sup>31</sup> En esta estrategia se introduce en el medio de reacción un agente que induzca la racemización de los enantiómeros del sustrato de partida. Con este fin se pueden emplear catalizadores metálicos, enzimas auxiliares, procesos radicalarios o ácido-base utilizando, por ejemplo, resinas de intercambio aniónico.<sup>30</sup>



**Esquema 1.** a) Resolución cinética y b) resolución cinética dinámica, donde A y B son enantiómeros y P el producto (enantioenriquecido) de la reacción.

Sin embargo, la aplicación de la biocatálisis no se ha centrado únicamente en resolver compuestos racémicos, ya sea de manera clásica o dinámica, ya que estas estrategias presentan la necesidad de sintetizar previamente el racemato de un sustrato. Otra estrategia estereoselectiva frecuentemente empleada en biocatálisis y que no presenta la limitación de obtener un 50% de rendimiento máximo teórico es la desimetrización. Este proceso se centra en la eliminación de uno de los elementos de simetría del sustrato,<sup>32</sup> de modo que se pueden obtener moléculas quirales con un rendimiento cuantitativo. Algunos grupos funcionales que presentan elementos de simetría son las cetonas, las iminas, los alquenos o bien formas *meso*, como pueden ser los dioles o diaminas, entre otros. En esta Tesis Doctoral se abordará de forma

<sup>30</sup> S. González-Granda, V. Gotor-Fernández, “Applications of Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution for the Synthesis of Biologically Active Compounds and Natural Products” en *Dynamic Kinetic Asymmetric Transformation (DYKAT) and Dynamic Kinetic Resolution (DKR)*. Science of Synthesis, Weinheim (Alemania), **2022**, cap. 17.

<sup>31</sup> (a) L.-C. Yang, H. Deng, H. Renata, *Org. Process. Res. Dev.* **2022**, *26*, 1925-1943; (b) C. Huang, J. Liu, J. Fang, X. Jia, Z. Zheng, S. You, B. Qin, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 929784.

<sup>32</sup> E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180 (Actualización de la revisión bibliográfica anterior: E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354).

recurrente a la desimetrización de distintas cetonas empleando ADHs o ATAs con el fin de obtener compuestos ópticamente activos.

También es necesario destacar los procesos de desracemización, que jugarán un papel importante en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral, por lo que su explicación y contextualización se muestra en la sección de *Introducción* del primer capítulo.

#### *0.2.2.1 Ejemplos de reacciones catalizadas por enzimas*

El hecho de que existan 6 grandes clases de enzimas con potencial catalítico, y a su vez que estas se subdividan en muy diversos grupos, hace que la biocatálisis ofrezca un amplio abanico de posibilidades sintéticas, entre las que se pueden destacar:<sup>23</sup>

- Hidrólisis de ésteres, epóxidos, nitrilos, amidas, así como los correspondientes procesos reversibles: Estas transformaciones son catalizadas por las hidrolasas, donde el nucleófilo empleado juega un papel fundamental. Por ejemplo, las lipasas pueden catalizar muy diversas reacciones de aminólisis, tiólisis, hidrazinólisis o perhidrólisis de ésteres, empleando respectivamente aminas, tioles, hidracinas o peróxidos.<sup>25</sup>
- Reducción de cetonas o aldehídos a alcoholes: Este tipo de reacciones son catalizadas por las ADHs,<sup>33</sup> pudiendo ocurrir de manera reversible, por lo que también se podría producir la oxidación de alcoholes primarios o secundarios a aldehídos o cetonas, respectivamente. Este tipo de enzimas requiere un cofactor, generalmente NAD(P)H, para ser activas catalíticamente. Sus propiedades serán discutidas en las próximas secciones de esta Tesis Doctoral.
- Reducción de ácidos carboxílicos a aldehídos: Reacciones catalizadas por las ácido carboxílico reductasas (CARs),<sup>34</sup> requieren de la presencia de cofactores como el NAD(P)H y el ATP. Generalmente las reacciones

---

<sup>33</sup> (a) E. Tassano, M. Hall, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 5596-5615; (b) A. A. Koesoema, D. M. Standley, T. Senda, T. Matsuda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 2897-2909; (c) F. Hollmann, D. J. Opperman, C. E. Paul, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 5644-5665.

<sup>34</sup> M. Winkler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *43*, 23-29.

## Introducción

catalizadas por estas enzimas se detienen en este estado intermedio, sin llegarse a observar la formación de los correspondientes alcoholes.

- Reducción de dobles enlaces C–C: Este tipo de reacciones son catalizadas por las alqueno reductasas (*ene-reductases*, EREDs),<sup>35</sup> siendo necesaria la presencia de un grupo electrón atractor conjugado con el alqueno, requiriendo del empleo de cofactores, generalmente FMN y NAD(P)H.
- Oxidación de alcoholes a cetonas/aldehídos y ácidos carboxílicos: Como ya se ha comentado previamente, las ADHs son capaces de catalizar esta transformación,<sup>25,26,33</sup> al igual que las alcohol oxidasas.<sup>36</sup>
- Oxidación de Baeyer-Villiger: Transformaciones catalizadas por las Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMOs),<sup>37</sup> para las que se requiere la presencia de oxígeno molecular y cofactores, generalmente FAD/FMN y NAD(P)H.
- Aminaciones reductivas de cetonas y aldehídos: Este tipo de reacciones son catalizadas por varios tipos de enzimas como las imino reductasas (IREDs),<sup>38</sup> las aminosas reductivas (*reductive aminases*, RedAms),<sup>39</sup> las amino deshidrogenas (AmDHs)<sup>40</sup> y las transaminasas.<sup>41</sup> Todas ellas son capaces de catalizar esta transformación de manera asimétrica y bajo condiciones suaves de reacción utilizando un cofactor. La reactividad y mecanismo de las ATAs serán discutidos en las próximas secciones de esta Tesis Doctoral.

Si bien las enzimas actúan de un modo específico y tienen un gran potencial en síntesis orgánica,<sup>26</sup> estas son capaces de catalizar reacciones distintas a las de su función natural. Este fenómeno se conoce con el nombre de *promiscuidad*

---

<sup>35</sup> C. K. Winkler, K. Faber, M. Hall, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *43*, 97-105.

<sup>36</sup> E. W. Hellemond, N. G. H. Leferink, D. P. H. Heuts, M. W. Fraaije, W. J. H. van Berkel, *Adv. Appl. Microbiol.* **2016**, *60*, 17-54.

<sup>37</sup> M. J. L. J. Fürst, A. Gran-Scheuch, F. S. Aalbers, M. W. Fraaije, *ACS Catal.* **2019**, *12*, 11207-11241.

<sup>38</sup> J. Mangas-Sánchez et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 19-25.

<sup>39</sup> (a) M. Sharma, J. Mangas-Sánchez, N. J. Turner, G. Grogan, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 2011-2025; (b) J. R. Marshall et al. *Nat. Chem.* **2021**, *13*, 140-148.

<sup>40</sup> T. Knaus, W. Böhmer, F. Mutti, *Green Chem.* **2017**, *19*, 453-463.

<sup>41</sup> (a) J. F. Rocha, A. F. Pina, S. F. Sousa, N. M. F. S. A. Cerqueira, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 4864-4876; (b) S. A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C. C. R. Allen, T. S. Moody, B. F. Gilmore, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 349-367.

*catalítica*,<sup>42</sup> y permite ampliar aún más la capacidad sintética de las enzimas. En este aspecto, es conocida la capacidad de las hidrolasas para catalizar reacciones aldólicas, de Henry, condensaciones de Knoevenagel y adiciones de Michael, entre otras.<sup>43</sup> Más recientemente se ha descrito la promiscuidad catalítica de otros tipos de enzimas,<sup>44</sup> por ejemplo, la capacidad de las ATAs para actuar como deshalogenasas,<sup>45</sup> o la capacidad que presentan las EREDs y las ADHs para catalizar procesos SET (*single electron transfer*) bajo irradiación lumínica gracias a la presencia del cofactor NAD(P)H.<sup>46</sup>

#### 0.2.2.2 Formación de enlaces C–C o C–X mediante métodos biocatalíticos

A pesar de la gran variedad de reacciones que son capaces de catalizar las enzimas, la gran mayoría de ellas se centran en las transformaciones de grupos funcionales, salvo algunas excepciones como los ejemplos de promiscuidad catalítica que se han presentado previamente en esta Tesis Doctoral. En cuanto a la formación de enlaces C–C, destaca la actividad catalítica natural de varias enzimas, siendo las más empleadas:<sup>47</sup>

- Liasas:<sup>48</sup> Capaces de catalizar reacciones aldólicas (aldolasas), condensaciones de aciloínas, o la formación de cianohidrinas, entre otras.<sup>49</sup>
- Enzimas dependientes de *S*-adenosil-L-metionina (SAM): Catalizan la transferencia de un grupo metilo electrófilo (Me<sup>+</sup>) mediante una reacción S<sub>N</sub>2, o también pueden actuar mediante mecanismos radicalarios para realizar esta transferencia.<sup>50</sup>

<sup>42</sup> R. B. Leveson-Gower, C. Mayer, G. Roelfes, *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3*, 687-705.

<sup>43</sup> (a) M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, *15*, 743-759; (b) A. Shannon, E. Weerapana, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 115-123; (c) B. P. Dwivedee, S. Soni, M. Sharma, J. Bhaumik, J. K. Laha, U. C. Banerjee, *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 2441-2466.

<sup>44</sup> M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401.

<sup>45</sup> (a) A. Cuetos, M. García-Ramos, E.-M. Fischereder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3144-3147; (b) M. García-Ramos, A. Cuetos, W. Kroutil, G. Grogan, I. Lavandera, *ChemCatChem* **2021**, *13*, 3967-3972.

<sup>46</sup> (a) T. K. Hyster, *Synlett* **2020**, *31*, 248-254; (b) B. A. Sandoval, T. K. Hyster, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 45-51.

<sup>47</sup> K. Fesko, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1248-1272.

<sup>48</sup> M. Brovetto, D. Gamemara, P. S. Méndez, G. A. Seoane, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4346-4403.

<sup>49</sup> N. G. Schmidt, E. Eger, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 4286-4311.

<sup>50</sup> (a) J. B. Broderick, B. R. Duffus, K. S. Duschene, E. M. Shepard, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4229-4317; (b) K. Yokoyama, E. A. Lilla, *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 660-694.

## Introducción

- Peroxidasas y lacasas: Se trata de enzimas capaces de catalizar reacciones de formación de enlaces C–C intermoleculares. Sin embargo, su capacidad para producir estas transformaciones de manera selectiva no fue conocida hasta años recientes.<sup>51</sup>
- Diels-Alderasas: Son enzimas que, como su propio nombre indica, catalizan reacciones de Diels-Alder de manera selectiva,<sup>52</sup> por lo que su interés sintético es muy elevado, ya que esta transformación es una de las reacciones más importante a la hora de sintetizar moléculas que presenten anillos de seis miembros. La primera enzima reportada que ha mostrado esta actividad catalítica fue una enzima artificial,<sup>53</sup> aunque se han encontrado varios biocatalizadores naturales que muestran esta actividad catalítica.<sup>54</sup>
- Halogenasas: Este tipo de enzimas catalizan la reacción de halogenación sobre moléculas aromáticas, aunque existen algunas halogenasas naturales y otras evolucionadas que permiten realizar la reacción de halogenación sobre compuestos alifáticos como derivados de terpenos. Este tipo de biotransformaciones requieren de la presencia de flavina,<sup>55</sup> además de oxígeno molecular y una fuente de halógeno para desempeñar su actividad catalítica.

En los últimos años la capacidad para formar y activar enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo de forma eficiente y selectiva ha sido la gran asignatura pendiente de la biocatálisis, limitada generalmente a los ejemplos que se han mostrado previamente. Sin embargo, el papel que ha jugado la evolución dirigida en este campo ha sido clave para solventar esta limitación, desarrollando nuevas alternativas, e incluso permitiendo dar lugar a reacciones que no ocurren en la naturaleza. En este contexto destaca el papel del citocromo P450.

Se estima que el citocromo P450 es una fuente de más de 12.000 enzimas distintas, responsables de diferentes reacciones de oxidación en la biosíntesis de

---

<sup>51</sup> (a) D. M. Mate, M. Alcalde, *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 1457-1467; (b) Y. Wang, D. Lan, R. Durrani, F. Hollmann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 1-9.

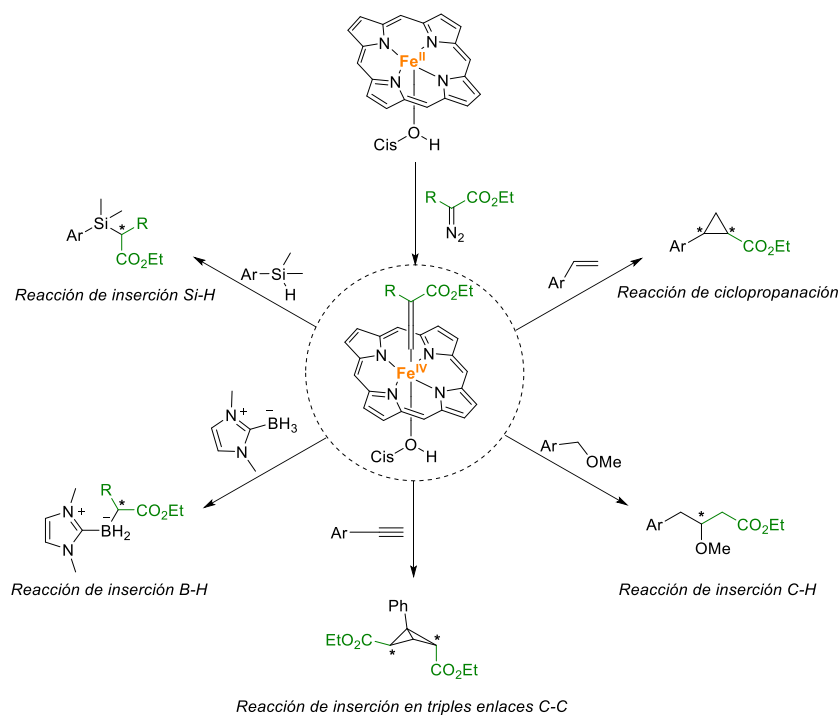
<sup>52</sup> W. Ghattas, J.-P. Mahy, M. Règlie, A. J. Simaan, *ChemBioChem* **2020**, *22*, 443-459.

<sup>53</sup> J. B. Siegel et al. *Science* **2010**, *329*, 309-313.

<sup>54</sup> L. Gao et al. *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 620-628.

<sup>55</sup> C. Crowe, S. Molyneux, S. V. Sharma, Y. Zhang, D. S. Gkotsi, H. Connaris, R. J. M. Goss, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 9443-9481.

diversos productos naturales.<sup>56</sup> La estructura de estos biocatalizadores presenta una metaloporfirina de hierro (grupo hemo) que destaca por su capacidad para catalizar reacciones de oxidación de enlaces C–H selectivas y reacciones de hidroxilación o epoxidación.<sup>57</sup> Gracias a la amplia promiscuidad que presentan, y a la investigación realizada en el área de la evolución dirigida con estos biocatalizadores, se ha logrado encontrar variantes capaces de catalizar reacciones de transferencia de carbenos para promover reacciones de ciclopropanación,<sup>58</sup> inserciones en enlaces C–H,<sup>59</sup> triples enlaces C–C,<sup>60</sup> enlaces Si–H,<sup>61</sup> o B–H (Figura 2).<sup>62</sup>



**Figura 2.** Reacciones de transferencia de carbeno catalizadas por citocromos P450.

<sup>56</sup> D. R. Nelson, *Genomics* **2009**, *4*, 59-65.

<sup>57</sup> R. Fasan, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 647-666.

<sup>58</sup> P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, *339*, 307-310.

<sup>59</sup> R. K. Zhang, K. Chen, X. Huang, L. Wohlschlager, H. Renata, F. H. Arnold, *Nature* **2019**, *565*, 67-72.

<sup>60</sup> K. Chen, X. Huang, S. B. J. Kan, R. J. Zhang, F. H. Arnold, *Science* **2018**, *360*, 71-75.

<sup>61</sup> S. B. J. Kan, R. D. Lewis, K. Chen, F. H. Arnold, *Science* **2016**, *354*, 1048-1051.

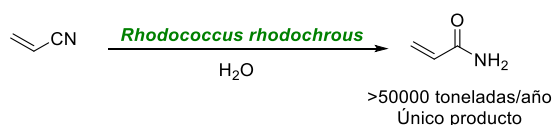
<sup>62</sup> I. Cho, C. K. Prier, Z.-J. Jia, R. K. Zhang, T. Görbe, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 3138-3142.

## Introducción

Recientemente se ha descubierto la posibilidad de catalizar reacciones de transferencia de nitreno, en lugar de carbeno, de manera enzimática. Para ello se ha desarrollado el citocromo P411 gracias a la sustitución de un residuo de aminoácido cisteína, unido al átomo de hierro del grupo hemo del citocromo P450, por uno de serina, un aminoácido que no se encuentra presente en ningún grupo hemo natural.<sup>16c</sup> De esta manera, se han conseguido promover reacciones de aminación mediante transferencias de nitreno.<sup>63</sup>

### 0.2.3 Biocatálisis aplicada a gran escala

Debido al gran número de biotransformaciones existentes hoy en día, cada día más empresas e industrias farmacéuticas incorporan el uso de enzimas a su repertorio sintético.<sup>23a</sup> En este contexto, son destacables los esfuerzos por llevar a cabo reacciones escalables y con una alta productividad, pues en muchos casos las reacciones se desarrollan a muy bajas concentraciones de sustrato. Una de las aplicaciones más destacadas de un biocatalizador a escala industrial es la producción de acrilamida mediante la reacción de monohidratación del acrilonitrilo catalizada por la nitrilo hidratasa de *Rhodococcus rhodochrous* (Esquema 2),<sup>64</sup> siendo posible la producción de acrilamida a una escala superior a las 50.000 toneladas por año. Se trata de un proceso que transcurre de manera quimioselectiva, obteniéndose tan solo como producto de reacción la amida deseada, y sin observarse la formación del correspondiente ácido carboxílico que se obtendría si el organismo tuviera carácter de amidasa o nitrilasa en lugar de exclusivamente de nitrilo hidratasa.



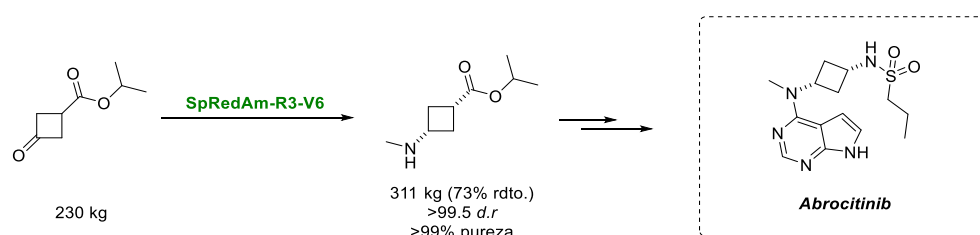
**Esquema 2.** Obtención industrial de acrilamida empleando una nitrilo hidratasa.

<sup>63</sup> (a) C. K. Prier, R. K. Zhang, F. H. Arnold, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 629-634; (b) C. Deane, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 817; (c) B. K. Mai, N. M. Neris, Y. Yang, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 11215-11225; (d) Z. Liu, Z.-Y. Qin, L. Zhu, S. V. Athavale, A. Sengupta, Z.-J. Jia, M. Garcia-Borràs, K. N. Houk, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 80-85.

<sup>64</sup> (a) C. Y. Lee, H. N. Chang, *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 23-28; (b) H. Yamada, M. Kobayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 1391-1400.



Otro ejemplo más reciente del empleo de un biocatalizador a nivel industrial es la producción del *Abrocitinib*, un inhibidor de la quinasa Janus JAK1.<sup>65</sup> Este fármaco es producido por la multinacional farmacéutica *Pzifer*, y es empleado para tratar la dermatitis atópica y la artritis reumatoide.<sup>66</sup> La enzima clave en este proceso es una aminasa reductiva que, tras varias rondas de evolución dirigida, permitió sintetizar el 3-(metilamino)-ciclobutano-1-carboxilato de isopropilo (Esquema 3), un precursor del *Abrocitinib*. Este se aisló exclusivamente como el diastereoisómero *cis*, y la transformación se realizó a una escala destacable de 230 kg. Esta aproximación enzimática ha supuesto una mejora considerable respecto a la reacción química de aminación reductiva empleada previamente para su síntesis. En ella se generaba el intermedio deseado como una mezcla 80:20 de los diastereoisómeros *cis:trans*, siendo necesarias sucesivas cristalizaciones para obtener el diastereoisómero deseado de manera pura.



**Esquema 3.** Síntesis enzimática del precursor del abrocitinib mediante el uso de una aminasa reductiva.

### 0.3 Catálisis Metálica

La catálisis metálica se fundamenta en el empleo de metales o complejos metálicos para dar lugar a distintos tipos de reacciones químicas. En los últimos años ha sido ampliamente empleada en síntesis orgánica,<sup>67</sup> incluyendo también su aplicación a nivel industrial.<sup>68</sup> Especialmente interesante es su papel para catalizar reacciones que son difíciles de llevar a cabo mediante otras metodologías o que no existen en la naturaleza. Sin duda alguna, la habilidad de muy diversas especies

<sup>65</sup> R. Kumar et al. *Nat. Catal.* **2021**, *4*, 775-782.

<sup>66</sup> M. L. Vazquez et al. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1130-1152.

<sup>67</sup> M. Beller, C. Bolm, *Transition metals for organic synthesis: Building blocks and fine chemicals*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2004**.

<sup>68</sup> G. P. Chiusoli, P. M. Maitlis, *Metal-catalysis in industrial organic processes*. RSC Publishing, Cambridge (Reino Unido), **2007**.

## Introducción

metálicas para formar enlaces C–C o C–X ha llevado esta disciplina a la plenitud, destacando el desarrollo de reacciones de acoplamiento cruzado,<sup>69</sup> metátesis de olefinas,<sup>70</sup> y activación de enlaces C–H.<sup>71</sup>

### 0.3.1 Catálisis de oro

Dentro de la catálisis metálica destaca el empleo de catalizadores de paladio para llevar a cabo distintos tipos de reacciones,<sup>72</sup> sin embargo, en las últimas décadas la catálisis de oro se ha consolidado como una metodología versátil y recurrentemente empleada. El oro (Au, del latín *aurum*) es el elemento químico del grupo 11 y del periodo 6 de la tabla periódica con número atómico 79 ([Xe] 4f<sup>14</sup> 5d<sup>10</sup> 6s<sup>1</sup>). Debido a su posición en la misma es considerado un metal de transición, sin embargo, posee una reactividad especial debido a los efectos relativistas que presenta.<sup>73</sup> Al aplicar la teoría de la relatividad a los elementos de la tabla periódica se pueden observar varios fenómenos:

- Cuando la velocidad de los electrones se aproxima a la velocidad de la luz, la masa corregida aumenta, disminuyendo así el radio de Bohr, por lo que se experimenta la contracción de los orbitales *s* y *p*, aumentando de esta manera el potencial de ionización y la electronegatividad de los elementos que experimentan este efecto.
- Los electrones presentes en los orbitales externos *d* y *f* se encuentran más protegidos que los que se encuentran en los orbitales *s* y *p*, que se encuentran contraídos y por tanto más cercanos al núcleo. Por ello los electrones que ocupan los orbitales *d* y *f* experimentan una menor atracción por parte del núcleo.

---

<sup>69</sup> C. C. J. Seechurn, M. O. Kitching, T. J. Colacot, V. Snieckus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5062-5085.

<sup>70</sup> O. M. Ogba, N. C. Warner, D. J. O’Leary, R. H. Grubbs, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 4510-4544.

<sup>71</sup> (a) T. Gensch, M. N. Hopkinson, F. Glorius, J. Wencel-Delord, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2900-2936; (b) P. Gandeepan, T. Müller, D. Zell, G. Cera, S. Warratz, L. Ackermann, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 2192-2452.

<sup>72</sup> J. Tsuji, *Palladium reagents and catalysts: New perspectives for the 21<sup>st</sup> century*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2004**.

<sup>73</sup> (a) P. Pykkö, *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 563-594; (b) N. Bartlett, *Gold Bull.* **1998**, *31*, 22-25.

- El desdoblamiento de las bandas en el espectro del átomo de hidrógeno es debido al acoplamiento spin-orbita.

Estos efectos son mucho más pronunciados en el caso del oro que en otros elementos de su mismo grupo como la plata o el cobre, de hecho, el oro es el elemento metálico más electronegativo de la tabla periódica (2.54 en la escala de Pauling). Se cree que sus propiedades únicas son debidas al solapamiento entre los orbitales de la capa de valencia  $6s$ , que se encuentran contraídos, y los  $5d$ .<sup>74</sup> Este efecto, además, es responsable del fenómeno conocido como *aurofilia*,<sup>75</sup> que es la tendencia que presentan los átomos de oro para formar interacciones estables Au–Au.

Otro efecto a tener en cuenta en cuanto a las propiedades que presentan los complejos de oro es la baja energía del LUMO,<sup>76</sup> que se encuentra formado principalmente por los orbitales  $6s$  y  $6p$ . Este hecho hace que las especies de oro sean consideradas como ácidos de Lewis blandos o  $\pi$ -ácidos, ideales para activar sistemas  $\pi$  C–C.<sup>77</sup> En este aspecto, se ha estudiado la interacción de las especies catiónicas metálicas del grupo 11 con alquenos y se ha observado que tiene lugar a través de una interacción  $\sigma$ -dadora  $\pi$ -aceptora, produciendo una elongación del enlace C–C al disminuir la densidad electrónica del alqueno en su orbital  $\sigma$  enlazante y aumentando en el  $\sigma$  antienlazante. Este efecto es más notorio en las especies de  $\text{Au}^+$  que en sus homologas de  $\text{Ag}^+$  o  $\text{Cu}^+$ .<sup>78</sup>

### 0.3.1.1 Estados de oxidación del oro

En cuanto a sus estados de oxidación, el oro puede presentar los estados 0, +1 y +3. Aunque las especies de Au(0), especialmente las nanopartículas, muestran actividad catalítica, generalmente requieren de un co-catalizador ácido y elevadas temperaturas. Por ello, en el campo de la catálisis, los dos estados de oxidación más comunes de las especies catalíticas son el Au(I) y el Au(III):

---

<sup>74</sup> J. Autschbach, S. Sekierski, M. Seth, P. Schwerdtfeger, W. H. E. Schwarz, *Comput. Chem.* **2002**, *23*, 804-813.

<sup>75</sup> F. Scherbaum, A. Grohmann, B. Huber, C. Krüger, H. Schmidbaur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1544-1546.

<sup>76</sup> D. J. Gorin, F. D. Toste, *Nature* **2007**, *446*, 395-403.

<sup>77</sup> (a) A. S. K. Hashmi, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3180-3211; (b) A. Fürstner, P. W. Davies, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3410-3449.

<sup>78</sup> M. S. Nechaev, V. M. Rayón, G. J. Frenking, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3134-3142.

## Introducción

- Au(I): Se trata de compuestos  $d^{10}$  que presentan una geometría lineal de 14 electrones, con dos huecos de coordinación. Presentan baja oxofilia,<sup>79</sup> y debido a los factores estéricos asociados a su geometría lineal, las especies de Au(I) tienen tendencia a interactuar con otros centros de Au(I) o metales pesados. En medio acuoso y en ausencia de agentes estabilizantes, las especies de Au(I) desproporcionan en Au(III) y Au(0).
- Au(III): Compuestos de tipo  $d^8$  que presentan una geometría plano cuadrada. En estos compuestos los efectos relativistas son mucho menos acusados que en el estado de oxidación +1,<sup>80</sup> y el fenómeno de *aurofilia* no se presenta o es muy débil.<sup>81</sup> Presentan un mayor carácter de ácido de Lewis que sus análogos de Au(I).

A pesar de sus diferencias, muchas veces las especies de Au(III) se emplean como precatalizadores que se reducen en el mismo medio de reacción para generar especies de Au(I).<sup>82</sup> Además, la desestabilización de los orbitales  $5d$  explica la fácil formación y particular estabilidad de las especies de Au(III).<sup>83</sup>

A lo largo de esta Tesis Doctoral se emplean fundamentalmente catalizadores de Au(I) por lo que a continuación se discute más en profundidad su estructura y reactividad.

### 0.3.1.2 Estructura de los catalizadores de Au(I)

Como se ha comentado en la anterior sección, las especies de Au(I) presentan una geometría lineal con dos huecos de coordinación (Figura 3), sin embargo, también se han descrito diversos complejos del Au(I) que presentan mayores números de coordinación.<sup>84</sup>

---

<sup>79</sup> Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7817-7831.

<sup>80</sup> P. Schwerdtfeger, P. D. W. Boyd, S. Brienne, A. K. Burrell, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3411-3422.

<sup>81</sup> A. N. Chernyshev, M. V. Chernysheva, P. Hirva, V. Y. Kukushkin, M. Haukka, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 14523-14531.

<sup>82</sup> B. Ranieri, I. Escofet, A. M. Echavarren, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7103-7118.

<sup>83</sup> M. C. Gimeno, *The Chemistry of Gold en Modern Supramolecular Gold Chemistry: Gold-Metal Interactions and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2004**, cap. 1.

<sup>84</sup> (a) M. C. Gimeno, A. Laguna, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 511-522; (b) C. Kaub, T. Augenstein, T. O. Bauer, E. Rothe, L. Esmezjan, V. Schünemann, P. W. Roesky, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 4491-4499; (c) L. M. C. Luong, M. M. Aristov, A. V. Adams, D. T. Walters, J. F. Berry, M. M. Olmstead, A. L. Balch,



**Figura 3.** Geometría lineal de los catalizadores de Au(I), siendo X un anión coordinante y L' un ligando neutro.

Debido a la geometría lineal que presentan las especies de Au(I), este tipo de catalizadores presentan desventajas a la hora de inducir estereoselectividad en las reacciones que catalizan. Generalmente, el desarrollo de un proceso asimétrico catalizado por especies de Au(I) requiere una extensa optimización y diseño de los ligandos empleados, sin embargo, en los últimos años se han descrito varios ejemplos en los que se abordan transformaciones asimétricas con éxito.<sup>85</sup>

A pesar de que especies sencillas de Au(I), como el cloruro de oro(I), poseen actividad catalítica y han sido empleadas en diversas reacciones,<sup>86</sup> lo más frecuente ha sido el uso de catalizadores de Au(I) que presenten ligandos de tipo fosfina, fosfito o carbenos N-heterocíclico (NHC) para llevar a cabo procesos catalíticos.<sup>87</sup> La influencia de los ligandos del catalizador se discutirá en la siguiente sección de esta Tesis Doctoral.

Por otro lado, las especies de Au(I) son de naturaleza catiónica, por lo que solo se presentan como especies neutras cuando se encuentran unidas a aniones coordinantes. En la catálisis de oro(I) la influencia del contraión empleado es igual de importante que la del ligando.<sup>88</sup>

### 0.3.1.3 Ligandos empleados en catálisis de Au(I)

La reactividad de distintos catalizadores metálicos puede ser modulada según el ligando que se emplee, pudiéndose de esta forma alterar de manera significativa el comportamiento químico de los catalizadores. Tanto los factores

*Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 4109-4117; (d) R. P. Herrera, M. C. Gimeno, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 8311-8363.

<sup>85</sup> (a) W. Zi, F. D. Toste, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4567-4589; (b) J.-J. Jiang, M.-K. Wong, *Chem. Asian J.* **2021**, *16*, 364-377.

<sup>86</sup> (a) S. Biswas, C. Dahlstrand, R. A. Watile, M. Kalek, F. Himo, J. S. M. Samec, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17939-17950; (b) A. K. Das, S. Park, S. Muthaiah, S. H. Hong, *Synlett* **2015**, *26*, 2517-2520.

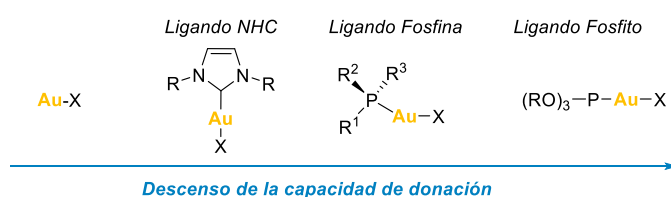
<sup>87</sup> A. Collado, D. J. Nelson, S. P. Nolan, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 8559-8612.

<sup>88</sup> Z. Lu, T. Li, S. R. Mudshinge, B. Xu, G. B. Hammond, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 8452-8477.

## Introducción

electrónicos como estéricos juegan un papel fundamental a la hora de modificar el comportamiento de estas especies.

Como se ha indicado previamente los ligandos de tipo fosfina, fosfito y carbeno N-heterocíclico son los ligandos más frecuentemente empleados en catálisis de Au(I) y todos ellos forman enlaces fuertes M–ligando, siendo esta una unión no lábil. Atendiendo a sus factores electrónicos (Figura 4), las fosfinas son consideradas ligandos  $\sigma$ -dadores  $\pi$ -aceptores, mientras que los ligandos NHCs son  $\sigma$ -dadores  $\pi$ -dadores  $\pi$ -aceptores.<sup>89</sup> De esta manera, los ligandos de tipo fosfina que presentan sustituyentes y grupos dadores de densidad electrónica y los NHC, se consideran ligandos ricos en densidad electrónica, mientras que los fosfitos y las fosfinas con grupos electrón atractores, son ligandos electrónicamente pobres que retiran densidad electrónica del centro metálico.<sup>90</sup>



**Figura 4.** Descenso de la capacidad de donación de los catalizadores de Au(I) en función de los ligandos que presenten.

En cuanto a los factores estéricos, estos son resultado de las interacciones, generalmente no enlazantes, entre distintas partes de la molécula. Ambos efectos no se pueden entender por separado ya que cambios en uno de ellos influyen en el otro, por lo que se han descrito parámetros, como el parámetro electrónico de Tolman (TEP), y el ángulo de Tolman ( $\Theta$ ) para determinar su influencia.<sup>89</sup> Sin embargo, en el caso de los ligandos NHCs, no es correcto aplicar el ángulo de Tolman para determinar su efecto estérico ya que este término fue acuñado para derivados de ligandos de fósforo. Por ello, particularmente para los ligandos NHCs, aunque también es aplicable a otros tipos de ligandos incluidos los de tipo fosfina, se describió el parámetro conocido como porcentaje de volumen enterrado ( $\%V_{bur}$ ),<sup>91</sup>

<sup>89</sup> M. N. Hopkinson, C. Richter, M. Schedler, F. Glorius, *Nature* **2014**, *510*, 485-496.

<sup>90</sup> C. A. Tolman, *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 313-348.

<sup>91</sup> (a) A. C. Hilier, W. J. Sommer, B. S. Yong, J. L. Petersen, L. Carvallo, S. P. Nolan, *Organometallics* **2003**, *22*, 4322-4326; (b) H. Clavier, S. P. Nolan, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 841-861.

que se define como el porcentaje del volumen total de una esfera ocupada por un ligando unido a un centro metálico a una distancia de 2.0 Å.

A lo largo de esta Tesis Doctoral los catalizadores de Au(I) empleados han sido los que presentan ligandos de naturaleza NHC. Este tipo de ligando fue descubierto por Arduengo en 1991,<sup>92</sup> y desde ese momento se ha convertido en uno de los más estudiados para el desarrollo de catalizadores metálicos de distinta naturaleza,<sup>89,93</sup> destacando a su vez su empleo como organocatalizadores,<sup>94</sup> y recientemente su combinación con distintas reacciones fotocatalíticas.<sup>95</sup> Algunas de las características que reúnen estos tipos de ligandos son:<sup>96</sup>

- Exhiben una fuerte capacidad  $\sigma$ -dadora, especialmente comparado con los ligandos de tipo fosfina.
- Forman un enlace fuerte metal-carbeno con metales blandos. Esta característica les hace ligandos especialmente estables, incluso a elevadas temperaturas, ya que se evita la descomposición del catalizador.
- Suelen ser ligandos muy voluminosos y con amplia variedad estructural. Se han descrito un gran número de ligandos NHC en los que se ha variado tanto el tamaño del anillo como los sustituyentes presentes en él y en los átomos de nitrógeno que poseen. Los más empleados son aquellos que presentan un anillo de cinco miembros, ya que la presencia y cercanía de los átomos de nitrógeno con el carbono carbénico le confieren una estabilidad elevada debido a la retirada de densidad electrónica  $\sigma$  y a la donación vía  $\pi$  a dicho carbono.

Todas estas propiedades les hacen unos ligandos muy versátiles y con una amplia aplicabilidad en catálisis metálica.

---

<sup>92</sup> A. J. Arduengo, R. L. Harlow, M. Kline, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 363-365.

<sup>93</sup> A. Doddi, M. Peters, M. Tamm, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 6994-7112.

<sup>94</sup> A. T. Biju, *N-Heterocyclic Carbenes in Organocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2018**.

<sup>95</sup> J. Liu, X.-N. Xing, J.-H. Huang, L.-Q. Lu, W.-J. Xiao, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 10605-10613.

<sup>96</sup> X.-T. Tang, F. Yang, T.-T. Zhang, Y.-F. Liu, S.-Y. Liu, T.-F. Su, D.-C. Lv, W.-B. Shen, *Catalysts* **2020**, *10*, 350.

## Introducción

### 0.3.1.4 Efecto del contraíón en la catálisis de Au(I)

Al igual que los ligandos, el contraíón empleado juega un papel clave en el desarrollo del ciclo catalítico de un proceso promovido por una especie de Au(I).<sup>88</sup> La aproximación inicial más empleada se centra en añadir un precatalizador, generalmente una especie del tipo L-Au-X, donde X suele ser un átomo de cloro, o un grupo hidroxilo, y generar *in situ* el verdadero catalizador, mediante una reacción de intercambio aniónico o una activación.

Para activar complejos neutros de tipo L-Au-Cl es frecuente el empleo de sales de plata de tipo AgX, siendo X el contraíón deseado para realizar la reacción catalítica. Al emplear estas sales de plata, se produce una reacción de intercambio en la que se genera el verdadero catalizador de la reacción, y AgCl, que precipita en el medio de reacción cuando se emplean disolventes orgánicos. Sin embargo, esta estrategia presenta inconvenientes ya que se ha observado la formación de intermedios no activos Au-Ag<sup>97</sup> y Au-Ag-Au,<sup>98</sup> además de descubrirse que tanto el orden de adición del precatalizador y de la sal de plata,<sup>99</sup> como la mera presencia de la especie de plata pueden influir en el rendimiento de la reacción.<sup>100</sup>

Alternativamente al uso de sales de plata se han empleado ácidos de Brønsted para activar precatalizadores del tipo L-Au-X, donde X es un grupo hidroxilo o metilo.<sup>101</sup> Cuando no se emplea la estrategia de añadir un precatalizador al medio de reacción, los catalizadores más frecuentes son aquellos que presentan contraiones del tipo OTf<sup>-</sup>, SbF<sub>6</sub><sup>-</sup> y NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>, debido a su estabilidad y precio asequible.<sup>88</sup>

La influencia del contraíón en la reacción se encuentra íntimamente ligada a la naturaleza del disolvente empleado en la reacción, ya que cuando se utilizan disolventes con grupos aromáticos o halogenados con baja constante dieléctrica, el catalizador se encuentra como un par iónico de contacto,<sup>102</sup> por lo que tiene mayor

<sup>97</sup> D. Weber, M. R. Gagné, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4962-4965.

<sup>98</sup> Y. Zhu, C. S. Day, L. Zhang, K. J. Hauser, A. C. Jones, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 12264-12271.

<sup>99</sup> A. Homs, I. Escofet, A. M. Echavarren, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5782-5785.

<sup>100</sup> D. Wang et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9012-9019.

<sup>101</sup> (a) E. Mizushima, T. Hayashi, M. Tanaka, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3349-3352; (b) A. Gómez-Suárez, R. S. Ramón, A. M. Z. Slawin, S. P. Nolan, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 5461-5463; (c) N. V. Tzouras, M. Saab, W. Janssens, T. Cauwenbergh, K. V. Hecke, F. Nahra, S. P. Nolan, *Chem. Eur. J.* **2020**, *24*, 5541-5551.

<sup>102</sup> (a) A. Macchioni, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2039-2074; (b) D. Zuccaccia, L. Belpassi, F. Tarantelli, A. Macchioni, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3170-3171.



influencia en la reacción, llegando incluso a influir en la reactividad y en la quimio- o regioselectividad del proceso. Sin embargo, cuando se emplean disolventes polares con elevada constante dieléctrica, la especie catiónica de Au(I) se encuentra altamente solvatada,<sup>103</sup> por lo que el contraión se dispone relativamente alejado y tiene una menor influencia en la reacción.

Por otro lado, también se pueden añadir aditivos al medio de reacción para aumentar la eficiencia o la selectividad de los procesos catalizados por especies de Au(I).<sup>88</sup>

#### 0.3.1.5 Activación carbofílica catalizada por complejos de oro

La transformación más común y por la que destaca la catálisis de oro es la activación de enlaces múltiples C-C, haciéndolos adecuados para un posterior ataque de un nucleófilo. En el momento en el que se coordina un sistema insaturado como un alqueno o un alquino a un complejo catiónico de oro, se produce una disminución de la densidad de carga  $\pi$  de este sistema a través de una interacción  $\sigma$ -dadora  $\pi$ -aceptora del catalizador con el sistema insaturado. Gracias a esta activación estos sistemas insaturados son más proclives a ser atacados por nucleófilos.<sup>104</sup>

El mecanismo de estas reacciones transcurre en tres etapas (Esquema 4).<sup>105</sup> En primer lugar, se produce la coordinación del sistema insaturado al catalizador de oro, para posteriormente producirse la activación de este mediante una interacción  $\sigma$ -dadora  $\pi$ -aceptora. Esta primera etapa se conoce como activación electrófila. Posteriormente, se produce el ataque de un nucleófilo al sistema activado, transcurriendo generalmente de manera *anti* con respecto al catalizador de oro. Sin embargo, en el caso específico de derivados de norborneno como ligandos la adición del nucleófilo es de naturaleza *syn*.<sup>106</sup> Además, salvo algunas excepciones que se comentarán más adelante en esta Tesis Doctoral, la adición del nucleófilo al sistema insaturado activado transcurre con una regioquímica de tipo Markovnikov. Una vez que el nucleófilo ha atacado a la especie activada se genera un intermedio *trans*-alquenoil oro, en el caso de los alquinos, o *trans*-alquil oro, si se emplean alquenos.

<sup>103</sup> Y. Marcus, G. Hefter, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4585-4621.

<sup>104</sup> (a) R. Dorel, A. M. Echavarren, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 9028-9072; (b) H. Huang, Y. Zhou, H. Liu, *Belstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 897-936

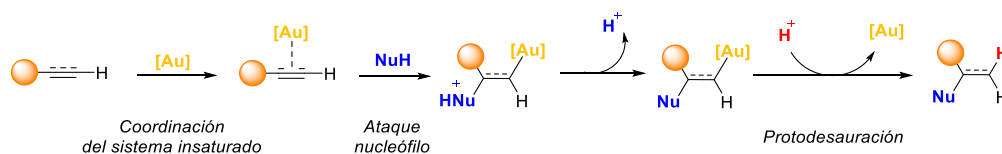
<sup>105</sup> A. S. K. Hashmi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5232-5241.

<sup>106</sup> M. A. Cinellu, G. Minghetti, F. Cocco, S. Stoccoro, A. Zucca, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6892-6895.

## Introducción

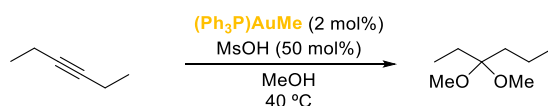
Finalmente, este intermedio reacciona con un electrófilo, generalmente un protón, para producir la reacción de protodesauración, liberando el producto al medio de reacción y completándose el ciclo catalítico.

Hay que destacar que, durante esta última etapa, una parte del catalizador se desactiva ya que se suelen producir reacciones de reducción de la especie catiónica para generar compuestos de Au(0) así como especies dicoordinadas  $AuL_2^+$ , en las que el centro metálico se encuentra coordinado a dos ligandos no lábiles, por lo que carece de actividad catalítica.<sup>107</sup> También es necesario tener en cuenta que los nucleófilos empleados pueden actuar como bases de Lewis que pueden competir con el sistema insaturado para coordinarse al catalizador de Au(I), provocando su inactivación.



**Esquema 4.** Adición de un nucleófilo a un sistema insaturado activado por un catalizador de oro.

El primer ejemplo descrito de activación de un alquino por parte de un catalizador catiónico de Au(I), y posterior ataque nucleófilo de un alcohol, fue propuesto en 1998 por Teles y colaboradores (Esquema 5),<sup>108</sup> y desde ese momento se han descrito una gran variedad de ejemplos de esta reacción que han sido recogidas en varias revisiones bibliográficas.<sup>77</sup>



**Esquema 5.** Primer ejemplo de activación de un alquino y posterior ataque nucleófilo empleando un catalizador catiónico de Au(I).

Además del empleo de nucleófilos oxigenados, como alcoholes, agua, o carbonilos, para realizar el ataque nucleófilo sobre alquinos activados, también

<sup>107</sup> W. Wang, G. B. Hammond, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5697-5705.

<sup>108</sup> J. H. Teles, S. Brode, M. Chabanas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1415-1418.

existen múltiples ejemplos de adición de nucleófilos nitrogenados, como aminas,<sup>101a,109</sup> azidas,<sup>110</sup> carbamatos,<sup>111</sup> o ureas,<sup>112</sup> nucleófilos derivados de azufre,<sup>113</sup> e incluso se han descrito adiciones de boronatos a alquinos.<sup>114</sup> Este tipo de reacciones se pueden producir tanto de manera intra- como intermolecular, siendo particularmente destacables las aproximaciones intramoleculares ya que permiten la síntesis sencilla de heterociclos.

Además, también se han empleado alquenos como nucleófilos, tanto de manera inter- como intramolecular. Así, destacan las reacciones de cicloisomerización de 1,*n*-eninos,<sup>104a,115</sup> que permiten acceder a compuestos de elevada complejidad molecular de manera sencilla. Este tipo de transformaciones catalizadas por especies de Au(I) transcurren por mecanismos distintos respecto a otros metales de transición,<sup>116</sup> debido a la geometría lineal que presentan y a la dificultad que presentan estos catalizadores para experimentar reacciones de adición oxidante.

Por otro lado, no solo los alquinos son capaces de ser activados por complejos de Au(I), ya que existen múltiples ejemplos de la activación de alenos, alenamidas e inamidas, entre otros.<sup>117</sup> Menos frecuentes son las activaciones de

<sup>109</sup> (a) Y. Fukuda, K. Utimoto, H. Nozaki, *Heterocycles* **1987**, *25*, 297-300; (b) C. Michon, J. Gilbert, X. Trivelli, F. Nahra, C. S. J. Cazin, F. Agbossou-Niedercorn, S. P. Nolan, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 3805-3811; (c) V. Laserna, M. J. Porter, T. D. Sheppard, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 11391-11406; (d) R. Vanjari, D. Panda, S. Mandal, G. B. Vamisetti, A. Brik, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 4966-4976.

<sup>110</sup> (a) N. Li, X. L. Lian, Y. H. Li, T. Y. Wang, Z. Y. Han, L. Zhang, L. Z. Gong, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4178-4181; (b) H. Su, M. Bao, C. Pei, W. Hu, L. Qiu, X. Xu, *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 2404-2409.

<sup>111</sup> T. Enomoto, A. L. Girard, Y. Yasui, Y. Takemoto, *J. Org. Chem.* **2009**, *23*, 9158-9164.

<sup>112</sup> (a) H. Li, F. Song, R. A. Widenhoefer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 955-962; (b) A. Gimeno, C. B. Cuenca, M. Medio-Simón, G. Asensio, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 229-236.

<sup>113</sup> (a) I. Nakamura, T. Sato, Y. Yamamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *118*, 4585-4587; (b) I. Nakamura, T. Sato, M. Terada, Y. Yamamoto, *Org. Lett.* **2007**, *20*, 4081-4083.

<sup>114</sup> (a) T. D. Sheppard, *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 2431-2441; (b) J. J. Hirner, D. J. Faizi, S. A. Blum, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4740-4745.

<sup>115</sup> (a) E. Jiménez-Nuñez, A. M. Echavarren, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3326-3350; (b) M. Marín-Luna, O. N. Naza, C. S. López, *Front. Chem.* **2019**, *7*, 296.

<sup>116</sup> (a) A. Marinetti, H. Jullien, A. Voituriez, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4884-4908; (b) C. I. Stathakis, P. L. Gkizis, A. L. Zografos, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1093-1117; (c) Y. Hu, M. Bai, Y. Yang, Q. Zhou, *Org. Chem. Front.* **2017**, *4*, 2256-2275.

<sup>117</sup> D. Campeau, D. F. L. Rayo, A. Mansour, K. Muratov, F. Gagosz, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 8756-8867.

## Introducción

olefinas empleando este tipo de catalizadores, aunque se han descrito algunos ejemplos en la bibliografía.<sup>118</sup>

A pesar de que este tipo de reacciones de activación carbofilica han sido las más estudiadas, las especies de Au(I) también son capaces de catalizar reacciones de activación de enlaces C–H,<sup>119</sup> cicloadiciones,<sup>120</sup> reacciones de acoplamiento cruzado,<sup>121</sup> y la generación de carbenos de oro,<sup>122</sup> entre otras.

## 0.4 Procesos multicatalíticos: Cascadas y aproximaciones secuenciales

Tradicionalmente las rutas sintéticas para la valorización de un determinado producto de partida se han realizado por pasos (*stepwise*), es decir, llevando a cabo una reacción, aislando el producto intermedio, y posteriormente, realizando las reacciones necesarias con sus correspondientes etapas de aislamiento, hasta alcanzar el producto deseado (Figura 5). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado y estudiado procesos que consisten en una secuencia de reacciones producidas en un mismo recipiente de reacción (*one-pot*) utilizando además varios catalizadores (procesos multicatalíticos). Este tipo de procesos concurrentes son de gran interés y utilidad sintética ya que evitan la purificación de los intermedios de reacción, permitiendo de esta manera un ahorro de tiempo y dinero, así como un incremento en el rendimiento de estas rutas es más elevado. Además, permiten que compuestos inestables sean directamente consumidos en el siguiente paso del proceso al existir durante menos tiempo en el medio de reacción.<sup>123</sup>

---

<sup>118</sup> (a) C.-G. Yang, C. He, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6966-6967; (b) M. Chiarucci, M. Bandini, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2586-2614; (c) Y. Zhu, W. Zhou, E. M. Petryna, B. R. Rogers, C. S. Day, A. C. Jones, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 7357-7362.

<sup>119</sup> G. Meera, K. R. Rohit, G. S. S. Treasa, G. Anilkumar, *Asian J. Org. Chem.* **2020**, *9*, 114-162.

<sup>120</sup> F. López, J. L. Mascareñas, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1075-1094.

<sup>121</sup> (a) A. Nijamudheen, A. Datta, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 1442-1487; (b) R. A. Dayle, A. S. Morrenzin, S. R. Neufeldt, J. J. Topczewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 13210-13218.

<sup>122</sup> R. J. Harris, A. Widenhoefer, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4533-4551.

<sup>123</sup> (a) W. Kroutil, M. Rueping, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2086-2087; (b) J. J. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270-358.

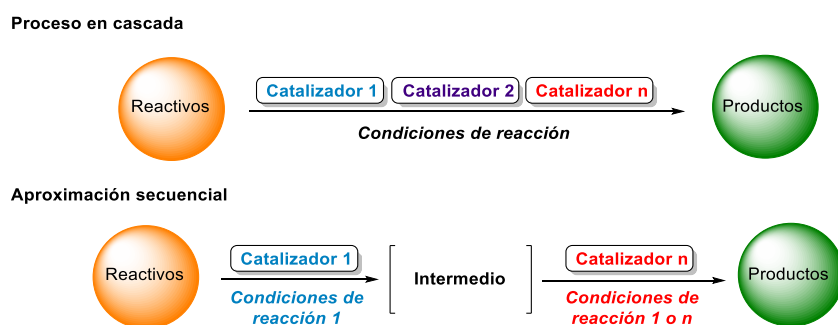


**Figura 5.** Representación esquemática de un proceso por pasos (stepwise).

Estas metodologías se pueden clasificar en función de su diseño y funcionalidad, de modo que existen distintos tipos de procesos, aunque sin duda alguna, los más interesantes desde un punto de vista sintético son los lineales, ya que un reactivo se convierte en el producto deseado a través de una secuencia consecutiva de reacciones, de modo que el producto de una reacción es el reactivo de la siguiente. Dentro de las aproximaciones concurrentes destacan los procesos en cascada y las aproximaciones secuenciales (Esquema 6):

- Procesos en cascada: En este tipo de sistemas todos los reactivos y catalizadores involucrados en la secuencia sintética son añadidos desde el inicio al medio de reacción, y las condiciones de reacción permanecen invariables a lo largo del tiempo. En este tipo de estrategias los intermedios se consumen a medida que se van generando, por lo que estas especies intermedias no se aíslan. Este tipo de aproximaciones también son conocidas como procesos tándem.
- Aproximación secuencial: Son procesos en los que los catalizadores o reactivos se van añadiendo sucesivamente al medio de reacción, y/o las condiciones de reacción varían a lo largo de los mismos. En este tipo de aproximaciones los intermedios de reacción podrían ser aislados, aunque este no es el objetivo primordial. Se emplean principalmente cuando el desarrollo simultáneo de dos etapas es incompatible, o bien si se busca minimizar la formación de productos secundarios en determinadas condiciones de reacción.

## Introducción



**Esquema 6.** Esquema general de un proceso multicatalítico en cascada y de una aproximación secuencial.

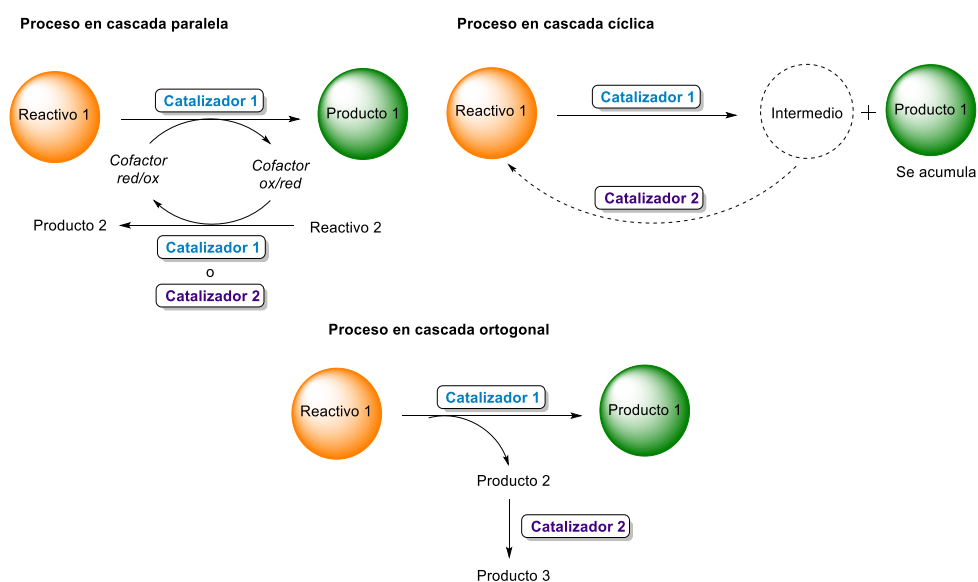
Además de los procesos en cascada lineal, los otros tipos de procesos en cascada que existen son (Esquema 7):

- Cascadas paralelas: En las cuales ocurren dos reacciones a la vez, y se encuentran conectadas por la acción de un compuesto, por ejemplo, un cofactor.<sup>124</sup>
- Cascadas cíclicas: Empleadas especialmente en procesos de desracemización o estereoinversión, principalmente descritas para la síntesis de alcoholes, aminas y aminoácidos ópticamente activos.<sup>125</sup>
- Cascadas ortogonales: En ellas se desplaza el equilibrio de una reacción hacia la formación del producto de interés, o bien se elimina algún (sub)producto que pueda inactivar el catalizador de la reacción principal.<sup>126</sup>

<sup>124</sup> (a) C. Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2525-2541; (b) S. Mordhorst, J. N. Andexer, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1316-1333.

<sup>125</sup> (a) M. M. Musa, F. Hollmann, F. G. Mutti, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 5487-5503; (b) C. Aranda, G. Oksdatch-Mansilla, F. R. Bisogno, G. de Gonzalo, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 1233-1257.

<sup>126</sup> R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129-143.



**Esquema 7.** Representación esquemática de reacciones en cascada paralela, cíclica y ortogonal.

A pesar de ser unas aproximaciones muy interesantes, el desarrollo de procesos *one-pot*, especialmente en el caso de las cascadas lineales, no es una tarea sencilla, ya que requiere de la compatibilidad de los catalizadores o de las condiciones de reacción involucradas en todas las etapas, para evitar inactivaciones de alguno de los catalizadores o la formación de subproductos no deseados.

Uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral es el diseño de transformaciones en cascada lineales. Para el desarrollo de este tipo de aproximaciones existen diversas combinaciones según los tipos de catalizadores involucrados en el proceso. En este ámbito existen distintos tipos de aproximaciones multicatalíticas que abarcan los procesos multienzimáticos, foto-enzimáticos y metal-enzima, entre otras.

#### 0.4.1 Procesos multienzimáticos

Los sistemas en cascada multienzimáticos son considerados el origen de la idea del desarrollo de los procesos multicatalíticos, ya que la naturaleza se ha encargado de diseñar y optimizar procesos multietapa para la síntesis de moléculas complejas en los organismos vivos. Ejemplos de ello son la biosíntesis de productos

## Introducción

naturales, como por ejemplo la de la pentalenolactona D, que implica la acción de tres tipos de enzimas,<sup>127</sup> o el ciclo de Krebs, que combina la acción de ocho enzimas distintas,<sup>128</sup> entre muchos otros.<sup>129</sup>

El diseño de un proceso multienzimático depende de la naturaleza de las enzimas implicadas en él, ya que se relaciona directamente con su estabilidad en el medio de reacción, ya sea en disolventes orgánicos o acuosos, el intervalo óptimo de pH para cada enzima en caso de trabajar en medio acuoso, la temperatura y/o el empleo de cofactores con sus correspondientes sistemas de regeneración, entre otros factores. Por ello, el diseño de procesos multienzimáticos no es un tema trivial como podría pensarse, sino que es necesaria una perfecta sincronía y una ausencia de inhibición de cada actividad catalítica involucrada en dicho sistema.<sup>130</sup>

Un ejemplo reciente es la síntesis del *Molnupiravir* (MK-4482),<sup>131</sup> fármaco antiviral que se encuentra en fase 3 para el tratamiento del COVID-19 (Esquema 8). En este trabajo se describe la síntesis de un precursor directo del fármaco MK-4482 mediante una aproximación secuencial que combina el uso de seis enzimas distintas a partir de sustratos de partida baratos y fácilmente accesibles. De esta manera se ha logrado obtener, tras una reacción química de formación de una oxima, el fármaco deseado con un rendimiento aislado global del 69%.<sup>131</sup>

---

<sup>127</sup> E. Davies, R. Croteau, *Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes*, en *Topics in Current Chemistry*, vol. 2009, Springer-Verlag, Berlín/Heidelberg (Alemania), **2000**.

<sup>128</sup> I. Jochmanova, K. Pacak, *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5001-5011.

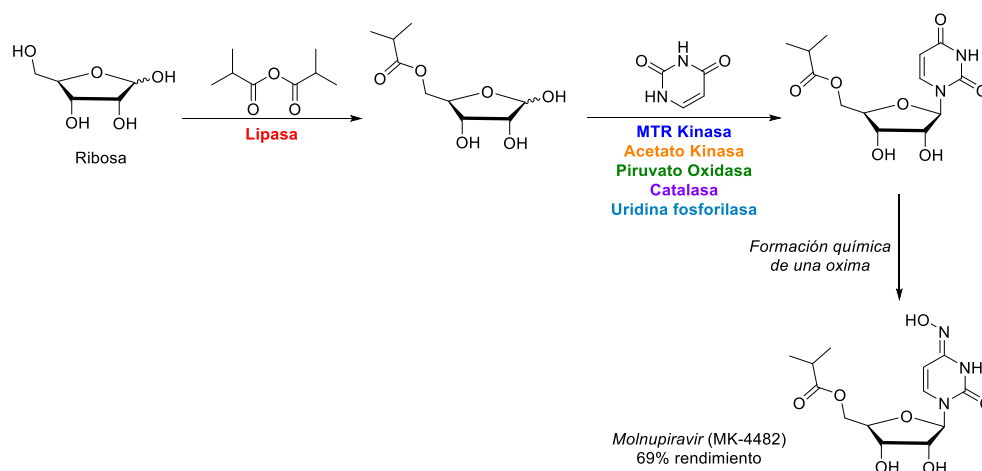
<sup>129</sup> (a) T. A. Scott, J. Piel, *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3*, 404-425; (b) C. S. Jamieson, J. Misa, Y. Tang, J. M. Billingsley, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 6950-7008.

<sup>130</sup> J. Albarrán-Velo, S. González-Granda, M. López-Agudo, V. Gotor-Fernández, *Practical Multienzymatic Transformations: Combining Enzymes for the One-Pot Synthesis of Organic Molecules in a Straightforward Manner* en *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2021**, cap. 13.

<sup>131</sup> J. A. McIntosh et al. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 1980-1985.



## Introducción



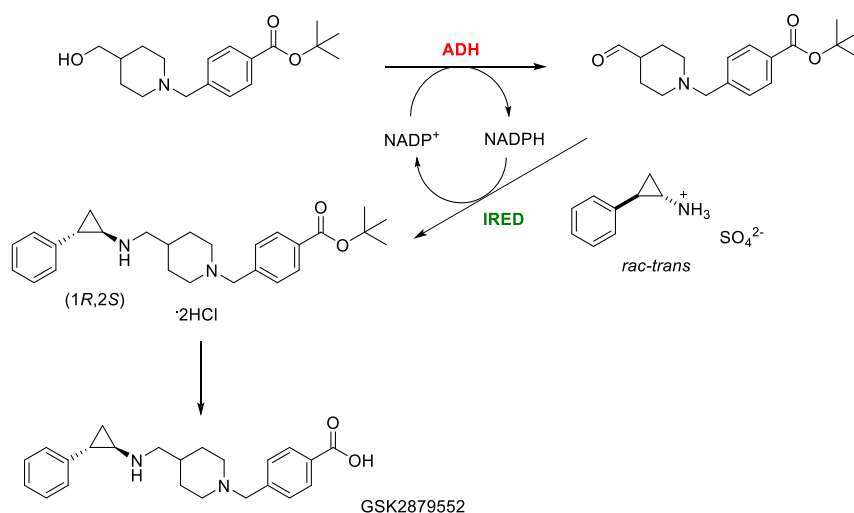
**Esquema 8.** Aproximación secuencial multienzimática para la síntesis del fármaco Molnupiravir.

Por otro lado, los procesos de transformación de alcoholes en aminas son particularmente interesantes, sobre todo si se realizan de manera estereoselectiva y bajo condiciones suaves de reacción. En este contexto se han descrito varias aproximaciones para llevar a cabo esta transformación basadas en el uso de enzimas oxidativos como lacasas o ADHs, junto con enzimas responsables de la transformación de los compuestos carbonílicos en las aminas como ATAs o AmDHs, entre otras.<sup>132</sup> Un ejemplo reciente de aminación de alcoholes multienzimática ha sido descrito para la síntesis del fármaco GSK2879552 (Esquema 9), un inhibidor de la lisina desmetilasa 1 (LSD1).<sup>133</sup> En esta aproximación en cascada se combina la acción de una ADH para oxidar selectivamente un alcohol primario al aldehído correspondiente, y una IRED para transformar el intermedio carbonílico en la correspondiente amina ópticamente activa. Este sistema es muy interesante ya que el cofactor empleado en ambas transformaciones se recicla internamente en el medio de reacción.

<sup>132</sup> (a) F. G. Mutti, T. Knaus, N. S. Scrutton, M. Breuer, N. J. Turner, *Science* **2015**, *349*, 1525-1529; (b) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Green Chem.* **2017**, *19*, 471-480; (c) T. Knaus, L. Cariati, M. F. Masman, F. G. Mutti, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8313-8325.

<sup>133</sup> M. Schober et al. *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 909-915.

## Introducción



**Esquema 9.** Cascada multienzimática combinando una ADH y una IRED para la síntesis del fármaco GSK2879552.

### 0.4.2 Procesos multicatalíticos fotoenzimáticos

En los últimos años la *fotocatálisis* se ha consolidado como una metodología versátil, eficiente y sostenible dentro de la síntesis orgánica.<sup>134</sup> Además, debido a las condiciones suaves de reacción que emplea, su combinación con la biocatálisis no ha pasado inadvertida puesto que las hace, a priori, plenamente compatibles.<sup>135</sup>

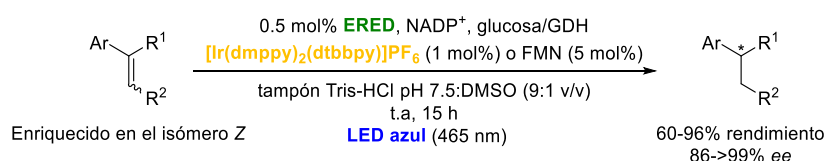
Un buen ejemplo de una combinación en cascada de un proceso fotocatalítico con otro enzimático es el propuesto por los grupos de investigación de los profesores Zhao y Hartwig.<sup>136</sup> Así, se ha descrito la isomerización de una olefina, enriquecida en su forma *Z*, mediante un fotocatalizador de iridio o flavina mononucleótido (FMN) y luz led azul, al que se ha acoplado una segunda etapa de biorreducción del doble enlace C=C empleando una ERED. La fotoisomerización de la olefina de partida es necesaria ya que las enzimas empleadas solo son capaces de

<sup>134</sup> (a) *Visible Light Photocatalysis in Organic Chemistry*, Eds. C. R. J. Stephenson, T. P. Yoon, D. W. C. MacMillan, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2018**; (b) X. Wang, K. Faungnawakij, M. Chareopanich, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 5838-5841; (c) P. Melchiorre, *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 1483-1484.

<sup>135</sup> (a) L. Schmermund, V. Jurkas, F. F. Özgen, G. D. Barone, H. C. Büchschütz, C. K. Winkler, S. Schmidt, R. Kourist, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 4115-4144; (b) S. Zhang, S. Liu, W. Sun, S. Li, J. Shi, Z. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 13449-13466.

<sup>136</sup> Z. C. Litman, Y. Wang, H. Zhao, J. F. Hartwig, *Nature* **2018**, *560*, 355-359.

reducir el isómero *E* de estos compuestos. De esta manera se consiguen obtener los productos saturados con elevados rendimientos y excesos enantioméricos (Esquema 10).



**Esquema 10.** Cascada fotoenzimática para la fotoisomerización-reducción de olefinas.

#### 0.4.3 Procesos multicatalíticos metal-enzima

La combinación en *one-pot* de reacciones catalizadas por especies metálicas y enzimas es muy atractiva en síntesis orgánica debido a la capacidad que presentan las especies metálicas para catalizar muy distintos tipos de reacciones, especialmente de acoplamiento cruzado, y a los elevados niveles de selectividad que son capaces de inducir las enzimas.<sup>137</sup>

Generalmente este tipo de procesos multicatalíticos se llevan a cabo en medio acuoso para facilitar la actividad de la enzima, al ser su entorno natural. Sin embargo, la presencia de agua es perjudicial para muchas reacciones organometálicas, ya que puede favorecer la formación de subproductos o hacer que el catalizador metálico no sea activo para la transformación deseada. Además, algunas especies metálicas pueden inhibir la enzima empleada, o bien los biocatalizadores o cofactores pueden coordinarse al catalizador metálico, lo que conduce a su rápida inactivación.<sup>138</sup> Por ello, este tipo de combinaciones suelen ser más difíciles de diseñar que las estrategias multienzimáticas, especialmente a la hora de realizar procesos en cascada.

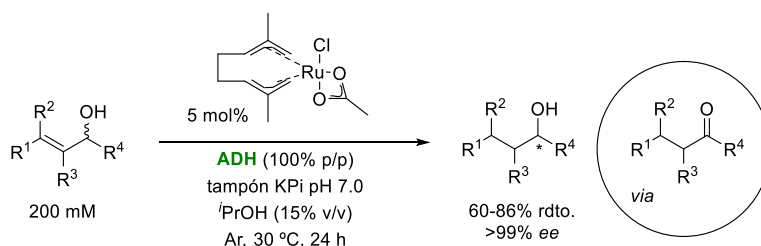
<sup>137</sup> (a) J. Muschiol, C. Peters, N. Oberleitner, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, F. Rudroff, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 5798-5811; (b) F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, 1, 12-22; (c) F. Dumeignil et al. *Catal. Sci. Technol.* **2018**, 8, 5708-5734; (d) X. Huang, M. Cao, H. Zhao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, 55, 161-170; (e) Y. Liu, P. Liu, S. Gao, Z. Wang, P. Luan, J. González-Sabín, Y. Jing, *Chem. Eng. Technol.* **2021**, 420, 127659; (f) L. Bering, J. Thompson, J. Micklefield, *Trends Chem.* **2022**, 4, 392-408.

<sup>138</sup> H. Gröger, *Metals and Metal Complexes in Cooperative Catalysis with Enzymes within Organic-Synthetic One-Pot Processes en Cooperative catalysis. Designing Efficient Catalysts for Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2015**, cap. 11.

## Introducción

En los últimos años se han descrito varios ejemplos para realizar este tipo de combinaciones metal-enzima, siendo el método más frecuente el desarrollo de aproximaciones secuenciales.<sup>139</sup> También es necesario destacar el diseño de metaloenzimas artificiales, las cuales son obtenidas mediante la ingeniería de proteínas, disponiendo un catalizador metálico en el centro activo de la enzima con el fin de producir una reacción organometálica en el entorno tridimensional que proporciona la proteína.<sup>140</sup> Otro ejemplo de la combinación metal-enzima son los complejos bionanhíbridos, los cuales están compuestos por nanopartículas de metales nobles y una enzima, de modo que son capaces de exhibir ambas actividades catalíticas.<sup>141</sup>

Históricamente, los primeros procesos en los que se desarrolló una combinación de tipo metal-enzima fueron las resoluciones cinéticas dinámicas, especialmente de alcoholes y aminas racémicas. Un ejemplo del potencial sintético que pueden presentar estos procesos en cascada combinando metales y enzimas es el descrito por González-Sabín y colaboradores.<sup>142</sup> En este trabajo se describe la isomerización redox de alcoholes alílicos, catalizada por una especie de rutenio, y un segundo paso de biorreducción empleando una ADH, que según su estereoespecificidad puede conducir a uno u otro enantiómero (Esquema 11).



**Esquema 11.** Cascada metal-enzima para la síntesis de alcoholes enantioenriquecidos.

<sup>139</sup> C. Ascaso-Alegre, J. Mangas-Sanchez, *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, e202200093.

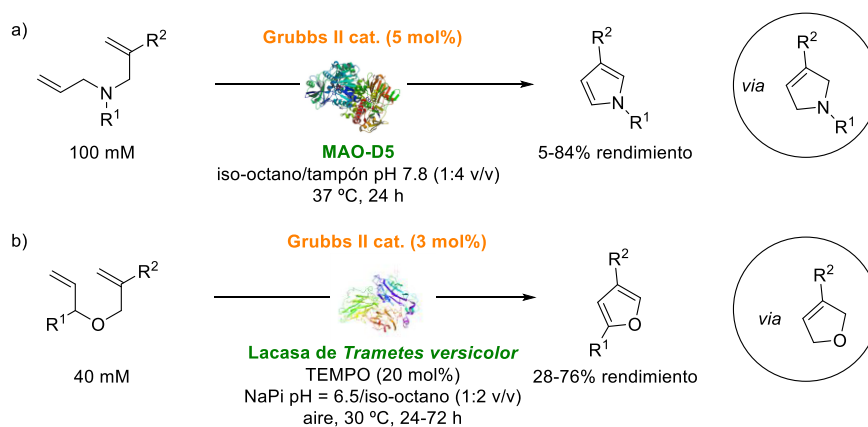
<sup>140</sup> (a) T. Heinisch, T. R. Ward, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1711-1721; (b) F. Schwizer et al. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 142-231.

<sup>141</sup> (a) M. Filice, M. Marciello, M. P. Morales, J. M. Palomo, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6876-6878; (b) J. M. Palomo, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 9583-9589.

<sup>142</sup> N. Ríos-Lombardía, C. Vidal, E. Liardo, F. Morís, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8691-8695.

## Introducción

Otro ejemplo del potencial sintético de la combinación metal-enzima es el trabajo descrito por Castagnolo y colaboradores (Esquema 12, a),<sup>143</sup> donde se combina en cascada el catalizador Grubbs de segunda generación, para producir la reacción de metátesis de cierre de anillo (*Ring Closing Metathesis*, RCM) de dialilaminas, y una monoamino oxidasa (MAO) que permite la aromatización del compuesto hacia los correspondientes pirroles. Más recientemente, el mismo grupo de investigación ha descrito una aproximación similar empleando el mismo catalizador de Grubbs y una lacasa para obtener derivados de furano (Esquema 12, b).<sup>144</sup>



**Esquema 12.** Cascadas metal-enzima para la síntesis de heterociclos: a) nitrogenados; y b) oxigenados.

<sup>143</sup> N. Scalacci, G. W. Black, G. Mattedi, N. L. Brown, N. J. Turner, D. Castagnolo, *ACS Catal.* **2017**, 7, 1295-1300.

<sup>144</sup> C. Risi, F. Zhao, D. Castagnolo, *ACS Catal.* **2019**, 9, 7264-7269.



## *Objetivos generales*





## *Objetivos generales*

En la introducción general de esta Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto la utilidad de la biocatálisis para la síntesis altamente selectiva y bajo condiciones suaves de reacción de distintos tipos de compuestos. Además, se ha mostrado y discutido la gran versatilidad que presenta la catálisis metálica, especialmente la de oro(I) para promover un gran número de transformaciones, demostrando una gran tolerancia a la presencia de diversos grupos funcionales. Por tanto, el eje central de esta Tesis Doctoral es el diseño, estudio y optimización de procesos *one-pot* en cascada, mediante la acción combinada de distintos tipos de enzimas (aproximaciones multienzimáticas), o bien utilizando catalizadores metálicos y enzimas (procesos metaloenzimáticos). Este tipo de metodologías en cascada permiten un ahorro sustancial en el tiempo, energía y coste económico asociado a la síntesis química tradicional ya que se evitan etapas de aislamiento y purificación de sustancias intermedias. Por todo ello, se han planteado una serie de objetivos generales, que se detallan a continuación.

En el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral se abordará la síntesis y desracemización de alcoholes propargílicos racémicos mediante un proceso multienzimático que involucre la acción del sistema oxidativo lacasa/TEMPO y diferentes ADHs capaces de reducir de manera asimétrica las cetonas intermedias.

En el segundo y tercer capítulo se estudiará el desarrollo de procesos en cascada para transformar alcoholes propargílicos racémicos en alcoholes o aminas alílicas ópticamente activas. Estas aproximaciones implicarán la identificación de catalizadores de oro(I) que lleven a cabo la reacción de reagrupamiento de Meyer-Schuster, así como ADHs o ATAs que catalicen procesos altamente selectivos de biorreducción y biotransaminación, respectivamente, de las cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas resultantes.

En el Capítulo 4 se abordará la síntesis de halohidrinas ópticamente activas mediante el desarrollo de un proceso en cascada que combine la reacción de hidratación regioselectiva de haloalquinos promovida por catalizadores de oro(I), seguida de la biorreducción de las  $\alpha$ -halometil cetonas intermedias empleando ADHs.

### *Objetivos generales*

Finalmente, en el Capítulo 5 se explorará el potencial de las especies de oro(I) para catalizar la reacción de hidratación de ésteres y amidas propargílicas, en este caso para el diseño de una metodología en cascada que permita obtener derivados de nor(pseudo)efedrina de tipo 1,2-diol, 1,2-aminoalcohol o 1,2-diamina dependiendo del sustrato de partida y de la enzima empleada (ADH o ATA).

# **Bloque I**

*Desarrollo de procesos multienzimáticos  
sobre alcoholes propargílicos*



# Capítulo 1

*Desracemización de alcoholes  
propargílicos mediante la combinación  
de lacasas y alcohol deshidrogenasas*



# *Introducción*

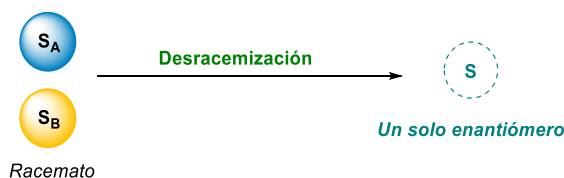




### I.1 Desracemización: Concepto y tipos

Los procesos de desracemización se definen como la transformación de una mezcla racémica en únicamente uno de sus enantiómeros. Sin embargo, existe cierta controversia acerca de esta definición. Así, Faber redefinió este concepto en 2001 para eliminar posibles ambigüedades en su formulación,<sup>145</sup> explicándolo como “cualquier proceso en el que un racemato es convertido en un producto no racémico con un rendimiento máximo teórico del 100% y sin necesidad de aislar los intermedios de reacción”. De esta manera, muy diversos tipos de procesos son incluidos en esta redefinición como resoluciones (cinéticas) dinámicas, estereoinversiones y procesos enantioconvergentes, entre otros.

Esta Tesis Doctoral se centrará en la definición clásica del término desracemización, es decir, aquella en la que el sustrato de partida es el mismo compuesto que el producto final (Esquema 13), pasando de ser racémico a encontrarse en forma enantiopura. Este tipo de reacciones son muy apreciadas desde un punto de vista sostenible debido a que transcurren con total economía atómica.



**Esquema 13.** Proceso de desracemización en el que un racemato ( $S_A + S_B$ ) se convierte en un solo enantiómero de dicho compuesto.

Generalmente para llevar a cabo un proceso de desracemización se sigue una estrategia de estereoinversión,<sup>146</sup> siendo posibles dos escenarios en este caso:

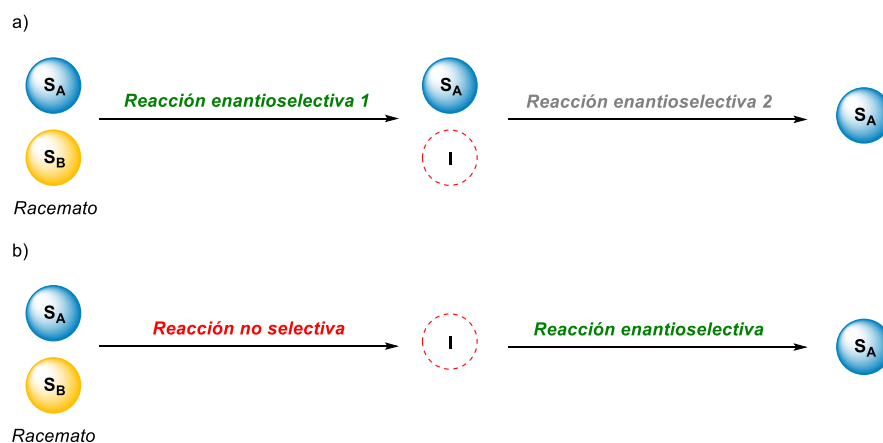
- Combinación de dos reacciones estereoselectivas: Uno de los enantiómeros del sustrato de partida ( $S_B$ ) es transformado selectivamente en un intermedio (I), generalmente proquiral, el cual es transformado mediante otra reacción estereoselectiva en el enantiómero opuesto ( $S_A$ ) del compuesto de partida (Esquema 14, a).

<sup>145</sup> K. Faber, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 5004-5010.

<sup>146</sup> C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 1789-1805.

## Bloque I. Introducción

- Combinación de una reacción no selectiva y otra estereoselectiva: En esta aproximación ambos enantiómeros del sustrato de partida ( $S_A + S_B$ ) son transformados mediante una reacción no selectiva en un intermedio (I), generalmente proquiral, el cual experimenta una reacción estereoselectiva para generar uno de los dos enantiómeros (por ejemplo  $S_A$ , Esquema 14, b).



**Esquema 14.** Opciones para el diseño de un proceso de desracemización de un racemato ( $S_A + S_B$ ) para la obtención de un único enantiómero.

Este tipo de procesos no son exclusivamente biocatalíticos ya que han sido descritos procesos de desracemización mediante el uso de dos catalizadores metálicos,<sup>147</sup> combinando procesos metálicos y fotocatalíticos,<sup>148</sup> o bien mediante métodos exclusivamente fotocatalíticos.<sup>149</sup> En lo referente a las estrategias biocatalíticas, generalmente, los compuestos sobre los que más se han estudiado estas transformaciones han sido alcoholes y aminas primarias. Recientemente han sido descrito ejemplos de procesos de desracemización sobre otras familias de compuestos orgánicos como sulfóxidos,<sup>150</sup> tetrahydroquinolinas,<sup>151</sup> o  $\alpha$ -hidroxiácidos,<sup>152</sup> entre otros.

<sup>147</sup> (a) Y. Shimada, Y. Miyake, H. Matsuzawa, Y. Nishibayashi, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 393-396; (b) G. R. A. Adair, J. M. J. Williams, *Chem. Commun.* **2007**, 2608-2609.

<sup>148</sup> Z. Zhang, X. Hu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 22833-22838.

<sup>149</sup> M. Huang, L. Zhang, T. Pan, S. Luo, *Science* **2022**, *375*, 869-874.

<sup>150</sup> V. Nosek, J. Mišek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9849-9852.

<sup>151</sup> S. Ju, M. Qian, J. Li, G. Xu, L. Yang, J. Wu, *Green Chem.* **2019**, *21*, 5579-5585.

<sup>152</sup> Y.-P. Xue, H. Zheng, X.-L. Jin, Z.-Q. Liu, Y.-G. Zheng, *Microb. Cell. Fact.* **2016**, *15*, 162-171.

En esta Tesis Doctoral se abordará un proceso de desracemización de alcoholes propargílicos mediante una estrategia de oxidación no selectiva, mediada por la lacasa de *Trametes versicolor*, y una segunda etapa de biorreducción asimétrica. Así, se estudiará el comportamiento de diversas ADHs con el fin de encontrar enzimas complementarias que nos permitan acceder a ambos enantiómeros de los alcoholes estudiados. Tanto lacasas como ADHs pertenecen al grupo de las oxidorreductasas, por ello a continuación se desglosarán las características principales de esta clase y subclases de enzimas.

## *1.2 Oxidorreductasas*

Las oxidorreductasas o enzimas redox (EC 1) son biocatalizadores capaces de realizar la transferencia de electrones de una sustancia reductora (donadora de electrones) a otra oxidante (aceptora de electrones). Esta transformación suele estar mediada por cofactores, que son moléculas que catalizan las transferencias electrónicas. Generalmente, suele ser el dinucleótido (fosfato) de adenina y nicotinamida [NAD(P)], aunque algunas veces también se requiere de la presencia de otros cofactores como el flavín mononucleótido (FMN), grupos hemo, clústeres de hierro-azufre, disulfuros o la pirroloquinolina quinona (PQQ).<sup>153</sup>

En cuanto a su potencial sintético, esta clase de enzimas catalizan procesos muy diversos, como pueden ser reacciones de oxidación de grupos hidroxilo y amino, reducciones de carbonilos e iminas, epoxidaciones de dobles enlaces, reacciones del tipo Baeyer-Villiger o reacciones de hidroxilación, entre otras.<sup>154</sup>

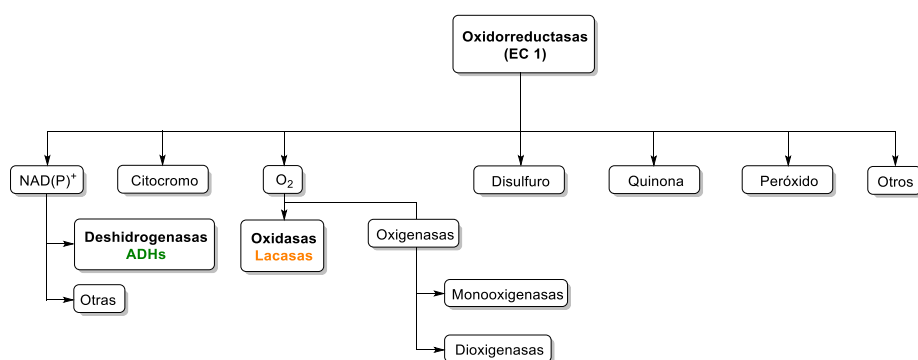
Las enzimas de la clase de las oxidorreductasas se dividen en distintos grupos en función de diversos criterios, siendo el más extendido aquel que se basa en la función del aceptor electrónico que utilicen (Figura 6). De esta manera destacan tres clases sobre todas las demás: Deshidrogenasas, oxidasas y oxigenasas.

---

<sup>153</sup> (a) D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111-4140; (b) M. Hall, *Applications of Oxidoreductases in Synthesis: A Roadmap to Access Value-Added Products en Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2021**, cap. 7.

<sup>154</sup> (a) M. Hall, A. S. Bommarius, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110; (b) A. T. Martínez et al. *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 815-831.

## Bloque I. Introducción



**Figura 6.** Clasificación de las enzimas oxidorreductasas en función del aceptor electrónico que emplean.

Mientras que las deshidrogenasas son capaces de acelerar reacciones redox reversibles, pudiendo ser empleadas tanto como agentes oxidantes como reductores, las oxigenasas y las oxidasas únicamente catalizan reacciones cuasi-irreversibles de oxidación. Este hecho es debido a que son capaces de facilitar la reducción del oxígeno molecular, la cual es altamente exotérmica, actuando en estos procesos como aceptor último de los electrones, reduciéndose a agua o peróxido de hidrógeno.

En esta Tesis Doctoral se han empleado lacasas y ADHs, oxidorreductasas pertenecientes a las subclases de las oxidasas y deshidrogenasas respectivamente. Por ello a continuación se mostrará un breve resumen de cada una de estas subclases, prestando especial atención a aquellas de un origen concreto y empleadas de manera amplia en distintos capítulos de esta memoria.

### 1.2.1 Oxidasas

Las oxidasas son un tipo de oxidorreductasas que, como su propio nombre indica, catalizan reacciones de oxidación de distintos sustratos, empleando oxígeno molecular ( $O_2$ ) como aceptor final de electrones, el cual se reduce a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o agua ( $H_2O$ ). Generalmente, no requieren de la presencia de cofactores externos para realizar su actividad catalítica, y en el caso de algunas oxidasas dependientes de FMN, este cofactor se encuentra covalentemente unido a la proteína, por lo que no es necesario realizar su adición externa.<sup>155</sup> En comparación con otros tipos de oxidorreductasas, y especialmente si se comparan con las

<sup>155</sup> A. J. C. Wahart, J. Staniland, G. J. Miller, S. C. Cosgrove, *R. Soc. Open Sci.* **2022**, *9*, 211572.

deshidrogenasas, las oxidasas no son tan abundantes en la naturaleza.<sup>36</sup> Catalizan preferentemente la reacción de oxidación sobre enlaces C–O y C–N, y se han dividido en función del sustrato que son capaces de oxidar. De esta manera se pueden encontrar las *alcohol oxidasas*, que catalizan la reacción de oxidación de enlaces C–O como, por ejemplo, en alcoholes alifáticos, las *amino oxidasas* que oxidan enlaces C–N en grupos amino, y las *aminoácido oxidasas*, que son similares a las amino oxidasas, pero actúan sobre el grupo amino presente en aminoácidos.

#### 1.2.1.1 Lacasas

Las *lacasas* son un tipo oxidasas dependientes de cobre que catalizan la reacción de oxidación monoelectrónica de sustratos activados, por lo general de aminas aromáticas y fenoles, a expensas de la reducción de oxígeno molecular a agua,<sup>156</sup> subproducto inocuo que demuestra la sostenibilidad de este tipo de reacciones. Estas enzimas funcionan con alta eficacia en medios acuosos, normalmente en condiciones ácidas, sin embargo, la baja solubilidad de muchos sustratos en estos medios hace que, con fines prácticos, se necesite de la presencia de cosolventes orgánicos miscibles con el agua.

Las lacasas se pueden encontrar en hongos, bacterias, plantas e insectos,<sup>157</sup> y presentan propiedades y características distintas en función del organismo del que proceden. De esta manera puede variar tanto el intervalo óptimo de temperatura como de pH en el que son activas, y aunque su función natural es diferente según el organismo del que provengan, en todos ellos son capaces de catalizar procesos de polimerización y despolimerización.

En lo referente a su empleo a gran escala, este tipo de oxidasas han sido ampliamente utilizadas para reducir los costes energéticos y la contaminación dentro de la industria:<sup>158</sup>

- Textil: En la destrucción de tintes y otros contaminantes.
- Papelera: Separación y degradación de la lignina presente en la madera.

---

<sup>156</sup> (a) M. Mogharabi, M. A. Faramarzi, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 897-927; (b) S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219-226; (c) M. D. Cannatelli, J. Ragauskas, *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 122-140.

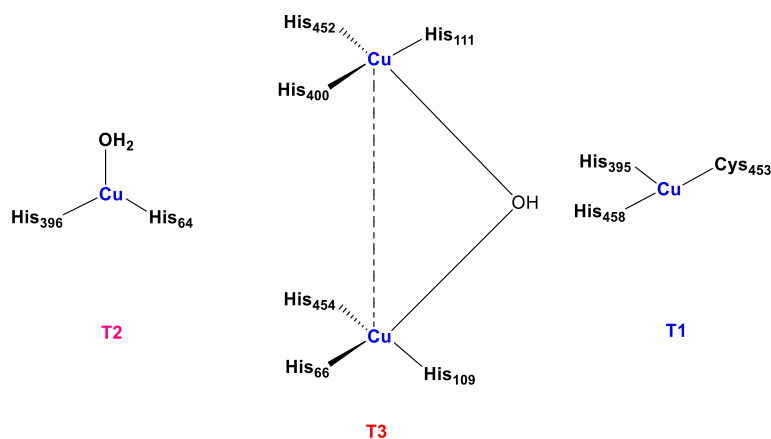
<sup>157</sup> (a) H. Forootanfar, M. A. Faramarzi, *Biotechnol. Prog.* **2015**, *31*, 1443-1463; (b) L. Arregui et al. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 200-233.

<sup>158</sup> (a) A. K. Siartz, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *36*, 70-86; (b) D. Singh, N. Gupta, *Biologia* **2020**, *75*, 1183-1193.

## Bloque I. Introducción

- Alimentaria: Eliminación de compuestos fenólicos no deseados en los alimentos, y reducción de la cantidad de oxígeno en estos, aumentando así su vida útil.

El mecanismo redox de acción de las lacasas tiene lugar gracias a la presencia de un clúster de cuatro átomos de cobre ubicado en el centro activo (Figura 7).<sup>159</sup> Estos cuatro átomos de cobre(II) han sido clasificados en tres tipos distintos (tipo I, tipo II y tipo III) dependiendo de las señales de resonancia paramagnética electrónica (*Electron Paramagnetic Resonance*, EPR) que presentan.



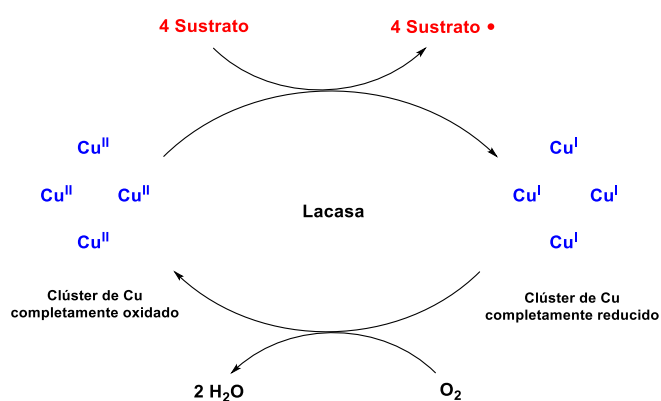
**Figura 7.** Modelo del clúster de cuatro átomos de cobre en la lacasa de *Trametes versicolor*. T1= átomo de cobre de tipo I, T2= átomo de cobre de tipo II, T3= átomos de cobre de tipo III.

El átomo de cobre de Tipo I se encuentra ecuatorialmente coordinado a dos residuos de histidina y a uno de cisteína, presentando una fuerte resonancia paramagnética electrónica y una intensa absorción a 610 nm debida a la transferencia de carga que recibe el cobre por parte del átomo de azufre de la cisteína a la que se encuentra coordinado. De hecho, esta transferencia electrónica es la responsable del color azulado característico que presentan este tipo de enzimas, lo que hace que se las conozca también como *blue copper oxidases*. Por otro lado, es en este átomo de cobre en el que se produce la oxidación del sustrato ya que es el que presenta un mayor potencial redox.

<sup>159</sup> (a) H. Claus, *Micron*. **2004**, 35, 93-96; (b) M. Valles, A. F. Kamaruddin, L. S. Wong, C. F. Blanford, *Catal. Sci. Technol.* **2020**, 10, 5386-5410.

A diferencia del átomo de cobre de Tipo I, el de Tipo II no presenta absorción en el espectro visible, pero sí posee propiedades paramagnéticas observadas en la EPR. Este tipo de cobre se encuentra coordinado a dos residuos de histidina y a una molécula de agua. Finalmente, los átomos equivalentes de cobre que constituyen el Tipo III se encuentran coordinados entre sí a través de un grupo hidroxilo puente, y a tres histidinas cada uno de ellos. En este caso, no presentan señales en la EPR y registran absorción electrónica a 330 nm.

En el clúster de cuatro átomos de cobre ocurren cuatro oxidaciones monoelectrónicas de cuatro moléculas de sustrato (Figura 8). El electrón abstraído reduce el átomo de cobre(II) de Tipo I, siendo posteriormente transferido a la unidad conformada por los átomos de cobre(II) de Tipo II y III, produciéndose por último la reducción de una molécula de oxígeno generando dos moléculas de agua, lo que regenera el estado de oxidación inicial de los átomos de cobre. Durante este tipo de procesos monoelectrónicos se produce la generación de radicales, los cuales se forman en el sustrato oxidado, y puesto que son muy reactivos, pueden dar lugar a reacciones de dimerización, trimerización o incluso de polimerización, así como a degradaciones de compuestos poliméricos y rupturas de anillos aromáticos.

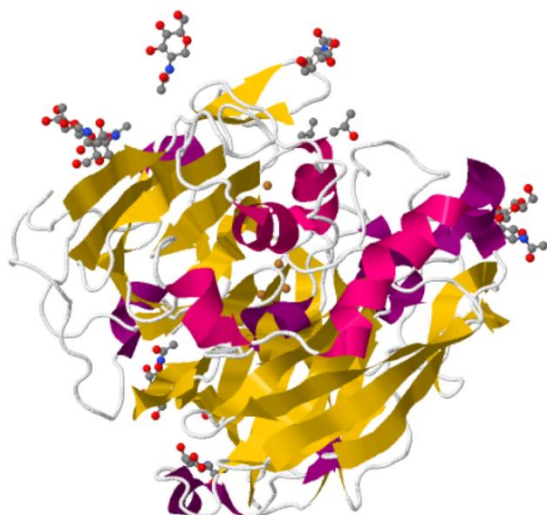


**Figura 8.** Representación esquemática del ciclo catalítico de las lacasas en el que se generan dos moléculas de agua y cuatro radicales del sustrato oxidado por cada molécula de oxígeno reducida.

## Bloque I. Introducción

### I.2.1.2 Lacasa de *Trametes versicolor*

De la gran variedad de lacasas descritas, en esta Tesis Doctoral se ha empleado la lacasa de *Trametes versicolor* (LTv, Figura 9). Esta oxidasa proviene de un hongo que presenta una gran capacidad para degradar la madera. Su estructura cristalina fue descrita en 2002,<sup>160</sup> y se trata de una glicoproteína monómerica con una masa molecular de 70 kDa.



**Figura 9.** Estructura cristalina de la lacasa de *Trametes versicolor* (LTv). Tomada del Protein Data Bank, estructura 1GYC, <https://www.rcsb.org/3d-view/jsmol/1GYC/1>.

Como se ha comentado en la sección anterior, las propiedades y características de cada lacasa dependen del organismo del que provengan. Así, la lacasa de *Trametes versicolor* presenta una actividad óptima en un intervalo de pH comprendido entre 4.5 y 6.0, y una temperatura de 25-35 °C.<sup>161</sup>

### I.2.1.3 Sistemas Lacasa-Mediador (LMS, laccase-mediator systems)

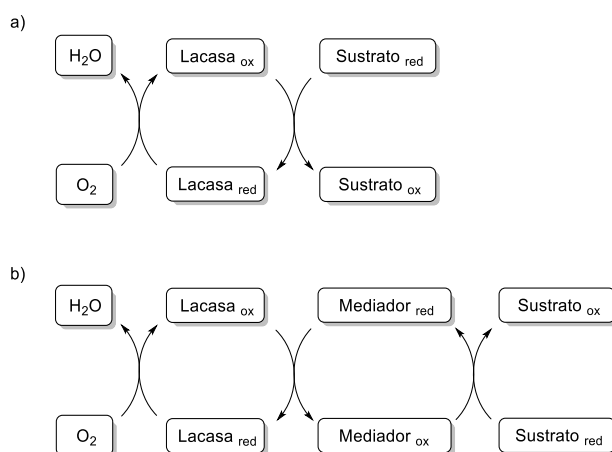
Los sustratos naturales de las lacasas son los fenoles con un potencial redox comprendido entre 0.5 y 1.0 voltios, por lo que pueden ser oxidados directamente

<sup>160</sup> (a) K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 37663-37669; (b) T. Bertrand, C. Jolivald, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougín, *Biochemistry* **2002**, 41, 7325-7333.

<sup>161</sup> S. Kurniawati, J. A. Nicell, *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, 7825-7834.



por el átomo de cobre Tipo I perteneciente al clúster del centro activo (Figura 10, a). Sin embargo, sustratos que presenten potenciales redox más elevados, o que no sean capaces de difundir de manera correcta hacia el centro activo de estas enzimas, no serán oxidados por la lacasa. Para solventar esta limitación se ha empleado una estrategia consistente en emplear un compuesto intermedio, el cual es reconocido y transformado por la lacasa, siendo este quien finalmente oxide al compuesto deseado. De esta manera se ha logrado aumentar el potencial sintético de las lacasas al aumentar el número y, en especial, el tipo de sustratos que son capaces de oxidar.<sup>156a,162</sup> Estas moléculas intermedias se denominan mediadores, y cuando son combinados con este tipo de enzimas, el conjunto es conocido como sistema lacasa-mediador (*Laccase-Mediator System, LMS*, Figura 10, b).<sup>163</sup>



**Figura 10.** Oxidaciones empleando lacasas de: a) sustratos activados en ausencia de mediador; y b) sustratos no activados en presencia de un mediador químico.

A la hora de diseñar un LMS es necesario emplear un mediador adecuado que cumpla una serie de requisitos:<sup>164</sup>

- Ser un buen sustrato para la lacasa empleada.
- Poseer un elevado potencial redox para oxidar las moléculas de interés.

<sup>162</sup> T. Kudanga, B. Nemadziva, M. Le Roes-Hill, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 13-33.

<sup>163</sup> A. I. Cañas, S. Camarero, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 694-705.

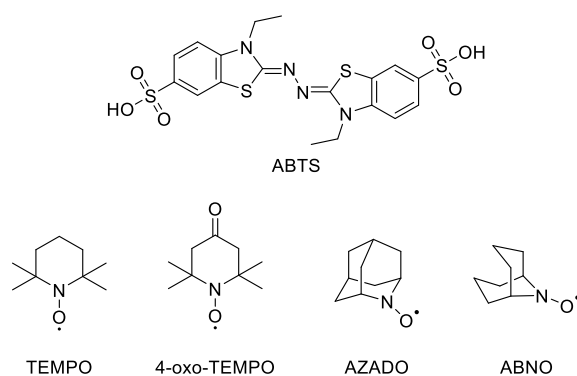
<sup>164</sup> P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, G. Sannia, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 369-385.

## Bloque I. Introducción

- Ser barato y fácilmente accesible.

A su vez, los mediadores pueden dividirse en tres grupos según su mecanismo de acción: Mediadores de transferencia de un átomo de hidrógeno (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT), de transferencia electrónica (*Electron Transfer*, ET), y el grupo formado por los radicales nitroxilo, cuyo mecanismo es distinto de los anteriores.<sup>163,165</sup> Así, el primer mediador descrito en el año 1990 fue el 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolidina)-6-sulfónico (ABTS), perteneciente al grupo de los mediadores por transferencia electrónica.<sup>166</sup>

Por otro lado, los mediadores que disponen de un grupo N–OH siguen un mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno, generando en el medio de reacción radicales de tipo nitroxilo (N–O<sup>•</sup>).<sup>167</sup> Los mediadores derivados de nitróxidos de dialquilo son los más efectivos para catalizar un gran número de transformaciones químicas, ya que son radicales muy estables.<sup>168</sup> En la Figura 11 se muestra la estructura de varios mediadores frecuentemente utilizados, todos ellos con una estructura derivada del radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-*N*-oxilo (TEMPO).<sup>169</sup>



**Figura 11.** Estructura del ABTS y nitróxidos de dialquilo empleados como mediadores.

<sup>165</sup> J.-R. Jeon, Y.-S. Chang, *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 335-341.

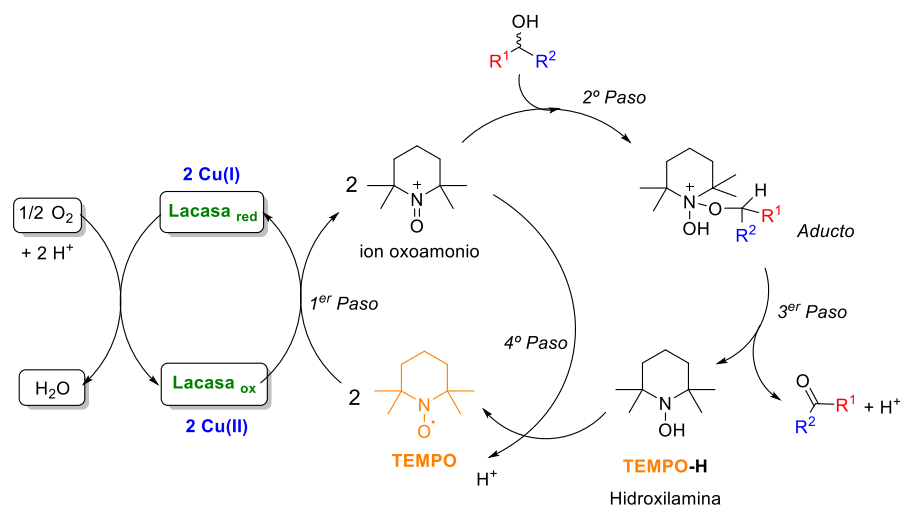
<sup>166</sup> R. Bourbonnais, M. G. Paice, *FEBS Lett.* **1990**, *267*, 99-102.

<sup>167</sup> R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2006**, *251*, 200-214.

<sup>168</sup> H. P. Call, H. P. I. Mucke, *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 163-202.

<sup>169</sup> (a) J. E. Nutting, M. Rafiee, S. S. Stahl, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4834-4885; (b) S. Nagasawa, Y. Sasano, Y. Iwabuchi, *Heterocycles* **2022**, *105*, 61-114.

El mecanismo de reacción que sigue el sistema lacasa/TEMPO se detalla en la Esquema 15 y es considerado un mecanismo iónico. En primer lugar, la lacasa oxida el mediador gracias a la reducción del oxígeno molecular, de esta manera se genera un catión oxoamonio, que es el encargado de catalizar la oxidación del sustrato de interés.<sup>170</sup> En una segunda etapa tiene lugar el ataque nucleófilo del alcohol al ion oxoamonio, formando un aducto. Posteriormente, ocurre la desprotonación intermolecularmente en posición  $\alpha$  al enlace N–O generado debido a la presencia de una base externa, generándose el compuesto carbonílico deseado y la forma reducida del TEMPO (TEMPO-H). Finalmente, en la cuarta etapa, se produce la comproporción entre esta forma reducida del TEMPO y una molécula del ion oxoamonio, regenerando la especie catalítica (TEMPO), completándose así el ciclo.



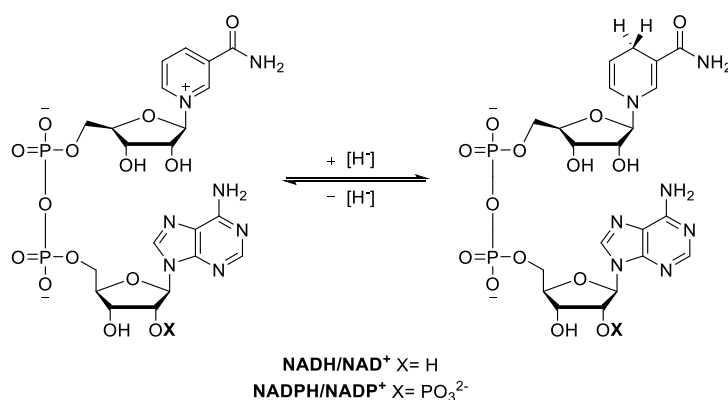
**Esquema 15.** Mecanismo de oxidación de un alcohol secundario empleando el sistema lacasa/TEMPO.

### 1.2.2 Alcohol deshidrogenasas (ADHs)

<sup>170</sup> (a) I. W. C. E. Arends, Y.-X. Li, R. Ausan, R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **2006**, 6659-6665; (b) S. A. Tromp, I. Matijosytè, R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, G. Mul, M. T. Kreutzer, J. A. Moulijn, S. de Vries, *ChemCatChem* **2010**, 2, 827-833.

## Bloque I. Introducción

Las ADHs, también conocidas como carbonil reductasas o ceterreductasas (*ketoreductases*, KREDs),<sup>33c,171</sup> son las enzimas más empleadas de la familia de las oxidorreductasas. Catalizan la reacción de reducción de cetonas o aldehídos a sus correspondientes alcoholes, así como el proceso reversible de oxidación dependiendo de las condiciones de reacción.<sup>172</sup> Para desempeñar su actividad catalítica las ADHs requieren la presencia de un cofactor de nicotinamida, el cual actúa como fuente o aceptor de hidruro. Este cofactor puede ser tanto el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), como el dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (NADPH) en sus formas reducidas (Figura 12).



**Figura 12.** Estructura de los cofactores NAD ( $X=H$ ) y NADP ( $X=PO_3^{2-}$ ) en su forma oxidada (izquierda) y reducida (derecha).

### 1.2.2.1 Sistemas de regeneración del cofactor

Este tipo de cofactores pirimidínicos requeridos por las ADHs son relativamente inestables y caros, por lo que su empleo en cantidades estequiométricas no es viable con fines prácticos. Así pues, se han desarrollado diferentes estrategias para producir *in situ* la regeneración de estos cofactores, haciendo posible su empleo en cantidades catalíticas.<sup>173</sup> De entre todas ellas se

<sup>171</sup> (a) H. Gröger, W. Hummel, S. Borchert, M. Krauß, *Reduction of Ketones and Aldehydes to Alcohols in Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed. Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, cap. 26; (b) J. An, Y. Nie, Y. Xu, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2019**, *39*, 366-379.

<sup>172</sup> (a) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120-126; (b) N. J. Turner, L. Humphreys, *Biocatalysis in Organic Synthesis: The Retrosynthesis Approach*, Royal Society of Chemistry, Cambridge (Reino Unido), **2018**.

<sup>173</sup> H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773-1789.

pueden distinguir métodos electroquímicos, fotoquímicos o de catálisis metálica.<sup>174</sup> Sin embargo, los más populares son los métodos enzimáticos,<sup>124b,175</sup> ya sean acoplando un cosustrato (Esquema 16, a) u otra enzima (Esquema 16, b).

- *Método del sustrato acoplado*: Es el sistema de regeneración del cofactor más simple donde un cosustrato reacciona mediante un proceso redox contrario al de la reacción principal, siendo ambas transformaciones catalizadas por la misma enzima. Lo más usual es emplear 2-propanol o etanol como cosustrato reducido, compuestos fácilmente accesibles y que experimentan su oxidación generando, respectivamente, acetona o acetaldehído que a su vez son fácilmente eliminables del medio de reacción. Sin embargo, el principal inconveniente de esta estrategia es la posible pérdida de la eficacia de la enzima debido a que su actividad tiene que dividirse en dos reacciones, la principal y la asociada al reciclaje del cofactor. Además, el empleo de elevadas concentraciones del sustrato auxiliar para desplazar el equilibrio de reacción en la dirección deseada hace que el proceso presente una pobre eficiencia atómica, pudiendo inactivar al biocatalizador. Por ello, se han desarrollado los denominados cosustratos inteligentes (*smart cosubstrates*), los cuales se emplean en cantidades prácticamente equimolares, y son capaces de desplazar el equilibrio de la reacción principal al formar especies muy estables de manera irreversible a través de una transformación secundaria.<sup>176</sup>
- *Método de la enzima acoplada*: En este caso la regeneración del cofactor se produce gracias a la intervención de una segunda enzima auxiliar que es capaz de transformar un cosustrato específico. Dicha reacción enzimática auxiliar transcurre de manera independiente a la biotransformación principal. Los ejemplos más comunes se basan en el empleo de una formiato

---

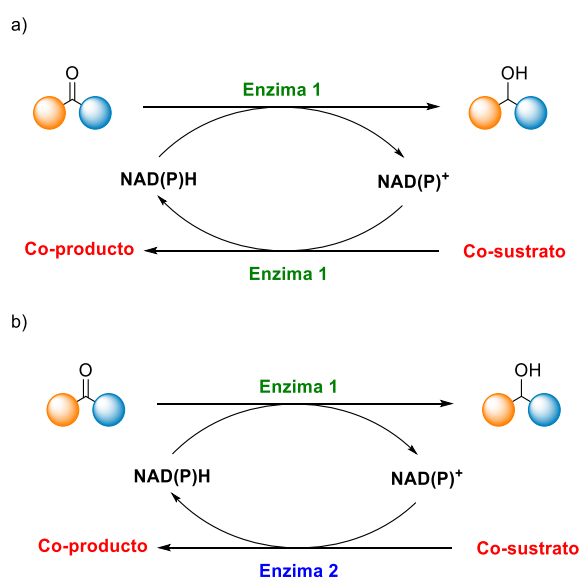
<sup>174</sup> Y. Cheng, Y. Wu, Z. Jiang, Y. Sun, Q. Huo, W. Li, Y. Zhao, J. Shi, *Non-conventional Cofactor Regeneration Systems en Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2021**, cap. 10.

<sup>175</sup> K. Goldberg, K. Schroer, S. Lutz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237-248.

<sup>176</sup> (a) S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, M. B. Ansorge-Schumacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1517-1529; (b) R. Zuhse, C. Leggewie, F. Hollmann, S. Kara, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 369-372; (c) A. Bornadel, R. Hatti-Kaul, F. Hollmann, S. Kara, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2442-2445; (d) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1618-1624; (e) S. N. Chanquia, L. Huang, G. G. Liñares, P. Domínguez de María, S. Kara, *Catalysts* **2020**, *10*, 1013.

## Bloque I. Introducción

deshidrogenasa (FDH) o una glucosa deshidrogenasa (GDH), transformando, mediante reacciones cuasi-irreversibles, el formiato en dióxido de carbono y la glucosa en glucono-1,5-lactona, que a su vez se hidroliza espontáneamente en el medio acuoso a ácido glucónico.

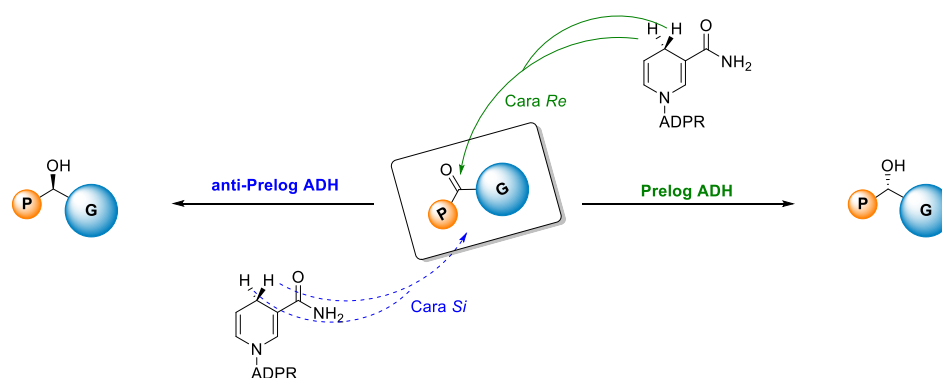


**Esquema 16.** Métodos de regeneración del cofactor utilizando el método del: a) sustrato acoplado; y b) enzima acoplada.

### 1.2.2.2 Selectividad de las ADHs

Una de las características más destacables de las ADHs es la estereoselectividad que son capaces de inducir en las reacciones en las que intervienen.<sup>177</sup> En este contexto, las ADHs catalizan la transferencia de un hidruro, proveniente de la forma reducida del cofactor pirimidínico, al carbonilo proquiral por una de sus caras, generando un alcohol secundario ópticamente activo (Esquema 17). Además, en procesos de oxidación de alcoholes racémicos son capaces de abstraer el hidruro en posición  $\alpha$  al grupo hidroxilo, pudiendo distinguir uno de los dos enantiómeros de la mezcla racémica.

<sup>177</sup> (a) M. M. Musa, R. S. Phillips, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1311-1323; (b) D. Romano, R. Villa, F. Molinari, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 739-749.



**Esquema 17.** Reducción estereoselectiva de una cetona proquiral siendo *P* el sustituyente pequeño y *G* el sustituyente grande.

La selectividad mostrada por las ADHs sigue, generalmente, la “regla de Prelog”, propuesta en el año 1964 por el propio Vladimir Prelog.<sup>178</sup> De esta manera, ADHs que catalicen la transferencia del hidruro a través de la cara *Re* de una cetona proquiral son consideradas de tipo “Prelog”, mientras que si lo hacen por la cara *Si* se denominan “anti-Prelog”. La mayoría de ADHs encontradas en la naturaleza siguen una selectividad de tipo “Prelog”, destacando los esfuerzos en años recientes para la creación de ADHs “anti-Prelog” gracias a los avances en técnicas de biología molecular.<sup>179</sup>

### 1.2.2.3 Tipos de ADHs

Las ADHs han sido clasificadas en tres grupos distintos en función de la longitud de su cadena de aminoácidos, estas son, las ADHs de cadena larga, las cuales presentan entre 600 y 750 aminoácidos, ADHs de cadena media, en torno a 350, mientras que las ADHs de cadena corta están constituidas por aproximadamente 250 unidades. Normalmente las de cadena media y corta son las más empleadas en procesos sintéticos y sus mecanismos de reacción han sido profundamente estudiados.<sup>180</sup>

- *ADHs de cadena media:* La gran mayoría son enzimas dependientes de  $Zn^{2+}$  y están formadas por dos dominios. En uno de ellos se produce la unión de

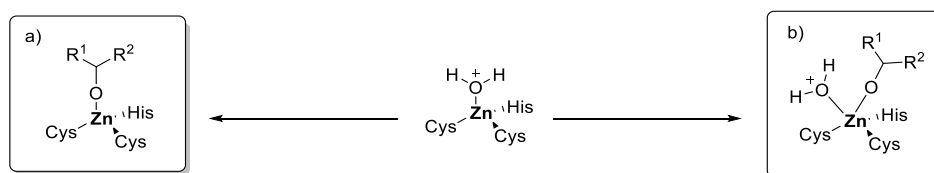
<sup>178</sup> V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9, 119-130.

<sup>179</sup> (a) C. M. Nealon, M. M. Musa, J. M. Patel, R. S. Phillips, *ACS Catal.* **2015**, 5, 2100-2114; (b) M. M. Musa, *ChemistryOpen* **2022**, e202100251.

<sup>180</sup> P. A. Frey, A. D. Hegeman, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, Nueva York (EE UU), **2007**.

## Bloque I. Introducción

la enzima con el cofactor y en el otro se une el sustrato, siendo este último dominio en el que se encuentra el centro activo de la enzima y el catión  $Zn^{2+}$ . Este átomo se encuentra tetracoordinado a dos residuos de cisteína, a uno de histidina y a una molécula de agua.<sup>181</sup> Existen dos hipótesis mediante las cuales esta especie tetracoordinada puede evolucionar; en una de ellas la molécula de agua es desplazada por el grupo hidroxilo del alcohol (en reacciones de oxidación) o por el carbonilo (en reacciones de reducción) (Figura 13, a); en la segunda opción se postula la formación de una especie pentacoordinada de zinc (Figura 13, b). Generalmente la hipótesis basada en el desplazamiento de la molécula de agua es la más aceptada.

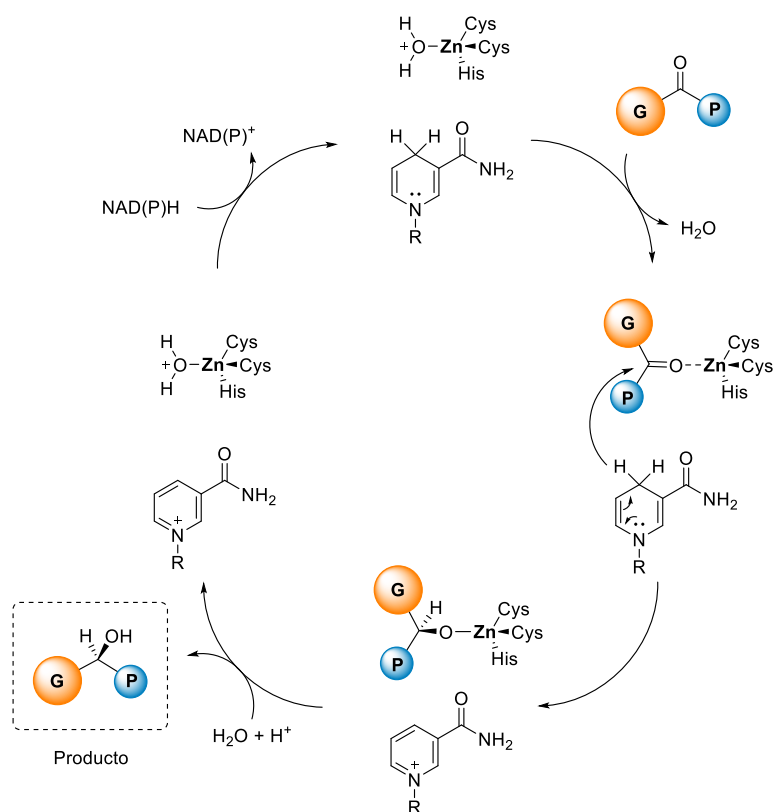


**Figura 13.** Coordinación del catión  $Zn^{2+}$  en las ADHs de cadena media a través de: a) la sustitución de la molécula de agua; o b) la formación de una especie pentacoordinada de Zn.

El mecanismo para este tipo de ADHs, en reacciones de reducción, comienza con el desplazamiento de la molécula de agua unida al  $Zn^{2+}$  del centro activo por parte del grupo carbonilo que se va a reducir. De esta manera se produce la activación del carbonilo por parte del catión  $Zn^{2+}$ , que actúa como un ácido de Lewis. Posteriormente se lleva a cabo la transferencia del hidruro desde el cofactor reducido  $[NAD(P)^+]$  al carbono carbonílico, reduciéndolo y formando un alcóxido que se encuentra unido al átomo de zinc. A continuación, ocurre el desplazamiento de dicho grupo por parte de una molécula de agua, y su protonación, ya sea gracias a otra molécula de agua o a un aminoácido con carácter ácido presente en el centro activo de la enzima, generándose de esta manera el alcohol deseado de manera enantioenriquecida (Esquema 18).

<sup>181</sup> R. Crichton, *Zinc-Lewis Acid and Gene Regulator en Biological Inorganic Chemistry: A New Introduction to Molecular Structure and Function*, Ámsterdam (Países Bajos), 2019, cap. 12.





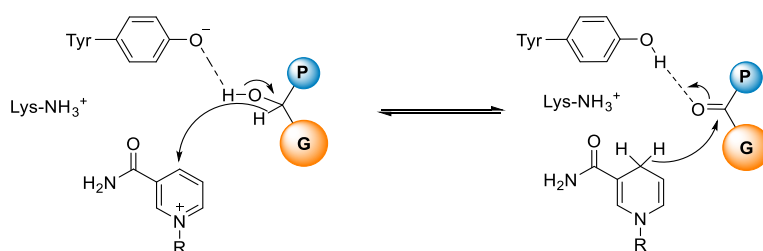
**Esquema 18.** Mecanismo de reducción de una cetona proquiral catalizada por una ADH de cadena media dependiente de Zn<sup>2+</sup> y con selectividad de tipo "Prelog".

- *ADHs de cadena corta:* Este tipo de enzimas no son dependientes de Zn ni de otros metales, aunque suelen presentar cationes Mg<sup>2+</sup> en su estructura, que estabilizan a estas proteínas frente a temperaturas elevadas y a cosolventes orgánicos. Se ha demostrado que al privar a la enzima de estos cationes se produce la inactivación de la misma, aunque su estructura cuaternaria permanezca prácticamente inalterada.<sup>182</sup> Es por ello que en este tipo de transformaciones la adición externa de cloruro de magnesio al medio de reacción sea recomendable. Desde un punto de vista mecanístico, destaca la acción de un residuo de tirosina para activar al sustrato. Dicho aminoácido debe encontrarse en su forma ionizada para abstraer el protón del alcohol que se oxida, o bien en su forma neutra para catalizar la reacción de

<sup>182</sup> N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813.

## Bloque I. Introducción

reducción, ya la que la tirosina cede un protón al alcóxido generado en la transformación (Esquema 19).



**Esquema 19.** Participación de un residuo de tirosina en el mecanismo de acción de una ADH de cadena corta.

### I.2.2.4 ADHs en síntesis orgánica

Las ADHs han sido ampliamente empleadas en síntesis orgánica debido a su elevada estereoselectividad, tanto para catalizar reacciones de oxidación de alcoholes como de reducción de grupos carbonilo bajo condiciones suaves de reacción.<sup>183</sup> Así, el empleo de ADHs supone una alternativa sostenible a la reacción de hidrogenación asimétrica de Noyori,<sup>184</sup> en la que normalmente se emplean elevadas presiones de hidrógeno y catalizadores de rutenio, si bien es cierto que en los últimos años se han desarrollado métodos basados en presencia de una base y/o un ácido en el medio de reacción, para llevar a cabo la reacción de hidrogenación en ausencia de una fuente externa de hidrógeno.<sup>185</sup>

Un ejemplo de la aplicación de ADHs en síntesis orgánica a gran escala es la síntesis del precursor del *Montelukast*, un fármaco desarrollado por Merck para el tratamiento de los síntomas del asma y alergias.<sup>186</sup> En este trabajo se describe la reducción asimétrica de una cetona estéricamente impedida empleando una ADH evolucionada por métodos de ingeniería de proteínas. De esta manera se obtuvo el alcohol intermedio enantiopuro (>99% *ee*) mostrado en el Esquema 20, con un rendimiento del 98% y a una escala preparativa de 230 kg.

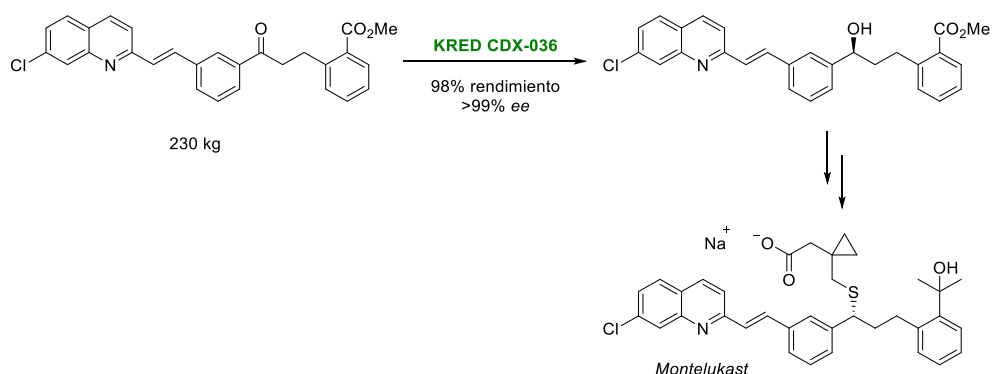
<sup>183</sup> (a) Z. Li, H. Yang, J. Liu, Z. Huang, F. Chen, *Chem. Rec.* **2021**, *21*, 1611-1630; (b) A. S. de Miranda, C. D. F. Milagre, F. Hollmann, *Front. Catal.* **2022**, *2*, 900554.

<sup>184</sup> R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008-2022.

<sup>185</sup> P. A. Dub, J. C. Gordon, *Nat. Rev. Chem.* **2018**, *2*, 396-408.

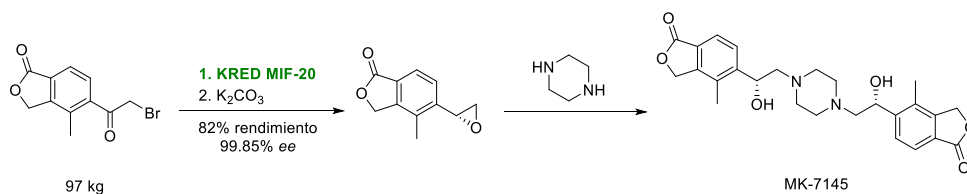
<sup>186</sup> J. Liang et al. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 193-198.

### Bloque I. Introducción



**Esquema 20.** Síntesis de un precursor del Montelukast empleando una ADH.

Otro ejemplo interesante que demuestra el potencial de este tipo de enzimas es la síntesis quimioenzimática del candidato a fármaco MK-7145, también desarrollado por la empresa Merck, el cual se emplea en el tratamiento de la hipertensión y la insuficiencia cardiaca.<sup>187</sup> La etapa clave de la ruta sintética de siete etapas consiste en la biorreducción de una  $\alpha$ -bromocetona intermedia catalizada por una ADH comercializada por Codexis, la cual da lugar a la correspondiente bromohidrina en forma enantiopura y que cicla intramolecularmente en presencia de carbonato de potasio (Esquema 21). Esta reacción enzimática fue llevada a cabo a una escala de 97 kg de la cetona de partida, obteniéndose el producto deseado con un rendimiento del 82% y con excelente estereoselectividad.



**Esquema 21.** Síntesis de un intermedio del candidato a fármaco MK-7145 empleando una ADH.

<sup>187</sup> R. T. Ruck, Q. Chen, N. Rivera, J. Kong, I. K. Mangion, L. Tan, F. J. Fleitz, *Org. Process Res. Dev.* **2021**, *25*, 405-410.



*Antecedentes*



Los alcoholes propargílicos constituyen una familia de compuestos muy útiles y recurrentemente empleados en síntesis orgánica debido a la presencia de dos grupos funcionales muy versátiles en su estructura, como son el alcohol y el triple enlace del alquino. Este tipo de compuestos han sido empleados como precursores, entre otros, de derivados heterocíclicos<sup>188</sup> o aromáticos,<sup>189</sup> algunos de ellos con interesantes propiedades antitumorales.<sup>190</sup> Especialmente destaca su papel como sustratos de partida en el campo de la catálisis metálica para realizar distintos tipos de transformaciones.<sup>191</sup> Entre todas las reacciones que pueden experimentar los alcoholes propargílicos, este primer capítulo abordará su proceso de oxidación así como la reducción asimétrica de las correspondientes cetonas propargílicas (también llamadas inonas o alquinonas), por lo que a continuación se mostrarán algunos antecedentes bibliográficos de este tipo de transformaciones.

### *1.3 Oxidación de alcoholes propargílicos*

La reacción de oxidación de los alcoholes propargílicos es un proceso delicado por la presencia del triple enlace, pudiendo ocurrir la formación de diversos subproductos a través de reacciones competitivas indeseadas. Por ello, para abordar esta transformación, es necesario diseñar metodologías altamente selectivas bajo condiciones suaves de reacción.

---

<sup>188</sup> J.-C. Tseng, J.-H. Chen, T.-Y. Luh, *Synlett* **2006**, 1209-1212.

<sup>189</sup> X. Zhang, S. Sarkar, R. C. Larock, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 236-243.

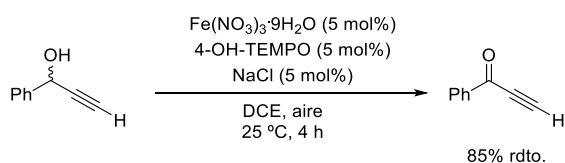
<sup>190</sup> (a) N. G. Kundu, J. S. Mahanty, C. P. Spears, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1497-1502; (b) R. M. Adlington, J. E. Baldwin, G. J. Pritchard, K. C. Spencer, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 575-578.

<sup>191</sup> (a) H. Qian, D. Huang, Y. Bi, G. Yan, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 3240-3280; (b) G. R. Kumar, M. Rajesh, S. Lin, S. Liu, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 5238-5256; (c) S. Du, A.-X. Zhou, R. Yang, X.-R. Song, Q. Xiao, *Org. Chem. Front.* **2021**, *8*, 6760-6782.

## Bloque I. Antecedentes

### 1.3.1 Oxidación de alcoholes propargílicos mediante métodos no enzimáticos

En cuanto a la oxidación de este tipo de compuestos empleando catalizadores metálicos destacan aquellos basados en vanadio,<sup>192</sup> cobalto,<sup>193</sup> cobre,<sup>194</sup> y rutenio.<sup>195</sup> También destaca la combinación de catalizadores de hierro, generalmente de Fe(III), con el agente radicalario TEMPO o sus derivados.<sup>196</sup> Un ejemplo reciente es el trabajo descrito por Ma y colaboradores,<sup>197</sup> en el que se emplea nitrato de hierro(III) y 4-hidroxi-TEMPO (4-OH-TEMPO) en presencia de cantidades subestequiométricas de cloruro de sodio a temperatura ambiente (Esquema 22), donde el uso del 4-OH-TEMPO, en detrimento del TEMPO, supone una gran ventaja desde el punto de vista económico en la aplicación industrial del proceso. Este proceso oxidativo ha sido llevado a cabo con éxito para la síntesis de 1-fenilprop-2-in-1-ona (85%), entre otras alquinonas.



**Esquema 22.** Oxidación de un alcohol propargílico empleando un catalizador de Fe(III) y 4-OH-TEMPO.

Adicionalmente al empleo de catalizadores metálicos, también se han descrito otros métodos catalíticos para llevar a cabo la oxidación de alcoholes propargílicos utilizando, por ejemplo, derivados de ABNO como el *N*-oxyl 3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonano (3-BocNH-ABN), nitrito de sodio como cocatalizador y ácido acético como disolvente en condiciones aeróbicas,<sup>198</sup> así

<sup>192</sup> (a) Y. Maeda, N. Kakiuchi, S. Matsumura, T. Nishimura, T. Kawamura, S. Uemura, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6718-6724; (b) A. T. Radosevich, C. Musich, F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1090-1091; (c) S. K. Hanson, R. Wu, L. A. P. Silks, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1908-1911.

<sup>193</sup> (a) V. B. Sharma, S. L. Jain, B. Sain, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 383-386; (b) G. Blay, L. Cardona, I. Fernández, J. R. Pedro, *Synthesis* **2007**, 3329-3332.

<sup>194</sup> (a) K. C. Weerasiri, A. E. V. Gorden, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1546-1550; (b) W. Lv, J. Tian, N. Deng, Y. Wang, X. Zhu, X. Yao, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1312-1316.

<sup>195</sup> (a) K. Masutani, T. Uchida, R. Irie, T. Katsuki, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5119-5123; (b) M. R. Patil, A. R. Kapdi, A. V. Kumar, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 3264-3278.

<sup>196</sup> (a) S. Ma et al. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1005-1017; (b) J. Liu, X. Xie, S. Ma, *Synthesis* **2012**, *44*, 1569-1576; (c) D. Zhai, L. Chen, M. Jia, S. Ma, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *360*, 153-160; (d) J. E. Nutting, K. Mao, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10565-10570.

<sup>197</sup> X. Jiang, J. Liu, S. Ma, *Org. Process Rev. Dev.* **2019**, *23*, 825-835.

<sup>198</sup> Y. Zhao, Y. Li, Z. Shen, X. Hu, B. Hu, L. Jin, N. Sun, M. Li, *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 150994.



como métodos fotoquímicos basados en el empleo de 2-bromoantraquinona como fotocatalizador.<sup>199</sup>

Además de los métodos catalíticos previamente expuestos, también se han descrito métodos de oxidación selectivos usando reactivos en cantidades estequiométricas, como el óxido de manganeso,<sup>200</sup> el periodinano de Dess-Martin,<sup>201</sup> o compuestos derivados de cromo como el PCC.<sup>202</sup> Sin embargo, la gran mayoría de estos procesos oxidativos, tanto catalíticos como estequiométricos, requieren del empleo de disolventes orgánicos, temperaturas elevadas o la presencia de aditivos o catalizadores metálicos que pueden inhibir posteriores etapas biocatalíticas para desarrollar, por ejemplo, desracemizaciones.

### 1.3.2 Oxidación de alcoholes propargílicos mediante métodos (químico)enzimáticos

Nuestro grupo de investigación ha estudiado ampliamente la oxidación de alcoholes activados, por ejemplo, en posiciones bencílicas y alílicas, utilizando el sistema lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO.<sup>203</sup> Sin embargo, la oxidación de alcoholes propargílicos mediante métodos enzimáticos no había sido explorada hasta la fecha por nuestra parte. Este proceso no tiene muchos precedentes en la bibliografía, destacando un primer ejemplo descrito por Riva y colaboradores en el que se empleó el sistema lacasa/TEMPO para producir la oxidación de un alcohol propargílico en la síntesis del alcaloide (+)-aloperina, obteniéndose la cetona deseada con un 95% de rendimiento aislado mediante el uso de 10 U de la lacasa de

---

<sup>199</sup> S. Liao, J. Liu, L. Yan, Q. Liu, G. Chen, L. Ma, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 37014-37022.

<sup>200</sup> Y. Aida, Y. Shibata, K. Tanaka, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 2617-2626.

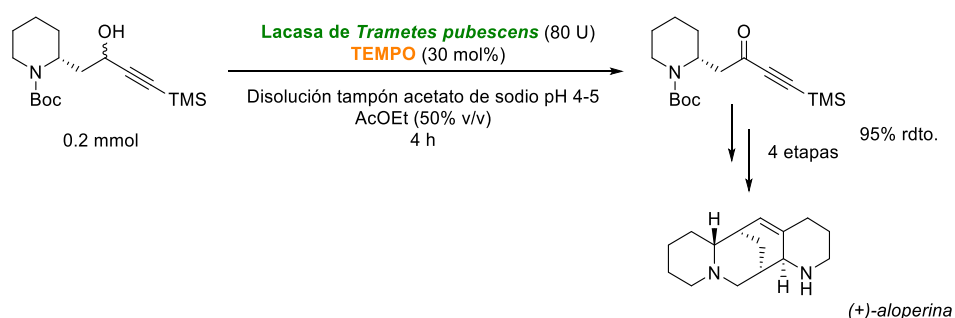
<sup>201</sup> (a) Y. Dai, F. Ma, Y. Shen, T. Xie, S. Gao, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 2872-2875; (b) M. Satoh, Y. Shibata, K. Tanaka, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 5434-5438.

<sup>202</sup> (a) R. S. Menon, M. G. Banwell, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5483-5485; (b) Y. Suganuma, S. Tanabe, Y. Sugihara, Y. Kobayashi, *Tetrahedron* **2018**, *74*, 1151-1159; (c) F. Romanov-Michailidis, B. D. Ravetz, D. W. Paley, T. Rovis, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5370-5374.

<sup>203</sup> (a) K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2448-2453; (b) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Green Chem.* **2017**, *19*, 474-480; (c) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 2413-2419; (d) J. Albarrán-Velo, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 200-211.

## Bloque I. Antecedentes

*Trametes pubescens* y un 30 mol% de TEMPO en medio acuoso pero con un alto porcentaje (50% v/v) de AcOEt como cosolvente (Esquema 23).<sup>204</sup>



**Esquema 23.** Primera reacción de oxidación de un alcohol propargílico empleando el sistema lacasa/TEMPO.

En un ejemplo más reciente y posterior al mostrado en esta Tesis Doctoral, se estudió la oxidación aeróbica de doce alcoholes propargílicos empleando 9.6 U de la lacasa de *Trametes versicolor* y un 5 mol% de TEMPO, obteniéndose generalmente elevados rendimientos aislados (69-100%) en la síntesis de cetonas propargílicas alifáticas, aromáticas y heteroaromáticas (Esquema 24).<sup>205</sup>



**Esquema 24.** Oxidación de alcoholes propargílicos empleando la lacasa de *Trametes versicolor* y TEMPO.

<sup>204</sup> A. Barilli, F. Belinghieri, D. Passarella, G. Lesma, S. Riva, A. Silvani, B. Danieli, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2921-2925.

<sup>205</sup> A. B. V. Silva, E. D. Silva, A. A. dos Santos, J. L. Princival, *Catal. Commun.* **2020**, *137*, 105946.

#### 1.4 Obtención de alcoholes propargílicos ópticamente activos mediante la reducción estereoselectiva de cetonas propargílicas

El acceso biocatalítico a alcoholes propargílicos en forma ópticamente activa se ha descrito principalmente a través de dos metodologías que emplean bien lipasas o ADHs como biocatalizadores. En el caso de las primeras, las resoluciones cinéticas, tanto clásicas<sup>206</sup> como dinámicas<sup>207</sup> de los derivados racémicos, han sido el método más empleado, destacando el uso de la lipasa de *Candida antarctica* en procesos de acetilación en disolventes orgánicos. Debido a la necesidad de trabajar en medio acuoso para el desarrollo de procesos enzimáticos de desracemización de alcoholes, nos centraremos a continuación en la reducción estereoselectiva de cetonas propargílicas basada tanto en métodos enzimáticos como no enzimáticos.

##### 1.4.1 Reducción de cetonas propargílicas empleando métodos no enzimáticos

En cuanto a la reducción estereoselectiva de este tipo de compuestos empleando métodos no enzimáticos, destaca el empleo de compuestos de boro como agentes reductores.<sup>208</sup> En este contexto, Corey y colaboradores describieron por primera vez el empleo de cantidades catalíticas de una oxazaborolidina como catalizador y un borano para llevar a cabo la reducción de distintas cetonas propargílicas con, generalmente, excelentes conversiones y elevados excesos enantioméricos (Esquema 25).<sup>209</sup> Esta reacción es conocida en síntesis orgánica como la reacción de reducción de Corey-Bakshi-Shibata, permitiendo en este caso, la reducción quimioselectiva del grupo carbonilo, dejando inalterado el alquino.

---

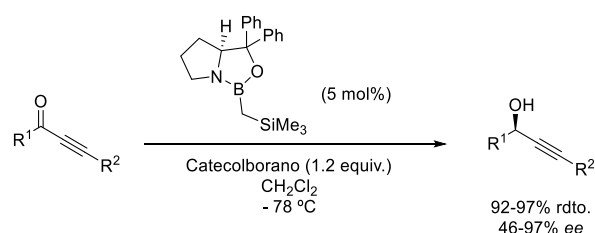
<sup>206</sup> (a) B. I. Glänzer, K. Faber, H. Griengl, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5791-5796; (b) J. A. Smulik, S. T. Diver, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1788-1792; (c) C. Raminelli, N. C. da Silva, A. A. Dos Santos, A. L. M. Porto, L. H. Andrade, J. V. Comasseto, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 409-415; (d) P. Chen, X. Zhu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *97*, 184-188; (e) J. G. Ferreira, C. R. Princival, D. M. Oliveira, R. X. Nascimento, J. L. Princival, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6458-6462; (f) J. G. Hernández, M. Frings, C. Bolm, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1769-1772.

<sup>207</sup> (a) H. Kim, Y. K. Choi, J. Lee, E. Lee, J. Park, M.-J. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10944-10948; (b) S. Kawanishi, S. Oki, D. Kundu, S. Akai, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2978-2982.

<sup>208</sup> (a) M. M. Midland, A. Tramontano, A. Kazubski, R. S. Graham, D. J. S. Tsai, D. B. Cardin, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1371-1380; (b) S. Desrat, P. van de Weghe, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6728-6734; (c) S. Eagon, C. DeLieto, W. J. McDonald, D. Haddenham, J. Saavedra, J. Kim, B. Singaram, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7717-7725.

<sup>209</sup> C. J. Helal, P. A. Magriotis, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10938-10939.

## Bloque I. Antecedentes



**Esquema 25.** Reducción asimétrica de cetonas propargílicas empleando una oxazaborolidina en presencia de un borano.

Adicionalmente, se han descrito varias aproximaciones para llevar a cabo la reducción estereoselectiva de este tipo de cetonas empleando catalizadores derivados de metales de transición como rutenio,<sup>210</sup> galio e indio.<sup>211</sup> Otra estrategia destacada para llevar a cabo la reducción de cetonas propargílicas consiste en el proceso de hidroboreación asimétrica que combina el uso del pinacolborano con catalizadores de lantano,<sup>212</sup> manganeso<sup>213</sup> o magnesio.<sup>214</sup>

### I.4.2 Reducción de cetonas propargílicas empleando métodos enzimáticos

La reducción enzimática de cetonas propargílicas empleando ADHs ha sido ampliamente estudiada por distintos grupos de investigación debido a la necesidad de desarrollar metodologías respetuosas con el medio ambiente que permitan la obtención de estos alcoholes ópticamente activos bajo condiciones suaves de reacción.<sup>215</sup> Uno de los trabajos pioneros en este campo fue el propuesto por Wong y colaboradores,<sup>216</sup> basado en el uso de la ADH de *Lactobacillus kefir* (LK-ADH) para sintetizar distintos alcoholes propargílicos con buenos excesos enantioméricos

<sup>210</sup> D. Morris, A. Hayes, M. Wills, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7035-7044.

<sup>211</sup> A. J. Blake, A. Cunningham, A. Ford, S. J. Teat, S. Woodward, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3586-3594.

<sup>212</sup> Y. Sun, C. Lu, B. Zhao, M. Xue, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 10504-10513.

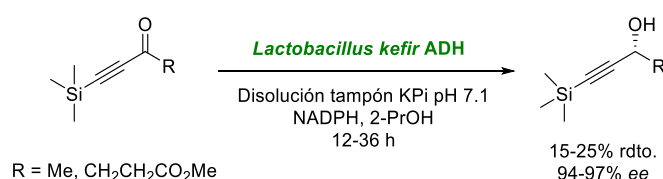
<sup>213</sup> V. Vasilenk, C. K. Blasius, H. Wadepohl, L. H. Gade, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8393-8397.

<sup>214</sup> A. Falconnet, M. Magre, B. Maity, L. Cavallo, M. Rueping, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 17567-17571.

<sup>215</sup> (a) C. Heiss, M. Laivenieks, J. G. Zeikus, R. S. Phillips, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1659-1666; (b) T. Schubert, W. Hummel, M.-R. Kula, M. Müller, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4181-4187; (c) T. Schubert, W. Hummel, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 634-637; (d) R. van Deursen, W. Stampfer, K. Edegger, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *31*, 159-163; (e) A. Jakoblinnert, R. Mladenov, A. Paul, F. Sibilla, U. Schwaneberg, M. B. Ansorge-Schumacher, P. Domínguez de María, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12230-12232; (f) M. Hamzic, J. Pietruszka, D. Sandkhul, *Chirality* **2011**, *23*, E110-E115; (g) A. Cuetos, F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2625-2627; (h) C. Holec, D. Sandkuhl, D. Rother, W. Kroutil, J. Pietruszka, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3125-3130.

<sup>216</sup> C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532-1536.

(Esquema 26), si bien con bajas conversiones puesto que los procesos no fueron optimizados en términos de cantidad de enzima y tiempos de reacción.



**Esquema 26.** Reducción asimétrica de cetonas propargílicas empleando la ADH de *Lactobacillus kefir*.

### 1.5 Desracemización enzimática de alcoholes propargílicos

Aunque existen diversos métodos enzimáticos para la obtención de alcoholes propargílicos enantioenriquecidos, las estrategias de desracemización de este tipo de compuestos apenas han sido abordadas. Por el contrario, existen múltiples ejemplos en la bibliografía acerca de estrategias (quimio)enzimáticas para la desracemización de muy diversas familias de alcoholes<sup>217</sup> y aminas.<sup>218</sup> Los trabajos pioneros en la desracemización de alcoholes propargílicos mediante métodos enzimáticos se centraron en el empleo de células enteras de microorganismos de *Nocardia fusca* o *Nocardia pseudosporangifera*,<sup>219</sup> y de *Candida parapsilosis* ATC7330.<sup>220</sup> Más recientemente, Zhang y colaboradores han descrito un proceso secuencial de desracemización empleando una peroxigenasa para la oxidación de una serie de alcoholes propargílicos, y distintas ADHs para la reducción estereoselectiva de las cetonas intermedias (Esquema 27).<sup>221</sup> Esta aproximación estereodivergente se centra en una primera etapa de oxidación no

<sup>217</sup> (a) C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 741-745; (b) D. Méndez-Sánchez, J. Mangas-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 4016-4020; (c) Y. Okamoto, V. Köhler, T. T. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5781-5784; (d) J. Albarrán-Velo, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Mol. Catal.* **2020**, *493*, 111087.

<sup>218</sup> (a) R. Carr, M. Alexeeva, M. J. Dawson, V. Gotor-Fernández, C. E. Humphrey, N. J. Turner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 637-639; (b) E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri, J. Hopwood, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2447-2450; (c) S. Yoon, M. D. Patil, S. Sarak, H. Jeon, G.-H. Kim, T. P. Khobragade, S. Sung, H. Yun, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 1898-1902; (d) S.-W. Han, Y. Jang, J.-S. Shin, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 6945-6954; (e) S. Nakano, K. Kozuka, Y. Minamino, H. Karasuda, F. Hasebe, S. Ito, *Commun. Chem.* **2020**, *3*, 181-192.

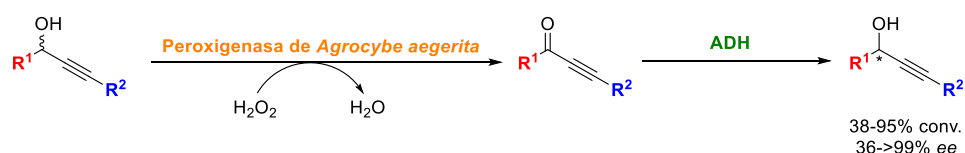
<sup>219</sup> J. Ogawa, S.-X. Xie, S. Shimizu, *Biotechnol. Lett.* **1999**, *21*, 331-335.

<sup>220</sup> (a) T. Saravanan, A. Chadha, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2973-2980; (b) T. Saravanan, S. Jana, A. Chadha, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 4682-4690.

<sup>221</sup> X. Sang et al. *Org. Lett.* **2022**, *24*, 4252-4257.

## Bloque I. Antecedentes

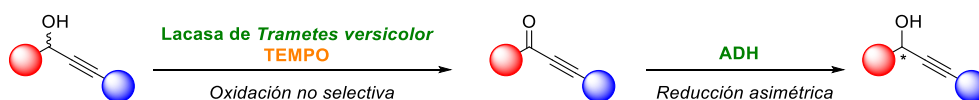
selectiva catalizada por la peroxigenasa de *Agrocybe aegerita*, que requiere de la presencia de peróxido de hidrógeno para llevar a cabo dicho proceso, y una segunda de reducción que emplea la ADH (*R*)-selectiva de *Lactobacillus kefir* o bien la (*S*)-selectiva de *Thermoanaerobacter brokii*. Gracias a esta metodología se obtuvieron los alcoholes propargílicos con conversiones comprendidas entre el 38% y el 95%, y excesos enantioméricos generalmente elevados.



**Esquema 27.** Desracemización de alcoholes propargílicos mediante la combinación secuencial de una peroxigenasa y una ADH.

Con estos antecedentes nos hemos propuesto en este capítulo:

- Sintetizar una familia de alcoholes propargílicos racémicos a partir de sustratos fácilmente accesibles y de una manera lo más general posible.
- Desarrollar su oxidación en condiciones sostenibles empleando el sistema lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO en medio acuoso.
- Estudiar y optimizar el proceso de biorreducción de estas cetonas propargílicas empleando ADHs estereocomplementarias con el fin de acceder a ambos enantiómeros de los alcoholes propargílicos.
- Investigar la viabilidad de los procesos de desracemización de los alcoholes propargílicos mediante la combinación del sistema oxidativo no selectivo compuesto por la lacasa y el TEMPO, seguido de la biorreducción de las cetonas intermedias usando ADHs (Esquema 28).



**Esquema 28.** Combinación del sistema lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO y una ADH para llevar a cabo la desracemización de una serie de alcoholes propargílicos.

## *Resultados y discusión*





A continuación, se describe el desarrollo de un proceso secuencial quimioenzimático de desracemización de alcoholes propargílicos.<sup>222</sup> Para ello, esta aproximación constará de una primera etapa de oxidación no selectiva de 1-arilprop-2-in-1-oles empleando el sistema lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO y una segunda etapa de biorreducción asimétrica de las cetonas intermedias catalizada por una ADH. La optimización de ambos procesos por separado, y el estudio de condiciones de reacción compatibles serán claves para poder desarrollar una metodología general y eficiente de desracemización con el fin de acceder a los alcoholes deseados con buenos rendimientos y excesos enantioméricos.

Ya que esta Tesis Doctoral se presenta como un compendio de publicaciones, la numeración de los compuestos descritos, así como la numeración de los esquemas y tablas se refieren al trabajo en que se ha descrito esta investigación,<sup>222</sup> y que se muestra a continuación de esta sección.

### *1.1 Estudio y optimización de la reacción de oxidación de alcoholes propargílicos derivados de 1-arilprop-2-in-1-oles*

En primer lugar, se estudió la reacción de oxidación del 1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**) empleando el sistema lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO (Tabla 1) empleando las condiciones de reacción previamente optimizadas por nuestro grupo de investigación (50 mM de **1a**, 30 mol% de TEMPO, 5 U de la lacasa de *Trametes versicolor*, TBME como cosolvente orgánico (10% v/v) y una disolución tampón de citrato de una concentración de 50 mM a pH 5.0 previamente oxigenada). Tras 16 h a 30 °C, se obtuvo la 1-fenilprop-2-in-1-ona (**2a**) con una conversión del 91% sin observarse ningún subproducto de reacción (entrada 1). Una optimización de las condiciones de reacción en términos de tiempo, carga de TEMPO, temperatura y concentración de **1a** condujo a la cetona **2a** con una conversión cuantitativa y un rendimiento aislado del 93% tras columna cromatográfica (entrada 5).

La eficacia de este proceso fue demostrada por comparación con procesos de oxidación tradicionales que se reflejan en la Tabla 2, empleando como agentes oxidantes el dióxido de manganeso (MnO<sub>2</sub>), el reactivo de Jones o el periodinano de Dess-Martin, todos ellos conduciendo a rendimientos aislados inferiores (19-86%).

---

<sup>222</sup> S. González-Granda, D. Méndez-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 520-527.

## Capítulo 1. Resultados y discusión

Además, como medida de la sostenibilidad de la metodología se calculó el factor-E,<sup>11</sup> para cada uno de estos procesos oxidativos (Figura S2 del material suplementario), resultando la aproximación quimioenzimática con valores entre 3.4 y 8.9 veces mejores que el resto de las metodologías estudiadas.

A continuación, se aplicó esta metodología de oxidación quimioenzimática a la obtención de distintas cetonas propargílicas **2a-n**, siendo necesaria la síntesis química de los alcoholes propargílicos **1a-n** mediante reacción de los correspondientes aldehídos aromáticos con reactivos de Grignard. Esta metodología de oxidación fue compatible con la presencia de muy diversas funcionalidades que se detallan en la Tabla 3, incluyendo la presencia tanto de triples enlaces terminales como disustituidos (**2a** y **2b**), grupos electrón dadores (**2c-e,k**) o electrón atractores en el anillo aromático (**2f-j,l**), decayendo la conversión ligeramente cuando se empleó un sustituyente fuertemente electrón atractor como es un grupo nitro (**2l**). También puede destacarse que la posición de los sustituyentes en el anillo aromático no tuvo influencia en los resultados obtenidos (**2c-e** o **2f,g**), alcanzándose también conversiones elevadas al emplear un alcohol propargílico que no se encontraba en posición bencílica (**1n**), es decir, sin encontrarse doblemente activado.

### 1.2 Estudio y optimización de la reacción de biorreducción de las cetonas propargílicas **2a-n**

Una vez optimizada la etapa de oxidación quimioenzimática, se realizó el estudio de la reacción de biorreducción de la cetona propargílica modelo **2a**. Para ello se emplearon las ADHs como células enteras liofilizadas, ya fueran (*S*)-selectivas provenientes de *Ralstonia* species (*RasADH*),<sup>223</sup> *Sphingobium yanoikuyae* (*SyADH*),<sup>224</sup> *Thermoanaerobacter* species (*ADH-T*),<sup>225</sup> *Thermoanaerobacter ethanolicus* (*TeSADH*)<sup>215a</sup> y *Rhodococcus ruber* (*ADH-A*),<sup>226</sup> o (*R*)-selectivas de

---

<sup>223</sup> I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6003-6005.

<sup>224</sup> I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155-2158.

<sup>225</sup> Z. Findrik, D. Vasic-Rački, S. Lütz, T. Daussmann, C. Wandrey, *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1087-1095.

<sup>226</sup> W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014-1017.

*Lactobacillus brevis* (LbADH)<sup>227</sup> y la ADH comercial evo-1.1.200.<sup>228</sup> Para estas reacciones de biorreducción se emplearon las condiciones previamente optimizadas en nuestro grupo de investigación: 25 mM de **2a**, DMSO como cosolvente orgánico (2.5% v/v), una disolución tampón 50 mM de Tris·HCl a pH 7.5 y el cofactor NAD(P)H (1 mM), el cual es regenerado mediante el método de la enzima acoplada (GDH), o mediante el método del sustrato acoplado (2-PrOH), dependiendo de la enzima empleada en cada caso. Tras 24 h a 30 °C, se obtuvo el alcohol (*S*)- y (*R*)-**1a** de manera cuantitativa y enantiopura, mediante el uso de la *RasADH* o la evo-1.1.200 respectivamente (Esquema 3 y Tabla S2 del material suplementario).

Este proceso fue extendido con éxito a la reducción de las cetonas **2b-n** empleando ambos biocatalizadores (Tabla 4). En el caso de la *RasADH* los valores de conversión fueron muy elevados en todos los casos (98->99%), al igual que las selectividades con la excepción del sustrato con el grupo metilo unido al triple enlace (**1b**, 85% *ee*), cuando se dispuso un grupo fuertemente electrón atractor en el anillo aromático (**1l**, R= 4-NO<sub>2</sub>, 88% *ee*), y especialmente al emplear la cetona con un sustituyente bencilo (**2n**, <3% *ee*). Al igual que en el caso de la *RasADH*, la evo-1.1.200 condujo a elevadas conversiones en todos los casos, sin embargo, los excesos enantioméricos obtenidos resultaron más dispares. Generalmente, se obtuvieron los (*R*)-alcoholes con purezas ópticas altas (88-99% *ee*), salvo en el caso de la presencia de grupos electrón dadores en el anillo aromático (**1c-e**, R= OMe, 62-73% *ee*, entradas 3-5). Por otro lado, la presencia de átomos voluminosos en la posición 2 del anillo (**1i,j**, R= 2-Br y 2-Br,5-F, entradas 9 y 10) condujo a los enantiómeros *S* aunque con bajas selectividades (21-34% *ee*).

### 1.3 Estudio y optimización del proceso de desracemización quimioenzimática de los alcoholes propargílicos

Una vez optimizadas ambas etapas, se diseñó un proceso secuencial para la desracemización de este tipo de alcoholes en un mismo recipiente de reacción. Hay que tener en cuenta que los procesos óptimos de oxidación y reducción transcurrieron en condiciones óptimas distintas:

<sup>227</sup> S. Leuchs, L. Greiner, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, 25, 267-281.

<sup>228</sup> S. Kara, D. Spickermann, A. Weckbecker, C. Leggewie, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2014**, 6, 973-976.

## Capítulo 1. Resultados y discusión

- pH del medio: el sistema lacasa/TEMPO de la etapa de oxidación ocurrió a un pH cercano a 5.0, mientras que la biorreducción fue optimizada a pH 7.5.
- disolución tampón: la oxidación se realizó en una disolución reguladora de citrato, mientras que la biorreducción transcurrió en un tampón de Tris·HCl.
- sistema de regeneración del cofactor requerido por las ADHs: la presencia del sistema lacasa/TEMPO en el medio de reacción puede oxidar alcoholes primarios de mono y disacáridos,<sup>229</sup> por lo que el sistema de regeneración del cofactor basado en glucosa/GDH puede verse inactivado, siendo un factor a tener en cuenta. También la utilización de grandes cantidades de 2-propanol, necesario para el caso de muchas de las ADHs estudiadas, puede inactivar el sistema lacasa/TEMPO.

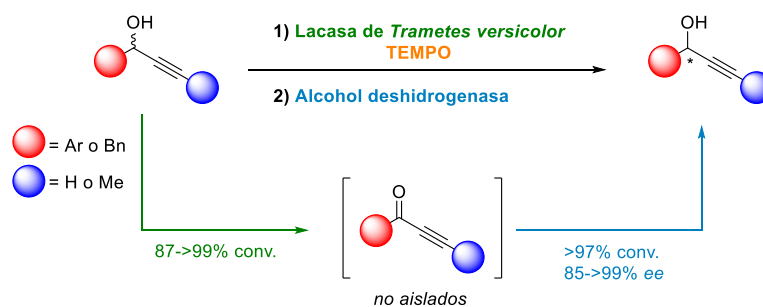
Con el fin de evaluar la influencia de estos factores en el proceso, se realizó un estudio de las reacciones de biorreducción empleando la *RasADH* y evo-1.1.200 como biocatalizadores. En este estudio se variaron las concentraciones de **2a** (25 o 50 mM), y las disoluciones tampón empleadas, tanto la composición como el pH de estas, buscando unas condiciones de compromiso que pudieran ser compatibles para ambas etapas (Tabla 5). Sin embargo, se observó que las biorreducciones no ocurrían con buenas conversiones a pHs ácidos (entradas 1-4), por lo que se optó por una aproximación secuencial. Así, los mejores resultados se obtuvieron al emplear una concentración de **1a** de 25 mM para la etapa oxidativa, momento en el cual se adicionaron el cofactor pirimidínico y su sistema de regeneración (glucosa/GDH o 2-PrOH), y una cantidad de una disolución acuosa de NaOH 3 M con el fin de ajustar el pH del medio a un valor comprendido entre 7.5 y 8.0, así como la correspondiente ADH. Así, tras 24 h a 30 °C, se obtuvieron ambos enantiómeros del alcohol **1a** de manera cuantitativa y enantiopura (entradas 5 y 6). Tras seleccionar aquellos casos donde las ADHs fueron altamente selectivas, como son los sustratos con un sustituyente metoxi en el anillo aromático (**1c-e**) y el derivado con un átomo de bromo en la posición *orto* del anillo (**1i**), se desarrollaron sus desracemizaciones con perfectos resultados (Tabla 6). El experimento a escala semipreparativa partiendo de **1a** (50 mg) resultó exitoso obteniéndose un rendimiento aislado tras columna cromatografía del 79% en el caso de (*S*)-**1a** (*RasADH*) y del 83% para (*R*)-**1a** (evo-1.1.200), ambos obtenidos con un 98% *ee*.

---

<sup>229</sup> M. Marzorati, B. Danieli, D. Haltrich, S. Riva, *Green Chem.* **2005**, 7, 310-315.

En definitiva, se puede concluir que en este capítulo:

- Se ha desarrollado una metodología quimioenzimática para oxidar catorce alcoholes propargílicos empleando el sistema catalítico formado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el TEMPO, y generando de esta manera las correspondientes cetonas propargílicas **2a-n** con elevadas conversiones (>87%). Este sistema ha demostrado ser más sostenible que otros procesos clásicos oxidativos como el empleo de MnO<sub>2</sub>, reactivo de Jones o periodinano de Dess-Martin.
- Se han encontrado ADHs eficientes para el proceso de biorreducción de estas cetonas, accediendo a los correspondientes 1-arylprop-2-in-1-oles **1a-n** con excelentes conversiones (>97%) y selectividades (normalmente >88% *ee*).
- La posibilidad de combinar ambos procesos en medio acuoso ha permitido el desarrollo de un proceso de desracemización secuencial de los alcoholes propargílicos en un mismo recipiente de reacción (Esquema 29). De esta manera se han obtenido cinco alcoholes propargílicos (**1a,c-e,i**) con excelentes selectividades (>98% *ee*), a través de un proceso reproducible y fácilmente escalable.



**Esquema 29.** Combinación secuencial del sistema lacasa/TEMPO junto con ADHs para la desracemización de alcoholes propargílicos.



*Artículo de investigación*







# Laccase-mediated Oxidations of Propargylic Alcohols. Application in the Deracemization of 1-arylprop-2-yn-1-ols in Combination with Alcohol Dehydrogenases

Sergio González-Granda,<sup>[a]</sup> Daniel Méndez-Sánchez,<sup>[a, b]</sup> Iván Lavandera,<sup>\*[a]</sup> and Vicente Gotor-Fernández<sup>\*[a]</sup>

Dedicated to Professor Marko D. Mihovilovic on occasion of his 50<sup>th</sup> birthday.

The catalytic system composed by the laccase from *Trametes versicolor* and the oxy-radical TEMPO has been successfully applied in the sustainable oxidation of fourteen propargylic alcohols. The corresponding propargylic ketones were obtained in most cases in quantitative conversions (87–>99% yield), demonstrating the efficiency of the chemoenzymatic methodology in comparison with traditional chemical oxidants, which usually lead to problems associated with the formation of by-products. Also, the stereoselective reduction of propargylic ketones was studied using alcohol dehydrogenases such as the one from *Ralstonia* species overexpressed in *E. coli* or the

commercially available evo-1.1.200, allowing the access to both alcohol enantiomers mostly with complete conversions and variable selectivities depending on the aromatic pattern substitution (97–>99% ee). To demonstrate the compatibility of the laccase-mediated oxidation and the alcohol dehydrogenase-catalyzed bioreduction, a deracemization strategy starting from the racemic compounds was developed through a sequential one-pot two-step process, obtaining a selection of (S)- or (R)-1-arylprop-2-yn-1-ols with excellent yields (>98%) and selectivities (>98% ee) depending on the alcohol dehydrogenase employed.

## Introduction

The oxidation of propargylic alcohols is considered a highly sensitive transformation since the presence of the carbon-carbon triple bond and the alcohol functionality often leads to poor selectivities when employing conventional oxidizing reagents. Traditional oxidative strategies involve the use of metal species or complexes from cobalt,<sup>[1]</sup> copper,<sup>[2]</sup> chromium,<sup>[3]</sup> ruthenium,<sup>[4]</sup> vanadium,<sup>[5]</sup> or iron,<sup>[6]</sup> some of them in combination with *N*-oxide radicals such as *N*-hydroxyphthalimide<sup>[7]</sup> or TEMPO and derivatives,<sup>[8]</sup> and the use of stoichiometric oxidative systems such as the Dess-Martin reagent<sup>[9]</sup> or manganese oxide.<sup>[10]</sup> Therefore, the development of sustainable methodologies for the preparation of propargylic ketones under mild reaction conditions is nowadays an area

worthy of investigation. Until now, the use of biocatalytic methods for the oxidation of propargylic alcohols remains unexplored, however the applicability of laccases in the oxidation of activated substrates such as benzylic<sup>[11]</sup> and allylic<sup>[12]</sup> alcohols (Scheme 1a), encouraged us to explore the potential of the catalytic laccase mediator system to produce the corresponding propargylic ketones under mild reaction conditions (Scheme 1b).

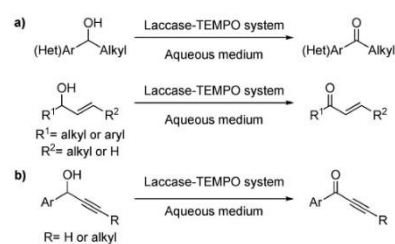
The synthesis of chiral propargylic alcohols represents also an attractive research area for organic chemists since this family of oxygenated compounds are present in numerous biologically active compounds including alkaloids, pheromones, prostaglandins or vitamins, among others, serving at the same time as valuable building blocks for the synthesis of more complex

[a] S. González-Granda, Dr. D. Méndez-Sánchez, Prof. I. Lavandera, Prof. V. Gotor-Fernández  
Organic and Inorganic Chemistry Department  
University of Oviedo  
Avenida Julián Clavería 8  
Oviedo 33006 (Spain)  
Fax: +34985103446  
E-mail: lavanderaivan@uniovi.es  
vicgotfer@uniovi.es

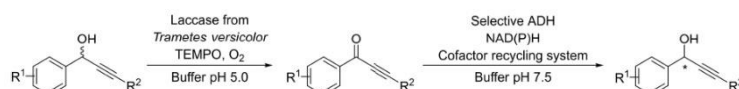
[b] Dr. D. Méndez-Sánchez  
Current address: Department of Chemistry  
University College London  
20 Gordon Street  
London WCH 0AJ (UK)

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cctc.201901543>

This publication is part of a joint Special Collection with ChemBioChem on "Excellence in Biocatalysis Research". Please follow the link for more articles in the collection.



Scheme 1. Use of the laccase-TEMPO system for the: a) previous oxidation of benzylic and allylic alcohols; b) oxidation of propargylic alcohols (this study).



**Scheme 2.** Chemoenzymatic oxidation of propargylic alcohols via laccase-mediated nonselective oxidation followed by stereoselective bioreduction of the propargylic ketone intermediates in order to develop a general strategy for the deracemization of racemic 1-arylalk-2-yn-1-ols.

molecules.<sup>[13]</sup> In the search for sustainable and stereoselective synthesis of this class of compounds, biocatalytic methods have already demonstrated their versatility for the preparation of various families of propargylic alcohol derivatives mainly by using alcohol dehydrogenase (ADH)-catalyzed reductions,<sup>[14]</sup> lipase-catalyzed hydrolytic<sup>[15]</sup> and transesterification<sup>[16]</sup> reactions, or even deracemizations experiments using whole cell systems,<sup>[17]</sup> although there is a lack for a general methodology to provide these valuable compounds.

Herein, we investigate first the design of a general strategy for the oxidation of racemic propargylic alcohols mediated by the laccase-TEMPO system<sup>[18]</sup> to later explore the bioreductions of the resulting propargylic ketones by alcohol dehydrogenase-catalyzed processes. This will allow the development of deracemization<sup>[19]</sup> experiments combining both enzymatic methodologies to produce valuable enantiopure alcohols from their racemates in a one-pot two step-process (Scheme 2).

## Results and Discussion

### Oxidation of Propargylic Alcohols

To evaluate the suitability of the catalytic system composed by the laccase from *Trametes versicolor* (LTv) and the oxy-radical TEMPO, 1-phenylprop-2-yn-1-ol (**1a**) was selected as model substrate due to its commercial accessibility at low cost. Based on our previous experience in the oxidation of benzylic and allylic alcohols,<sup>[11,12]</sup> the oxidation of **1a** (Table 1) was carried out in a 50 mM substrate concentration and 30 mol% of TEMPO

using an oxygenated 50 mM citrate buffer at pH 5 and 10% v/v *tert*-butyl methyl ether (MTBE) as cosolvent in order to favor the alcohol solubility at 30 °C. Under these conditions, formation of 1-phenylprop-2-yn-1-one (**2a**) was accomplished in 91% yield (entry 1), being quantitatively transformed after 48 h (entry 2).

Trying to reach complete conversions at shorter reaction times, different parameters were studied including the TEMPO loading, temperature, and the concentration of alcohol **1a** (entries 3–6). The use of a higher amount of TEMPO or the increase of the temperature to 37 °C led to a partial deactivation of the enzyme and lower recycling rate of the radical TEMPO, achieving then lower conversions (75–80%, entries 3 and 4). Interestingly, the use of more diluted conditions (25 mM of **1a**, entry 5), pleasingly allowed quantitative conversions into ketone **2a**, although conversion did not overcome 80% when reducing the TEMPO loading to 20%, even after prolonged reaction times (entries 6 and 7).

At this point the viability of this chemoenzymatic route was evaluated comparing these results (Table 1, entry 5) with those achieved when using different conventional chemical oxidizing agents such as manganese dioxide (MnO<sub>2</sub>),<sup>[20]</sup> the Jones reagent or the Dess-Martin reagent<sup>[21]</sup> (Table 2).

In all cases, several advantages in favor of the LTv/TEMPO system were noticed, not only in the conversions but also in the selectivity of the reactions. For instance, the oxidation of **1a** with MnO<sub>2</sub> only yielded a 19% of the ketone (entry 2), while the use of a Cr(VI) species such as the Jones reagent led to a 35% of the product (entry 3), which can be explained due to the formation of multiple by-products, some of them caused by the reactivity of the carbon-carbon triple bond. Finally, the iodine reagent, popularly known as the Dess-Martin reagent, led to the ketone **2a** after 4 h of reaction with an 86% yield after purification by column chromatography (entry 4). These results reveal the great sensitivity of propargylic alcohols under typical oxidative conditions, highlighting the use of a chemoenzymatic approach based on two facts, first the complete conversion

**Table 1.** Chemoenzymatic oxidation of alcohol **1a** using the LTv/TEMPO system.<sup>[a]</sup>

Entry	[ <b>1a</b> ] [mM]	TEMPO [mol%]	T [°C]	t [h]	c [%] <sup>[b]</sup>
1	50	30	30	16	91
2	50	30	30	48	>99
3	50	40	30	16	80
4	50	30	37	16	75
5	25	30	30	16	>99
6	25	20	30	16	72
7	25	20	30	48	79

[a] See a general procedure in the experimental section, [b] Conversion values were determined by GC analysis.

**Table 2.** Oxidation of alcohol **1a** through chemical or chemoenzymatic strategies.<sup>[a]</sup>

Entry	Oxidizing agent	Reaction conditions	Yield [%] <sup>[b]</sup>
1	LTv/TEMPO, O <sub>2</sub>	Citrate buffer pH 5, 30 °C, 16 h	93
2	MnO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , rt, 6 h	19
3	Jones reagent	Acetone, rt, 7 h	35
4	Dess-Martin reagent	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , rt, 4 h	86

[a] See the experimental section and the ESI file for detailed reaction conditions and procedures, [b] Isolated yields after purification.

achieved and second the possibility to work in aqueous medium, which will facilitate the development of concurrent processes such as the alcohol dehydrogenase-catalyzed reduction of the so-obtained ketones.

For these transformations, we performed a simple quantification of the *E*-factor<sup>20</sup> to have an estimation of the environmental impact of these methods. Hence, the EATOS tool<sup>21</sup> was used focusing on waste generated regarding the reaction and isolation auxiliaries (excluding solvents). As can be seen in the ESI (Figure S2), the values obtained clearly favored the chemoenzymatic approach regarding the chemical procedures (between 3.4 and 8.9-times), mainly due to the avoidance of a flash chromatography column.

Next, efforts were devoted to extending the laccase-mediated oxidation to other propargylic alcohols using the reaction conditions previously optimized for **1a**. With this purpose, 1-phenylbut-2-yn-1-ol (**1b**) and 1-arylprop-2-yn-1-ols **1c–m** were chemically synthesized in moderate to high yields (53–96%, see full structures in Figure S1 of the ESI), by reaction of the corresponding benzaldehydes with a slight excess of ethynylmagnesium bromide or prop-1-yn-1-ylmagnesium bromide in dry THF at room temperature. The selection of 11 different benzaldehydes allowed us to obtain the corresponding 1-arylprop-2-yn-1-ols **1c–m** with different pattern substitutions on the aromatic ring including electron donating and withdrawing groups to immediately study their oxidations using the LTV/TEMPO system under previously optimized conditions (Table 3).

Regarding the chemoenzymatic oxidation, satisfyingly 1-phenylbut-2-yn-1-ol (**2b**, R<sup>2</sup> = Me, entry 2) was produced in quantitative conversion, so the methodology seems applicable for alcohols in the presence of a methyl substituent at the terminal position of the carbon-carbon triple bond. For 1-arylprop-2-yn-1-ols bearing monosubstitution such as the

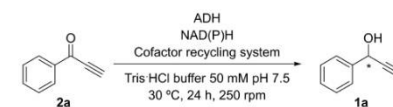
methoxy moiety or a halogen atom on the aromatic ring, the position of these functionalities seemed to do not have a remarkable influence in the reactivity of the LTV/TEMPO system, affording quantitative conversions in all cases when containing a methoxy group (entries 3–5), while when bearing a fluorine atom both the *para*- and *meta*-substituted ketones **2f** and **2g** were obtained in 98% conversion (entries 6 and 7). Excellent results were found as well when considering the *p*-chloro or *o*-bromo derivatives **1h** and **1i** (entries 8 and 9), decreasing the conversion to a 93% when disubstituted alcohol **1j** was used as starting material (entry 10). Finally, high reactivities were also observed when considering additional functional groups including the *p*-methyl, *p*-nitro or a bulkier naphthalene derivative (entries 11–13, 87–97%).

To have more information about this synthetic oxidative strategy, an additional substrate 1-phenylbut-3-yn-2-ol (**1n**) was included in the study. This compound did not present a double activation as the hydroxyl group is not linked to a benzylic position. Interestingly a high conversion was also attained (92%, entry 14), showing that in general propargylic alcohols were excellent substrates for the LTV/TEMPO catalytic system. Overall, the chemoenzymatic system resulted more effective than the oxidation using the Dess-Martin reagent (51–88%, see Table S1 in the ESI), obtaining conversions over 86% but in most cases quantitative, isolating the product through a simple liquid-liquid extraction.

### Stereoselective Bioreduction of Propargylic Ketones

Once that the oxidation of propargylic alcohols **1a–n** into the corresponding ketones **2a–n** was properly addressed, stereoselective bioreduction catalyzed by alcohol dehydrogenases was investigated to produce optically active alcohols. 1-Phenylprop-2-yn-1-ol (**2a**, 25 mM) was selected as model substrate and the behaviors of a panel of ADHs acting with known opposite stereopreference were studied in bioreduction processes using standard conditions (TrisHCl buffer 50 mM pH 7.5 in the presence of NAD(P)H (1 mM) with DMSO in 2.5% v/v due to the low solubility of these ketones in aqueous media, 30 °C, 24 h and 250 rpm, Scheme 3). Depending on the selected ADH, isopropanol or the combination of *D*-glucose and glucose dehydrogenase (GDH) were employed as reducing agents for the required recycling of the nicotinamide cofactor.

As (*S*)-selective enzymes, lyophilized cells of *E. coli* over-expressing ADHs from *Ralstonia* species (RasADH),<sup>22</sup> *Sphingobium yanoikuyae* (SyADH),<sup>23</sup> *Thermoanaerobacter* species



Scheme 3. Stereoselective bioreduction of 1-phenylprop-2-yn-1-one (**2a**, 25 mM) using ADHs.

Table 3. Chemoenzymatic oxidation of racemic propargylic alcohols **1a–n** (50 mM) using the LTV/TEMPO system.<sup>[a]</sup>

Entry	Alcohol <b>1a–n</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	c <b>2a–n</b> [%] <sup>[b]</sup>
1	<b>1a</b>	Ph	H	>99
2	<b>1b</b>	Ph	Me	>99
3	<b>1c</b>	4-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99
4	<b>1d</b>	3-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99
5	<b>1e</b>	2-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99
6	<b>1f</b>	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	98
7	<b>1g</b>	3-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	98
8	<b>1h</b>	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99
9	<b>1i</b>	2-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99
10	<b>1j</b>	2-Br,5-F-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	93
11	<b>1k</b>	4-Me-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	97
12	<b>1l</b>	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	87
13	<b>1m</b>	2-C <sub>10</sub> H <sub>7</sub>	H	94
14	<b>1n</b>	PhCH <sub>2</sub>	H	92

[a] See the experimental section for a general procedure. [b] Conversion values were determined by GC analysis.

(ADH-T),<sup>[24]</sup> *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TeSADH)<sup>[14b]</sup> and *Rhodococcus ruber* (ADH-A)<sup>[25]</sup> were considered, while ADHs from *Lactobacillus brevis* (LbADH)<sup>[26]</sup> and commercially available evo-1.1.200<sup>[27]</sup> were employed for the production of the (*R*)-alcohol. The results of this screening have been summarized in Table S2 of the ESI, finding the best results with RasADH, usually an enzyme that accepts sterically hindered substrates,<sup>[28]</sup> which gave access to (*S*)-**1a** in quantitative conversion and enantiopure form, while (*R*)-**1a** was obtained with complete conversion and selectivity using evo-1.1.200. On the basis of this preliminary screening, the bioreductions of ketones **2b–n** were rushed using the RasADH and evo-1.1.200 enzymes (Table 4).

Satisfyingly, in all cases excellent conversions were achieved (97–>99% conversion). On the one hand, when using RasADH, (*S*)-1-phenylprop-3-yn-1-ols (**1a, c–m**) were obtained in very high to excellent selectivities (88–>99% ee, entries 1,3–13). The selectivity decreased when considering the alcohol **1b** with a methyl moiety at the propargylic position (85% ee, entry 2), and this enzyme did not act with any preference towards the alkyl derivative **2n** (entry 14). On the other hand, the (*R*)-alcohols were preferentially obtained with different degree of selectivity employing evo-1.1.200. In general, the alcohol optical purities ranged from high to excellent (88–>99% ee), except when considering electron-donating groups as the methoxy at different positions of the aromatic ring (**1c–e**, 62–73% ee, entries 3–5), or sterically hindered *o*-brominated derivatives **1i** and **1j** (21–34% ee, entries 9 and 10) affording preferentially the (*S*)-enantiomers in these last two examples. Finally, the alcohol (*S*)-**1n** was obtained due to a switch in the Cahn-Ingold-Prelog (CIP) priority of the substituents.

#### Chemoenzymatic Deracemization of Propargylic Alcohols

Based on the high activity displayed by the L7v/TEMPO catalytic system and the stereoselectivity shown by complementary ADHs, the development of a one-pot two-step deracemization process of those racemic alcohols presenting the best reactivities and selectivities was investigated. So far, the design of biocatalytic deracemizations has been less explored in comparison with kinetic resolution and desymmetrization,<sup>[19]</sup> being just reported an example implying propargylic alcohols using a microorganism as whole cell system.<sup>[17]</sup> In an ideal deracemization approach, this methodology will allow the production of enantiopure alcohols from their racemic forms, although the different reaction conditions (*i.e.*, pH) required for the oxidation and bioreduction steps must be considered in the current case. Also, the occurrence of oxidative conditions obviously hampers the performance of the selective reduction. In addition, it has been described that the laccase-TEMPO system can oxidize mono- and disaccharides at the primary alcohol position, being not possible the use of the glucose and glucose dehydrogenase pair for cofactor recycling purposes.<sup>[12,29]</sup> For these reasons, the optimization of a one-pot sequential approach was considered from the beginning, again considering 1-phenylprop-2-yn-1-ol (**1a**) and 1-phenylprop-2-yn-1-one (**2a**) as model substrates for individual reaction optimizations.

At this point is necessary to overcome that each enzyme effectively works at different pH values (acidic for the laccase and slightly basic conditions for the ADH). To start, the use of 50 mM alcohol concentration is advisable for the laccase-mediated oxidation (Table 1, entry 2) while 25 mM is ideal for the bioreduction step (Table 4). This fact obviously must also be transferred to the use of different buffer compositions (citrate buffer for the oxidation and TrisHCl for the reduction). For all these issues, the bioreductions of ketone **2a** using RasADH and

**Table 4.** Stereoselective bioreduction of propargylic ketones **2a–n** (25 mM) using RasADH and evo-1.1.200 at 30 °C for 24 h at 250 rpm.<sup>[a]</sup>

Entry	Ketone	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	RasADH c [%] <sup>[b]</sup>	ee [%] <sup>[c]</sup>	evo-1.1.200 c [%] <sup>[b]</sup>	ee [%] <sup>[d]</sup>
1	<b>2a</b>	Ph	H	>99	>99	>99	>99
2	<b>2b</b>	Ph	Me	>99	85	>99	88
3	<b>2c</b>	4-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99	>99	97	73
4	<b>2d</b>	3-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99	>99	>99	62
5	<b>2e</b>	2-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99	>99	>99	63
6	<b>2f</b>	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99	95	>99	99
7	<b>2g</b>	3-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99	99	>99	>99
8	<b>2h</b>	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99	98	>99	99
9	<b>2i</b>	2-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99	>99	>99	34 <sup>[e]</sup>
10	<b>2j</b>	2-Br,5-F-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	>99	95	98	21 <sup>[e]</sup>
11	<b>2k</b>	4-Me-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	98	98	>99	>99
12	<b>2l</b>	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	>99	88	>99	>99
13	<b>2m</b>	2-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	>99	97	>99	89
14	<b>2n</b>	PhCH <sub>2</sub>	H	99	<3	>99	>99 <sup>[d]</sup>

[a] See the experimental section for a general procedure, [b] Conversion values of the bioreduction processes were determined by GC analysis, [c] Enantiomeric excess of alcohols **1a–n** were determined by GC analysis, RasADH leading to the (*S*)-enantiomers and evo-1.1.200 to their (*R*)-antipodes, [d] The (*S*)-enantiomer was preferentially obtained, [e] The (*S*)-enantiomer was obtained due to a switch in the CIP rule priority.

evo-1.1.200 were next deeply studied (see Table S3 in the ESI). The reduction of **2a** was attempted using different substrate concentrations (25 and 50 mM), buffer compositions (TrisHCl and citrate) and pH values (5.0, 6.5 and 7.5), observing in all cases 99% conversion. For RasADH in TrisHCl buffer, the use of a higher ketone concentration led to a decrease in the selectivity (86% ee at 50 mM, >99% ee at 25 mM) and a similar effect was observed using the same concentration but a lower pH (89% ee at 25 mM and pH 6.5). Interestingly, very high selectivities were observed in the same aqueous medium employed in the laccase-catalyzed reaction (96–97% ee at pH 5.0 in both 25 and 50 mM). Additionally, evo-1.1.200 displayed excellent selectivity at 25–50 mM and pH 6.5–7.5 (>98% ee), while moderate ee values were observed when using a citrate buffer pH 5.0 (79 and 68% ee at 25 and 50 mM, respectively).

The sequential approach was then addressed changing the ketone intermediate concentration and/or the pH of the reaction once the racemic alcohol **1a** was completely transformed into ketone **2a** after 16 h reaction at 30 °C in the citrate buffer 50 mM pH 5.0 with 10% v/v DMSO (Table 5). Firstly, at 25 mM substrate concentration, it was found that RasADH dramatically lost most of the activity, reaching only 27% conversion in the bioreduction process (entry 1), while evo-1.1.200 catalyzed the reaction almost to completion and with just a small loss of the selectivity (entry 2).

Similar results were achieved when starting from 50 mM of **1a** and diluting the ketone intermediate up to 25 mM by addition of TrisHCl buffer pH 7.5, thus increasing the pH value until 6.1 (entries 3 and 4). Remarkably excellent results with both ADHs were attained in terms of conversion and optical purities towards **1a** (25 mM, entries 5 and 6), when after the oxidation step a unique addition of 30  $\mu$ L of a NaOH 3 M aqueous solution was achieved, elevating the pH until 8.1. Finally, successful experiments were also attained in the process at 50 mM substrate concentration and diluting in the middle

stage with the TrisHCl buffer pH 7.5 and extra addition of NaOH 3 M (entries 7 and 8).

Once demonstrated the deracemization of racemic alcohol **1a** using complementary ADHs (Table 6, entries 1 and 2), and based on the excellent reactivity in the chemoenzymatic oxidation of racemic methoxy substituted alcohols **1c–e** and *o*-bromo-derivative **1i**, and the bioreduction of the corresponding ketones **2c–e, i** using RasADH as biocatalyst, the deracemization of alcohols **1c–e, i** was successfully developed, yielding with complete conversions and excellent selectivities the corresponding (*S*)-alcohols (entries 3–6). Finally, the deracemization of **1a** was scaled-up at 50 mg using RasADH or evo-1.1.200 affording both **1a** enantiomers in 98% ee and high isolated yields after column chromatography on silica gel, 83% for the (*S*)-alcohol and 79% for its (*R*)-antipode.

## Conclusions

A mild and chemoselective oxidation of propargylic alcohols has been described by the combined action of a catalytic system composed by the laccase from *Trametes versicolor* and the oxy-radical TEMPO, which was able to oxidize 14 racemic alcohols in very high to quantitative conversions (87–>99%). This strategy has been compared with traditional oxidizing agents such as manganese(IV) oxide, Jones or Dess-Martin reagents, improving or achieving comparable results in terms of selectivity and yields. Remarkably, the laccase-mediated oxidation has been proved to be a sustainable oxidative method for the production of propargylic ketones as demonstrated by a simple quantification of the *E*-factor using the EATOS tool regarding other traditional oxidative methods. Moreover, bioreduction of the corresponding ketones was studied, screening different alcohol dehydrogenases commercially available or made in house and overexpressed in *E. coli*. The best results were found with the ADH from *Ralstonia* species and evo-1.1.200, which allowed the production of the (*S*)-1-arylalk-2-yn-1-ols (**1a–m**, >98% conv., >85% ee) and the (*R*)-alcohols (**1b, f–h, k–n**, >97% conv., >88% ee), respectively. Taking advantage of the development of both biotransformations in aqueous medium, we decided to explore the possibility to carry out a sequential one-pot two-step deracemization protocol of some of these substrates. For this concurrent process, changing the pH was necessary from 5.0, the best one for the laccase action, to 7.5 where the ADH is able to display high activity. Hence, the

**Table 5.** Deracemization of **1a** under different reaction conditions.<sup>[a]</sup>

Entry	rac- <b>1a</b>		Reaction		(S)- or (R)- <b>1a</b>	
	[ <b>1a</b> ] (mM)	Final pH	ADH	c [%] <sup>[b]</sup>	ee [%] <sup>[c]</sup>	ee [%] <sup>[d]</sup>
1	25	5.0	Ras	27	n.d.	
2	25	5.0	evo-1.1.200	98	93 (R)	
3	50	6.1 <sup>[e]</sup>	Ras	17	n.d.	
4	50	6.1 <sup>[e]</sup>	evo-1.1.200	88	94 (R)	
5	25	8.0 <sup>[e]</sup>	Ras	99	99 (S)	
6	25	8.0 <sup>[e]</sup>	evo-1.1.200	98	99 (R)	
7	50	7.5 <sup>[e]</sup>	Ras	99	99 (S)	
8	50	7.5 <sup>[e]</sup>	evo-1.1.200	94	97 (R)	

[a] See the experimental section for detailed reaction conditions and a general procedure. [b] Conversion (regarding the ketone intermediate) and enantiomeric excess values of **1a** were determined by GC analysis. In parentheses the major alcohol enantiomer appears. [c] pH value obtained after the addition of TrisHCl buffer pH 7.5 to obtain a 25 mM ketone concentration. [d] 30  $\mu$ L of NaOH 3 M were added. [e] pH value obtained after the addition of TrisHCl buffer pH 7.5 to obtain a 25 mM ketone concentration and additional 30  $\mu$ L of NaOH 3 M. n.d.: Not determined.

**Table 6.** Deracemization of **1a, c–e, i** using RasADH and evo-1.1.200.<sup>[a]</sup>

Entry	Alcohol	ADH	c [%] <sup>[b]</sup>	ee [%] <sup>[c]</sup>
1	<b>1a</b> (H)	Ras	99	>99 (S)
2	<b>1a</b> (H)	evo-1.1.200	98	>99 (R)
3	<b>1c</b> (4-OMe)	Ras	>99	>99 (S)
4	<b>1d</b> (3-OMe)	Ras	>99	>99 (S)
5	<b>1e</b> (2-OMe)	Ras	>99	>99 (S)
6	<b>1i</b> (2-Br)	Ras	>99	99 (S)

[a] See the experimental section for detailed reaction conditions and a general procedure. [b] Conversion (regarding the ketone intermediate) and enantiomeric excess values of **1a, c–e, i** were determined by GC analysis.

deracemization of five 1-arylprop-2-yn-1-ols was successfully achieved to produce the corresponding optically active alcohols in excellent yields and selectivities, demonstrating the scalability of the process at semi-preparative scale.

## Experimental Section

**Materials.** Chemical reagents for the chemical synthesis of alcohols **1a–n** and ketones **2a–n** were purchased from Sigma-Aldrich. Laccase from *Trametes versicolor* (LTV, 0.5 U/mg), glucose, NADH and NADPH were also acquired from Sigma-Aldrich, while glucose dehydrogenase (GDH-105) was obtained from Codexis Inc. to develop the biotransformations. For the chemoenzymatic oxidations, citrate buffer 50 mM pH 5.0 was previously oxygenated by bubbling molecular oxygen using a balloon for at least 30 minutes. Sequential reactions were performed in a microwave tube [(19 × 130 × 3) mm]. The oxidation step mediated by the laccase-TEMPO catalytic system was performed open-to-air, while for the bioreduction step, the microwave tube was closed. Lyophilized *E. coli*/RasADH cells were obtained as previously described in the bibliography,<sup>28</sup> and evo-1.1.200 was purchased from Evonx technologies.

NMR spectra (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>19</sup>F NMR) were recorded on a Bruker AV300 MHz spectrometer. All chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm). Gas chromatography (GC) analyses were performed on an Agilent HP6890 GC chromatograph equipped with a FID detector. High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were carried out in a Hewlett Packard 1100 chromatograph equipped with a VIS-UV detector. Thin-layer chromatography (TLC) was conducted with Merck Silica Gel 60 F254 precoated plates and visualized with UV, potassium permanganate and vanillin stain. Column chromatography was performed using silica gel 60 (230–240 mesh). Melting points were taken on samples in open capillary tubes and are uncorrected. High resolution mass spectra (HRMS) experiments were carried out by ESI<sup>+</sup> using a Micro ToF Q spectrometer.

**General procedure for the chemical synthesis of racemic propargylic alcohols 1a–n.** To a solution of the corresponding benzaldehyde (5 mmol) in dry THF (2.5 mL) at 0 °C and under argon atmosphere, a 0.5 M solution of ethynylmagnesium bromide or prop-1-yn-1-ylmagnesium bromide in dry THF (11 mL, 5.50 mmol) was added. The mixture was stirred at 0 °C for 4 h and after this time, the reaction was quenched by the addition of a saturated NH<sub>4</sub>Cl aqueous solution (10 mL). The solvent was removed under vacuum, and the mixture extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 10 mL). The combined organic phases were washed with a saturated NaCl aqueous solution (2 × 10 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. Reaction crudes were purified by column chromatography on silica gel, obtaining the corresponding racemic propargylic alcohols **1a–n** (53–96%). See the Supporting Information for details related to the full characterization of synthesized alcohols.

**General procedure for the chemical oxidation of propargylic alcohols 1a–n with the Dess-Martin reagent.** To a solution of propargylic alcohol **1a–n** (2.27 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (22.7 mL) placed in a round bottom-flask, the Dess-Martin reagent (1.4 g, 3.2 mmol) was added and the reaction stirred at room temperature. The reaction was followed by TLC analyses, observing the consumption of the starting material after 4 h. After this time, a 50% v/v aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> was added, and then extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 15 mL). The organic phases were combined and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and the solvent finally removed under vacuum. The reaction crude was purified by column

chromatography on silica gel (30% EtOAc/Hexane), obtaining the corresponding propargylic ketones **2a–n** (51–88% yield). See the Supporting Information for details related to the full characterization of synthesized ketones.

**General procedure for the chemoenzymatic oxidation of propargylic alcohols 1a–n using the catalytic system composed by the laccase from *Trametes versicolor* and the oxy-radical TEMPO.** In a microwave tube open to the air, the corresponding racemic propargylic alcohol **1a–n** (0.05 mmol), MTBE (200 μL, 10% v/v) and a previously oxygenated citrate buffer 50 mM pH 5.0 (2 mL) were added. Next, the laccase from *Trametes versicolor* (10 mg, 5 U) and TEMPO (2.40 mg, 0.015 mmol) were added, and the mixture reacted for 16 h with magnetic stirring at 30 °C. After this time, the mixture was extracted with EtOAc (3 × 1 mL), the organic layers combined, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. The solution was finally concentrated, and the conversion values measured by GC analyses.

**General procedure for the bioreduction of propargylic ketones 2a–n using RasADH.** To a 1.5 mL-Eppendorf tube containing the corresponding propargylic ketone **2a–n** (0.015 mmol), DMSO (75 μL), a solution of GDH (60 μL, 10 U), an aqueous solution of D-glucose (60 μL, 500 mM), an aqueous solution of NADPH (60 μL, 10 mM), buffer TrisHCl pH 7.5 (345 μL, 50 mM) and lyophilized cells of *E. coli* overexpressing RasADH (12 mg) were successively added. Then, the Eppendorf tube was closed and kept under orbital shaking at 250 rpm at 30 °C for 24 h. After this time, the solution was extracted with EtOAc (3 × 0.5 mL), the organic layers combined, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. The resulting solution was concentrated, measuring the conversion and the enantiomeric excess values of alcohols (S)-**1a–n** by GC analyses.

**General procedure for the bioreduction of propargylic ketones 2a–n using evo-1.1.200.** To a 1.5 mL-Eppendorf tube containing the corresponding propargylic ketone **2a–n** (0.0125 mmol), DMSO (56 μL), PrOH (25 μL), an aqueous solution of MgCl<sub>2</sub> (50 μL, 10 mM), an aqueous solution of NADH (50 μL, 10 mM), buffer TrisHCl pH 7.5 (319 μL, 50 mM) and evo-1.1.200 (12 mg) were successively added. Then, the Eppendorf tube was closed and kept under orbital shaking at 250 rpm at 30 °C for 24 h. After this time, the solution was extracted with EtOAc (3 × 0.5 mL), the organic layers combined, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. The resulting solution was concentrated, measuring the conversion and the enantiomeric excess values of alcohols **1a–n** by GC analyses.

**General procedure for the deracemization of propargylic alcohols 1a, c–e, i using the laccase from *Trametes versicolor*, TEMPO and RasADH in analytical scale.** To a solution of the corresponding racemic propargylic alcohol **1a, c–e, i** (0.05 mmol) in a previously oxygenated citrate buffer 50 mM pH 5.0 (2 mL) and MTBE (200 μL, 10% v/v) inside a microwave tube (19 × 130 × 3 mm) open to the air, the laccase from *Trametes versicolor* (10 mg, 5 U) and TEMPO (2.40 mg, 0.015 mmol) were added. The mixture reacted for 16 h with magnetic stirring at 30 °C. After this time, the following reagents were added: GDH (240 μL, 40 U), an aqueous solution of D-glucose (240 μL, 500 mM), an aqueous solution of NADPH (240 μL, 10 mM), an aqueous solution of NaOH 3 M (16.25 μL) to adjust the pH to a value between 7.5 and 8.0, and lyophilized cells of *E. coli* overexpressing RasADH (12 mg). The microwave tube was closed and orbitally shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h. After this time, the mixture was extracted with EtOAc (3 × 0.5 mL), combining the organic layers, which were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. Then, the solution was concentrated and the conversion and the enantiomeric excess values of the propargylic alcohols were measured by GC analyses.

**General procedure for the deracemization of propargylic alcohol 1a using the laccase from *Trametes versicolor*, TEMPO and evo-**

**1.1-200 in analytical scale.** To a solution of the corresponding racemic propargylic alcohol **1a** (0.05 mmol) in a previously oxygenated citrate buffer 50 mM pH 5.0 (2 mL) and MTBE (200  $\mu$ L, 10% v/v) inside a microwave tube (19  $\times$  130  $\times$  3 mm) open to the air, the laccase from *Trametes versicolor* (10 mg, 5 U) and TEMPO (2.40 mg, 0.015 mmol) were added. The mixture reacted for 16 h with magnetic stirring at 30 °C. After this time, the following reagents were added: *t*-PrOH (250  $\mu$ L), an aqueous solution of MgCl<sub>2</sub> (250  $\mu$ L, 10 mM), an aqueous solution of NADH (250  $\mu$ L, 10 mM), an aqueous solution of NaOH 3 M (16.25  $\mu$ L) to adjust the pH to a value between 7.5 and 8.0, and evo-1.1.200 (12 mg). Then, the tube was closed and kept under orbital shaking at 250 rpm at 30 °C for 24 h. After this time, the mixture was extracted with EtOAc (3  $\times$  0.5 mL), combining the organic layers, which were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. Then, the solution was concentrated and the conversion and the enantiomeric excess values of **1a** were measured by GC analyses.

**General procedure for the deracemization of 1-phenylprop-2-yn-1-ol (**1a**) using the laccase from *Trametes versicolor*, TEMPO and RasADH at semi-preparative scale.** To a solution of racemic alcohol **1a** (0.35 mmol) in a previously oxygenated citrate buffer 50 mM pH 5.0 (14 mL) and MTBE (1.4 mL, 10% v/v) inside a microwave tube (19  $\times$  130  $\times$  3 mm) open to the air, the laccase from *Trametes versicolor* (48 mg, 24 U) and TEMPO (16.50 mg, 0.105 mmol) were added. The mixture reacted for 16 h with magnetic stirring at 30 °C. After this time, the following reagents were added: GDH (1.4 mL, 233 U), an aqueous solution of D-glucose (1.4 mL, 50 mM), an aqueous solution of NADPH (1.4 mL, 10 mM), an aqueous solution of NaOH 3 M (113.5  $\mu$ L) to adjust the pH to a value between 7.5 and 8.0, and lyophilized cells of *E. coli* overexpressing RasADH (82 mg). The microwave tube was closed and orbitally shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h. After this time, the mixture was extracted with EtOAc (3  $\times$  3 mL), combining the organic layers, which were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. Then, the solution was concentrated and the conversion and the enantiomeric excess values of (S)-**1a** were measured by GC analyses. The product was finally purified by column chromatography on silica gel (30% EtOAc/Hexane), obtaining the alcohol (S)-**1a** in 83% isolated yield and 98% ee.

**General procedure for the deracemization of 1-phenylprop-2-yn-1-ol (**1a**) using the laccase from *Trametes versicolor*, TEMPO and evo-1.1.200 at semi-preparative scale.** To a solution of the corresponding racemic propargylic alcohol **1a** (0.35 mmol) in a previously oxygenated citrate buffer 50 mM pH 5.0 (14 mL) and MTBE (1.4 mL, 10% v/v) inside a microwave tube (19  $\times$  130  $\times$  3 mm) open to the air, the laccase from *Trametes versicolor* (48 mg, 24 U) and TEMPO (16.50 mg, 0.105 mmol) were added. The mixture reacted for 16 h with magnetic stirring at 30 °C. After this time, the following reagents were added: *t*-PrOH (788  $\mu$ L), an aqueous solution of MgCl<sub>2</sub> (1.55 mL, 10 mM), an aqueous solution of NADH (1.55 mL, 10 mM), an aqueous solution of NaOH 3 M (113.5  $\mu$ L) to adjust the pH to a value between 7.5 and 8.0, and evo-1.1.200 (80 mg). After this time, the mixture was extracted with EtOAc (3  $\times$  3 mL), combining the organic layers, which were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. Then, the solution was concentrated and the conversion and the enantiomeric excess values of (R)-**1a** were measured by GC analyses. The product was finally purified by column chromatography on silica gel (30% EtOAc/Hexane), obtaining the alcohol (R)-**1a** in 79% isolated yield and 98% ee.

## Acknowledgements

Financial supports from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MEC, Project CTO2016-75752-R) and the Asturian Regional Government (FC-GRUPIN-IDI/2018/000181) are gratefully acknowledged. We thank Prof. Wolfgang Kroutil (University of Graz, Austria) for providing us with alcohol dehydrogenases overexpressed in *E. coli* cells.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** Bioreduction · Deracemization · Laccases · Oxidation · Propargylic alcohols

- [1] a) V. B. Sharma, S. L. Jain, B. Sain, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 383–386; b) G. Blay, L. Cardona, I. Fernández, J. R. Pedro, *Synthesis* **2007**, 3329–3332.
- [2] a) C. Han, M. Yu, W. Sun, X. Yao, *Synlett* **2011**, 2363–2368; b) K. C. Weerasiri, A. E. V. Gordon, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1546–1550; c) W. Lv, J. Tian, N. Deng, Y. Wang, X. Zhu, X. Yao, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1312–1316.
- [3] a) L. S. van de Vondervoort, S. Bouttemy, J. M. Padrón, J. L. Bras, J. Muzart, P. L. Alsters, *Synlett* **2002**, 243–246; b) Y. Suganuma, S. Tanabe, Y. Sugihara, Y. Kobayashi, *Tetrahedron* **2018**, *74*, 1151–11–59; c) F. Romanov-Michailidis, B. D. Ravetz, D. W. Paley, T. Rovis, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5370–5374.
- [4] a) K. Masutani, T. Uchida, R. Irie, T. Katsuki, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5119–5123; b) M. R. Patel, A. R. Kapdi, A. V. Kumar, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6*, 3264–3278.
- [5] a) Y. Maeda, N. Kakiuchi, S. Matsumura, T. Nishimura, S. Uemura, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8877–8879; b) Y. Maeda, N. Kakiuchi, S. Matsumura, T. Nishimura, T. Kawamura, S. Uemura, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6718–6724; c) Y. Maeda, Y. Washitake, T. Nishimura, K. Iwai, T. Yamauchi, S. Uemura, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9031–9036; d) A. T. Radosevich, C. Musich, F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1090–1091.
- [6] X. Jiang, J. Liu, S. Ma, *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23*, 825–835.
- [7] S. Sakaguchi, T. Takase, T. Iwahama, Y. Ishii, *Chem. Commun.* **1998**, 2037–2038.
- [8] a) J. Liu, X. Xie, S. Ma, *Synthesis* **2012**, *44*, 1569–1576; b) D. Zhai, L. Chen, M. Jia, S. Ma, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 153–160; c) S. A. Miller, K. A. Bisset, N. E. Leadbeater, N. A. Eddy, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 1413–1417.
- [9] a) Y. Dai, F. Ma, Y. Shen, T. Xie, S. Gao, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 2872–2875; b) M. Satoh, Y. Shibata, K. Tanaka, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 5434–5438.
- [10] Y. Aida, Y. Shibata, K. Tanaka, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 2617–2626.
- [11] a) K. Kędziora, A. Diaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2448–2453; b) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Green Chem.* **2017**, *19*, 474–480.
- [12] L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 2413–2419.
- [13] a) P. J. Stang, F. Diederich, *Modern Acetylene Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**; b) J. S. Yadav, S. Chandrasekhar, in *Drug Discovery and Development: Drug Development*, Vol. 2 (Ed.: M. S. Chorghade), John Wiley & Sons, Hoboken, **2007**, pp 141–160; c) P. Forgione, L. D. Fader, *Sci. Synth.* **2008**, *36*, 531–571; d) H. Qian, D. Huang, Y. Bi, G. Yan, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 3240–3280.
- [14] a) C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532–1536; b) C. Heiss, M. LaVenekes, J. G. Zeikus, R. S. Phillips, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1659–1666; c) T. Schubert, W. Hummel, M.-R. Kula, M. Müller, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4181–4187; d) T. Schubert, W. Hummel, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 634–637; e) R. van Deursen, W. Stampfer, K. Edegger, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B* **2004**, *31*, 159–163; f) A. Jakoblinert, R. Mladenov, A. Paul, F. Sibilla, U. Schwaneberg, M. B. Ansorge-Schumacher, P. Dominguez de Maria, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12230–12232; g) M. Hamzic, J. Pietruszka, D.

- Sandkhul, *Chirality* **2011**, *23*, E110-E115; h) C. Holec, D. Sandkhul, D. Rother, W. Kroutil, J. Pietruszka, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3125–3130.
- [15] a) B. I. Gläzner, K. Faber, H. Griengl, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5791–5796; b) C. Waldinger, M. Schneider, M. Botta, F. Corelli, V. Summa, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1485–1488.
- [16] a) K. Burgess, L. D. Jennings, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6129–6139; b) J. A. Smulik, S. T. Diver, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1788–1792; c) D. Xu, Z. Li, S. Ma, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6343–6346; d) C. Raminelli, J. V. Comasseto, L. H. Andrade, A. L. M. Porto, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3117–3122; e) A. Horváth, J. Benner, J.-E. Bäckvall, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3240–3243; f) C. Raminelli, N. C. da Silva, A. A. Dos Santos, A. L. M. Porto, L. H. Andrade, J. V. Comasseto, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 409–415; g) H. Kim, Y. K. Choi, J. Lee, E. Lee, J. Park, M.-J. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10944–10948; h) P. Chen, X. Zhu, *J. Mol. Catal. B* **2013**, *97*, 184–188; i) J. G. Ferreira, C. R. Pincival, D. M. Oliveira, R. X. Nascimento, J. L. Pincival, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6458–6462; j) J. G. Hernández, M. Frings, C. Bolm, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1769–1772; k) D. Koszelewski, F. Borys, A. Brodzka, R. Ostaszewski, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 1653–1658; l) S. Kawanishi, S. Oki, D. Kundu, S. Akai, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2978–2982.
- [17] T. Saravanan, A. Chadha, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2973–2980.
- [18] a) D. M. Mate, M. Alcalde, *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 1457–1467; b) C. Romero-Guido, A. Baez, E. Torres, *Catalysts* **2018**, *8*, 223.
- [19] a) C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789–1805; b) A. Diaz-Rodriguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Green Chem.* **2015**, *2*, 192–211.
- [20] R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2017**, *19*, 18–43.
- [21] EATOS: Environmental Assessment Tool for Organic Syntheses, <http://www.metzger.chemie.uni-oldenburg.de/eatos/english.htm>. See: M. Eisen, J. O. Metzger, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3580–3585.
- [22] I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6003–6005.
- [23] I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155–2158.
- [24] Z. Findrik, D. Vasić-Rački, S. Lütz, T. Dausmann, C. Wandrey, *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1087–1095.
- [25] W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014–1017.
- [26] S. Leuchs, L. Greiner, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, *25*, 267–281.
- [27] S. Kara, D. Spickermann, A. Weckbecker, C. Leggewie, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 973–976.
- [28] H. Mar, K. Keđziora, J. Kulig, A. Frank, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, D. Rother, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 356–365.
- [29] M. Marzorati, B. Danieli, D. Haltrich, S. Riva, *Green Chem.* **2005**, *7*, 310–315.

Manuscript received: August 20, 2019  
 Revised manuscript received: September 19, 2019  
 Accepted manuscript online: September 20, 2019  
 Version of record online: October 30, 2019



## **Bloque II**

*Diseño de procesos multicutalíticos  
basados en la combinación de  
especies de Au(I) y enzimas*



## **Parte I**

*Procesos en cascada mediante la  
combinación del reagrupamiento de  
Meyer-Schuster catalizado por  
especies de Au(I) y enzimas*



# *Introducción*



### II.1 Procesos one-pot metal-enzima

El primer bloque de esta Tesis Doctoral se ha centrado en el uso de la catálisis multienzimática para desarrollar una metodología eficiente de desracemización de alcoholes propargílicos empleando una lacasa y una alcohol deshidrogenasa. Teniendo en cuenta el potencial sintético de la catálisis metálica sobre alquinos y sistemas propargílicos, en este segundo bloque se abordarán diversas estrategias para acceder a moléculas quirales de interés, haciendo uso en concreto de especies de oro(I) y de biocatalizadores como las alcohol deshidrogenasas y transaminasas, que permiten modificar estereoselectivamente grupos carbonilo a través de procesos de desimetrización.

Por un lado, la catálisis metálica es una metodología tradicional y consolidada para llevar a cabo distintos tipos de reacciones que involucren la formación y/o la activación tanto de enlaces carbono-carbono como carbono-heteroátomo. Por otro lado, la biocatálisis está considerada hoy en día como una disciplina sintética en continua evolución,<sup>230</sup> que permite el desarrollo de transformaciones altamente selectivas en condiciones sostenibles. La combinación de ambas estrategias catalíticas en similares condiciones de reacción supone un gran reto hoy en día, pues se podría acceder a muy diversas familias de compuestos mediante procesos concurrentes desarrollados en *one-pot*.<sup>137,139</sup> De esta forma, este tipo de reacciones presenta un gran número de ventajas con respecto a los métodos tradicionales por pasos (*stepwise*), como evitar las etapas de purificación y aislamiento de los intermedios de reacción, reduciendo así el tiempo y el coste económico y energético del proceso, lo que además permite diseñar sistemas en los cuales el equilibrio químico se encuentre desplazado hacia la dirección deseada.

---

<sup>230</sup> (a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194; (b) M. T. Reetz, *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 2449-2459.

## *Bloque II. Parte I. Introducción*

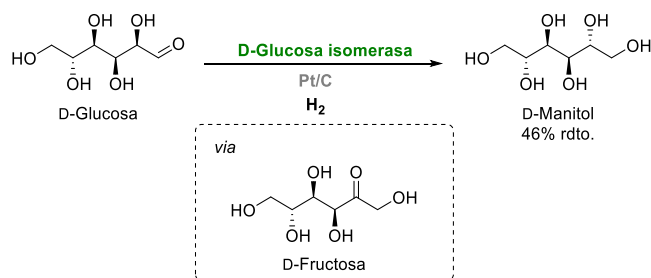
A pesar de las ventajas que ofrecen estas combinaciones, su diseño no es trivial ya que existen diversas limitaciones que hay que superar a la hora de diseñar un proceso *one-pot* metal-enzima:

- El medio de reacción natural de las enzimas es el agua, por lo que es necesario realizar procesos en los que el catalizador metálico sea activo y/o no genere productos indeseados en un medio acuoso. Alternativamente podría ser viable el uso de disolventes orgánicos en los que las especies metálicas, generalmente, desempeñan mejor su actividad catalítica, siempre y cuando el biocatalizador empleado sea activo en esas condiciones, por ejemplo, si se encuentra inmovilizado.
- Ambos catalizadores deben ser compatibles entre sí y en las condiciones de reacción empleadas, evitando su inhibición mutua, o la de uno de ellos sobre el otro. En este punto también es necesario tener en cuenta las temperaturas de reacción necesarias para cada etapa, o la presencia de cofactores u otros aditivos necesarios para el correcto funcionamiento de la enzima o el metal.
- Es necesario evitar o minimizar la formación de subproductos debidos a la reactividad cruzada de alguno de los catalizadores empleados en el proceso con alguno de los sustratos o intermedios de la reacción, ya que minimizarían el rendimiento del proceso en cascada.
- Es necesaria la optimización de cada una de las etapas por separado, pero también la del proceso en cascada, ya que la presencia de determinadas especies intermedias o aditivos en el medio, así como las condiciones de reacción elegidas, pueden afectar a alguna de las etapas del proceso.
- Generalmente, el diseño operacional de los procesos que combinan ambas metodologías es más complejo, ya que el recipiente de reacción o el tipo de agitación empleados pueden ser factores claves en este tipo de transformaciones.



## II.1.1 Perspectiva histórica

Como se ha comentado anteriormente, la búsqueda y optimización de condiciones de reacción de los procesos metal-enzima desarrollados en *one-pot* es clave para su desarrollo satisfactorio. En este contexto, se han descrito muy diversos procesos en las últimas décadas. El primer ejemplo de este tipo de combinaciones fue propuesto en 1980 por Roels y colaboradores,<sup>231</sup> consistente en una cascada concurrente que combinaba la isomerización de la D-glucosa en D-fructosa catalizada por una D-glucosa isomerasa, seguida de una etapa de hidrogenación catalizada por platino soportado sobre carbono (Esquema 30). El proceso se desarrolló en medio acuoso y a una temperatura de 60 °C, permitiendo obtener el D-manitol como producto mayoritario con un rendimiento del 46%.



**Esquema 30.** Combinación de una isomerasa y un catalizador de Pt para la obtención de D-manitol mediante un proceso en cascada.

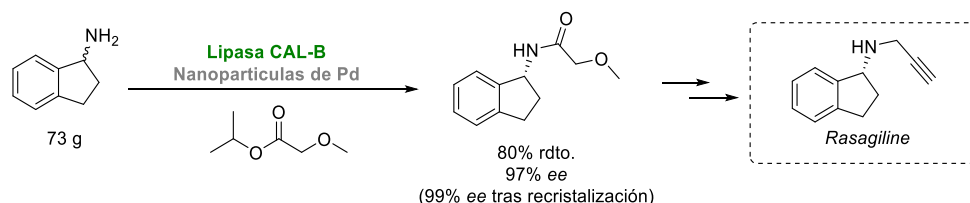
Sin embargo, como se ha comentado en la *Introducción* de esta Tesis Doctoral, históricamente, los procesos metal-enzima se han centrado en el desarrollo de resoluciones cinéticas dinámicas, en las que un biocatalizador transforma selectivamente uno de los dos enantiómeros de la mezcla racémica, mientras que el catalizador metálico induce la racemización del enantiómero del sustrato de partida que queda sin reaccionar.<sup>232</sup> Generalmente, este tipo de procesos han sido estudiados mayoritariamente empleando lipasas inmovilizadas en un disolvente orgánico, aunque existen varios ejemplos descritos con otros tipos de enzimas no hidrolíticas.

<sup>231</sup> M. Makkee, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum, J. A. Roels, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 930-931.

<sup>232</sup> O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009.

## Bloque II. Parte I. Introducción

Un ejemplo interesante de un proceso de DKR, combinando biocatálisis y especies metálicas, es el propuesto por Jia y colaboradores en el año 2014.<sup>233</sup> En este trabajo se planteó la síntesis de un precursor de la Rasagiline, fármaco comúnmente empleado en el tratamiento del Parkinson. La estrategia sintética involucra la resolución cinética dinámica de una amina, empleando nanopartículas de Pd como agente de racemización, y la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) para transformar selectivamente uno de los dos enantiómeros de la amina racémica de partida. Esta aproximación se realizó a una escala de 73 g de sustrato de partida, empleando tolueno como disolvente y metoxiacetato de isopropilo como donador del grupo acilo, siendo posible de esta forma obtener el producto deseado con un rendimiento aislado del 80% y un 97% de exceso enantiomérico (99% *ee* tras recristalización, Esquema 31).



**Esquema 31.** Síntesis de un precursor del fármaco Rasagiline mediante un proceso de DKR combinando una lipasa y nanopartículas de Pd.

Más recientemente, la combinación en cascada de catalizadores metálicos y enzimas se ha extendido más allá de las estrategias de DKR, de manera que diversas clases de enzimas han sido compatibles con procesos de:

- (Ciclo)isomerización, donde destaca el empleo de catalizadores de Ru<sup>234</sup> y Pd,<sup>235</sup>
- Oxidación, utilizando preferentemente catalizadores de Pd, como por ejemplo en la oxidación de Wacker-Tsuji de alquenos terminales,<sup>236</sup>

<sup>233</sup> G. Ma, Z. Xu, P. Zhang, J. Liu, X. Hao, J. Ouyang, P. Liang, S. You, X. Jia, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 1169-1174.

<sup>234</sup> (a) N. Ríos-Lombardía, C. Vidal, M. Cocina, F. Morís, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10937-10940; (b) B. Yang, C. Zhu, Y. Qiu, J.-E. Bäckvall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5568-5572.

<sup>235</sup> M. J. Rodríguez-Álvarez, N. Ríos-Lombardía, S. Schumacher, D. Pérez-Iglesias, F. Morís, V. Cadierno, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 7753-7759.

<sup>236</sup> (a) H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4488-4492; (b) F. Uthoff, H. Sato, H. Gröger, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 555-558; (c) F. Uthoff, H. Gröger, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*,

## Bloque II. Parte I. Introducción

- Metátesis de olefinas catalizadas por especies de Ru.<sup>143,144,237</sup>
- Acoplamiento cruzado donde el empleo de diversas especies de paladio ha jugado un papel destacado para llevar a cabo reacciones de Heck,<sup>238</sup> Suzuki,<sup>239</sup> Sonogashira,<sup>240</sup> Liebeskind-Srogl,<sup>241</sup> y Buchwald-Hartwig.<sup>242</sup>

Sin embargo, hasta la fecha, todas las aproximaciones descritas que abordan este tipo de combinación se han realizado o bien de manera secuencial, o bien empleando estrategias de compartimentalización para evitar la inactivación de alguno de los catalizadores involucrados en el proceso.

La combinación de especies de oro y etapas biocatalíticas en cascada es uno de los temas centrales de esta Tesis Doctoral, por lo que a continuación se mostrarán algunos ejemplos de este tipo de procesos descritos previamente en la bibliografía.

---

9517-9521; (d) D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2582-2593.

<sup>237</sup> (a) C. A. Denard, M. J. Bartlett, Y. Wang, L. Lu, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 3817-3822; (b) Á. Gómez Baraibar, D. Reichert, C. Mügge, S. Seger, H. Gröger, R. Kourist, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14823-14827; (c) S. Wu, Y. Zhou, D. Gerngross, M. Jeschek, T. R. Ward, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5060; (d) R. V. Maaskant, S. Chordia, G. Roelfes, *ChemCatChem* **2021**, *13*, 1607-1613.

<sup>238</sup> (a) M. Peng, E. Mittmann, L. Wenger, J. Hubbuch, M. K. M. Engqvist, C. M. Niemeyer, K. S. Rabe, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 15998-16001; (b) M. C. Maier, A. Valotta, K. Hiebler, S. Soritz, K. Gavric, B. Grabner, H. Gruber-Woelfler, *Org. Process Res. Dev.* **2020**, *24*, 2197-2207; (c) F. Lackner, K. Hiebler, B. Grabner, H. Gruber-Woelfler, *Catalysts* **2020**, *10*, 1404; (d) N. Ríos-Lombardía, M. J. Rodríguez-Álvarez, F. Morís, R. Kourist, N. Comino, F. López-Gallego, J. González-Sabín, J. García-Álvarez, *Front. Chem.* **2020**, *8*, 139; (e) D. Schwendenwein, A. K. Ressmann, M. Entner, V. Savic, M. Winkler, F. Rudroff, *Catalysts* **2021**, *11*, 932.

<sup>239</sup> (a) E. Burda, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9551-9554; (b) S. Borchert, E. Burda, J. Schatz, W. Hummel, H. Gröger, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *84*, 89-93; (c) J. Paris, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, H. Gröger, J. González-Sabín, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 4417-4423; (d) D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 5800-5807; (e) E. Tassano, K. Merusic, I. Buljubasic, O. Laggner, T. Reiter, A. Vogel, M. Hall, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 6340-6343; (f) P. Luan, Y. Liu, Y. Li, R. Chen, C. Huang, J. Gao, F. Hollmann, Y. Jiang, *Green Chem.* **2021**, *23*, 1960-1964; (g) N. Akporji, V. Singhania, J. Dussart-Gautheret, F. Gallou, B. H. Lipshutz, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 11847-11850; (h) E. J. Craven, J. Latham, S. A. Shepherd, I. Khan, A. Diaz-Rodriguez, M. F. Greaney, J. Micklefield, *Nat. Catal.* **2021**, *4*, 385-394.

<sup>240</sup> S. Hassan, A. Ullrich, T. J. J. Müller, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1571-1576.

<sup>241</sup> P. Schaaf, T. Bayer, M. Koley, M. Schnürch, U. T. Bornscheuer, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 12978-12981.

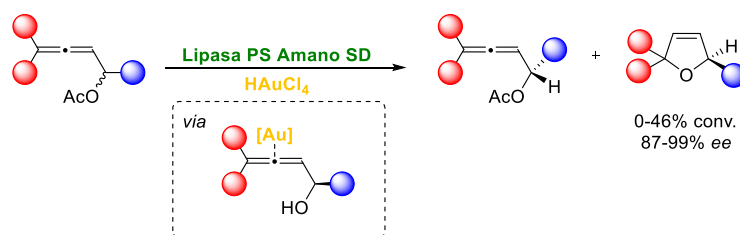
<sup>242</sup> (a) S. C. Cosgrove, M. P. Thompson, S. T. Ahmed, F. Parmeggiani, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 18156-18160; (b) C. M. Heckmann, F. Paradisi, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 16616-16620.

## Bloque II. Parte I. Introducción

### II.1.2 Procesos one-pot oro-enzima

A pesar de la gran capacidad catalítica que presentan las especies de oro para llevar a cabo distintos tipos de reacciones en condiciones suaves, tanto en medio orgánico como acuoso,<sup>77a,104a</sup> su empleo combinado con reacciones enzimáticas de manera concurrente apenas ha sido explorado. Esta cooperación además puede ayudar a superar uno de los puntos débiles de la catálisis de Au(I), como es su dificultad para mediar procesos estereoselectivos debido a la geometría lineal que presentan estas especies (ver *Introducción*), lo que abriría nuevas vías para la síntesis de compuestos ópticamente activos.

El primer ejemplo de este tipo de combinaciones fue propuesto por Asikainen y Krause en el año 2009,<sup>243</sup> en el que se describió la hidrólisis de distintos ésteres alénicos catalizada por la lipasa PS Amano SD (lipasa de *Burkholderia cepacia* inmovilizada sobre diatomita), seguida de la activación carbofílica de la función aleno presente en la molécula usando un catalizador de Au(III) como es el ácido tetracloroáurico. De esta manera, se consiguió la resolución cinética clásica del éster de partida empleando como medio de reacción una disolución tampón de fosfato, y una vez hidrolizado, el alcohol alénico resultante experimentó una reacción de cicloisomerización catalizada por el catalizador de Au, dando lugar a distintos 2,5-dihidrofuranos ópticamente activos (Esquema 32).



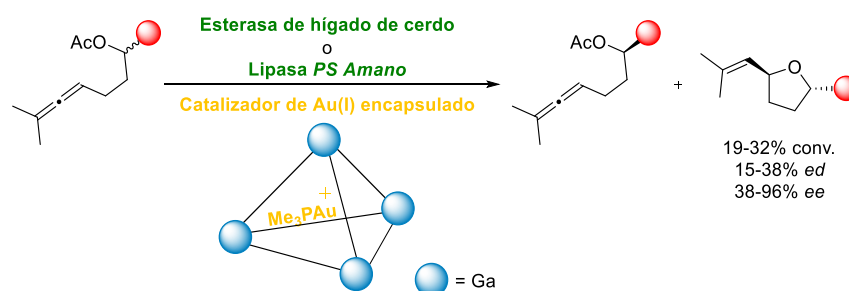
**Esquema 32.** Primer ejemplo de la combinación de un catalizador de oro y una enzima en cascada, consistente en un proceso de hidrólisis-cicloisomerización.

Posteriormente, Toste y colaboradores describieron una aproximación similar para la obtención de tetrahidrofuranos enantioenriquecidos.<sup>244</sup> En este caso los autores emplearon como enzima, o la esterasa de hígado de cerdo, o la lipasa PS

<sup>243</sup> M. Asikainen, N. Krause, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2305-2309.

<sup>244</sup> Z. J. Wang, K. N. Clary, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 100-103.

Amano, para llevar a cabo la hidrólisis del grupo éster presente en el sustrato de partida, y por otro lado un catalizador de Au(I),  $\text{Me}_3\text{PAu}^+$ , encapsulado en un clúster de galio tetraédrico, para realizar la activación carbofílica del aleno. Gracias a esta encapsulación se evitó la inactivación del catalizador debido a su coordinación con la enzima empleada. De esta manera, se consiguió llevar a cabo la reacción de cicloisomerización de distintos alenos, mediante un proceso en cascada, obteniendo varios derivados de tetrahidrofurano con elevados excesos enantioméricos, pero moderadas diastereoselectividades y conversiones (Esquema 33).



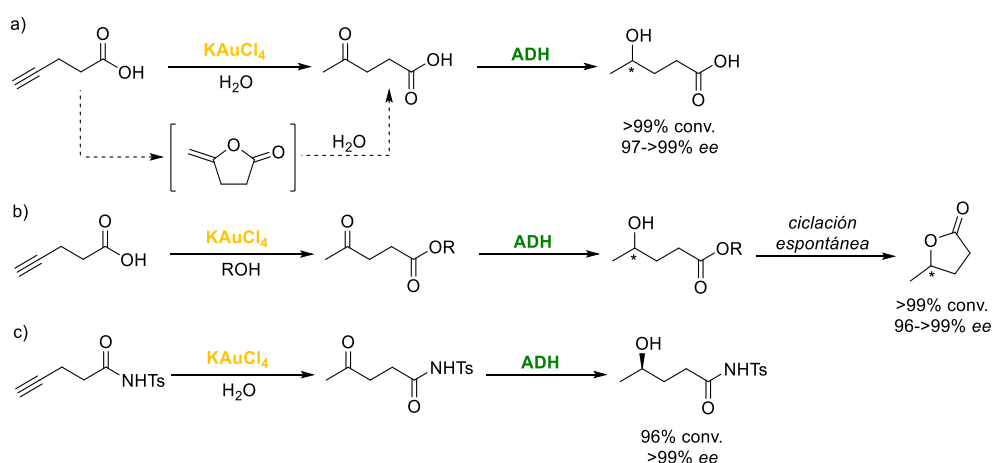
**Esquema 33.** Proceso en cascada combinando una hidrolasa y un catalizador de Au(I) encapsulado en un clúster de Ga para la síntesis estereoselectiva de tetrahidrofuranos.

Los primeros ejemplos de combinaciones *one-pot* empleando catalizadores de oro y enzimas no hidrolíticas no se describieron hasta hace menos de cinco años, donde el uso de oxidorreductasas despertó un gran interés. En este aspecto, González-Sabín y colaboradores mostraron, en el año 2017, la combinación de un catalizador de Au(III) y alcohol deshidrogenasas para obtener el ácido  $\gamma$ -hidroxivalérico de manera ópticamente activa mediante un proceso secuencial.<sup>245</sup> En esta aproximación se llevó a cabo la cicloisomerización del ácido pentinoico en medio puramente acuoso empleando  $\text{KAuCl}_4$  como catalizador, observándose la hidrólisis espontánea del intermedio lactona generado, produciendo de esta manera la formación del ácido levulínico. Posteriormente, la adición al medio de reacción de ADHs estereocomplementarias permitió obtener ambos enantiómeros del ácido  $\gamma$ -hidroxivalérico con elevadas conversiones y selectividades (Esquema 34, a). En este trabajo también se describe la síntesis de la  $\gamma$ -valerolactona enantioenriquecida, empleando un alcohol como disolvente de la reacción de cicloisomerización, y se

<sup>245</sup> M. J. Rodríguez-Álvarez, N. Ríos-Lombardía, S. Schumacher, D. Pérez-Iglesias, F. Morís, V. Cadierno, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, 7, 7753-7759.

## Bloque II. Parte I. Introducción

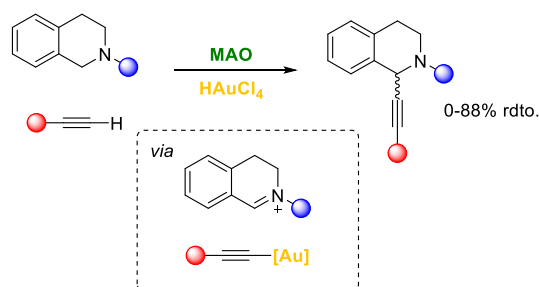
obtuvo como productos intermedios distintos levulinatos, los cuales fueron transformados por la acción de una ADH en los  $\gamma$ -cetoésteres correspondientes. De esta manera fue posible sintetizar la  $\gamma$ -valerolactona a través de una última reacción de ciclación espontánea (Esquema 34, b). En este trabajo también se describe la síntesis de una  $\gamma$ -hidroxiamida enantioenriquecida empleando una aproximación similar y N-tosilpent-4-inamida como sustrato de partida (Esquema 34, c).



**Esquema 34.** Combinación de un catalizador de Au(III) y ADHs para obtener derivados del ácido  $\gamma$ -hidroxivalérico y  $\gamma$ -valerolactona.

Turner y colaboradores describieron en el año 2018 un proceso en cascada que combinaba la acción de una monoamino oxidasa (MAO) y el ácido tetracloroaurico para la obtención de derivados de tetrahydroisoquinolina.<sup>246</sup> En esta aproximación, una MAO evolucionada genéticamente catalizó de manera regioselectiva la formación de un ion iminio en el carbono C1 de la tetrahydroisoquinolina de partida, el cual a continuación experimentó una reacción de adición electrófila con un acetiluro de oro, generado a partir de un alquino terminal y el catalizador de Au(III). De esta manera se obtuvieron distintos derivados de tetrahydroisoquinolina racémicos y funcionalizados selectivamente en el C1 (Esquema 35).

<sup>246</sup> M. Odachowski, M. F. Greaney, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2018**, 8, 10032-10035.



**Esquema 35.** Combinación en cascada de una MAO y  $\text{HAuCl}_4$  para la obtención de derivados de tetrahidroisoquinolina racémicos.

Existen algunos ejemplos más de la combinación de catalizadores de oro y enzimas en procesos *one-pot*, sin embargo, en todos ellos se emplean las especies de oro para llevar a cabo reacciones de hidratación de alquinos, por lo que estos ejemplos se discutirán en los antecedentes de los Capítulos 4 y 5 de esta Tesis Doctoral.

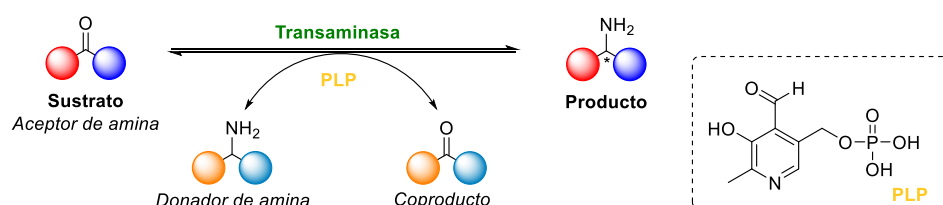
## II.2 Transaminasas

En el *Bloque I* de esta Tesis Doctoral se han descrito las características generales del tipo de enzimas empleadas en el *Capítulo 1*, las lacasas y las alcohol deshidrogenasas, que también se emplearán en el *Capítulo 2*. Debido a que las transaminasas serán las enzimas utilizadas en el *Capítulo 3*, en este momento es necesario describir su modo de acción.

Las aminotransferasas o transaminasas (TAs) pertenecen al grupo de las transferasas y catalizan la transferencia reversible de un grupo amino de un donador (generalmente una amina primaria), a un aceptor (un compuesto carbonílico como una cetona o un aldehído), empleando piridoxal 5'-fosfato (*pyridoxal 5'-phosphate*, PLP) como cofactor necesario para realizar esta transferencia (Esquema 36).<sup>247</sup>

<sup>247</sup> (a) I. Slabu, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2017**, 7, 8263-8284; (b) M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts* **2018**, 8, 254.

## Bloque II. Parte I. Introducción



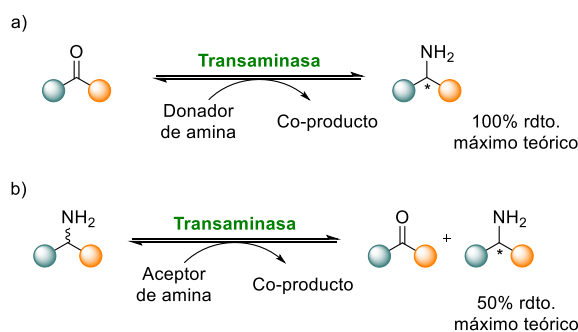
**Esquema 36.** Esquema general de la transferencia reversible de un grupo amino a un compuesto carbonílico empleando una transaminasa.

El primer trabajo en el que se demostró que una enzima era capaz de catalizar procesos de transaminación fue descrito en el año 1930 por Needham,<sup>248</sup> y desde ese momento, se han descubierto, estudiado y evolucionado numerosas transaminasas, con el fin de ser aplicadas en distintos procesos sintéticos. De esta manera, las transaminasas pueden catalizar dos tipos de procesos estereoselectivos principalmente:

- Biotransaminación de grupos carbonilos: Es, sin duda alguna, el proceso sintético más interesante y más ampliamente estudiado de este tipo de enzimas, ya que permite obtener las correspondientes aminas con un rendimiento máximo teórico del 100%, al tratarse de un proceso de desimetrización de un compuesto proquiral (Esquema 37, a). Sin embargo, la termodinámica de esta transformación no es favorable, por lo que es necesario aplicar distintas estrategias (ver Sección II.2.2) con el fin de maximizar el rendimiento de la reacción.
- Resolución cinética de aminas racémicas: Las transaminasas también son capaces de catalizar la resolución cinética de aminas racémicas mediante la desaminación de uno de los dos enantiómeros de la mezcla racémica que es transformado en un derivado carbonílico, mientras el otro permanece inalterado. De esta manera tan solo es posible obtener un rendimiento máximo teórico del 50% de un compuesto enantiopuro (Esquema 37, b).

<sup>248</sup> D. M. Needham, *Biochem. J.* **1930**, *24*, 208-227.





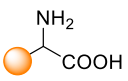
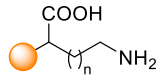





**Esquema 37.** Procesos estereoselectivos mediados por transaminasas: a) desimetrización de compuestos carbonílicos proquirales; y b) resolución cinética de aminas racémicas.

Las transaminasas se pueden clasificar en tres grandes grupos en función de la naturaleza del sustrato sobre el que son capaces de actuar (Figura 14):<sup>249</sup>

- $\alpha$ -Transaminasas ( $\alpha$ -TAs): Son enzimas muy específicas y solamente aceptan sustratos que presenten un grupo ácido carboxílico en la posición  $\alpha$  al grupo amino.
- $\omega$ -Transaminasas ( $\omega$ -TAs): Transfieren grupos amino hacia/desde posiciones terminales espaciadas al menos por un átomo de carbono del grupo ácido carboxílico.
- Amino Transaminasas (ATAs): Este tipo de transaminasas son las más versátiles de todas ya que no requieren de la presencia de un grupo ácido carboxílico en la molécula que se desea transformar. Por ello, son las más empleadas en síntesis orgánica permitiendo, entre otras, la obtención de aminas ópticamente activas a partir de cetonas proquirales.

<sup>249</sup> M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *Application of Transaminases en Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, cap. 19.

## Bloque II. Parte I. Introducción

Tipo de transaminasa	$\alpha$ -transaminasas	$\omega$ -transaminasas	amino transaminasas
Donador de amina			
	 = cadena de aminoácido	 = NHR o H	 = alquilo o arilo  = H, CH <sub>3</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , CH <sub>2</sub> OH
Aceptor de amina natural	$\alpha$ -cetoglutarato	$\alpha$ -cetoglutarato	piruvato

**Figura 14.** Clasificación de las transaminasas en función del donador y aceptor del grupo amino empleado.

### II.2.1 Mecanismo de reacción

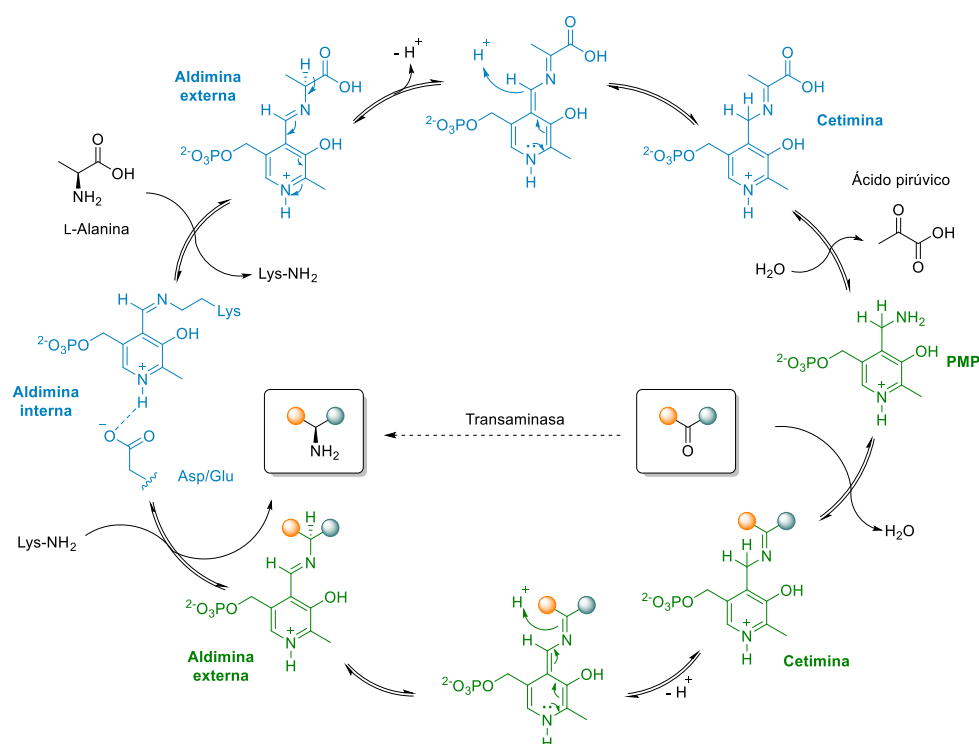
El mecanismo de reacción que sigue este tipo de enzimas se ha estudiado en profundidad para el caso de la aspartato aminotransferasa, y se puede considerar análogo para el resto de TAs.<sup>250</sup> Se trata de un mecanismo completamente reversible y se puede dividir en dos partes bien diferenciadas. En la primera de ellas (azul en el Esquema 38), el PLP se encuentra unido al residuo de lisina (Lys) del centro activo de la transaminasa mediante un enlace imínico, formando el intermedio conocido como aldimina interna, la cual se encuentra estabilizada gracias a un aspartato (Asp) o glutamato (Glu).<sup>251</sup> Posteriormente reacciona con el donador del grupo amino (L-alanina, por ejemplo) para generar una aldimina externa, de manera que se produce la transferencia del grupo amino desde el donador al complejo PLP-transaminasa. Posteriormente, la lisina presente en el centro activo cataliza la isomerización del doble enlace de la aldimina externa generando una cetimina, la cual experimenta una reacción de hidrólisis, generando la piridoxamina 5'-fosfato (*pyridoxamine 5'-phosphate*, PMP) y el subproducto del proceso de transaminación, el ácido pirúvico en este caso.

En la segunda parte del mecanismo (verde en el Esquema 38), el PMP reacciona con el aceptor de amina (por ejemplo, una cetona) generando una cetimina, que es transformada en una aldimina externa mediante un proceso de isomerización, mediado de nuevo por la lisina catalítica, y posterior protonación. Finalmente, esta

<sup>250</sup> (a) J. M. Goldeberg, J. F. Kirsch, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5280-5291; (b) H. Mizuguchi, H. Hayashi, K. Okada, I. Miyahara, K. Hirotsu, H. Kagamiyama, *Biochemistry* **2001**, *40*, 353-360.

<sup>251</sup> A. C. Elliot, J. F. Kirsch, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 383-415.

aldimina reacciona con la lisina catalítica, dando lugar al producto de transaminación y regenerando el PLP, el cual será empleado en un nuevo ciclo catalítico.<sup>252</sup>



**Esquema 38.** Mecanismo de la reacción de transaminación empleando una transaminasa y L-alanina como donador del grupo amino.

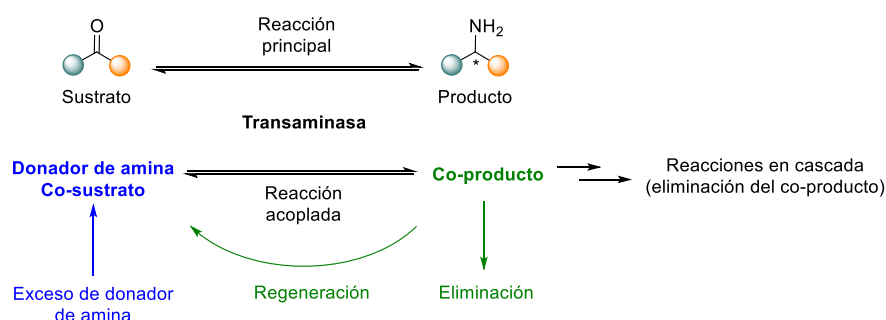
### II.2.2 Termodinámica de la reacción de biotransaminación

El proceso de transaminación de un compuesto carbonílico empleando como donador de grupo amino un aminoácido, como la alanina, se encuentra desfavorecido termodinámicamente, por lo que, si se desea sintetizar una amina mediante este procedimiento, es necesario desplazar el equilibrio de la reacción en el sentido deseado (Esquema 39).<sup>253</sup>

<sup>252</sup> K. E. Cassimjee, B. Manta, F. A. Himo, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8453-8464.

<sup>253</sup> (a) P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, J. S. Jensen, N. Al-Haque, W. Neto, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1479-1493; (b) M. Voges, R. Abu, M. T. Gundersen, C. Held, J. M. Woodley, G. Sadowski, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 976-986; (c) B. Manta, K. E. Cassimjee, F. Himo, *ACS Omega* **2017**, *2*, 890-898.

## Bloque II. Parte I. Introducción



**Esquema 39.** Desplazamiento del equilibrio de la reacción de transaminación hacia la formación de la amina deseada.

El donador del grupo amino natural de las amino transaminasas es la alanina,<sup>254</sup> la cual es transformada en ácido pirúvico (ver Esquema 40). Está descrito que este compuesto provoca la progresiva inhibición de las transaminasas cuando se acumula en elevadas concentraciones,<sup>41b,247b</sup> de ahí que la utilización de un gran exceso molar de alanina no tenga el efecto deseado de desplazar el equilibrio de la reacción. Por tanto, resulta esencial eliminar el ácido pirúvico del medio, y con este fin, se han desarrollado diversas aproximaciones que implican el empleo de otras enzimas:

- Alanina deshidrogenasa (AlaDH) como estrategia de regeneración del donador de amina.<sup>255</sup> Permite transformar el ácido pirúvico generado en alanina, lo que permite su uso en cantidades catalíticas. Sin embargo, esta metodología requiere el empleo de otra enzima adicional (GDH o FDH), ya que es necesario regenerar el cofactor pirimidínico empleado por la AlaDH (Esquema 40, verde).
- Lactato deshidrogenasa (LDH) como estrategia de eliminación del co-producto.<sup>256</sup> Mediante esta metodología el ácido pirúvico se transforma en ácido láctico mediante un proceso de reducción siendo necesaria la

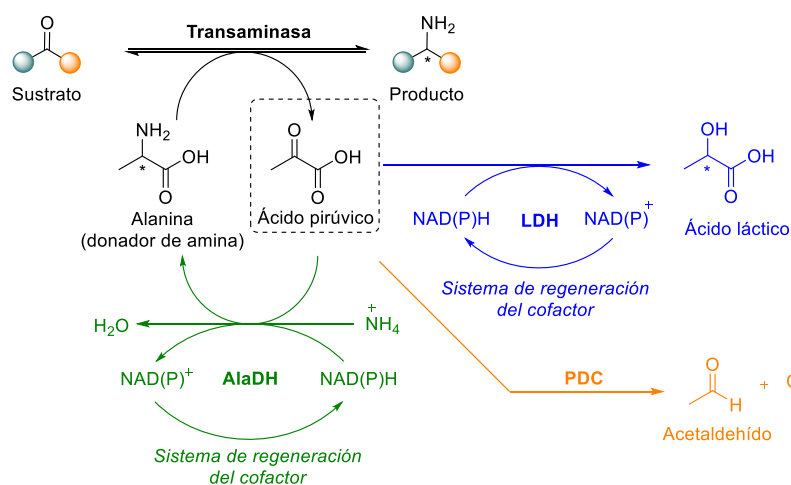
<sup>254</sup> Se emplea L o D-alanina en función de la selectividad de la transaminasa empleada. L-Alanina para las ATAs (*S*)-selectivas y D-alanina para las ATAs (*R*)-selectivas.

<sup>255</sup> D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337-9340.

<sup>256</sup> (a) J. S. Shin, B. G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *62*, 206-211; (b) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761-2766; (c) N. Richter, J. E. Farnberger, D. Pressnitz, H. Lechner, F. Zepeck, W. Kroutil, *Green Chem.* **2015**, *17*, 2952-2958.

presencia de un cofactor pirimidínico y su correspondiente sistema de regeneración (Esquema 40, azul).

- Piruvato descarboxilasa (PDC) como estrategia de eliminación del co-producto:<sup>257</sup> En este caso el ácido pirúvico experimenta una reacción de descarboxilación catalizada por la PDC, generando CO<sub>2</sub> y acetaldehído. Esta metodología presenta las ventajas de no requerir la adición de un cofactor adicional y que la formación de CO<sub>2</sub> desplaza el equilibrio de reacción en el sentido deseado de manera cuasi-irreversible. Sin embargo, la presencia de acetaldehído puede ser un problema ya que algunas transaminasas son capaces de catalizar su transformación en etilamina, por lo que se suele requerir un exceso mayor del donador de amina (Esquema 40, naranja).



**Esquema 40.** Estrategias para la regeneración de la alanina (verde), y para la eliminación del ácido pirúvico (azul y naranja).

En los últimos años se ha estudiado la posibilidad de utilizar un donador del grupo amino distinto al natural. Entre todas estas alternativas destaca el uso de isopropilamina (Esquema 41, a), ya que es un reactivo de bajo coste económico, además de ser aquiral por lo que puede ser empleado tanto con ATAs (*S*)- como (*R*)-selectivas. Por otro lado, el único subproducto de la reacción es la acetona, producto

<sup>257</sup> (a) M. D. Truppo, N. J. Turner, J. D. Rozzell, *Chem. Commun.* **2009**, 2127-2129; (b) M. Höhne, S. Hühl, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2008**, 9, 363-365.

## Bloque II. Parte I. Introducción

fácilmente eliminable del medio debido a su bajo punto de ebullición.<sup>258</sup> Sin embargo, el empleo de isopropilamina como donador de amina presenta la desventaja de requerir grandes excesos molares (>40 equivalentes) para desplazar el equilibrio de reacción hacia la formación de la amina deseada si no se elimina la acetona. Además, muy pocas transaminasas naturales son capaces de aceptar este donador de amina ya que, debido a su pequeño tamaño y gran nucleofilia, puede verse afectada su coordinación al centro activo de la enzima, así como a dar lugar a procesos de inhibición en presencia de elevadas concentraciones de esta amina.<sup>259</sup> Con el fin de solventar esta limitación, y debido a las ventajas tanto operacionales como económicas que presenta el empleo de isopropilamina en lugar de alanina (no es necesaria la adición de enzimas auxiliares para eliminar o reciclar el ácido pirúvico), se han modificado un gran número de transaminasas naturales mediante técnicas de biología molecular para que sean capaces de catalizar diferentes procesos utilizando esta amina.<sup>258b,260</sup>

Por otro lado, al igual que en los procesos de biorreducción, en los últimos años se ha investigado el empleo de *smart cosubstrates* como donadores del grupo amino en reacciones de biotransaminación, siendo únicamente necesario su uso en cantidades prácticamente equimolares con respecto al sustrato.<sup>33,261</sup> Este tipo de sustratos experimentan reacciones espontáneas de ciclación o polimerización tras el proceso de transaminación, por lo que son capaces de desplazar el equilibrio químico de la reacción de manera cuasi-irreversible hacia la formación de la amina deseada (Esquema 41, b-e). Generalmente, las diaminas suelen ser el tipo de *smart cosubstrates* más empleado, ya que generan un aminoaldehído intermedio, el cual experimenta una reacción espontánea de ciclación irreversible.<sup>33d,261</sup>

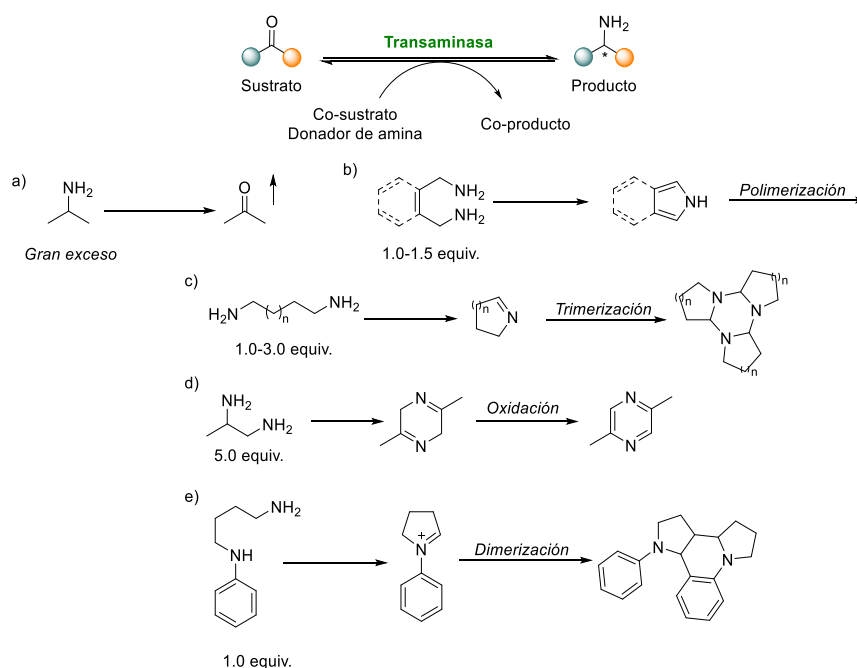
---

<sup>258</sup> (a) P. Tufvesson, M. Nordblad, U. Krühne, M. Schürmann, A. Vogel, R. Wohlgemuth, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 652-660; (b) P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrikos-Ergas, I. V. Pavlidis, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1634-1642.

<sup>259</sup> R. Abu, J. M. Woodley, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3094-3105.

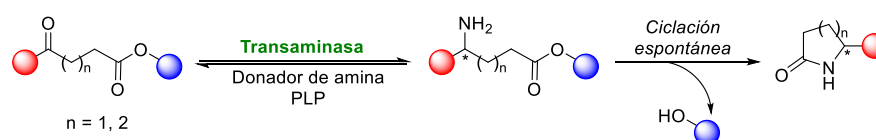
<sup>260</sup> (a) C. K. Savile et al. *Science* **2010**, *329*, 305-309; (b) M. Höhne, S. Schätzle, H. Jochens, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 807-813.

<sup>261</sup> (a) A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717; (b) I. Slabu, J. L. Galman, N. J. Weise, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1038-1042; (c) A. Gomm, W. Lewis, A. P. Green, E. O'Reilly, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 12692-12695; (d) S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 2553-2559; (e) S. Grigoriou, P. Kugler, E. Kulcinskaja, F. Walter, J. King, P. Hill, V. F. Wendisch, E. O'Reilly, *Green Chem.* **2020**, *22*, 4128-4132; (f) C. A. McKenna, M. Štiblariková, I. de Silvestro, D. J. Campopiano, A. L. Lawrence, *Green Chem.* **2022**, *24*, 2010-2016.



**Esquema 41.** Desplazamiento del equilibrio de la reacción de biotransaminación empleando: a) isopropilamina; y b-e) smart cosubstrates.

Otra alternativa es el diseño de un proceso en el cual el producto propio de la reacción de biotransaminación dé lugar a una transformación espontánea, o sea consumido de alguna otra forma. Un ejemplo de ello es el trabajo propuesto por nuestro grupo de investigación en el cual, tras una reacción de biotransaminación se genera un aminoéster, el cual experimenta una reacción espontánea de ciclación generando una lactama, desplazando así el equilibrio de la reacción en el sentido deseado (Esquema 42).<sup>262</sup>



**Esquema 42.** Desplazamiento del equilibrio de una reacción de biotransaminación mediante un proceso químico espontáneo del producto generado.

<sup>262</sup> Á. Mourelle-Insua, L. A. Zampieri, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, 360, 686-695.

## Bloque II. Parte I. Introducción

### II.2.3 Transaminasas en síntesis orgánica

Las transaminasas se han convertido en una de las subclases de enzimas más empleadas en síntesis orgánica, destacando especialmente su papel como biocatalizadores en procesos de desimetrización de cetonas proquirales para la obtención de aminas ópticamente activas,<sup>247,263</sup> las cuales son compuestos de gran importancia en la industria farmacéutica y agroquímica.<sup>264</sup>

Al igual que ocurre con las ADHs en la reducción de grupos carbonilo, las transaminasas son una alternativa sostenible a la reacción de hidrogenación asimétrica de iminas de Noyori para la obtención de aminas ópticamente activas.<sup>184,265</sup> Además, aunque existen algunos ejemplos de reacciones de transaminación catalizadas por especies metálicas, especialmente de  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ , o  $Cu^{2+}$ , generalmente suelen requerirse temperaturas muy elevadas y las selectividades de estos procesos suelen ser moderadas.<sup>266</sup>

Uno de los ejemplos más clásicos que pone de manifiesto el potencial de estas enzimas ha sido la síntesis del antidiabético *Sitagliptina*, desarrollado en un trabajo colaborativo por personal de las empresas Codexis y Merck.<sup>260a</sup> Esta investigación supuso una alternativa sintética a la síntesis establecida para este compuesto, la cual se basaba en una reacción de hidrogenación de una enamina empleando un catalizador de Rh a una presión de hidrógeno de 250 psi. A través de un proceso de evolución dirigida, se logró desarrollar una transaminasa de la especie de *Arthrobacter* con un total de 27 mutaciones en su secuencia de aminoácidos, la ArRmut11-TA, con la cual fue posible obtener el precursor directo de la Sitagliptina con un rendimiento del 92% y de manera enantiopura utilizando isopropilamina como donador de amina (Esquema 43). Esta alternativa enzimática supuso una nueva ruta sintética, con mejor rendimiento y una disminución de la generación de residuos.<sup>267</sup>

---

<sup>263</sup> (a) H. Sun, H. Zhang, E. L. Ang, H. Zhao, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1275-1284; (b) J. Chapman, A. E. Ismail, C. Z. Dinu, *Catalysts* **2018**, *8*, 238; (c) S. A. Kelly, S. Mix, T. S. Moody, B. F. Gilmore, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 4781-4794.

<sup>264</sup> O. I. Afanasyev, E. Kuchuk, D. L. Usanov, D. Chusov, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 11857-11911.

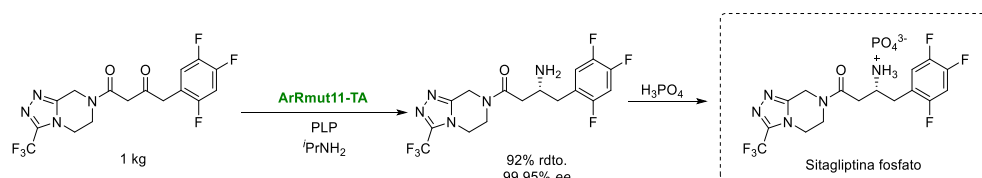
<sup>265</sup> D. Sakamoto, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 10793-10800.

<sup>266</sup> (a) Y. Xie, H. Pan, M. Liu, X. Xiao, Y. Shi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1740-1748; (b) R. J. Mayer, H. Kaur, S. A. Rauscher, J. Moran, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 19099-19111.

<sup>267</sup> A. A. Desai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1974-1976.

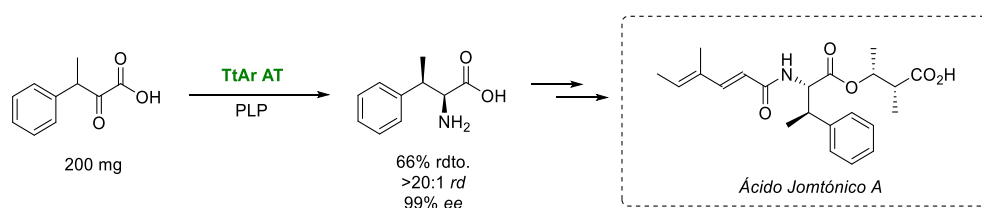


## Bloque II. Parte I. Introducción



**Esquema 43.** Síntesis de la Sitagliptina empleando una transaminasa evolucionada.

Recientemente, Renata y colaboradores han descrito la primera síntesis total del ácido *Jomtónico A*, un producto natural con propiedades antidiabéticas y antiteratogénicas.<sup>268</sup> Para ello, en un primer paso, los autores desarrollaron la resolución cinética dinámica de un  $\alpha$ -cetoácido catalizada por una  $\alpha$ -transaminasa evolucionada. De esta manera fue posible obtener el derivado de aminoácido deseado con un 66% de rendimiento y una excelente selectividad (Esquema 44).



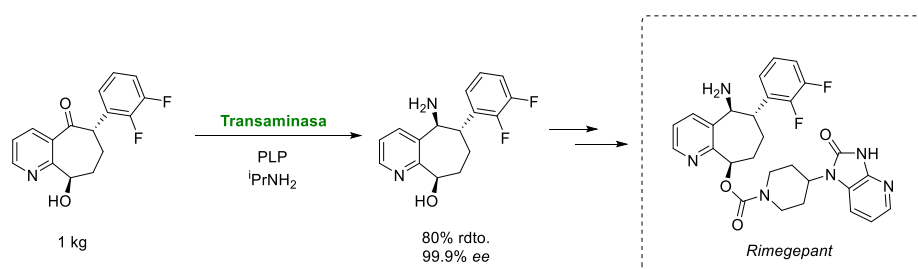
**Esquema 44.** Resolución cinética dinámica de un  $\alpha$ -cetoácido catalizada por una transaminasa modificada en la síntesis total del ácido *Jomtónico A*.

Más recientemente, Zhang y colaboradores han descrito la síntesis de un precursor directo del *Rimegepant*, fármaco empleado en el tratamiento de las migrañas.<sup>269</sup> En esta propuesta se ha empleado una transaminasa modificada genéticamente de *Chromobacterium violaceum* e isopropilamina como donador del grupo amino, de manera que fue posible obtener el compuesto deseado con un rendimiento aislado del 80% y de manera enantiopura a una escala de reacción de 1 kg de sustrato (Esquema 45).

<sup>268</sup> F. Li, L.-C. Yang, J. Zhang, J. S. Chen, H. Renata, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 17680-17685.

<sup>269</sup> Y. Ma, X. Jiao, Z. Wang, H. Mu, K. Sun, X. Li, T. Zhao, X. Liu, N. Zhang, *Org. Process Res. Dev.* **2022**, *26*, 1971-1977.

Bloque II. Parte I. Introducción



Esquema 45. Síntesis de un precursor del Rimegepant empleando una transaminasa.

*Antecedentes*



### II.3 Sistemas alílicos: Importancia de alcoholes y aminas alílicos

Los sistemas alílicos, especialmente los alcoholes y aminas, constituyen una estructura químicamente muy interesante debido a la presencia de dos grupos funcionales que pueden ser modificados de manera sencilla. En este aspecto, los alcoholes alílicos enantioenriquecidos se han empleado como sustratos de partida en la síntesis de diversos compuestos de interés, como por ejemplo de un inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV,<sup>270</sup> o del (*R*)-(-)-baclofeno, un inhibidor de la ácido  $\gamma$ -aminobutírico aminotransferasa (GABA),<sup>271</sup> entre otros.

En cuanto a la función de las aminas alílicas, estas estructuras son de gran interés debido a que se encuentran presentes en numerosos compuestos biológicamente activos como, entre otros, la terbinafina o la naftifina, fármacos empleados como antimicóticos, o la himandravina, un producto natural utilizado como agente antiespasmódico.<sup>272</sup>

Además, este tipo de compuestos pueden experimentar la reacción de sustitución alílica, en la que se emplea un catalizador metálico, generalmente una especie de Pd,<sup>273</sup> aunque existen ejemplos descritos utilizando otros metales de transición.<sup>274</sup>

Una manera de obtener alcoholes y aminas alílicas enantioenriquecidas es mediante una reacción de desimetrización de una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, empleando

---

<sup>270</sup> (a) S. D. Edmondson et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3048-3052; (b) S. D. Edmondson et al. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3614-3627.

<sup>271</sup> E. Brenna, N. Caraccia, C. Fuganti, D. Fuganti, P. Grasselli, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3801-3805.

<sup>272</sup> W.-Y. Zhang, P. C. Hogan, C.-L. Chen, J. Niu, Z. Wang, D. Lafrance, O. Gilicky, N. Dunwoody, M. Ronn, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 1784-1795.

<sup>273</sup> O. Pàmies et al. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 4373-4505.

<sup>274</sup> (a) N. A. Butt, W. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 7929-2967; (b) Q. Cheng, H.-F. Tu, C. Zheng, J.-P. Qu, G. Helmchen, S.-L. You, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 1855-1969; (c) D. Ghorai, À. Cristòfol, A. W. Kleij, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2022**, e202100820.

## Bloque II. Parte I. Antecedentes

para ello ADHs o ATAs como catalizadores. Para acceder a este tipo de precursores, el reagrupamiento de Meyer-Schuster de alcoholes propargílicos se considera una aproximación adecuada, la cual se mostrará en detalle a continuación.

### II.4 Reagrupamiento de Meyer-Schuster de alcoholes propargílicos

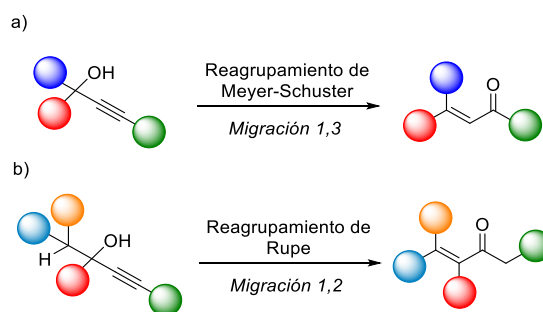
Una de las transformaciones más características que pueden experimentar los alcoholes propargílicos es el llamado reagrupamiento de Meyer-Schuster, mediante el cual es posible obtener compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados.<sup>275</sup> Esta reacción se entiende formalmente como una transposición 1,3 del grupo hidroxilo del alcohol propargílico, seguido de un proceso redox en el cual se oxida el grupo alcohol y se reduce el triple enlace C–C (Esquema 46, a). Si el alcohol propargílico de partida presenta un enlace C–H en la posición  $\beta$  respecto al grupo hidroxilo, se produce el reagrupamiento de Rupe, el cual compite con el reagrupamiento de Meyer-Schuster, y se entiende como una migración 1,2 del alcohol (Esquema 46, b).<sup>276</sup> Ambos tipos de reagrupamientos han sido ampliamente estudiados para la obtención de diversas moléculas de interés,<sup>277</sup> y suponen una alternativa sostenible para la síntesis de compuestos  $\alpha,\beta$ -insaturados, ya que son reacciones que transcurren con total economía atómica al tratarse de procesos de isomerización. No solo los alcoholes sufren este tipo de reagrupamientos, ya que también los ésteres propargílicos pueden experimentar este tipo de reactividad.

---

<sup>275</sup> (a) K. H. Meyer, K. Schuster, *Chem. Ber.* **1922**, *55*, 819; (b) D. A. Engel, G. B. Dudley, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4149-4158; (c) V. Cadierno, P. Crochet, S. E. García-Garrido, J. Gimeno, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 4015-4031.

<sup>276</sup> (a) H. Rupe, E. Kambli, *Helv. Chim. Acta* **1926**, *9*, 672; (b) G. F. Hennion, R. B. Davis, D. E. Maloney, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2813-2814.

<sup>277</sup> (a) S. C. Welch, C. P. Hagan, D. H. White, W. P. Fleming, J. W. Trotter, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 549-556; (b) A. C. Eddine, A. Daïch, A. Jilale, B. Decroix, *Heterocycles* **1999**, *51*, 2907; (c) H. Stark, B. Sadek, M. Krause, A. Hüls, X. Ligneau, C. R. Ganellin, J.-M. Arrang, J. C. Schwartz, W. Schunack, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3987-3994; (d) D. Colombo, G. Bombieri, R. Lenna, N. Marchini, E. Modica, A. Scala, *Steroids* **2006**, *71*, 745-750; (e) R. Beretta, M. Gallotti, U. Pennè, A. Porta, J. F. G. Romero, G. Zanon, G. Vidari, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 1601-1609; (f) W. C. Chan, K. Koide, *Org. Lett.* **2019**, *20*, 7798-7802; (g) J. Liu, L. Zhou, Y. Zou, Q. Wang, A. Goeke, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 7832-7836.



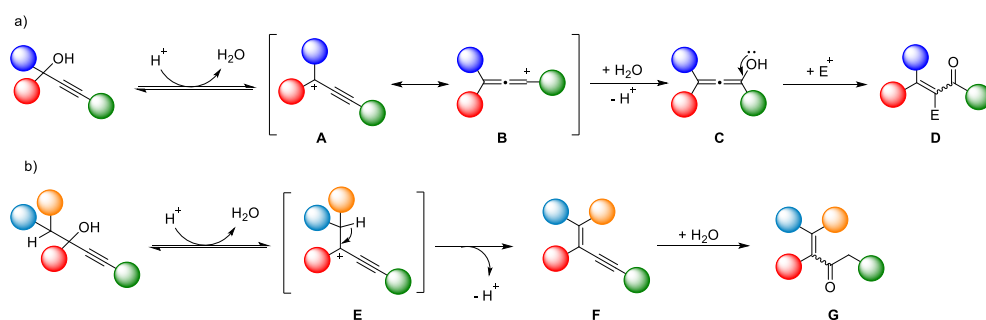
**Esquema 46.** Reorganizamientos de Meyer-Schuster y Rupe de alcoholes propargílicos.

Tradicionalmente, ambos reorganizamientos transcurrían empleando condiciones fuertes de reacción, como elevadas temperaturas y medios ácidos, lo que hacía que, originalmente, estas transformaciones no fueran compatibles con la presencia de otros grupos funcionales. El mecanismo de reacción de estos dos reorganizamientos (Esquema 47) tiene una primera etapa común en la que se produce la protonación del grupo hidroxilo, generando un carbocatión mediante la pérdida de una molécula de agua. Posteriormente, sus mecanismos divergen a través de dos rutas independientes:

- *Meyer-Schuster*: Una vez generado el carbocatión en la posición propargílica **A**, este se encuentra en equilibrio con su forma resonante **B**, cuya formación se puede explicar como una transposición 1,3 del carbocatión generado. Posteriormente, se produce el ataque nucleófilo de una molécula de agua a la especie **B**, para formar el alenol **C**, el cual evoluciona mediante una reacción de tautomerización generando el compuesto  $\alpha,\beta$ -insaturado **D**. Este alenol intermedio **C** puede reaccionar con distintos electrófilos permitiendo incorporar diferentes sustituciones en la posición  $\alpha$  al grupo carbonilo (Esquema 47, a).<sup>278</sup>
- *Rupe*: Tras generar el carbocatión **E**, se produce una eliminación del hidrógeno en  $\alpha$  al carbocatión, generando el enino **F**, el cual experimenta una reacción de hidratación del triple enlace C–C para generar el compuesto  $\alpha,\beta$ -insaturado **G** (Esquema 47, b).

<sup>278</sup> D. Roy, P. Tharra, B. Baire, *Asian J. Org. Chem.* **2018**, 7, 1015-1032.

## Bloque II. Parte I. Antecedentes



**Esquema 47.** Mecanismo de reacción de los reagrupamientos de: a) Meyer-Schuster; y b) Rupe.

Aunque tradicionalmente, la manera más común de producir el reagrupamiento de Meyer-Schuster ha sido mediante el empleo de ácidos de Brønsted,<sup>279</sup> recientemente se han descrito nuevas metodologías utilizando catalizadores metálicos, con el fin de llevar a cabo esta transformación bajo condiciones más suaves de reacción. Así, se conocen múltiples ejemplos del uso de catalizadores de vanadio,<sup>277g,280</sup> rutenio,<sup>281</sup> indio,<sup>282</sup> o hierro,<sup>283</sup> entre otros.<sup>275b,c,279</sup> Actualmente, las especies de oro son las más frecuentemente empleadas para catalizar el reagrupamiento de Meyer-Schuster, mostrándose varios ejemplos a continuación al tratarse de la reacción metálica de estudio en los Capítulos 2 y 3 de esta Tesis Doctoral.

<sup>279</sup> (a) F. Justaud, A. Hachem, R. Grée, *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 514-542; (b) L. Radtanajiravong, J. Peters, J. Hummell, S. Díez-González, *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20*, 7338-7342.

<sup>280</sup> (a) B. M. Trost, X. Luan, Y. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12824-12833; (b) A. Antiñolo, F. Carrillo-Hermosilla, V. Cadierno, J. García-Álvarez, A. Otero, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 123-128; (c) B. M. Trost, J. S. Tracy, *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 1568-1579.

<sup>281</sup> (a) M. Picquet, C. Bruneau, P. H. Dixneuf, *Chem. Commun.* **1997**, 1201-1202; (b) M. Picquet, A. Fernández, C. Bruneau, P. H. Dixneuf, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2361-2366; (c) V. Cadierno, S. E. García-Garrido, J. Gimeno, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 101-110; (d) V. Cadierno, P. Crochet, J. Gimeno, *Synlett* **2008**, 1105-1124.

<sup>282</sup> (a) D. A. Engel, S. S. Lopez, G. B. Dudley, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6988-6996; (b) V. Cadierno, J. Francos, J. Gimeno, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4773-4776; (c) Y. Onishi, Y. Nishimoto, M. Yasuda, A. Baba, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1176-1179; (d) J. Francos, J. Borge, J. Díez, S. E. García-Garrido, V. Cadierno, *Catal. Commun.* **2015**, *63*, 10-14.

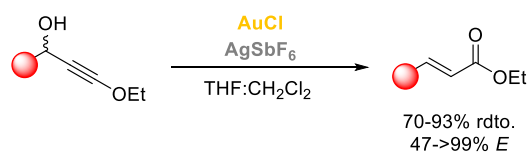
<sup>283</sup> (a) B. Alcaide, P. Almendros, S. Cembellín, T. Martínez del Campo, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1070-1078; (b) N. Ríos-Lombardía, L. Cicco, K. Yamamoto, J. A. Hernández-Fernández, F. Morís, V. Capriati, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 15165-15168.



## II.4.1 Reagrupamiento de Meyer-Schuster catalizado por especies de Au(I)

La capacidad de los ácidos de Lewis blandos para coordinarse y activar enlaces  $\pi$  los convierte en excelentes catalizadores para promover este tipo de reacciones de isomerización. En este contexto, históricamente, las especies de mercurio han sido empleadas para catalizar el reagrupamiento de Meyer-Schuster,<sup>284</sup> sin embargo, debido a su elevada toxicidad, a su uso en cantidades estequiométricas, y a las condiciones de reacción agresivas requeridas, se han sustituido, especialmente, por catalizadores de oro.

Uno de los trabajos pioneros en este campo fue el descrito por Dudley y colaboradores en el año 2007 (Esquema 48).<sup>285</sup> Para ello, se empleó AuCl como catalizador junto con AgSbF<sub>6</sub>. Mediante su uso se logró aumentar la selectividad del proceso hacia la formación de los isómeros *E* de los productos deseados con respecto a un trabajo previo del mismo grupo en el cual se utilizó únicamente AuCl<sub>3</sub> como catalizador.<sup>286</sup>



**Esquema 48.** Primer ejemplo del reagrupamiento de Meyer-Schuster catalizado por una especie de Au(I).

Desde ese momento, numerosos ejemplos del empleo de catalizadores de Au(I) para producir el reagrupamiento de Meyer-Schuster han sido descritos y recogidos en varias revisiones bibliográficas.<sup>275b,c,278,279,287</sup> De entre todos ellos, cabe destacar el propuesto por Nolan y colaboradores, en el cual se describe el uso, por primera vez, de un catalizador de Au(I) de tipo NHC para llevar a cabo el reagrupamiento de Meyer-Schuster.<sup>288</sup> Así, se estudió el comportamiento de distintos

<sup>284</sup> (a) G. F. Hennion, F. P. Kupiecki, *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 1601-1609; (b) D. Szemenyei, D. Steichen, J. E. Byrd, *J. Mol. Catal.* **1977**, *2*, 105-117; (c) J. E. Byrd, *J. Mol. Catal.* **1983**, *19*, 119-138; (d) J. S. Yadav, V. Prahlad, B. Muralidhar, *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 3415-3418; (e) Y. Li, H. Huang, J. Liu, P. Yan, H. Liu, Q. Sun, X. Wang, C. Wang, *Steroids* **2011**, *76*, 1615-1620.

<sup>285</sup> S. S. Lopez, D. A. Engel, G. B. Dudley, *Synlett* **2007**, 949-953.

<sup>286</sup> D. A. Engel, G. B. Dudley, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4027-4029.

<sup>287</sup> J. García-Álvarez, S. E. García-Garrido, P. Crochet, V. Cadierno, *Curr. Top. Catal.* **2012**, *10*, 35-56.

<sup>288</sup> R. S. Ramón, N. Marion, S. P. Nolan, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1767-1773.

## Bloque II. Parte I. Antecedentes

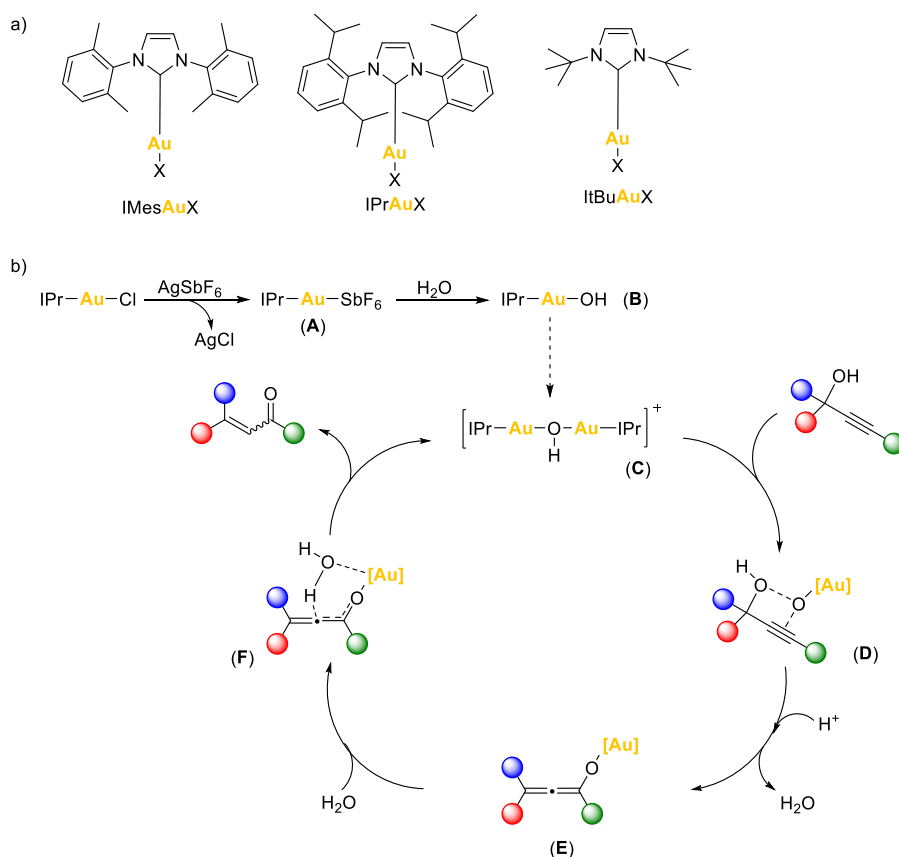
catalizadores de tipo NHC, como el IMes [1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-1,3-dihidro-2*H*-imidazol-2-ilideno], el IPr [1,3-bis-(2,6-diisopropilfenil)-1,3-dihidro-2*H*-imidazol-2-ilideno] y el ItBu [1,3-bis-*tert*-butil-2,3-dihidro-2*H*-imidazol-2-ilideno] (Esquema 49, a), obteniéndose los mejores resultados al emplear IPrAuCl junto con AgSbF<sub>6</sub>.

El mecanismo de esta transformación (Esquema 49, b) comienza con una reacción de intercambio del anión entre el catalizador de Au(I) y la sal de plata, para generar la especie IPrAuSbF<sub>6</sub> (**A**), la cual reacciona con una molécula de agua activada por el catalizador de Au, para generar un intermedio hidroxoro [IPrAu(OH)] (**B**). Esta especie de Au(I) intermedia, se consideraba el verdadero catalizador de la reacción, sin embargo, fue aislada y caracterizada, observándose que su actividad catalítica para promover el reagrupamiento de Meyer-Schuster era moderada.<sup>289</sup> Posteriormente, se consiguió aislar e identificar una especie dinuclear de Au(I), [{IPrAu}<sub>2</sub>(μ-OH)][BF<sub>4</sub>] (**C**) como la verdadera especie catalítica de esta transformación en medio acuoso.<sup>290</sup> Una vez generada, se coordina al triple enlace del alcohol propargílico de partida, dando lugar a la especie intermedia **D**, la cual evoluciona mediante la eliminación de una molécula de agua, para formar el alenolato **E**. La reacción entre **E** y una molécula de agua completa el ciclo catalítico, regenerándose el catalizador y liberándose el producto del reagrupamiento de Meyer-Schuster al medio de reacción.

---

<sup>289</sup> S. Gaillard, A. M. Z. Slawin, S. P. Nolan, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 2742-2744.

<sup>290</sup> R. S. Ramón, S. Gaillard, A. M. Z. Slawin, A. Porta, A. D'Alfonso, G. Zanoni, S. P. Nolan, *Organometallics* **2010**, 29, 3665-3668.



**Esquema 49.** a) Ejemplos de complejos NHC-Au(I). b) Mecanismo del reagrupamiento de Meyer-Schuster promovido por un catalizador de Au(I) de tipo NHC.

A pesar de que el reagrupamiento de Meyer-Schuster catalizado por especies de Au es una estrategia muy útil y sencilla para la generación de compuestos  $\alpha,\beta$ -insaturados, no se ha propuesto hasta la fecha su combinación junto con alguna etapa biocatalítica. Basados en estos antecedentes, nos hemos propuesto estudiar en este capítulo:

- El desarrollo del reagrupamiento de Meyer-Schuster de distintos alcoholes propargílicos racémicos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos empleando varios catalizadores de Au(I) en un medio predominantemente acuoso que pueda hacerlo compatible con el uso de enzimas.

*Bloque II. Parte I. Antecedentes*

- El estudio y optimización de la reacción de biorreducción de las cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas generadas mediante el reagrupamiento de Meyer-Schuster, con el fin de encontrar ADHs de estereoselectividad complementaria que permitan acceder a ambos enantiómeros de una serie de alcoholes alílicos  $\beta,\beta$ -disustituidos.
- El estudio y optimización de la reacción de biotransaminación de las cetonas intermedias empleando transaminasas, para obtener aminas alílicas enantioenriquecidas.
- Investigar la posibilidad de llevar a cabo los procesos en cascada que permitan transformar alcoholes propargílicos racémicos en alcoholes o aminas alílicas enantioenriquecidas, mediante la combinación de un catalizador de Au(I) y alcohol deshidrogenasas o transaminasas, respectivamente.

## **Capítulo 2**

*Combinación del reagrupamiento de  
Meyer-Schuster y alcohol  
deshidrogenasas para la síntesis de  
alcoholes alílicos ópticamente activos*

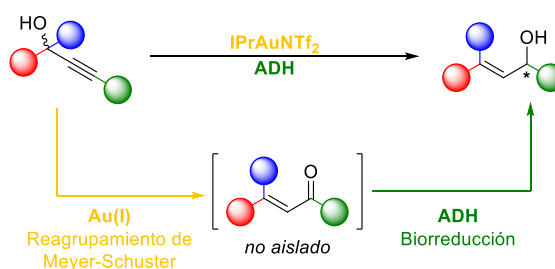


## *Resultados y discusión*





A continuación, se describe el diseño de un proceso en cascada que combina por primera vez la acción de un catalizador de Au(I) y una ADH de manera concurrente.<sup>291</sup> Gracias a la acción de un catalizador de oro tipo NHC (IPrAuNTf<sub>2</sub>), se han transformado una serie de alcoholes propargílicos racémicos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos en las correspondientes cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas mediante el reagrupamiento de Meyer-Schuster. En el propio medio de reacción, estos compuestos carbonílicos intermedios se transformaron mediante una ADH estereoselectiva en los correspondientes alcoholes alílicos  $\beta,\beta$ -disustituidos con buenos rendimientos y selectividades (Esquema 50). La optimización de ambos procesos por separado y el estudio de condiciones de reacción compatibles han sido claves para el diseño del proceso en cascada.



**Esquema 50.** Síntesis quimioenzimática de alcoholes alílicos ópticamente activos a través de un proceso concurrente combinando un catalizador de Au(I) y una ADH.

Ya que esta Tesis Doctoral se presenta como un compendio de publicaciones, la numeración de los compuestos descritos, así como la de los esquemas y tablas, se refieren al trabajo en que se ha descrito esta investigación, y que se muestra a continuación de esta sección de *Resultados y Discusión*.

<sup>291</sup> S. González-Granda, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 13945-13951.

## Capítulo 2. Resultados y discusión

### 2.1 Estudio y optimización del reagrupamiento de Meyer-Schuster de alcoholes propargílicos empleando catalizadores de Au(I)

En primer lugar, se realizó el estudio del reagrupamiento de Meyer-Schuster del 2-fenilpent-3-in-2-ol (**3a**), alcohol propargílico seleccionado como sustrato modelo para este estudio debido a su simple accesibilidad sintética (Tabla 1). Para ello se estudió la reactividad de dos catalizadores de tipo NHC-Au(I), como son el JohnPhosAuNTf<sub>2</sub> y el IPrAuNTf<sub>2</sub>, empleando un medio de reacción predominantemente acuoso y 2-PrOH como cosolvente (20% v/v). El uso de 2-PrOH como cosolvente es muy importante, ya que además de ayudar a solubilizar el alcohol **3a** para trabajar a concentraciones de 100 mM, permitiría el diseño de un proceso en cascada utilizando ADHs, actuando como cosustrato en el sistema de regeneración del cofactor pirimidínico requerido por las enzimas en la segunda etapa del proceso. Los mejores resultados, en cuanto a conversión y selectividad del proceso, se obtuvieron usando IPrAuNTf<sub>2</sub> como catalizador (3 mol%) y 40 o 45 °C de temperatura, obteniendo la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada **4a** con conversión completa, y con una gran selectividad hacia la formación de su isómero *E* de este compuesto (87 o 94%, Tabla 1, entradas 5 y 6).

Posteriormente, se extendió esta metodología a distintos alcoholes propargílicos **3b-x**, previamente sintetizados mediante una reacción de adición de un reactivo de Grignard a los correspondientes compuestos carbonílicos. En todos los casos se observó la conversión completa del alcohol de partida hacia la correspondiente cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (*E*)-**4b-x**, si bien la selectividad del proceso resultó muy dependiente del sustrato de partida (Tabla 2). Generalmente, fue más elevada cuando se emplearon 2-arylpent-3-in-2-oles que presentaban grupos electrón atractores en las posiciones *meta* o *para* del anillo aromático (F, Cl, Br o NO<sub>2</sub>, 86-96%), encontrando un cambio en la selectividad cuando la sustitución era en posición *orto*, por ejemplo, en el caso del compuesto nitrado (90% *Z*, entrada 12). El uso de sustratos aromáticos con sustituyentes electrón donadores, como grupos metoxi o metilo, condujo a selectividades moderadas. A continuación, se analizó la reactividad de sustratos heteroaromáticos; así, mientras los derivados de tiofeno **3p** y **3q** condujeron a selectividades elevadas (entradas 16 y 17), al emplear derivados de furano o de piridina la reacción no tuvo lugar. Finalmente, esta metodología se aplicó con éxito a un derivado alifático **3r** (entrada 18), y se estudió la posibilidad de incorporar distintas sustituciones tanto en el carbono directamente unido a la

función hidroxilo, como en el carbono terminal del alquino, observándose que al incorporar sustituciones de mayor tamaño que un grupo metilo, por ejemplo, un etilo (**3t** y **3v**, entradas 20 y 22) o un fenilo **3w** (entrada 23), la selectividad del proceso decayó notablemente.

## 2.2 Estudio del proceso de biorreducción de la cetona (*E*)-**4a** empleando ADHs

Una vez estudiado y optimizado el reagrupamiento de Meyer-Schuster en medio acuoso, se analizó la etapa de biorreducción de la cetona modelo (*E*)-**4a**. Para ello se emplearon tanto ADHs de estructura conocida y producidas en nuestro grupo de investigación tras sobreexpresión en *E. coli* (*RasADH*, *SyADH*, *ADH-T*, *TeSADH*, *ADH-A* y *LbADH*), como enzimas comerciales de las casas Codexis y Evvxx Technologies. Las condiciones de reacción para el proceso de biorreducción fueron idénticas a las utilizadas para el reagrupamiento de Meyer-Schuster, con el fin de observar si la temperatura o el uso de 2-PrOH como cosolvente en un porcentaje elevado (20% v/v), podían tener un efecto negativo en la etapa enzimática. Tras analizar los resultados obtenidos a 40 °C, se logró obtener ambos enantiómeros del alcohol alílico (*E*)-**5a** mediante el empleo de diez ADHs (*R*)-selectivas y dos (*S*)-selectivas (Tabla S2 del material suplementario).

## 2.3 Estudio y optimización del proceso en cascada concurrente para la obtención de los alcoholes alílicos ópticamente activos

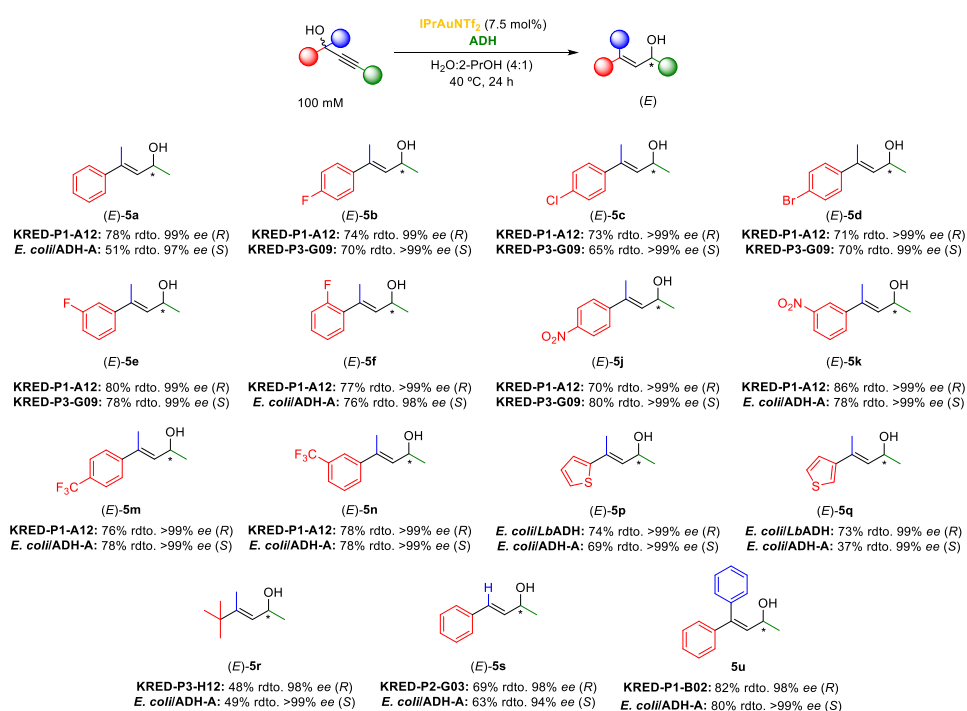
Una vez observado que tanto el reagrupamiento de Meyer-Schuster catalizado por una especie de Au(I), como la reacción de biorreducción asimétrica trascurrían sin problema por separado en el mismo medio de reacción, el siguiente paso se centró en el diseño y optimización del proceso en cascada que permitiera obtener una serie de alcoholes alílicos ópticamente activos a partir de los correspondientes alcoholes propargílicos racémicos.

Para los estudios de optimización del proceso en cascada partiendo de **3a** (0.1 mmol), se utilizaron tanto la *LbADH* como la KRED-P1-A12 adquirida a Codexis. Tras realizar una extensa optimización (Tabla S8 y Tabla 3) en la que se estudió tanto la carga del IPrAuNTf<sub>2</sub> como de la ADH empleada, la temperatura y el tiempo de reacción, los mejores resultados fueron obtenidos al emplear un 7.5 mol%

## Capítulo 2. Resultados y discusión

del catalizador de oro, la enzima KRED-P1-A12 a 40 °C durante 24 h de reacción. De esta manera se logró acceder al alcohol (*R,E*)-**5a** con un rendimiento aislado del 78% tras columna cromatográfica y un elevado exceso enantiomérico (99% *ee*).

Finalmente se desarrolló esta metodología en cascada con el fin de obtener distintos alcoholes alílicos ópticamente activos. Así, se seleccionaron aquellos sustratos que conducían a una elevada selectividad en el reagrupamiento de Meyer-Schuster hacía la formación de las cetonas *E*, ya que ninguna de las ADHs empleadas fueron capaces de transformar los isómeros *Z* de estos compuestos. De esta manera, se lograron obtener ambos enantiómeros de quince alcoholes alílicos diferentes, con rendimientos aislados entre moderados y buenos, y con elevadas selectividades en todos los casos (Esquema 51). Es necesario destacar que en el caso de emplear ADHs sobreespresadas en *E. coli*, como la ADH-A o la *Lb*ADH, fue necesario realizar la adición del catalizador de oro en dos porciones para lograr una mayor conversión global, debido a una posible inactivación del catalizador de Au(I) con los restos de *E. coli* presentes en la preparación enzimática empleada.



**Esquema 51.** Síntesis de alcoholes alílicos  $\beta,\beta$ -disustituídos enantioenriquecidos mediante el proceso concurrente propuesto.

## Capítulo 2. Resultados y discusión

Finalmente, con el fin de demostrar la aplicabilidad sintética de esta metodología se realizaron experimentos a escala semipreparativa (100 mg de sustrato), accediendo a ambos enantiómeros del alcohol alílico (*E*)-**5e** con elevados rendimientos aislados (78-79%) y selectividades (99% *ee*) cuando se utilizó la *E. coli*/ADH-A o la KRED-P1-A12.

De esta manera, se puede concluir que en este capítulo se ha:

- Desarrollado una metodología eficiente para llevar a cabo el reagrupamiento de Meyer-Schuster de veinticuatro alcoholes propargílicos empleando un catalizador NHC de Au(I) como el IPrAuNTf<sub>2</sub> en medio acuoso y bajo condiciones suaves de reacción. De esta manera, se han sintetizado las correspondientes cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas con rendimientos elevados y selectividades generalmente favorables hacia la formación de los isómeros *E*.
- Estudiado el proceso de biorreducción de las cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas intermedias empleando ADHs, encontrando biocatalizadores estereocomplementarios que permitieron sintetizar los correspondientes alcoholes alílicos con elevadas conversiones y excesos enantioméricos.
- Diseñado y optimizado el primer ejemplo de una cascada concurrente que combina la acción de un catalizador de Au(I) y una ADH. Mediante esta metodología altamente selectiva ha sido posible acceder a ambos enantiómeros de quince alcoholes alílicos con buenos rendimientos y elevados excesos enantioméricos, obteniéndose únicamente los isómeros *E* de estos productos ya que las enzimas estudiadas no mostraron ninguna actividad frente a las correspondientes cetonas de configuración *Z*.



*Artículo de investigación*





**Synthetic Methods** Hot Paper

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 13945–13951  
 International Edition: doi.org/10.1002/anie.202015215  
 German Edition: doi.org/10.1002/ange.202015215

## Alcohol Dehydrogenases and N-Heterocyclic Carbene Gold(I) Catalysts: Design of a Chemoenzymatic Cascade towards Optically Active $\beta,\beta$ -Disubstituted Allylic Alcohols

Sergio González-Granda, Iván Lavandera,\* and Vicente Gotor-Fernández\*

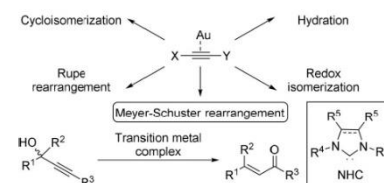
**Abstract:** The combination of gold(I) and enzyme catalysis is used in a two-step approach, including Meyer–Schuster rearrangement of a series of readily available propargylic alcohols followed by stereoselective bioreduction of the corresponding allylic ketone intermediates, to provide optically pure  $\beta,\beta$ -disubstituted allylic alcohols. This cascade involves a gold N-heterocyclic carbene and an enzyme, demonstrating the compatibility of both catalyst types in aqueous medium under mild reaction conditions. The combination of [1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene]-[bis(trifluoromethanesulfonyl)-imide]gold(I) (IPrAuNTf<sub>2</sub>) and a selective alcohol dehydrogenase (ADH-A from *Rhodococcus ruber*, KRED-P1-A12 or KRED-P3-G09) led to the synthesis of a series of optically active (E)-4-arylpent-3-en-2-ols in good yields (65–86%). The approach was also extended to various 2-hetarylpent-3-yn-2-ol, hexynol, and butynol derivatives. The use of alcohol dehydrogenases of opposite selectivity led to the production of both allyl alcohol enantiomers (93–>99% ee) for a broad panel of substrates.

### Introduction

One-pot synthesis provides nowadays multiple advantages over traditional stepwise approaches, avoiding the isolation and purification of unstable intermediates, simplifying the reaction set-up, reducing time and costs associated with the chemical process, and generally leading to higher isolated yields.<sup>[1–4]</sup> Focusing on the field of biocatalysis, apart from multi-enzymatic transformations,<sup>[5–10]</sup> one-pot chemoenzymatic syntheses represent elegant alternatives to traditional conventional organic multi-step strategies, combining biotransformations with other (un)catalyzed processes.<sup>[11–14]</sup> Interestingly, the compatibility of organo-, photo-, or metal catalysts with enzymes has been intensively investigated in the last decade,<sup>[15–19]</sup> and many efforts have been put in the setup of environmentally friendly media where the different (bio)catalysts can be compatible, ranging from aqueous systems to neoteric solvents.<sup>[20–21]</sup>

Hence, the search for active metal complexes in aqueous medium is a consolidated synthetic possibility, since water soluble complexes made from gold, indium, iridium, nickel, palladium, ruthenium, rhodium, osmium or zinc among many others have been successfully applied in a plethora of organic reactions.<sup>[22–26]</sup> Considering that gold catalysis has emerged in the last decades as a powerful tool for chemical synthesis through the activation of unsaturated systems and formation of gold carbenes and vinylidenes,<sup>[27–36]</sup> herein it was envisaged the possible combination of gold complexes and enzymes. With that purpose and due to the large  $\pi$ -acidic character of Au complexes, the selection of alkynes as benchmark substrates flourish as a wise choice based on the diverse chemical possibilities of this pair Au-alkyne.<sup>[37–41]</sup> Interestingly, a broad number of organic transformations can be successfully accomplished such as cyclization, hydration, redox isomerization or rearrangements such as the Rupe or Meyer–Schuster ones (Scheme 1).<sup>[42–46]</sup> gold N-heterocyclic carbenes (NHCs) playing a relevant role in the catalysis of these type of chemical processes.<sup>[47–49]</sup>

The Meyer–Schuster rearrangement consists in the transformation of propargylic (acetylated) alcohols into the corresponding  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds, requiring metal catalysis (Cu, Sc, Hg, Ag, Au, In...), and traditionally performed under harsh reaction conditions (organic solvent, acidic catalysis, high temperature).<sup>[42, 46, 50]</sup> This is a highly atom economy process occurring via formal 1,3-hydroxy shift and tautomerization, that has attracted great attention in the last decades questing for more sustainable solutions. Therefore, a key point of this study is the replacement of conventional organic solvents by aqueous media, making the process compatible with a second enzymatic reaction, foreseeing the use of NHC gold(I) complexes as



**Scheme 1.** Activation of alkynes with gold for the development of diverse chemical transformations including Meyer–Schuster rearrangements. General structure of N-heterocyclic carbenes appears in the box.

[\*] S. González-Granda, Prof. I. Lavandera, Prof. V. Gotor-Fernández  
 Organic and Inorganic Chemistry Department  
 University of Oviedo  
 Avenida Julián Clavería 8, 33006 Oviedo (Spain)  
 E-mail: lavanderaivan@uniovi.es  
 vicgotfer@uniovi.es

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:  
<https://doi.org/10.1002/anie.202015215>.

a solution for the performance of this selective transformation under milder reaction conditions.

Particularly, the gold-enzyme pair has been successfully applied in a concurrent cascade fashion combining gold(I) or gold(III) species with hydrolases<sup>[51,52]</sup> and monoamine oxidases.<sup>[53]</sup> Among them, the only stereoselective application was demonstrated by Asikainen and Krause, who reported the synthesis of optically active 2,5-dihydrofurans through a tandem hydrolytic kinetic resolution/cycloisomerization employing *Pseudomonas cepacia* lipase and HAuCl<sub>4</sub>.<sup>[51]</sup> On the other hand, approaches involving gold catalysis and alcohol dehydrogenases (ADHs) have also been described, but through sequential transformations due to the incompatibility of individual catalytic systems and reaction conditions.<sup>[54–56]</sup> In this context, the one-pot two-step synthesis of chiral *sec*-alcohol derivatives in high conversions and enantiomeric excess was described via gold-catalyzed hydration of terminal aryl- or alkyl acetylenes using either gold(III) chloride at 65 °C in a water/2-propanol (2-PrOH) mixture,<sup>[55]</sup> or HandaPhos-gold(I) chloride, a silver salt and a surfactant in water that formed micelles under argon atmosphere,<sup>[56]</sup> both followed by the ketone intermediate bioreduction with external addition of the corresponding ADH and auxiliary reagents (Scheme 2, top).

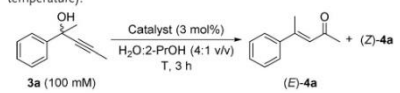
Encouraged by the synthetic possibilities that  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones offer, and considering the great applicability of the Meyer–Schuster rearrangement<sup>[42,46,50]</sup> herein we propose the development of a concurrent cascade process to get access to a series of enantioenriched  $\beta,\beta$ -disubstituted allylic alcohols, by combining an active NHC gold(I) catalyst in aqueous medium with ADHs of opposite selectivity (Scheme 2, bottom), by considering 2-propanol as a key element due to its compatibility with NHC gold complexes and simultaneous key role in the enzyme cofactor recycling action.

## Results and Discussion

As a starting point, the (racemic) propargylic alcohols **3a–x** were synthesized in 59–92% yield from commercially available carbonyl compounds **1** and the corresponding Grignard or organolithium reagent (**2**, see Section III in the Supporting Information). Then, 2-phenylpent-3-yn-2-ol (**3a**) was selected as benchmark substrate for the study and optimization of the Meyer–Schuster rearrangement to explore the influence of the gold catalyst type and the reaction temperature in a medium composed of a mixture of water and 2-propanol.

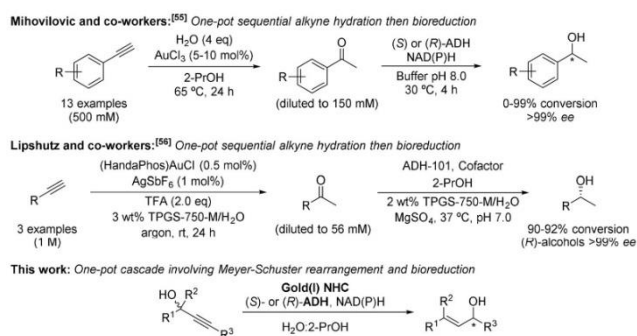
Hence, two commercially available gold(I) catalysts were initially tested (3 mol %, Table 1) containing the bis(trifluoromethanesulfonyl)imide moiety (NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>) as a weakly coordinating counteranion (entries 1 and 2). These are [1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazo-2-ylidene]

**Table 1:** Meyer–Schuster rearrangement optimization (catalyst and temperature).



Entry	Catalyst	T [°C]	Yield [%] <sup>[a]</sup>	
			(E)-4a	(Z)-4a
1	IPrAuNTf <sub>2</sub>	30	85	15
2	JohnPhosAuNTf <sub>2</sub>	30	75	25
3	IPrAuNTf <sub>2</sub>	20	80	20
4	IPrAuNTf <sub>2</sub>	25	80	20
5	IPrAuNTf <sub>2</sub>	40	87	13
6	IPrAuNTf <sub>2</sub>	45	94	6

[a] Percentage of products measured by GC analyses of the crude reaction mixture. See the Supporting Information for detailed reaction conditions and GC methods. Complete conversions were attained in all cases.



**Scheme 2.** One-pot combinations of gold catalysis involving hydration or Meyer–Schuster rearrangement of alkynes and an alcohol dehydrogenase-catalyzed bioreduction for the production of chiral alcohols.

[bis(trifluoromethanesulfonyl)imide]gold(I) (IPrAuNTf<sub>2</sub>) and (2-di-*tert*-butylphosphinobiphenyl)gold(I) [bis(trifluoromethanesulfonyl)imide] (JohnPhosAuNTf<sub>2</sub>).<sup>[59]</sup> The reactions were carried out in a water:2-propanol (4:1 v/v) mixture, which would increase the solubility of the substrate and the gold catalyst in the reaction medium, and at the same would facilitate the use of an ADH in a concurrent manner, since 2-propanol is commonly used as hydrogen donor for ADH-catalyzed bioreduction processes.<sup>[57]</sup> Satisfyingly, complete conversions were attained in both cases after 3 h, finding a higher selectivity for the IPrAuNTf<sub>2</sub> catalyst (85:15, *E* vs. *Z*). At this point, different temperatures were studied leading at 45 °C to the best selectivity towards (*E*)-allylic alcohol **4a** (94:6, entry 6). Higher temperatures were not tested due to the potential enzyme deactivation using harsher conditions. Bearing in mind this fact, 40 °C was selected as upper limiting conditions, and the Meyer–Schuster rearrangement reaction was next studied with the previously synthesized propargylic alcohols **3a–x**.

For the substrate scope, three molecular engineering vectors were selected (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup>, Scheme of Table 2) including 2-(het)arylpent-3-yn-2-ols (**3a–q**), hexynols **3r,t,v** and butynols **3s,u,w,x** bearing different pattern substitutions for a total of 24 substrates. Complete conversions were

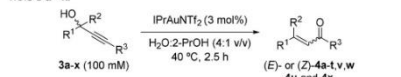
achieved in all cases, resulting in a highly selective strategy for most of the substrates under these conditions, 14 out of 22 (*E*)-allylic alcohols **4a–f,j,k,m,n,p–s** being obtained with over 85% conversion (Table 2).

In general, good results were found with 2-arylpent-3-yn-2-ols **3a–o**, only attaining poor selectivities for substrates bearing electron-donating substitutions at the *para* position (methyl and methoxy, entries 8 and 9), or electron-donating and electron-withdrawing groups at the *ortho*-position (entries 7 and 15), highlighting the preference change when the nitro functionality at the *ortho*-position was subjected to investigation (10:90 *E* vs. *Z*, entry 12). Trying to expand the possibilities of our methodology, 2-hetarylpent-3-yn-2-ols were considered, for instance containing a thienyl moiety at C-2 or C-3 (**3p** and **3q**), and good selectivities were found (entries 16 and 17), being especially noticeable the exclusive formation of (*E*)-4-(thiophen-2-yl)pent-3-en-2-one (**4p**). Next, the reaction was performed with the propargylic alcohol bearing a furyl group substituted at C-2 position, but a complex mixture was found. This is in accordance with the already described reactivity of furan derivatives in combination with gold catalysis, occurring e.g., furan-alkyne intramolecular cyclizations or other rearrangements.<sup>[58]</sup> At this point, the use of pyridine derivatives was omitted since it is well known that the basic nitrogen atom coordinates to the gold catalyst leading to a dramatic loss of the metal activity,<sup>[59]</sup> requiring therefore higher reaction temperatures<sup>[60]</sup> that on the other hand would not be compatible with a second enzymatic reaction.

This strategy was also applicable when developing the rearrangement over the aliphatic derivative **3r** (R<sup>1</sup>=*t*-Bu) with very high preference towards the recovery of (*E*)-4,5,5-trimethylhex-3-en-2-one (96:4 *E/Z*, entry 18). Next, the influence of the substitution at the carbon bearing the hydroxyl functionality was studied, in comparison with our model substrate (R<sup>2</sup>=CH<sub>3</sub>, **3a**, entry 1), and 3 different substitutions (R<sup>2</sup>=H, Et, or Ph, **3s–u**) were also considered, obtaining ketones **4s–u** with complete conversion, although a significant decrease of the *E/Z* selectivity was observed when moving from the formation of the less bulky substrate (*E*)-**4s** (R<sup>2</sup>=H, >97%, entry 19) to the ones bearing aliphatic moieties **4a** (R<sup>2</sup>=Me, 87%) and **4t** (R<sup>2</sup>=Et, 54%) of the *E*-isomer (entries 1 and 20). Obviously, for 4,4-diphenylbut-3-en-2-one (**4u**, entry 21), *E/Z* isomerism was not applicable.

The replacement of the methyl substitution at the terminal alkyne position by an ethyl or a phenyl group (R<sup>3</sup>=Et or Ph, entries 22 and 23) was also considered, achieving also a complete transformation into ketones **4v** and **4w**, but observing a decrease or even an inversion of the *E/Z* selectivity when enlarging the size of the terminal substitution, favoring the formation of the (*Z*)-ketones (43 and 71%, entries 22 and 23), in contrast to the preferred formation of (*E*)-**4a** (entry 1, only 13% of the *Z* isomer). Finally, maintaining the terminal aromatic ring but replacing the phenyl ring by a methyl group at the R<sup>1</sup> substitution, 3-methyl-1-phenylbut-2-en-1-one (**4x**, entry 24) was also obtained in full conversion. Overall, a very general methodology was developed for the straightforward synthesis of allylic

**Table 2:** Meyer–Schuster rearrangement of (racemic) propargylic alcohols **3a–x**.



Entry	<b>3a–x</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Yield [%] <sup>[a]</sup>	
					( <i>E</i> )- <b>4a–x</b>	( <i>Z</i> )- <b>4a–x</b>
1	<b>a</b>	Ph	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	87	13
2	<b>b</b>	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	90	10
3	<b>c</b>	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	86	14
4	<b>d</b>	4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	85	15
5	<b>e</b>	3-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	91	9
6	<b>f</b>	2-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	90	10
7	<b>g</b>	2-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	59	41
8	<b>h</b>	4-CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	55	45
9	<b>i</b>	4-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	43	57
10	<b>j</b>	4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	96	4
11	<b>k</b>	3-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	94	6
12	<b>l</b>	2-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	10	90
13	<b>m</b>	4-CF <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	92	8
14	<b>n</b>	3-CF <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	89	11
15	<b>o</b>	2-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	58	42
16	<b>p</b>	2-thienyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	>97	<3
17	<b>q</b>	3-thienyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	86	14
18	<b>r</b>	<i>t</i> -Bu	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	96	4
19	<b>s</b>	Ph	H	CH <sub>3</sub>	>97	<3
20	<b>t</b>	Ph	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	54	46
21	<b>u</b>	Ph	Ph	CH <sub>3</sub>	>97	<3
22	<b>v</b>	Ph	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	57	43
23	<b>w</b>	Ph	CH <sub>3</sub>	Ph	29	71
24	<b>x</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Ph	>97	<3

[a] Percentage of products measured by <sup>1</sup>H NMR analyses of the crude reaction mixture. See the Supporting Information for detailed reaction conditions. Complete conversions to ketones **4a–x** were attained in all cases. [b] Not applicable the *E–Z* isomerism.

ketones from propargylic alcohols in aqueous medium, and next all the efforts were focused on the accomplishment of a bioreduction process under similar reaction conditions.

Before exploring the possible compatibility of IPrAuNTf<sub>2</sub> and ADHs under certain conditions, the bioreduction of (*E*)-4-phenylpent-3-en-2-one (**4a**) was screened using a series of ADHs. Among them, some ketoreductases were made in house and overexpressed in *E. coli*, while others were purchased from commercially available sources (Evovx Technologies GmbH and Codexis Inc). Thus, a wide biocatalyst screening is disclosed in Table S2 of the Supporting Information, some of them providing enantioenriched allylic alcohol (*E*)-**5a** with above 90% conversion and enantiomeric excess (Scheme 3). Ten ADHs allowed the synthesis of the



**Scheme 3.** Screening of ADHs for the bioreduction of ketone (*E*)-**4a** for the synthesis of (*E*)-**5a** alcohol enantiomers depending on the ADH of choice.

alcohol (*R*)-**5a** (93–96% conversion and 98–99% *ee*), while only two Prelog enzymes led to the (*S*)-**5a** antipode (94–96% conversion and 98–99% *ee*). Satisfyingly, complementary stereoselective overexpressed ADHs on *E. coli* such as the one from *Rhodococcus ruber* (ADH-A)<sup>[64,62]</sup> and the one from *Lactobacillus brevis* (LBADH)<sup>[63,64]</sup> were found, and also various commercially available enzymes from the Codexis Inc. kit. Absolute configurations were assigned based on the known selectivity of the overexpressed ADHs on *E. coli* and confirmed by comparing the measured specific optical rotations with those previously described in the literature, such as the allylic alcohol (*S,E*)-**5a**.<sup>[65,66]</sup>

The coupling of gold species and biocatalysts is still in its infancy,<sup>[51–56]</sup> and as mentioned before only sequential attempts have been reported when considering ADHs<sup>[54–56]</sup> mainly caused due to the high temperatures required by gold(I) and gold(III) catalysts in aqueous media. For that reason, the search for adequate reaction conditions with model substrate **3a** (100 mM) was next chased, selecting the overexpressed LBADH on *E. coli* and commercial KRED-P1-A12 for the design of an efficient concurrent cascade approach. An exhaustive analysis can be found in Table S8, displaying the influence of experimental parameters that affect to the gold and ADH catalysts reactivity, including different

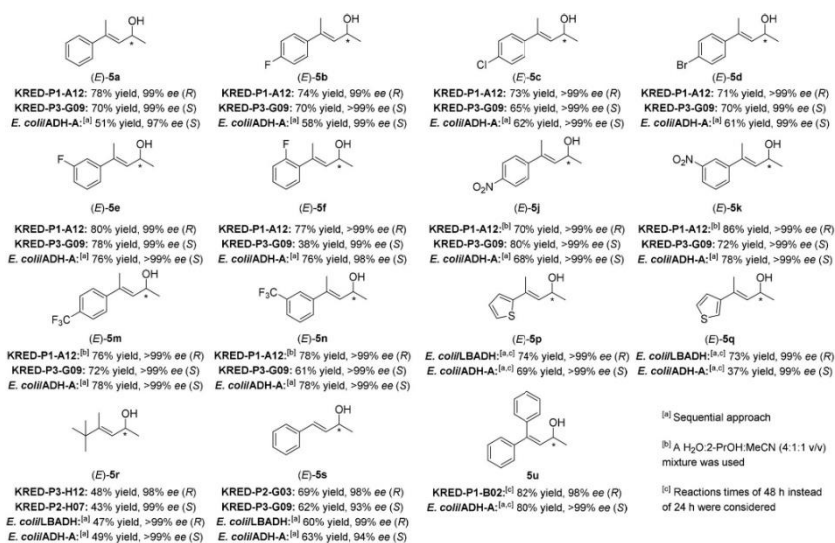
loading of IPrAuNTf<sub>2</sub> and enzyme, the use of additives, different temperatures and reaction times. Among these data, a few experiments are highlighted in Table 3. Reactions were carried out in an orbital shaker at 220 rpm since the use of higher speeding rates usually led to a conversion decrease as the reactants spilled around the glass vial. Over 60% conversion for the global process was reached when using lyophilized cells of *E. coli*/LBADH (2:1 w/w enzyme:substrate) at 30 and 40 °C during 24 and 72 h, respectively (entries 1 and 2) without significant increasing the reaction yield at prolonged reaction times. It must be highlighted that in this case, the use of higher loadings of IPrAuNTf<sub>2</sub> catalyst (10 mol%) was required to obtain the mentioned conversion levels. The reaction was also studied with the commercial KRED-P1-A12 (entries 3–8), that provided higher conversions and very high selectivities towards (*R,E*)-**5a** (> 96% *ee*). Remarkably, the use of lower IPrAuNTf<sub>2</sub> loadings resulted in an efficient transformation at 7.5 mol% ratio, isolating the desired enantiopure allylic alcohol in 78% yield after column chromatography purification (entry 8).

At this point, the extension of the cascade approach to 18 propargylic alcohols **3** was undertaken to get access to both (*R*)- and (*S*)-allylic alcohol enantiomers **5** (Table S9 and Figure 1). Compounds bearing bromo, nitro or methoxy substitutions at the *ortho*-position of the aromatic ring at the R<sup>1</sup> position (**3g**, **3i** and **3o**), an ethyl group at R<sup>2</sup> (**3t**), or the ones bearing an ethyl or phenyl rest at the terminal alkyne position (**3v** and **3w**), were omitted from the cascade reaction scope due to the low selectivities achieved for the production of the corresponding ketones (*E*)-**4** (41–46% (*Z*)-**4g**, **4t**, **v**), or the preferred formation of the (*Z*)-isomers (10:90 and 29:71, **4i** and **4w**). It is important to remark that (*Z*)-allylic ketones **4** are not converted by the tested ADHs. In spite of the almost negligible selectivity achieved in the Meyer–Schuster rearrangement for compounds substituted with electron donating groups such as 4-methyl (**h**, 55:45) and 4-methoxy (**i**, 43:57),

**Table 3.** Optimization of the Meyer–Schuster rearrangement and bioreduction concurrent cascade for the production of allylic alcohol (*R,E*)-**5a**.

Entry	ADH <sup>[a]</sup>	IPrAuNTf <sub>2</sub> [mol %]	T		Yield [%] <sup>[b]</sup>				ee [%] <sup>[c]</sup>
			[°C]	[h]	<b>3a</b>	<b>4a</b>	( <i>E</i> )- <b>5a</b>	( <i>E</i> )- <b>5a</b>	
1	<i>E. coli</i> /LBADH (46)	10	40	72	35	23	42	n.d.	
2	<i>E. coli</i> /LBADH (46)	10	30	24	38	18	44	94	
3	KRED-P1-A12 (22)	10	30	72	<1	14	86	98	
4	KRED-P1-A12 (22)	5	30	24	6	26	68	97	
5	KRED-P1-A12 (22)	7.5	30	24	<1	15	85	98	
6	KRED-P1-A12 (16)	10	30	24	<1	15	85	98	
7	KRED-P1-A12 (8)	10	30	24	<1	20	80	97	
8	KRED-P1-A12 (16)	7.5	40	24	<1	15	85 (78)	99	

[a] Amount of ADH in mg for 0.1 mmol of racemic substrate **3a**. [b] Percentage of products was measured by GC analyses. Yield of product isolated after liquid-liquid extraction and column chromatography purification on silica gel appears within parentheses. See the Supporting Information for additional analytical and experimental details. [c] Enantiomeric excess values of (*R,E*)-**5a** were measured by GC analyses. n.d.: not determined



**Figure 1.** Summary of the best results obtained in terms of yield of isolated product and optical purity for the production of a series of allylic alcohols through a one-pot Meyer-Schuster rearrangement and bioreduction concurrent cascade using a commercial ADH or in a sequential approach when employing *E. coli*/ADH-A or *E. coli*/LBADH.

these were considered in the study to broaden the scope of the presented cascade methodology. Unfortunately, low conversions into the allylic alcohols (<25%, Table S9) were observed.

Overall, the Au<sup>I</sup>-ADH chemoenzymatic strategy resulted feasible in a concurrent manner using commercial ketoreductases, especially KRED-P1-A12 and KRED-P3-G09 for the synthesis of 2-arylpent-3-yn-2-ols, while better results in terms of activity were found through a sequential approach when employing enzymes overexpressed in *E. coli*. For instance, ADH-A was found as a suitable biocatalyst for the synthesis of alcohols (*S,E*)-**5a-f,j,k,m,n,p-s** and (*S*)-**5u** requiring the addition of the metal catalyst in two portions along the process. Both sequential and cascade approaches provided the desired alcohols in very high to excellent optical purities (93- >99% ee), compounds that were recovered in moderate to high isolated yields (up to 86% for the (*R*)-alcohols and up to 80% for the (*S*)-alcohols), obtaining lower yields for alcohol **5r** due to the high volatility of this aliphatic substrate. The reaction resulted unsuccessful for the synthesis of alcohol **5x** due to the spontaneous 1,3-rearrangement of the final product in aqueous medium<sup>[67]</sup> forming the achiral (*E*)-2-methyl-4-phenylbut-3-en-2-ol and therefore hampering the development of a stereoselective process. In fact, when the chemically synthesized racemic **5x** was incubated in the

bioreduction medium without enzyme, the isomerization reaction occurred.

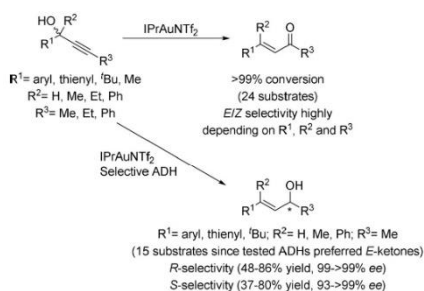
Finally, to demonstrate the practical applicability of both concurrent and sequential approaches, the reaction with racemic 2-(3-fluorophenyl)pent-3-yn-2-ol (**3e**) was scaled-up to 100 mg using KRED-P1-A12 or *E. coli*/ADH-A, yielding (*R,E*)- and (*S,E*)-**5e** enantiomers, respectively, with excellent conversions (84–85%) and isolated yields (78–79%, Table S10).

## Conclusion

A novel chemoenzymatic cascade is described for the stereoselective synthesis of a series of β,β-disubstituted allylic alcohols, compounds which are not easily accessible by other chemical means, and that have been used as precursors of, for example, aroma compounds.<sup>[68]</sup> Initially, both (*E*)-4-(het)arylpent-3-en-2-ol enantiomers were synthesized by properly combining the action of a gold(I) N-heterocyclic carbene complex and a stereoselective alcohol dehydrogenase in aqueous medium, using 2-propanol to improve the substrate solubility and acting as hydrogen donor in the bioreduction process. In general, high selectivities were achieved in the Meyer-Schuster rearrangement to fully transform 2-(het)ar-

ylpent-3-en-2-ols into the corresponding (*E*)-4-(het)arylpen-3-en-2-ones using IPrAuNTf<sub>2</sub> at 40 °C, conditions that were compatible with the use of made in house overexpressed and commercial ketoreductases. Depending on the enzyme of choice, the desired optically active allylic alcohols (96- >99% *ee*) were obtained in good to high isolated yields (65-86%). The cascade reaction was successfully achieved in a concurrent mode with the commercial enzymes and worked better through a sequential approach for the overexpressed enzymes.

Satisfyingly, the synthetic possibilities of the Meyer-Schuster rearrangement and the metal-enzyme combination were extended by considering various molecular engineering vectors at both sides of the triple carbon-carbon bond as depicted in Scheme 4, including hexynol and butynol deriv-



**Scheme 4.** Overall representation of the Meyer-Schuster rearrangement and bioreduction cascade strategy including their substrate scope.

atives, thus replacing for instance the (het)aromatic ring by aliphatic chains (methyl or *tert*-butyl) at R<sup>1</sup>, considering different substitutions at the carbon directly linked to the hydroxyl group of the propargylic alcohol (hydrogen, methyl, ethyl or phenyl), or even with different moieties at the terminal alkyne position (methyl, ethyl or phenyl). In addition, semi-preparative transformations were successfully accomplished using racemic 2-(3-fluorophenyl)pent-3-yn-2-ol (100 mg) as starting material. Overall, we believe that this first example of a concurrent cascade combining NHC gold(I) species and enzymes under mild conditions can be envisaged as a powerful tool to get access to highly valuable molecules through complementary and selective catalyst reactivities.

#### Acknowledgements

Financial supports from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MEC, Project CTQ2016-75752-R), the Spanish Ministry of Science and Innovation (MCI, PID2019-109253RB-I00), and the Asturian Regional Government (FC-GRUPIN-IDI2018/000181) are gratefully acknowledged. We thank Prof. Wolfgang Kroutil (University

of Graz, Austria) for providing us with alcohol dehydrogenases overexpressed in *E. coli* cells.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** alcohols · enzymes · gold · rearrangements · stereoselectivity

- [1] C. Vaxelaire, P. Winter, M. Christmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3605–3607; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3685–3687.
- [2] D. B. Ramachary, S. Jain, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1277–1300.
- [3] W. Zhao, F.-E. Chen, *Curr. Org. Synth.* **2012**, *9*, 873–897.
- [4] Y. Hayashi, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 866–880.
- [5] E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2239–2262.
- [6] E. García-Junceda, I. Lavandera, D. Rother, J. H. Schrittwieser, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *114*, 1–6.
- [7] J. Muschiol, C. Peters, N. Oberleitner, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, F. Rudroff, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5798–5811.
- [8] S. P. France, L. J. Hepworth, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 710–724.
- [9] J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270–348.
- [10] E. T. Hwang, S. Lee, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 4402–4425.
- [11] H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171–179.
- [12] F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12–22.
- [13] J. Liang, K. Liang, *Chem. Rec.* **2020**, *20*, 1100–1116.
- [14] T. J. Doyon, A. R. H. Narayan, *Synlett* **2020**, *31*, 230–236.
- [15] F. F. Özgen, M. E. Runda, S. Schmidt, *ChemBioChem* **2021**, *27*, 790–806.
- [16] X. Huang, M. Cao, H. Zhao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 161–170.
- [17] C. Jiang, W. Chen, W.-H. Zheng, H. Lu, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 8673–8689.
- [18] F. R. Bisogno, M. G. López-Vidal, G. de Gonzalo, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 2026–2049.
- [19] C. A. Denard, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2856–2864.
- [20] N. Ríos-Lombardía, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Catalysts* **2018**, *8*, 75.
- [21] S. Schmidt, K. Castiglione, R. Kourist, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 1755–1768.
- [22] M. Martínez-Calvo, J. L. Mascareñas, *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *359*, 57–79.
- [23] M. Martínez-Calvo, J. L. Mascareñas, *Chimia* **2018**, *72*, 791–801.
- [24] F. Zhou, C.-J. Li, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 34–46.
- [25] S. Shome, S. P. Singh, *Chem. Rec.* **2019**, *19*, 1935–1951.
- [26] F. Scalambra, P. Lorenzo-Luis, I. de los Rios, A. Romerosa, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *393*, 118–148.
- [27] A. Arcadi, S. Di Giuseppe, *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 795–812.
- [28] A. S. K. Hashmi, G. J. Hutchings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7896–7936; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8064–8105.
- [29] A. Fürstner, P. W. Davies, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3410–3449; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3478–3519.
- [30] A. S. K. Hashmi, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3180–3211.
- [31] S. Sengupta, X. Shi, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 609–619.
- [32] N. Krause, C. Winter, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 1994–2009.
- [33] L. Fensterbank, M. Malacria, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 953–965.

- [34] B. Ranieri, I. Escofet, A. M. Echavarrén, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7103–7118.
- [35] K. Sugimoto, Y. Matsuya, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 4420–4426.
- [36] X. Zhao, M. Rudolph, A. S. K. Hashmi, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 12127–12135.
- [37] R. Dorel, A. M. Echavarrén, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 9028–9072.
- [38] W. Debrouwer, T. S. A. Heugebaert, B. I. Roman, C. V. Stevens, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 2975–3006.
- [39] C. J. V. Halliday, J. M. Lynam, *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 12611–12626.
- [40] D. B. Huplé, S. Ghorpade, R.-S. Liu, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1348–1367.
- [41] A. L. S. Kumari, A. S. Reddy, K. C. K. Swamy, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6651–6671.
- [42] D. A. Engel, G. B. Dudley, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4149–4158.
- [43] V. Cadierno, P. Crochet, S. E. García-Garrido, J. Gimeno, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 4015–4031.
- [44] E. B. Bauer, *Synthesis* **2012**, *44*, 1131–1151.
- [45] J. García-Álvarez, S. E. García-Garrido, P. Crochet, V. Cadierno, *Curr. Top. Catal.* **2012**, *10*, 35–56.
- [46] D. Roy, P. Tharra, B. Baire, *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 1015–1032.
- [47] H. Sak, M. Mawick, N. Krause, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 5821–5829.
- [48] K. Yamamoto, E. López, P. Barrio, J. Borge, L. A. López, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 6999–7003.
- [49] X.-T. Tang, F. Yang, T.-T. Zhang, Y.-F. Liu, S.-Y. Liu, T.-F. Su, D.-C. Lv, W.-B. Shen, *Catalysis* **2020**, *10*, 350.
- [50] S. Swaminathan, K. V. Narayanan, *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 429–438.
- [51] M. Asikainen, N. Krause, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2305–2309.
- [52] Z. J. Wang, K. N. Clary, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 100–103.
- [53] M. Odachowski, M. F. Greaney, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 10032–10035.
- [54] M. J. Rodríguez-Álvarez, N. Ríos-Lombardía, S. Schumacher, D. Pérez-Iglesias, F. Moris, V. Cadierno, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 7753–7759.
- [55] P. Schaaf, V. Gojic, T. Bayer, F. Rudroff, M. Schnürch, M. D. Mihovilovic, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 920–924.
- [56] M. Cortes-Clerget, N. Akporji, J. Zhou, F. Gao, P. Guo, M. Parmentier, F. Gallou, J.-Y. Berthon, B. H. Lipshutz, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2169.
- [57] K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237–248.
- [58] S. Nejrrotti, C. Prandi, *Synthesis* **2021**, *53*, 1046–1060.
- [59] M. N. Pennell, P. G. Turner, T. D. Sheppard, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 4748–4758.
- [60] X.-S. Li, D.-t. Xu, Z.-J. Niu, M. Li, W.-Y. Shi, C.-T. Wang, W.-X. Wei, Y.-M. Liang, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 832–836.
- [61] W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014–1017; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1056–1059.
- [62] C. E. Paul, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3875–3881.
- [63] M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306–4308; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4476–4478.
- [64] S. Leuchs, L. Greiner, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, *25*, 267–281.
- [65] A. Abate, E. Brenna, G. Fronza, C. Fuganti, F. G. Gatti, S. Serra, E. Zardoni, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 765–780.
- [66] N. Harrington-Frost, H. Leuser, M. I. Calaza, F. F. Kneisel, P. Knochel, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2111–2114.
- [67] P.-F. Li, H.-L. Wang, J. Qu, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3955–3962.

Manuscript received: November 14, 2020  
 Revised manuscript received: February 22, 2021  
 Accepted manuscript online: March 15, 2021  
 Version of record online: April 16, 2021





## **Capítulo 3**

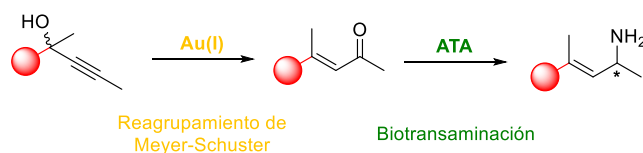
*Combinación del reagrupamiento de Meyer-Schuster y transaminasas para la síntesis de aminas alílicas ópticamente activas*



## *Resultados y discusión*



A continuación, se describe la síntesis estereoselectiva de aminas alílicas mediante un proceso secuencial que combina el reagrupamiento de Meyer-Schuster, catalizado por especies de Au(I), y una segunda etapa de biotransaminación empleando transaminasas (Esquema 52).<sup>292</sup> Particularmente, se ha estudiado en profundidad la posibilidad de diseñar un proceso en cascada combinando ambos tipos de catalizadores, ya que hasta la fecha solo se han descrito procesos que empleen catalizadores de oro y transaminasas de manera secuencial.



**Esquema 52.** Cascada quimioenzimática propuesta para la síntesis de aminas alílicas ópticamente activas.

Ya que esta Tesis Doctoral se presenta como un compendio de publicaciones, la numeración de los compuestos descritos, así como la de los esquemas, figuras y tablas, se refieren al trabajo en que se ha detallado esta investigación, y que se muestra a continuación de esta sección de *Resultados y Discusión*.

### 3.1 Estudio del reagrupamiento de Meyer-Schuster de alcoholes propargílicos empleando catalizadores de Au(I)

Basados en los resultados obtenidos en el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral,<sup>291</sup> en primer lugar, se ha extendido el estudio del reagrupamiento de Meyer-Schuster de alcoholes propargílicos en medio acuoso, en este caso tratando de identificar un nuevo catalizador ideal para promover esta transformación. Así, a través de una colaboración con el grupo de investigación del Profesor Nolan (Universidad de Ghent, Bélgica), se han empleado diversos catalizadores de Au(I) (Tabla S1), conteniendo tanto ligandos de tipo fosfina como NHCs derivados de IPr, como una especie de Au(I) dinuclear. Los mejores resultados, tanto en términos de

<sup>292</sup> S. González-Granda, N. V. Tzouras, S. Nolan, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2022**, doi: 10.1002/adsc.202200777.

### Capítulo 3. Resultados y discusión

conversión como de selectividad, se obtuvieron al usar el IPrAuNTf<sub>2</sub>, el JohnPhosAuNTf<sub>2</sub> y la especie dinuclear {[IPrAu]<sub>2</sub>(μ-OH)}[BF<sub>4</sub>].

Gracias a la elevada compatibilidad observada en el trabajo de investigación anterior entre los catalizadores de Au(I) con ligandos NHCs y enzimas, se seleccionaron tanto el IPrAuNTf<sub>2</sub> (**A**) como la especie dinuclear **B** como los más adecuados para desarrollar esta transformación. En un primer lugar, se realizó un estudio utilizando IPrAuNTf<sub>2</sub> como catalizador, para identificar el cosolvente ideal de la reacción (Tabla S2 y Figura 1), así como su cantidad (5-50% v/v, Tabla S3) y la temperatura del proceso (Tabla S4). Tras analizar los resultados obtenidos se observó que el empleo tanto de 2-PrOH, como THF o 2-Me-THF, ofrecían resultados similares. Por otro lado, la selectividad de la reacción no se vio modificada al variar la temperatura entre 40 y 45 °C. De esta manera, el cosolvente y la temperatura empleados en el proceso *one-pot* quedaron determinados por la estabilidad de la enzima en estas condiciones.

Posteriormente, se estudió la posibilidad de desarrollar el proceso en cascada concurrente que combinara un catalizador de Au(I) y una transaminasa. Para ello, se estudió el reagrupamiento de Meyer-Schuster del alcohol propargílico **1a**, catalizado por IPrAuNTf<sub>2</sub>, en presencia de diferentes aditivos necesarios para llevar a cabo la reacción de biotransaminación (Tabla 1). Gracias a este estudio se observó una clara incompatibilidad entre el catalizador de Au(I) y la isopropilamina (iPrNH<sub>2</sub>, 0-1 M, entradas 1-3). Sin embargo, al variar el donador del grupo amino (L-alanina), se observó que la reacción tenía lugar con conversiones y selectividades buenas (entrada 4). Por último, la presencia de una transaminasa y de PLP en el medio de reacción no tuvieron una influencia negativa en el desarrollo del reagrupamiento de Meyer-Schuster, permitiendo obtener la cetona **2a** con conversión completa y elevada selectividad hacia su isómero *E* (entradas 5 y 6).

Finalmente, se estudió la composición del medio acuoso empleado (Tabla 2), debido a que el control del pH del medio suele ser un factor clave en el desarrollo de procesos de biotransaminación, ya que normalmente estos tienen lugar a pHs superiores a 7.0 (normalmente 7.5-9.5). Los mejores resultados se obtuvieron al usar agua destilada o una disolución tampón de ácido 3-(*N*-morfolino)-propano sulfónico (MOPS) de pH 7.5 y una concentración de 50 mM (entradas 1 y 7). La actividad del IPrAuNTf<sub>2</sub> en estas condiciones nos hizo pensar que sería posible el diseño de un

proceso en cascada empleando alanina como donador del grupo amino, y agua o una disolución tampón MOPS como disolvente, siempre y cuando que la etapa de transaminación fuera compatible con estas condiciones de reacción.

### 3.2 Estudio de la reacción de biotransaminación de la cetona **2a**

Posteriormente se estudió la reacción de biotransaminación de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (*E*)-**2a**. Para ello se emplearon tanto transaminasas de estructura conocida y sobreexpresadas en *E. coli* en nuestro grupo de investigación como la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* (CvTA),<sup>293</sup> *Arthrobacter citreus* (ArSTA),<sup>294</sup> *Vibrio fluvialis* así como una variante evolucionada (VfTA y VfTA mutante),<sup>295</sup> *Aspergillus terreus* (AtTA),<sup>296</sup> *Arthrobacter* sp. (ArRTA),<sup>297</sup> y su variante modificada ArRmut1ITA,<sup>260a</sup> así como 28 transaminasas comerciales de la casa Codexis. Para el estudio de la reacción de transaminación se empleó, en primer lugar, isopropilamina como donador del grupo amino debido a la mayor simplicidad que ofrece su uso frente a la utilización de alanina, y se estudió la influencia de la temperatura (Tablas S6 y S7) y en presencia de cosolventes (Tabla S8). Los mejores resultados se encuentran recogidos en la Tabla 3, de manera que se identificaron diez transaminasas para obtener ambos enantiómeros de la amina alílica (*E*)-**3a**, con elevadas conversiones y excesos enantioméricos.

Una vez seleccionadas las mejores transaminasas para sintetizar la amina alílica (*E*)-**3a** de manera ópticamente activa, se estudió la posibilidad de emplear alanina como donador del grupo amino. Sin embargo, tan solo fue posible obtener conversiones elevadas al usar la AtTA como biocatalizador, 2-PrOH como cosolvente (2.5% v/v) y agua o una disolución tampón de fosfato como medio acuoso (Tabla 4).

---

<sup>293</sup> U. Kaulmann, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 628-637.

<sup>294</sup> S. Pannuri, S. V. Kamat, A. R. M. Garcia, PCT Int. Appl. WO 2006063336A2 20060615, **2006**.

<sup>295</sup> F. Cabirol, A. Gohel, S. H. Oh, D. Smith, B. Wong, J. LaLonde, PCT Int. Appl. WO 2011159910A2 20111222, **2011**.

<sup>296</sup> E. Busto, R. C. Simon, B. Grischek, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 1937-1942.

<sup>297</sup> A. Iwasaki, Y. Yamada, N. Kizaki, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *69*, 499-505.

### 3.3 Estudio del proceso en cascada para la síntesis de (*E*)-**3a**

Una vez identificada la *AtTA* como la mejor transaminasa para llevar a cabo la biotransaminación de la cetona (*E*)-**2a**, se realizó un estudio y optimización del proceso en cascada para transformar el alcohol propargílico racémico **1a** en la amina alílica (*E*)-**3a** ópticamente activa. Para ello se desarrolló una extensa optimización, estudiando varios parámetros de reacción como el catalizador de Au(I) empleado, la temperatura, el medio de reacción y la concentración del alcohol propargílico de partida **1a** (Tabla 5). Desafortunadamente, en el mejor de los casos, tan solo fue posible obtener el compuesto deseado (*E,R*)-**3a** con una conversión del 48% y un *ee* del 97%, tras 48 h de reacción y utilizando el complejo dinuclear {[IPrAu]<sub>2</sub>(μ-OH)}[BF<sub>4</sub>] como catalizador (entrada 12 de la Tabla 5).

### 3.4 Estudio y optimización del proceso secuencial para la síntesis de las aminas alílicas (*E*)-**3a-h**

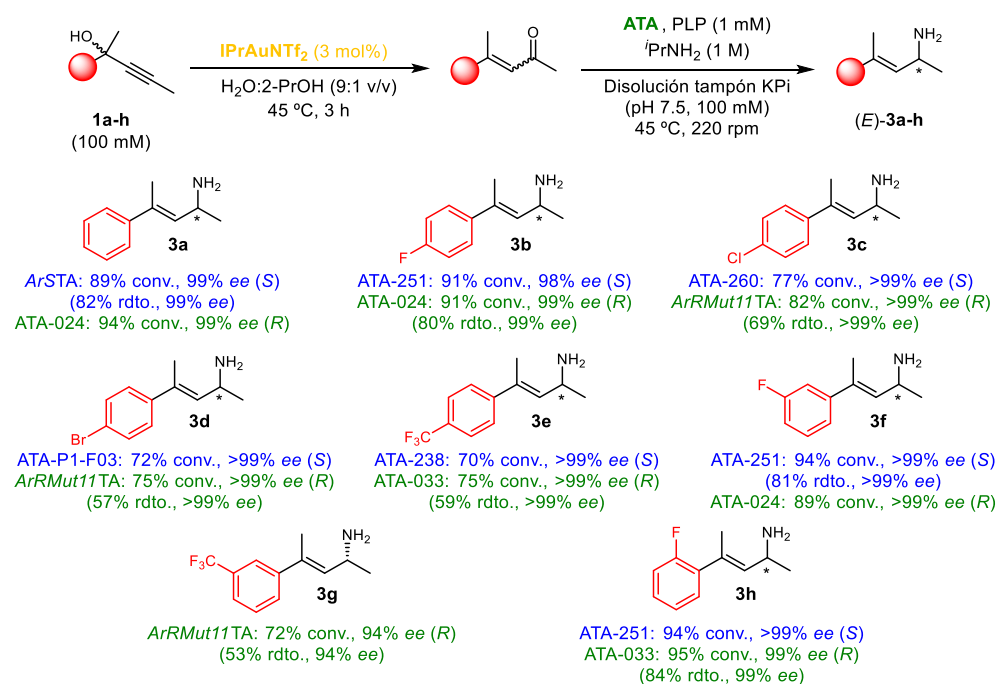
Debido a las conversiones moderadas obtenidas en el proceso en cascada, se optó por desarrollar un proceso secuencial que permitiera obtener las aminas alílicas deseadas con mayores conversiones. Para ello se empleó isopropilamina como donador del grupo amino debido a la mayor sencillez operacional, ya que no se necesitarán enzimas auxiliares. La estrategia para desarrollar el proceso secuencial se centró en la adición de la disolución tampón para ajustar el pH, la isopropilamina, el PLP y la transaminasa correspondiente, una vez finalizada la reacción de Meyer-Schuster catalizada por la especie de Au(I).

Para la optimización del proceso secuencial partiendo de **1a** se estudiaron diferentes parámetros de reacción como el catalizador de Au(I) y la transaminasa empleados, la concentración de sustrato en la etapa enzimática y el tiempo de reacción (Tabla 6). De esta manera, fue posible obtener ambos enantiómeros de la amina (*E*)-**3a** con conversiones y excesos enantioméricos elevados, empleando la *ArSATA* y la *ATA-024*, una concentración de sustrato en la etapa de biotransaminación de 15 mM y 48 horas de reacción a 45 °C. Es necesario destacar que, al igual que ocurría en la transformación con las ADHs, el isómero *Z* de la cetona intermedia **2a**, no era transformado por ninguna de las ATAs empleadas, obteniendo exclusivamente la amina (*E*)-**3a**.



### Capítulo 3. Resultados y discusión

Esta metodología se extendió a la síntesis de ambos enantiómeros de ocho aminas alílicas  $\beta,\beta$ -disustituidas, obteniéndose generalmente conversiones y excesos enantioméricos elevados (Esquema 53). Los alcoholes propargílicos de partida **1a-h** se eligieron en base a la elevada selectividad obtenida en el reagrupamiento de Meyer-Schuster hacia la formación de los isómeros *E* de las cetonas intermedias **2a-h**. Con el fin de demostrar la aplicabilidad sintética de esta metodología, se llevaron a cabo las reacciones a escala semipreparativa (100 mg o 500 mg de sustrato), obteniéndose las aminas **3a-h** con rendimientos aislados de moderados a buenos (53-84%) y excesos enantioméricos excelentes (>94%), que permitieron además la medida de las rotaciones ópticas de las aminas obtenidas para la asignación de sus configuraciones absolutas.



**Esquema 53.** Aminas alílicas sintetizadas mediante la aproximación secuencial propuesta.

Para finalizar, en este capítulo se puede concluir que se ha:

- Ampliado el estudio del comportamiento de diversos catalizadores de Au(I) en el reagrupamiento de Meyer-Schuster del alcohol propargílico **1a**, identificando no solo el IPrAuNTf<sub>2</sub> del que ya se conocía su

### Capítulo 3. Resultados y discusión

potencial, sino también del JohnPhosAuNTf<sub>2</sub> y de la especie dinuclear {[IPrAu]<sub>2</sub>(μ-OH)}[BF<sub>4</sub>].

- Optimizado el proceso de biotransaminación de las cetonas α,β-insaturadas intermedias empleando transaminasas, encontrando varias ATAs que permitieron sintetizar las correspondientes aminas alílicas ópticamente activas con conversiones y excesos enantioméricos elevados.
- Analizado el proceso en cascada que combinaba la acción de un catalizador de Au(I) y una transaminasa, para la síntesis de la amina (*E*)-**3a** utilizando alanina como donador de amina, si bien esta ha transcurrido con conversiones cercanas al 50% en las mejores condiciones encontradas.
- Desarrollado un proceso secuencial para la síntesis de 8 aminas alílicas β,β-disustituidas enantioenriquecidas mediante la combinación de un catalizador de Au(I) y una transaminasa, obteniendo buenos resultados en términos de conversión y estereoselectividad.

*Artículo de investigación*



DOI: 10.1002/adsc.202200777

# Merging Gold(I) Catalysis with Amine Transaminases in Cascade Catalysis: Chemoenzymatic Transformation of Propargylic Alcohols into Enantioenriched Allylic Amines

Sergio González-Granda,<sup>a</sup> Nikolaos V. Tzouras,<sup>b</sup> Steven P. Nolan,<sup>b</sup> Iván Lavandera<sup>a\*</sup> and Vicente Gotor-Fernández<sup>a\*</sup><sup>a</sup> Organic and Inorganic Chemistry Department, University of Oviedo, Avenida Julián Clavería 8, 33006 Oviedo (Asturias, Spain).

I.L.: Phone number: (+34)985103452. Fax number: (+34)985103446. E-mail: lavanderaivan@uniovi.es

V.G.-F.: Phone number: (+34)985103454. Fax number: (+34)985103446. E-mail: vicgotfer@uniovi.es

<sup>b</sup> Department of Chemistry and Centre for Sustainable Chemistry, Ghent University, Krijgslaan 281, S-3, 9000 Ghent (Belgium)

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201#####>.

**Abstract.** The compatibility between gold(I) catalysts and amine transaminases has been explored to transform racemic propargylic alcohols into enantioenriched allylic amines in a straightforward and selective manner. The synthetic approach consists of a gold(I)-catalysed Meyer-Schuster rearrangement of a series of 2-arylpent-3-yn-2-ols and a subsequent stereoselective enzyme-catalysed transamination of the resulting  $\alpha,\beta$ -unsaturated prochiral ketones. The design of cascade processes involving sequential or concurrent approaches has been studied in our search for ideal reaction conditions to produce the desired amines. Thus, the N-heterocyclic carbene complex

[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene]-[bis(trifluoromethanesulfonyl)-imide]gold(I) ([Au(IPr)(NTf<sub>2</sub>)] (A) in aqueous medium was found to be an ideal catalyst, while selective, made-in-house and commercial amine transaminases permitted the asymmetric synthesis of both (*E*)-4-arylpent-3-en-2-amine enantiomers in good isolated yields (53-84%) and excellent stereoselectivities (97 to >99% enantiomeric excess).

**Keywords:** Chiral amines; Gold catalysis; Meyer-Schuster rearrangement; N-Heterocyclic carbene; Transaminases

## Introduction

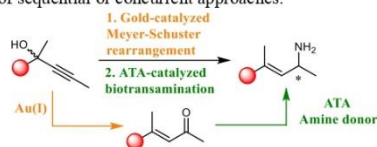
The impact of chiral amines in the preparation of drugs and bioactive compounds is continuously increasing. Recent studies consider that around 40 to 45% of small pharmaceutical products on the market contain this nitrogenated core.<sup>[1]</sup> Additionally, optically active amines display a pivotal role in asymmetric synthesis due to their versatility as building blocks, chiral auxiliaries, and ligands for synthetic purposes.<sup>[2]</sup> Nowadays, biocatalysis provides useful solutions to obtain optically active amines from racemic mixtures or carbonyl compounds. The development of enantioselective desymmetrisation with imine reductases (IREDS), reductive aminases (RedAms), amine dehydrogenases (AmDHs) or transaminases (ATAs), replacing the traditional role played by lipases in (dynamic) kinetic resolutions represent state-of-the-art developments.<sup>[1,3]</sup>

One-pot chemoenzymatic strategies allow for the introduction of molecular complexity with simultaneous chiral induction.<sup>[4]</sup> However, the combination of metal catalysts and enzymes is

particularly challenging when primary amine syntheses are targeted due to metal-catalyst deactivation and/or amine coordination and cross-reactivity issues. Therefore, the compatibility of reaction conditions found for metal-only and biocatalysed-only transformations limit the design of general and efficient routes to produce chiral amines. Additionally, metalloenzymatic approaches towards the synthesis of chiral amines have been less investigated than reactions yielding alcohols, amides and esters.<sup>[4,5]</sup> In this context, a limited number of examples have been described involving mainly palladium-catalysed transformations (hydrogenation, Wacker-Tsuji oxidation or Suzuki-Miyaura cross-coupling, among others).<sup>[6]</sup> One notable example is the ruthenium-catalysed isomerisation of allylic alcohols<sup>[7]</sup> in combination with enzymes (with a selection of ATAs) for selective transformation of ketones into chiral amines. In fact, these metal-ATA combinations were developed in a sequential manner due to incompatibilities between the amine donor and the metal catalyst, precluding the development of these processes in a one-pot cascade mode.

The combination of gold catalysts and enzymes has attracted recent attention, disclosing elegant examples for multi-step transformations. Among the biocatalysts used, lipases and esterases from the hydrolase family,<sup>[8]</sup> and redox enzymes including monoamine oxidases (MAOs),<sup>[9]</sup> and alcohol dehydrogenases (ADHs),<sup>[10]</sup> have provided access to different families of organic compounds, although the performance of concomitant strategies has been scarcely demonstrated using either lipases<sup>[8a]</sup> or ADHs.<sup>[10d,e]</sup> Very recently, two one-pot alkyne amination strategies have been reported based on the gold hydration of terminal alkynes to produce methyl ketones as amine precursors.<sup>[11,12]</sup> On one hand, Rueping and co-workers identified gold(I) chloride, which was employed at low loading, to synthesise a series of aryl ketones at 60 °C, requiring principally an organic reaction medium for 25 mM alkyne concentration.<sup>[11]</sup> Once the hydration step was complete, the reaction was diluted five times by addition of the ATA preparation, and the enzymatic step was carried out at 30 °C, that are more suitable conditions for the enzyme stability. Excellent stereoselectivities and a range of yields were achieved using commercial enzymes, pyridoxal-5'-phosphate (PLP) and isopropylamine (PrNH<sub>2</sub>) as amine donor. On the other hand, Liu and co-workers prepared an encapsulated Au/carbene mediating the hydration of propargylic ethers,<sup>[12]</sup> employing an ammonia source together with an amine dehydrogenase and a cofactor regeneration system for the second step. This approach led to 25 aliphatic amines bearing in all cases the 2-aminopropan-1-oxo core with good to very high conversions and excellent selectivity.

Encouraged by the previous development of the Meyer-Schuster rearrangement<sup>[13]</sup> of a series of racemic propargylic alcohols using a N-heterocyclic carbene (NHC)-gold(I) catalyst, and since it can be compatible with the enzyme reaction as previously described with ADHs,<sup>[10d]</sup> herein the possibility to combine a gold(I) catalyst with ATAs has been investigated, to obtain a series of allylic amine enantiomers using a one-pot approach (Scheme 1). In addition to the reactivity of both catalysts, special efforts have been made in the design and optimisation of sequential or concurrent approaches.



**Scheme 1.** One-pot Meyer-Schuster rearrangement of propargylic alcohols and enzyme-catalyzed stereoselective transamination of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone intermediates.

## Results and Discussion

The determination of suitable reaction conditions in aqueous medium to permit the action of gold catalysts and ATAs is crucial, especially in the case of concurrent cascade approaches. Shifting the equilibrium in the biotransamination of ketones represents one of the major challenges, since the reaction equilibrium is highly favoured in the opposite direction.<sup>[3g,3h,14]</sup> Therefore, the use of easily accessible and inexpensive amine donors is required, and nowadays two main strategies are employed, the use of a large excess of PrNH<sub>2</sub> (forming acetone as by-product), or using a small excess of alanine (Ala) with *in situ* removal of the resulting pyruvate.<sup>[11,15]</sup> Although other possibilities such as the use of the so-called “smart” amine donors in almost equimolecular amounts with regard to the carbonyl substrate can be an alternative.<sup>[16]</sup> The addition of various reactants needed for the enzymatic step was explored taking as an initial set of conditions our previously optimised gold-catalyzed Meyer-Schuster rearrangement of racemic alcohol **1a** to provide preferentially the ketone isomer (*E*)-**2a**.<sup>[10d]</sup> This included different amine donors (PrNH<sub>2</sub> and L-Ala), an ATA and PLP required as enzyme cofactor (Table 1). A clear incompatibility between the metal reactivity and the use of PrNH<sub>2</sub> was observed, even when reducing the amount of the amine donor from 1 to 0.1 M (entries 2 and 3). Importantly, L-alanine appears to be compatible with the gold(I) catalyst leading to the formation of the (*E*)-unsaturated ketone **2a** in a similar ratio than in the absence of any additive (entries 1 and 4).<sup>[10d]</sup> The use of an enzyme such as commercial ATA-415 and PLP did not impede the development of a cascade approach (entries 5 and 6).

**Table 1.** Influence of additives in the Meyer-Schuster rearrangement of racemic alcohol **1a**.

Entry	Additive	<b>1a</b> [%] <sup>[a]</sup>	( <i>E</i> )- <b>2a</b> [%] <sup>[a]</sup>	( <i>Z</i> )- <b>2a</b> [%] <sup>[a]</sup>
1 <sup>[b]</sup>	---	<1	89	11
2	PrNH <sub>2</sub> (1 M)	>99	<1	<1
3	PrNH <sub>2</sub> (0.1 M)	96	3	1
4	L-Ala (0.1 M)	<1	87	13
5	ATA-415	<1	85	15
6	PLP (1 mM)	<1	86	14

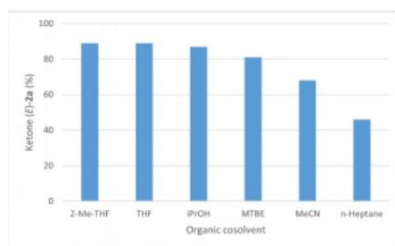
<sup>[a]</sup> Product percentages measured by GC analyses.

<sup>[b]</sup> Data reported in reference 10d.

Searching for an efficient and compatible gold(I) catalyst for this cascade,<sup>[17]</sup> a screening of NHC-gold catalysts was performed (Table S1 in SI).<sup>[18]</sup> Interestingly, apart from [Au(IPr)(NTf<sub>2</sub>)] (**A**) (87% conversion), the dinuclear gold(I) hydroxide complex

{[Au(IPr)]<sub>2</sub>(μ-OH)}[BF<sub>4</sub>] (**B**)<sup>[19]</sup> also provided a remarkable 84% conversion, which provided us with two adequate catalysts to study the process in both sequential and cascade manners.

As possible cosolvents, 2-methyltetrahydrofuran (2-Me-THF), tetrahydrofuran, *tert*-butyl methyl ether (MTBE), 2-propanol (<sup>i</sup>PrOH), acetonitrile (MeCN) and *n*-heptane were tested (Figure 1 and Table S2 in SI). All led to complete conversions with variable amounts of the ketone (*E*)-**2a** isomer, attaining 87–89% with 2-Me-THF, THF and <sup>i</sup>PrOH. The use of the eutectic mixture choline chloride:glycerol (1:2 mol/mol) was also studied, but a lower total conversion was found (85%), with a poor selectivity towards (*E*)-**2a** formation (44%). At this point, the use of lower amounts (5–15% vol) of 2-Me-THF was studied in more detail, but no improvement of the reaction outcome (82–88%, Table S3 in SI) was observed. Interestingly, higher 2-Me-THF ratios (50% vol) achieved a remarkable 92% to (*E*)-**2a**, although this condition will not be suitable for the action of the ATA in the second step of the chemoenzymatic sequence, so it was not further considered.



**Figure 1.** Influence of the cosolvent (20% vol) in the Meyer-Schuster rearrangement of **1a** (100 mM) using [Au(IPr)(NTf<sub>2</sub>)] (3 mol%) in water for 3 h at 40 °C.

Higher temperatures usually favoured this transformation, but in a chemoenzymatic cascade context, the use of elevated temperatures is deleterious for the enzymatic step. For this reason, the Meyer-Schuster rearrangement of **1a** was performed at 40 °C or 45 °C using 2-Me-THF, THF and <sup>i</sup>PrOH as cosolvents, but no significant differences were observed towards (*E*)-**2a** formation (87–90%, Table S4 in SI) under these conditions. Finally, the use of different aqueous media was explored, since the control of the pH is a key parameter in biotransformations, especially after addition of an amine donor such as <sup>i</sup>PrNH<sub>2</sub> which can affect both the final pH value and the enzyme activity. Apart from distilled water, different buffers were examined ranging from phosphate (KPi) to derivatives of 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) or 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS). These results are displayed in Table 2. The use of water and MOPS buffer resulted in the most beneficial results for

the gold(I) species (entries 1 and 7), while the use of different concentrations of KPi or MES buffers (entries 2–5), commonly accepted by ATAs, led to lower conversion values.

**Table 2.** Effect of the aqueous medium in the Meyer-Schuster rearrangement of racemic alcohol **1a**.

Entry	Aqueous medium <sup>[a]</sup>	<b>1a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>E</i> )- <b>2a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>Z</i> )- <b>2a</b> [%] <sup>[b]</sup>
<b>1</b> <sup>[b]</sup>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<1	<b>89</b>	<b>11</b>
2	KPi (100 mM)	42	50	8
3	KPi (50 mM)	38	54	8
4	KPi (25 mM)	30	63	7
5	MES (50 mM)	35	59	6
6	MOPS (50 mM)	16	75	9
<b>7</b>	<b>MOPS (50 mM)</b> <sup>[c]</sup>	<1	<b>87</b>	<b>13</b>

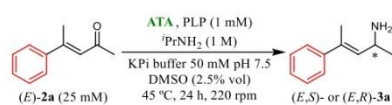
<sup>[a]</sup> The pH values for all the tested buffers were 7.5.

<sup>[b]</sup> Product percentages measured by GC analyses.

<sup>[c]</sup> Reaction time was extended to 24 h.

Moving to the biotransformation step and considering the screening, six lyophilised *E. coli* whole-cell preparations heterologously expressing different ATAs were used. These are the (*S*)-selective ATAs from *Chromobacterium violaceum* (CvTA),<sup>[20]</sup> *Arthrobacter citreus* (ArSTA),<sup>[21]</sup> wild type<sup>[22]</sup> and a variant from *Vibrio fluvialis* (VfTA and VfTA mutant),<sup>[23]</sup> the (*R*)-selective ATAs from *Aspergillus terreus* (AtTA),<sup>[24]</sup> *Arthrobacter* sp. (ArRTA)<sup>[25]</sup> and its engineered variant ArRmut11TA.<sup>[26]</sup> Additionally, a commercial kit from Codexis Inc. was employed containing 28 ATAs. For simplicity, all the biotransformations were carried out using <sup>i</sup>PrNH<sub>2</sub> (1 M) to identify active enzyme hits, which could be later examined with alanine to design the concomitant chemoenzymatic approach.

Parameters such as temperature and the addition of a cosolvent were investigated. On the one hand, biotransformations were carried out at 30 °C (Table S6 in SI), 40 °C and 45 °C (Table S7 in SI), leading to the best conversions at 45 °C, while the selectivity remained unaffected at the highest temperature. The best results are summarised in Table 3. The selection of this temperature is advantageous since it is also suitable for the metal-catalysed step. On the other hand, DMSO and <sup>i</sup>PrOH (2.5% vol) led to better outcomes than 2-Me-THF for the formation of (*E*)-**3a** for a representative number of ATAs, considering both (*R*)- and (*S*)-selective ones (82–92% yield, Table S8 in SI). Remarkably, in no case was (*Z*)-**2a** accepted by ATAs since the amine (*Z*)-**3a** was not observed in the reaction crude analyses, a situation similarly found for reactions involving ADHs,<sup>[10d]</sup> likely due to steric hindrance.

**Table 3.** ATA screening for the biotransamination of (*E*)-**2a** under standard conditions.

Entry	Enzyme	<i>c</i> [%] <sup>[a]</sup>	( <i>E</i> )- <b>3a</b> <i>ee</i> [%] <sup>[b]</sup>
1	<i>Ar</i> STA	85	99 ( <i>S</i> )
2 <sup>[c]</sup>	<i>I</i> / <i>T</i> A mutant	84	>99 ( <i>S</i> )
3	ATA-237	86	99 ( <i>S</i> )
4	ATA-251	90	99 ( <i>S</i> )
5	ATA-254	90	99 ( <i>S</i> )
6	ATA-260	89	99 ( <i>S</i> )
7	ATA-415	89	97 ( <i>R</i> )
8	ATA-024	91	99 ( <i>R</i> )
9	ATA-025	89	99 ( <i>R</i> )
10	ATA-033	92	99 ( <i>R</i> )

<sup>[a]</sup> Conversion values were measured by GC analyses.

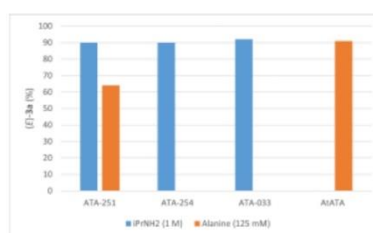
<sup>[b]</sup> Enantiomeric excess values were measured by chiral HPLC after chemical acetylation of the reaction crude.

<sup>[c]</sup> Reaction was carried out at 30 °C instead of 45 °C.

Notably, some enzymes proved able to accept alanine as an amine donor (5 equiv, 125 mM) in lieu of <sup>t</sup>PrNH<sub>2</sub>, using the lactate dehydrogenase, glucose and glucose dehydrogenase system (LDH/Glu/GDH) for the transformation of pyruvate into lactate (Table S9 in SI). This was the case for ATA-251 (64%) to obtain the enantiopure (*E,S*)-**3a**, while *Ar*TA, that was inactive with <sup>t</sup>PrNH<sub>2</sub>, displayed the highest activity giving access to the opposite enantiomer in an outstanding 90% (Figure 2).

The compatibility between [Au(IPr)(NTf<sub>2</sub>)] and alanine already displayed in Table 1 (entry 4), deserved a deeper study of the enzymatic step, in order to achieve an efficient cascade sequence. The most

remarkable results about the use of the LDH/Glu/GDH system and different temperatures with ATA-251 and the use of <sup>t</sup>PrOH as cosolvent in *Ar*TA-catalysed reactions are highlighted in Table 4.

**Figure 2.** Influence of the amine donor in the biotransamination of (*E*)-**2a** (25 mM) using a KPi buffer pH 7.5 and DMSO (2.5% vol) for 24 h at 45 °C and 220 rpm.

On the one hand, ATA-251 suffered a significant loss of activity at 30 °C compared to the reaction at 45 °C (57-64%, entries 1 and 2), while changing the amount of amine donor and enzyme related to the pyruvate removal did not lead to any improvement (entries 3-5). On the other hand, <sup>t</sup>PrOH was explored as possible cosolvent of the *Ar*TA-catalysed reactions since it was previously demonstrated that DMSO is not adequate for the [Au(IPr)(NTf<sub>2</sub>)] catalysed step.<sup>[10d]</sup> Satisfyingly, conversion values were similar and practical for synthetic purposes (entries 6 and 7). Additional experiments using other aqueous systems (entries 8 and 9), or higher cosolvent concentrations (entries 10-12) led to poorer results. With *Ar*TA as the unique enzyme capable to fulfil the requirements for the chemoenzymatic approach, the development of the concurrent cascade was next explored (Table 5).

**Table 4.** ATA-catalysed biotransamination of (*E*)-**2a** (25 mM) using alanine as amine donor.<sup>[a]</sup>

Entry	Enzyme	Ala [mM]	LDH [U]	GDH [U]	T [°C]	Cosolvent [% vol]	<i>c</i> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>E</i> )- <b>3a</b> <i>ee</i> [%] <sup>[c]</sup>
1	ATA-251	125	45	15	45	DMSO (2.5)	64	>99 ( <i>S</i> )
2	ATA-251	125	45	15	30	DMSO (2.5)	57	>99 ( <i>S</i> )
3	ATA-251	125	60	15	45	DMSO (2.5)	62	>99 ( <i>S</i> )
4	ATA-251	200	45	15	45	DMSO (2.5)	65	>99 ( <i>S</i> )
5	ATA-251	125	45	20	45	DMSO (2.5)	63	>99 ( <i>S</i> )
6	<i>Ar</i> TA	125	45	15	45	DMSO (2.5)	90	>99 ( <i>R</i> )
7	<i>Ar</i> TA	125	45	15	45	<sup>t</sup> PrOH (2.5)	91	>99 ( <i>R</i> )
8	<i>Ar</i> TA	125	45	15	45	<sup>t</sup> PrOH (2.5) <sup>[d]</sup>	65	>99 ( <i>R</i> )
9	<i>Ar</i> TA	125	45	15	45	<sup>t</sup> PrOH (2.5) <sup>[e]</sup>	61	>99 ( <i>R</i> )
10	<i>Ar</i> TA	125	45	15	45	<sup>t</sup> PrOH (5)	68	>99 ( <i>R</i> )
11	<i>Ar</i> TA	125	45	15	45	<sup>t</sup> PrOH (10)	15	n.d.
12	<i>Ar</i> TA	125	45	15	45	<sup>t</sup> PrOH (15)	<1	n.d.

<sup>[a]</sup> Reaction conditions: (*E*)-**2a** (25 mM), KPi buffer (pH 7.5, 50 mM), cosolvent (2.5-15% vol), 24 h, 220 rpm, ATA-251 (1:1 w/w), L-Ala, GDH (15-20 U) and D-Glucose (75 mM); or *Ar*TA (4:1 w/w), D-Ala, GDH (15 U) and D-glucose (75 mM).

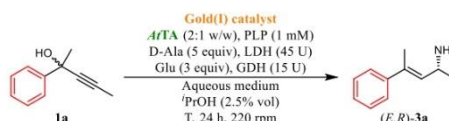
<sup>[b]</sup> Conversion values were measured by GC analyses.

<sup>[c]</sup> Enantiomeric excess values were measured by chiral HPLC after chemical acetylation of the reaction crude. Major amine enantiomer appears in parentheses. n.d.: Not determined.

<sup>[d]</sup> Distilled water was used instead of KPi buffer.

<sup>[e]</sup> MOPS buffer (pH 7.5, 50 mM) was used instead of KPi buffer.



**Table 5.** Optimisation of the one-pot Meyer-Schuster rearrangement and biotransamination of **1a** conducted in concurrent mode.<sup>[a]</sup>

Entry	Aqueous medium	Gold(I) catalyst [mol%]	T [°C]	[ <b>1a</b> ] [mM]	<b>1a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>E</i> )- <b>2a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>Z</i> )- <b>2a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>E,R</i> )- <b>3a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>E,R</i> )- <b>3a</b> ee [%] <sup>[c]</sup>
1	KPi pH 7.5 50 mM	<b>A</b> (5)	45	100	35	57	2	6	n.d.
2	H <sub>2</sub> O	<b>A</b> (5)	45	100	33	59	2	6	n.d.
3	KPi pH 7.5 50 mM	<b>A</b> (5)	45	25	35	39	1	25	n.d.
4	H <sub>2</sub> O	<b>A</b> (5)	45	25	41	46	1	12	n.d.
5	KPi pH 7.5 50 mM	<b>A</b> (5)	45	10	87	4	<1	9	n.d.
6	KPi pH 7.5 50 mM	<b>A</b> (5)	40	25	53	18	<1	29	n.d.
7	KPi pH 7.5 50 mM	<b>A</b> (5)	30	25	67	19	1	13	n.d.
8	KPi pH 7.5 50 mM	<b>A</b> (7.5)	45	25	35	28	1	36	>99
9	KPi pH 7.5 50 mM	<b>A</b> (7.5)	45 <sup>[d]</sup>	25	28	25	6	41	>99
10	KPi pH 7.5 50 mM	<b>B</b> (5+5) <sup>[e]</sup>	45	25	35	43	3	19	n.d.
11	KPi pH 7.5 50 mM	<b>B</b> (7.5)	45	25	36	29	1	34	97
12	KPi pH 7.5 50 mM	<b>B</b> (7.5)	45 <sup>[d]</sup>	25	25	22	5	48	97

<sup>[a]</sup> Reaction conditions: **1a** (10–100 mM), KPi buffer (pH 7.5, 50 mM, 696 μL), <sup>i</sup>PrOH (25 μL, 2.5% vol), gold catalyst (5–10 mol%), ATA (2:1 w/w), PLP (1 mM), D-Ala (5 equiv), D-glucose (3 equiv), LDH (45 U), GDH (15 U), 24 h, 220 rpm.

<sup>[b]</sup> Conversion values were measured by GC analyses.

<sup>[c]</sup> Enantiomeric excess values measured by chiral HPLC after acetylation of the reaction crude. n.d.: Not determined.

<sup>[d]</sup> Reaction was run for 48 h.

<sup>[e]</sup> Catalyst added in two portions (5 mol% at the beginning plus 5 mol% after 6 h).

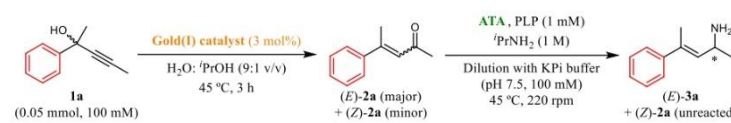
Reactions were initially carried out in phosphate buffer or water as the aqueous medium, finding in both cases at 100 mM substrate concentration, that there remained a significant amount of unreacted propargylic alcohol (33–35%, entries 1 and 2), but also that the reactions just produced the  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone intermediate **2a**. Therefore, the substrate concentration was decreased to 25 mM (entries 3 and 4), which slightly favoured the ketone transformation into the amine but still to a low extent, and a lower concentration (10 mM) only led to 9% conversion (entry 5). The use of 40 °C allowed to increase the amine formation to 29%, but lower temperatures led again to poor results (entries 6 and 7).

Better results were found with the use of higher [Au(IPr)(NTf<sub>2</sub>)] (**A**) loadings (7.5 mol%), and prolonging the reaction time to 48 h allowed the formation of enantiopure (*E,R*)-**3a** to 41% conversion (entries 8 and 9). Finally, the use of another gold(I) catalyst, the dinuclear species {[Au(IPr)]<sub>2</sub>(μ-OH)}[BF<sub>4</sub>] (**B**) was explored, considering its addition in portions along the process and running it for one or two days (entries 10–12), providing the highest conversion of 48%, although the optical purity of the amine slightly decreased (97% ee) in comparison with the **A**-catalysed reactions.

Bearing in mind that conversions did not reach a 50% yield in the concomitant approach, we studied a sequential approach, by adding the ATA, the amine donor, PLP and <sup>i</sup>PrNH<sub>2</sub> once the first metal-mediated step was completed. In this case, two active and

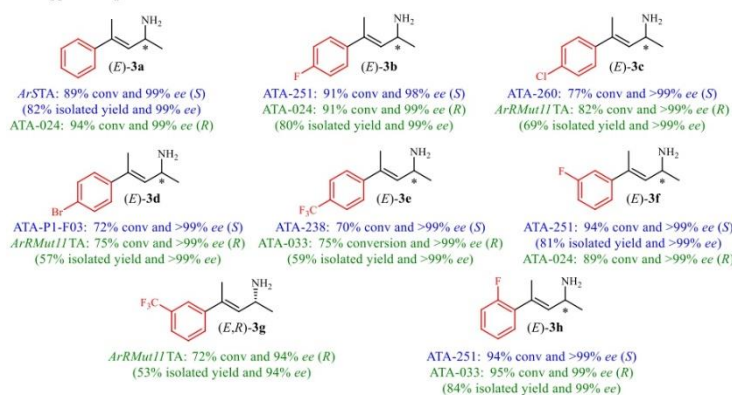
selective ATAs were selected (Table 3), one (*S*)-selective and overexpressed in *E. coli* (*Ar*SATA) and another (*R*)-selective and commercially available (ATA-024), and their reactions were optimised obtaining up to 89% and 94% conversion, respectively (Table 6). Before studying the sequential approach, the influence of the presence of the gold catalyst **A** (3 mol%) on the *Ar*SATA and ATA-024 was studied, finding that both ATAs were not affected by the presence of the metal (Table S19). These results prompted us to study the sequential approach more in depth.

This optimisation was based on the study of different gold(I) species, dilutions of the ketone intermediate, reaction times and amounts of ATA. Thus, starting from a concentration of 100 mM of the propargylic alcohol **1a**, the best results were found when the gold reaction was allowed to proceed for 3 h, and following dilution of the reaction content to 15 mM ketone concentration for the second step by addition of the KPi buffer (entries 1–4). In this case, the amount of *Ar*SATA did not have an impact on the process outcome, while longer reaction times (48 h) allowed the formation of (*E,S*)-**3a** with the highest conversion. Both, **A** and **B** displayed good catalytic performance (entries 4 and 5), although to extend the reaction scope, **A** was selected. To obtain the amine (*E,R*)-**3a** using ATA-024, the use of longer reaction times (48 h) proved crucial to achieve the optimal results (entries 6–8).

**Table 6.** Optimisation of the one-pot Meyer-Schuster rearrangement and biotransamination of **1a** carried out in a sequential mode.


Entry	Gold(I) cat.	ATA <sup>[a]</sup>	Dilution [mM]	t [h]	<b>1a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>E</i> )- <b>2a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>Z</i> )- <b>2a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>E</i> )- <b>3a</b> [%] <sup>[b]</sup>	( <i>E</i> )- <b>3a</b> <i>ee</i> [%] <sup>[c]</sup>
1	A	<i>Ar</i> STA (20 mg)	25	24	<3	33	<3	63	99 ( <i>S</i> )
2	A	<i>Ar</i> STA (30 mg)	25	24	<3	30	3	65	99 ( <i>S</i> )
3	A	<i>Ar</i> STA (20 mg)	15	24	<3	15	5	79	99 ( <i>S</i> )
4	A	<i>Ar</i> STA (20 mg)	15	48	<3	7	4	89	99 ( <i>S</i> )
5	B	<i>Ar</i> STA (20 mg)	15	48	<3	17	7	76	96 ( <i>S</i> )
6	A	ATA-024 (8 mg)	15	48	<3	6	<3	94	>99 ( <i>R</i> )
7	A	ATA-024 (4 mg)	15	48	<3	6	<3	94	>99 ( <i>R</i> )
8	A	ATA-024 (8 mg)	15	24	<3	16	<3	84	>99 ( <i>R</i> )

<sup>[a]</sup> Weight of lyophilised cells of *E. coli* overexpressed (entries 1-5) or commercial (entries 6-8) ATAs appear in parentheses.  
<sup>[b]</sup> Percentage of products were determined after liquid-liquid extraction and <sup>1</sup>H-NMR analysis of the corresponding reaction crude.  
<sup>[c]</sup> Enantiomeric excess values were measured by chiral HPLC after chemical acetylation of the reaction crude. Major amine enantiomer appears in parentheses.

**Figure 3.** One-pot sequential A-catalysed Meyer-Schuster rearrangement followed by stereoselective biotransamination: Au(IPr)(NTf<sub>2</sub>) (3 mol%), H<sub>2</sub>O:PrOH (9:1 v/v), 45 °C, 3 h and magnetic stirring; then dilution to 15 mM with KPi buffer pH 7.5 100 mM, PrNH<sub>2</sub> (1 M), PLP (1 mM), ATA (see the experimental section for individual enzyme details), 45 °C, 48 h and 220 rpm. Blue and green data for (*S*)- and (*R*)-selective ATAs, respectively, including preparative experiments in parentheses for 100 mg of substrate.

After enzyme screening of the biotransamination of ketones **2b-h** (Tables S10 to S16 in SI), the scope of the sequential chemoenzymatic cascade was next explored using seven additional propargylic alcohols **1b-h** bearing different pattern substitutions at the aromatic ring, which were selected since they are known to be good substrates for their [Au(IPr)(NTf<sub>2</sub>)]-catalysed Meyer-Schuster rearrangement (Figure 3).<sup>[10d]</sup> The best [Au(IPr)(NTf<sub>2</sub>)]-ATA pairs were

identified (Table S18 in SI), allowing the preparation of both amine enantiomers **3b-h** (97 to >99% *ee*) in good to excellent conversions (70-95%). Absolute configurations were assigned based on the known ATA stereoselective preference,<sup>[20-26]</sup> finding that the (*R*)-enantiomers released first in the HPLC analyses (see Section X in SI). The reaction was also extended to the 2-thiophene derivative (**1i**) as an example of a heteroaromatic substrate, although the low

conversions achieved in the biotransamination step of ketone **2i** (<45%, Table S17 in SI) hampered the development of the chemoenzymatic approach.

Sequential reactions were scaled-up on semipreparative scale (100 mg of substrate), producing the enantioenriched amines **3a-g** in moderate to high isolated yields (53-84%) and excellent *ee* values, after liquid-liquid extraction and column chromatography purification. Importantly, the obtained amines were recovered with the same optical purity as the ones attained in the cascade reactions previously carried out on smaller analytical scale. Additionally, the reaction with 0.5 g of **1a** was performed with *ArSATA* and <sup>1</sup>PrNH<sub>2</sub>, producing (S)-**3a** in 79% isolated yield and 99% *ee*.

## Conclusions

After identifying a smooth access to chiral allylic amines from propargylic alcohols, the gold(I)-catalysed Meyer-Schuster rearrangement and the stereoselective biotransamination of the unsaturated ketone intermediates have been optimised, exploring the possibility of obtaining high-yielding sequential and cascade processes. From the different parameters affecting catalyst activities, for instance catalyst loadings, (co)solvent, temperature or substrate concentration, the use of an adequate amine donor has proved crucial to develop an efficient chemoenzymatic strategy. Although the use of alanine has allowed for the first time the synthesis of an optically active amine through a gold-enzyme concurrent strategy, the conversions into (*E*)-4-phenylpent-3-en-2-amine (**3a**) did not exceed 50% conversion (at 25 mM substrate concentration). While still low, it is a remarkable value since the deactivation of metals in the presence of highly nucleophilic species such as amine derivatives is known (in this case, both the amine donor and the final product), as demonstrated in previous metalloenzymatic approaches to synthesise amines.<sup>[6,7,9,11,12]</sup> Thus, both enantiomers of a series of (*E*)-4-arylpent-3-en-2-amines (**3a-h**) were produced in good conversions (67-95%) and excellent selectivities (>97% *ee*), the scalability of these processes being also demonstrated by recovering the target enantiopure amines in good to high isolated yields (53-84%).

## Experimental Section

Lyophilised made in house ATAs heterologously expressed in *E. coli* from *CyTA*, *ArSTA*, *VfTA*, *VfTA* mutant), *ArTA*, *ArRTA* and its mutant *ArRmut1* were obtained as already described,<sup>[20-26]</sup> while commercially available ATAs were obtained from Codexis Inc. GDH-105 (48 U/mg) was obtained from Codexis Inc. and LDH (300 U/mg) was purchased from Sigma-Aldrich. All other reagents for chemical transformations and product recovery were obtained from Sigma-Aldrich and used as received. Thin layer chromatographies (TLCs) were conducted with silica gel precoated plates and visualised with UV and potassium permanganate stain. Column chromatographies were performed using silica gel (230-400 mesh). NMR spectra were recorded on a Bruker 300 MHz spectrometer. All chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million (ppm) and referenced to the residual solvent signal as internal

standard. IR spectra were recorded on a spectrophotometer on NaCl pellets.

Gas chromatography (GC) analyses were performed on standard gas chromatograph apparatus equipped with a FID detector. High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were carried out in a chromatograph with UV detector at a 210 nm wavelength. GC and HPLC analyses served to calculate conversion, enantiomeric excess and diastereomeric excess values. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained in a spectrometer using the ES-TOF positive mode. Measurement of the optical rotation was carried out at 590 nm in a standard polarimeter. Typical procedures for the Meyer-Schuster rearrangement of alcohols **1a-h** and ATA-catalysed transamination of ketone (*E*)-**2a-h** appear in the Supporting Information.

**Typical procedure for the one-pot Meyer-Schuster and biotransamination performed in a concurrent manner at analytical scale using ATA overexpressed in *E. coli*.** Propargylic alcohol **1a** was dissolved in <sup>1</sup>PrOH (25  $\mu$ L) inside a glass vial (2.5 x 4 cm), and then a 50 mM KPi buffer pH 7.5 or distilled water (696  $\mu$ L), containing PLP (1 mM) and *D*-alanine (125 mM), LDH (45 U), glucose (75 mM), GDH (15 U) and NADH (1 mM) were successively added. Finally, the gold(I) catalyst (5 or 7.5 mol%) and lyophilised cells of *E. coli* overexpressing *ATA* (30 mg) were added. The mixture was shaken at the corresponding temperature (30-45°C) and 220 rpm for 24 h, and after this time the reaction was stopped with the addition of a NaOH 10 M aqueous solution (200  $\mu$ L). The mixture was extracted with EtOAc (3 x 750  $\mu$ L) and the organic phases were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. Conversions were determined by GC and <sup>1</sup>H-NMR analyses, and enantiomeric excess values were determined by HPLC after chemical acetylation using DMAP and acetic anhydride.

**Typical procedure for the one-pot Meyer-Schuster and biotransamination performed in a sequential manner at analytical scale using commercial enzymes overexpressed in *E. coli*.** Propargylic alcohol **1a** (0.05 mmol, 8.0 mg) was dissolved in <sup>1</sup>PrOH (50  $\mu$ L) inside a glass vial (2.5 x 4 cm), and then distilled water (450  $\mu$ L) and the gold(I) catalyst (3 mol%, 0.0015 mmol) were added. The mixture was stirred at 45 °C for 3 h. After this time, 100 mM KPi buffer pH 7.5 (2.83 mL) containing PLP (1 mM) and <sup>1</sup>PrNH<sub>2</sub> (1 M), and *E. coli* overexpressing *ArSTA* or *ArRmut1/ITA* (20 mg), were then added. The mixture was stirred for 48 h at 45 °C, after this time the reaction was stopped by the addition of a NaOH 10 M aqueous solution (400  $\mu$ L). The mixture was extracted with EtOAc (3 x 2 mL) and the organic phases were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. The conversion values were determined by <sup>1</sup>H-NMR analyses, and enantiomeric excess values were determined by HPLC after chemical acetylation using DMAP and acetic anhydride.

**Typical procedure for the one-pot Meyer-Schuster and biotransamination performed in a sequential manner at analytical scale using commercial enzymes.** Propargylic alcohol **1a** (0.05 mmol, 8.0 mg) was dissolved in <sup>1</sup>PrOH (50  $\mu$ L) inside a glass vial (2.5 x 4 cm), and then distilled water (450  $\mu$ L) and the gold(I) catalyst (3 mol%, 0.0015 mmol) were added. The mixture was stirred at 45 °C for 3 h. After this time, 100 mM KPi buffer pH 7.5 (2.83 mL) containing PLP (1 mM) and <sup>1</sup>PrNH<sub>2</sub> (1 M), and the corresponding ATA (*ATA-024*, *ATA-033*, *ATA-238*, *ATA-251*, *ATA-P1-F03* or *ATA-260*, 4 mg), were then added. The mixture was stirred for 48 h at 45 °C, and after this time the reaction was stopped by the addition of a NaOH 10 M aqueous solution (400  $\mu$ L). The mixture was extracted with EtOAc (3 x 2 mL) and the organic phases were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. The conversion values were determined by <sup>1</sup>H-NMR analyses, and enantiomeric excess values were determined by HPLC after chemical acetylation using DMAP and acetic anhydride.

**Typical procedure for the one-pot Meyer-Schuster and biotransamination performed in a sequential manner at semipreparative scale.** The corresponding propargylic alcohol **1a-h** (0.6 mmol) was dissolved in <sup>1</sup>PrOH (310  $\mu$ L)

inside an Erlenmeyer flask, and then distilled water (2.81 mL) and  $\text{IPrAuNTf}_2$  (3 mol%, 0.018 mmol, 15.0 mg) were added. The mixture was stirred at 45 °C for 3 h. After this time, 100 mM KPi buffer pH 7.5 (17.54 mL) containing PLP (1 mM) and  $\text{PrNH}_2$  (1 M), and the corresponding ATA (120 mg of an overexpressed *E. coli* transaminase or 25 mg of a commercial one from Codexis) were added. The mixture was stirred for 48 h at 45 °C, and after this time the reaction was stopped by the addition of a NaOH 10 M aqueous solution (5 mL). The mixture was extracted with EtOAc (4 x 25 mL) and the organic phases were combined, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated under vacuum. The conversion values were determined by  $^1\text{H-NMR}$  analyses, and enantiomeric excess values were determined by HPLC after chemical acetylation using DMAP and acetic anhydride. Purification by column chromatography on silica gel (MeOH) led to the allylic amines **3a-h** (53–84% isolated yields and 97–99% ee).

**(E)-4-Phenylpent-3-en-2-amine (3a)**. Yellowish oil (82% yield).  $R_f$  (MeOH): 0.12. IR:  $\nu$  3418, 2939, 1605, 1580, 1507, 1276  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.41–7.38 (m, 2H), 7.34–7.19 (m, 3H), 5.69 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 3.97–3.88 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.46 (br s, 2H), 1.22 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  143.4 (C), 134.6 (CH), 133.8 (C), 128.2 (C), 126.9 (CH), 125.7 (2CH), 45.4 (CH), 23.9 (CH<sub>3</sub>), 15.9 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): calcd for  $(\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N})^+$  (M+H)<sup>+</sup>: 162.1277; found 162.1281.

**(E)-4-(4-Fluorophenyl)pent-3-en-2-amine (3b)**. Yellowish oil (80% yield).  $R_f$  (MeOH): 0.08. IR:  $\nu$  3362, 3012, 1593, 1507, 1257  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.35–7.30 (m, 2H), 7.00–6.94 (m, 2H), 5.61 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 3.95–3.86 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.87 (br s, 2H), 1.20 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  161.9 (d,  $J = 249.2$  Hz, C), 139.3 (d,  $J = 3.8$  Hz, C), 134.1 (CH), 133.1 (C), 127.2 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2CH), 115.0 (d,  $J = 21.1$  Hz, 2CH), 45.4 (CH), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 16.1 (CH<sub>3</sub>).  $^{19}\text{F-NMR}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -116.08. HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): calcd for  $(\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{FN})^+$  (M+H)<sup>+</sup>: 180.1183; found 180.1187.

**(E)-4-(4-Chlorophenyl)pent-3-en-2-amine (3c)**. Yellowish oil (69% yield).  $R_f$  (MeOH): 0.16. IR:  $\nu$  3341, 3026, 1568, 1493, 1273  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.32–7.24 (m, 4H), 5.66 (d,  $J = 9.9$  Hz, 1H), 3.96–3.86 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.59 (br s, 2H), 1.20 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  141.7 (C), 134.9 (CH), 132.8 (C), 132.6 (C), 128.3 (2CH), 127.0 (2CH), 45.4 (CH), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 15.9 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): calcd for  $(\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClN})^+$  (M+H)<sup>+</sup>: 196.0888; found 196.0894.

**(E)-4-(4-Bromophenyl)pent-3-en-2-amine (3d)**. Yellowish oil (57% yield).  $R_f$  (MeOH): 0.16. IR:  $\nu$  3348, 3013, 1552, 1488, 1261  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.42 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 5.67 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 3.94–3.87 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.57 (br s, 2H), 1.21 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  142.2 (C), 135.0 (C), 132.9 (C), 131.2 (2CH), 127.4 (2CH), 120.8 (CH), 45.4 (CH), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 15.8 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): calcd for  $(\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrN})^+$  (M+H)<sup>+</sup>: 240.0382; found 240.0382.

**(E)-4-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)pent-3-en-2-amine (3e)**. Yellowish oil (59% yield).  $R_f$  (MeOH): 0.08. IR:  $\nu$  3264, 2991, 1564, 1502, 1243  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.57 (m, 2H), 7.49 (m, 2H), 5.74 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 3.94 (br s, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.66 (br s, 2H), 1.23 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  146.9 (C), 136.4 (C), 132.9 (CH), 128.8 (q,  $J = 32.4$  Hz, C), 126.0 (2CH), 125.1 (q,  $J = 2.8$  Hz, 2CH), 124.3 (q,  $J = 272.3$  Hz, C), 45.4 (CH), 23.8 (CH<sub>3</sub>), 15.9 (CH<sub>3</sub>).  $^{19}\text{F-NMR}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -62.40. HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): calcd for  $(\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N})^+$  (M+H)<sup>+</sup>: 230.1151; found 230.1155.

**(E)-4-(3-Fluorophenyl)pent-3-en-2-amine (3f)**. Yellowish oil (81% yield).  $R_f$  (MeOH): 0.10. IR:  $\nu$  3319, 3002, 1601, 1510, 1255  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.29–7.21 (m, 1H), 7.16–7.08 (m, 1H), 7.07 (dd,  $J$

= 10.8, 2.2 Hz, 1H), 6.91 (td,  $J = 8.3, 2.6$  Hz, 1H), 5.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 3.96–3.87 (apparent dt,  $J = 8.6, 6.4$  Hz, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.78 (br s, 2H), 1.21 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  162.9 (d,  $J = 245.4$  Hz, C), 145.6 (d,  $J = 7.6$  Hz, C), 135.2 (C), 133.0 (CH), 129.6 (d,  $J = 8.3$  Hz, CH), 121.3 (d,  $J = 3.0$  Hz, CH), 113.6 (d,  $J = 21.1$  Hz, CH), 112.7 (d,  $J = 21.1$  Hz, CH), 45.4 (CH), 23.7 (CH<sub>3</sub>), 15.9 (CH<sub>3</sub>).  $^{19}\text{F-NMR}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -113.77. HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): calcd for  $(\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{FN})^+$  (M+H)<sup>+</sup>: 180.1183; found 180.1189.

**(E)-4-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)pent-3-en-2-amine (3g)**. Yellowish oil (53% yield).  $R_f$  (MeOH): 0.10. IR:  $\nu$  3239, 2989, 1562, 1508, 1253  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.61–7.38 (m, 4H), 5.73 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 3.95 (br s, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.86 (br s, 2H), 1.23 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  144.1 (C), 135.8 (C), 132.9 (CH), 130.6 (q,  $J = 31.8$  Hz, C), 129.0 (CH), 128.6 (CH), 124.2 (q,  $J = 272.6$  Hz, C), 123.5 (q,  $J = 3.8$  Hz, CH), 122.5 (q,  $J = 3.8$  Hz, CH), 45.4 (CH), 23.7 (CH<sub>3</sub>), 15.9 (CH<sub>3</sub>).  $^{19}\text{F-NMR}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -62.60. HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): calcd for  $(\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N})^+$  (M+H)<sup>+</sup>: 230.1151; found 230.1157.

**(E)-4-(2-Fluorophenyl)pent-3-en-2-amine (3h)**. Yellowish oil (84% yield).  $R_f$  (MeOH): 0.10. IR:  $\nu$  3271, 3029, 1588, 1513, 1241  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.26–7.17 (m, 2H), 7.09–6.97 (m, 2H), 5.50 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 3.92 (apparent quint,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.80 (br s, 2H), 1.22 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159.9 (d,  $J = 246.9$  Hz, C), 137.5 (CH), 132.1 (d,  $J = 14.3$  Hz, C), 130.7 (C), 129.7 (d,  $J = 4.6$  Hz, CH), 128.3 (d,  $J = 8.2$  Hz, CH), 123.9 (d,  $J = 3.8$  Hz, CH), 115.6 (d,  $J = 22.7$  Hz, CH), 45.1 (CH), 23.6 (CH<sub>3</sub>), 17.0 (d,  $J = 4.6$  Hz, CH<sub>3</sub>).  $^{19}\text{F-NMR}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -115.30. HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): calcd for  $(\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{FN})^+$  (M+H)<sup>+</sup>: 180.1183; found 180.1187.

**Procedure for the one-pot Meyer-Schuster and biotransamination performed in a sequential manner at preparative scale.** Propargylic alcohol **1a** (3.12 mmol, 0.5 g) was dissolved in  $\text{PrOH}$  (1.5 mL) inside an Erlenmeyer flask, and then distilled water (13.60 mL) and  $[\text{Au}(\text{IPr})(\text{NTf}_2)]$  (3 mol%, 0.0936 mmol, 39 mg) were added. The mixture was stirred at 45 °C for 3 h. After this time, 100 mM KPi buffer pH 7.5 (84.85 mL) containing PLP (1 mM) and  $\text{PrNH}_2$  (1 M), and *Ar*STA (550 mg) were added. The mixture was stirred for 48 h at 45 °C, and after this time the reaction was stopped by the addition of a NaOH 10 M aqueous solution (25 mL). The mixture was extracted with EtOAc (4 x 70 mL) and the organic phases were combined, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated under vacuum. The enantiomeric excess values were determined by HPLC after chemical acetylation using DMAP and acetic anhydride. Purification by column chromatography on silica gel (MeOH) led to the allylic amine (**S**)-**3a** (398 mg, 79% isolated yield and 99% ee).

## Acknowledgements

Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MCI, PID2019-109233RB-I00) and Asturias Regional Government (AYUD/2021/51542) are gratefully acknowledged. S.G.-G. thanks University of Oviedo (UNIOVI) for a predoctoral fellowship (PAPF-21-PF-14) inside the "Programa de Apoyo y Promoción de la Investigación". Technical support from the Scientific-Technical Services (UNIOVI) is acknowledged. We thank Prof. Wolfgang Krouitl (University of Graz, Austria) for the donation of heterologously expressed amine transaminases. For work performed in Ghent, we acknowledge the BOF and IBOF support as well as generous donations from Umcore AG. The Research Foundation – Flanders (FWO) is also acknowledged for a Fundamental Research PhD fellowship to N.V.T. (1116921N).

## References

- [1] M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommaris, H. Yun, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 10985-11015.
- [2] a) M. Breuer, K. Ditrach, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßler, R. Stirmer, T. Zelinski, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 806-843; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824; b) T. C. Nugent, Chiral amine synthesis. Methods, developments and applications. Wiley-VCH, Weinheim, **2010**; c) J. Duan, P. Li, *Catal. Sci. Technol.* **2014**, *4*, 311-320; d) B. M. Paz, H. Jiang, K. A. Jørgensen, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 1846-1853; e) H. Ishikawa, S. Shiomu, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 409-424.
- [3] a) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51; b) V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Curr. Opin. Drug. Discov. Dev.* **2009**, *12*, 784-797; c) D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284-300; d) H. Kohls, F. Steffen-Munsberg, M. Höhne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180-192; e) O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009; f) G. Grogan, N. J. Turner, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 1900-1907; g) S. A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C. C. R. Allen, T. S. Moody, B. F. Gilmore, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 349-367; h) A. Gomm, E. O'Reilly, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *43*, 106-112; i) G. Grogan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *43*, 15-22.
- [4] a) F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12-22; b) X. Huang, M. Cao, H. Zhao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 161-170; c) Y. Liu, P. Liu, S. Gao, Z. Wang, P. Luan, J. González-Sabín, Y. Jing, *Chem. Eng. J.* **2021**, *420*, 127659; d) A. I. Benitez-Mateos, D. R. Padrosa, F. Paradisi, *Nat. Chem.* **2022**, *14*, 489-499.
- [5] a) C. An, K. M. Maloney, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2022**, *34*, 100591; b) L. Bering, J. Thompson, J. Micklefield, *Trends Chem.* **2022**, *4*, 392-408.
- [6] a) C. Palo-Nieto, S. Afewerki, M. Anderson, C.-W. Tai, P. Berglund, A. Córdova, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 3932-3940; b) F. Uthoff, H. Sato, H. Gröger, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 555-558; c) F. Uthoff, H. Gröger, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 9517-9521; d) A. W. H. Dawood, J. Bassut, R. O. M. A. de Souza, U. T. Bornscheuer, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 16009-16013; e) D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2582-2593; f) J. Paris, A. Telzerow, N. Ríos-Lombardía, K. Steiner, H. Schwab, F. Moris, H. Gröger, J. González-Sabín, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7*, 5486-5493; g) J. Albarrán-Velo, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2021**, *363*, 4096-4108.
- [7] N. Ríos-Lombardía, C. Vidal, M. Cocina, F. Moris, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10937-10940.
- [8] a) M. Asikainen, R. Krause, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2305-2309; b) Z. J. Wang, K. N. Clary, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 100-103.
- [9] M. Odachowski, M. F. Greaney, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 10032-10035.
- [10] a) M. J. Rodríguez-Álvarez, N. Ríos-Lombardía, S. Schumacher, D. Pérez-Iglesias, F. Moris, V. Cadierno, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 7753-7759; b) P. Schaaf, V. Gojic, T. Bayer, F. Rudroff, M. Schürch, M. D. Mihovilovic, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 920-924; c) M. Cortes-Clerget, N. Akporji, J. Zhou, F. Gao, P. Guo, M. Parmentier, F. Gallou, J.-Y. Berthon, B. H. Lipshutz, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2169; d) S. González-Granda, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 14064-14070; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 13945-13951; e) S. González-Granda, L. Escot, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 2552-2560.
- [11] S. Mathew, A. Sagadevan, D. Renn, M. Rueping, *ACS Catal.* **2021**, *11*, 12565-12569.
- [12] F. Chang, C. Wang, Q. Chen, Y. Zhang, G. Liu, *Angew. Chem.* **2022**, *134*, e202114809; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202114809.
- [13] a) D. A. Engel, G. B. Dudley, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4149-4158; b) D. Roy, P. Tharra, B. Baire, *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 1015-1032.
- [14] See reviews about transaminase applications: a) W. Kroutil, E.-M. Fischereder, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. G. Mutti, D. Pressnitz, A. Rajagopalan, J. H. Sattler, R. C. Simon, E. Sirola, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751-759; b) M. Fuchs, J. E. Farnberger, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6965-6982; c) M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommaris, H. Yun, *Catalysts* **2018**, *8*, 254; d) S. A. Kelly, S. Mix, T. S. Moody, B. F. Gilmore, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 4781-4794.
- [15] a) P. Tufvesson, M. Nordblad, U. Krühlne, M. Schürmann, A. Vogel, R. Wohlgenuth, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 652-660; b) F. Guo, P. Berglund, *Green Chem.* **2017**, *19*, 333-360; c) P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrkos-Ergas, I. V. Pavlidis, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1634-1642.
- [16] See for instance: a) B. Wang, H. Land, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 161-163; b) A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10890-10893; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717; c) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1618-1624; d) S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 2553-2559.
- [17] a) S. Swaminathan, K. V. Narayanan, *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 429-438; b) N. Marion, S. P. Nolan, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1776-1782; c) D. A. Engel, G. B. Dudley, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4149-4158; d) D. Roy, P. Tharra, B. Baire, *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 1015-1032.
- [18] a) S. Gaillard, J. Bosson, R. Ramón, P. Nun, A. M. Z. Slawin, S. P. Nolan, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 13729-13740; b) R. S. Ramón, S. Gaillard, A. M. Z. Slawin, A. Porta, A. D'Alfonso, G. Zanoni, S. P. Nolan, *Organometallics* **2010**, *29*, 3665-3668; c) R. S. Ramón, S. Gaillard, A. Poater, L. Cavallo, A. M. Z. Slawin, S. P.

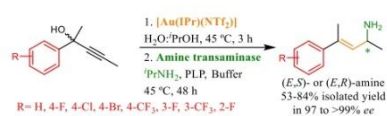
- Nolan, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1238-1246; d) Y. Oonishi, A. Gómez-Suárez, A. R. Martin, S. P. Nolan, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9949-9953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9767-9771; e) M. Brill, F. Nahra, A. Gómez-Herrera, C. M. Zinser, D. B. Cordes, A. M. Z. Slawin, S. P. Nolan, *ChemCatChem* **2016**, *9*, 117-120; f) N. V. Tzouras, M. Saab, W. Janssens, T. Cauwenbergh, K. Van Hecke, F. Nahra, S. P. Nolan, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 5541-5551; g) T. A. C. A. Bayrakdar, F. Nahra, O. Zugazua, L. Eykens, D. Ornerod, S. P. Nolan, *Green Chem.* **2020**, *22*, 2598-2604; h) I. D. Sorbelli, J. Segato, A. Del Zotto, L. Belpassi, D. Zuccaccia, P. Belanzoni, *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 5154-5160; i) R. Gauthier, N. V. Tzouras, Z. Zhang, S. Bedard, M. Saab, L. Falivene, K. Van Hecke, J.-F. Paquin, S. P. Nolan, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202103886.
- [19] F. Nahra, N. V. Tzouras, A. Collado, S. P. Nolan, *Nat. Protoc.* **2021**, *16*, 1476-1493.
- [20] U. Kaulmann, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 628-637.
- [21] S. Pannuri, S. V. Kamat, A. R. M. Garcia, PCT Int. Appl. WO 2006063336A2 20060615, **2006**.
- [22] H. Yun, J. Kim, K. Kinnera, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 391-395.
- [23] F. Cabirol, A. Gohel, S. H. Oh, D. Smith, B. Wong, J. LaLonde, PCT Int. Appl. WO 2011159910A2 20111222, **2011**.
- [24] E. Busto, R. C. Simon, B. Grisciek, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 1937-1942.
- [25] A. Iwasaki, Y. Yamada, N. Kizaki, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *69*, 499-505.
- [26] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309.

## RESEARCH ARTICLE

Merging Gold(I) Catalysis with Amine Transaminases in Cascade Catalysis: Chemoenzymatic Transformation of Propargylic Alcohols into Enantioenriched Allylic Amines

*Adv. Synth. Catal.* Year, Volume, Page – Page

Sergio González-Granda, Nikolaos V. Tzouras, Steven P. Nolan, Iván Lavandera\* and Vicente Gotor-Fernández\*







## **Parte II**

*Procesos en cascada basados en la  
combinación de reacciones de  
hidratación de alquinos catalizadas  
por especies de Au(I) y enzimas*

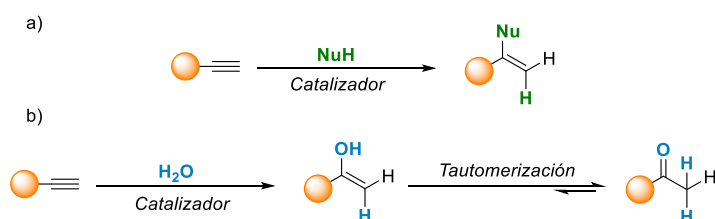


# *Introducción*



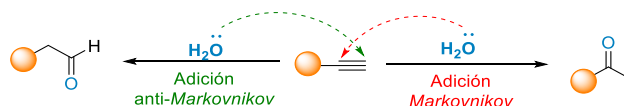
## II.5 Reacciones de hidratación de alquinos

La reacción de hidrofuncionalización de alquinos ha sido una de las reacciones químicas más ampliamente estudiadas para la síntesis de un amplio número de compuestos orgánicos (compuestos carbonílicos, iminas, enaminas, éteres de vinilo, halogenuros, etc.). Consiste en el ataque de un nucleófilo a un alquino activado por un catalizador, de manera que se obtiene un alqueno funcionalizado como producto de la reacción (Esquema 54, a). En este contexto, cuando el nucleófilo empleado es una molécula de agua, la reacción se denomina reacción de hidratación, generándose un producto carbonílico debido a la tautomerización del alqueno intermedio, en este caso un enol (Esquema 54, b).



**Esquema 54.** Reacciones de alquinos terminales: a) hidrofuncionalización; b) hidratación.

Este proceso transcurre con total economía atómica, y puede llevarse a cabo de manera regioselectiva, ya que la adición de la molécula de agua puede presentar una selectividad del tipo Markovnikov o anti-Markovnikov cuando se emplea un alquino terminal como sustrato de partida (Esquema 55).



**Esquema 55.** Regioselectividad de la reacción de hidratación de un alquino, en este caso, sobre un alquino terminal.

A pesar de ser una estrategia muy útil para la generación de compuestos carbonílicos, la reacción de hidratación sobre alquinos no tiene lugar en ausencia de un catalizador, de manera que los más empleados, generalmente, han sido los ácidos de Brønsted y los catalizadores metálicos.

## Bloque II. Parte II. Introducción

El primer ejemplo descrito de una reacción de hidratación de alquinos data del año 1863,<sup>298</sup> donde se describió la hidratación del acetileno en presencia de ácido sulfúrico, para generar una mezcla de acetaldehído y crotonaldehído.<sup>299</sup> Años más tarde, Kutscheroff descubrió que era posible sintetizar acetona y acetaldehído a partir de los correspondientes alquinos, empleando en este caso sales de Hg(II) como catalizadores, lo que constituye el primer ejemplo de una reacción de hidratación de alquinos catalizada por una especie metálica.<sup>300</sup> Debido a su peligrosidad, en los últimos años se han propuesto distintas alternativas al uso de especies de mercurio como catalizadores de esta reacción. Así, se han descrito estrategias que involucran el empleo de catalizadores de Fe,<sup>301</sup> Co,<sup>302</sup> Cu,<sup>303</sup> Zn,<sup>304</sup> Pd,<sup>305</sup> o Pt,<sup>306</sup> aunque sin duda alguna, los catalizadores de Ru y de Au han sido los más usados para promover esta transformación.<sup>307</sup>

Desde un punto de vista biocatalítico, la reacción de hidratación de alquinos catalizada por enzimas no es una reactividad común, al contrario de lo que sucede

---

<sup>298</sup> M. Berthelot, *Ann. Chim. Phys.* **1863**, 67, 52.

<sup>299</sup> H. Lagermarck, A. Eltekoff, *Chem. Ber.* **1877**, 10, 637.

<sup>300</sup> (a) M. Kutscheroff, *Chem. Ber.* **1881**, 14, 1540; (b) M. Kutscheroff, *Chem. Ber.* **1884**, 17, 13; (c) M. Kutscheroff, *Chem. Ber.* **1909**, 42, 2759.

<sup>301</sup> (a) X.-F. Wu, D. Bezier, C. Darcel, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 367-370; (b) J. R. Cabrero-Antonino, A. Leyva-Pérez, A. Corma, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 11107-11114; (c) M. Bassetti, S. Ciceri, F. Lancia, C. Pasquini, *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 1608-1612; (d) A. Antenucci, P. Flamini, M. V. Fornaiolo, S. D. Silvio, S. Mazzetti, P. Mencarelli, R. Salvio, M. Bassetti, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, 361, 4517-4526.

<sup>302</sup> (a) T. Tachinami, T. Nishimura, R. Ushimaru, R. Noyori, H. Naka, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 50-53; (b) Z. Lin, Z.-M. Zhang, Y.-S. Chen, W. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13739-13743; (c) S. Hou, H. Yang, B. Cheng, H. Zhai, Y. Li, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 6926-6929; (d) J.-W. Lai, Z.-Y. Liu, X.-Y. Chen, H. Zhang, H.-Y. Liu, *Tetrahedron Lett.* **2020**, 61, 152426.

<sup>303</sup> (a) H. Jiang, W. Zeng, Y. Li, W. Wu, L. Huang, W. Fu, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 5179-5183; (b) M. Jha, G. M. Shelke, K. Pericherla, A. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 4814-4816; (c) M. Hassam, W.-S. Li, *Tetrahedron* **2015**, 71, 2719-2723; (d) Q. Mei, H. Liu, M. Hou, H. Liu, B. Han, *New J. Chem.* **2017**, 41, 6290-6295.

<sup>304</sup> (a) X. Chew, W. Lin, Y. W. Lim, *RSC Adv.* **2014**, 4, 16765-16768; (b) Q. Wang, M. Zhu, H. Zhang, C. Xu, B. Dai, J. Zhang, *ChemistrySelect* **2018**, 3, 9603-9609; (c) Q. Wang, M. Zhu, H. Zhang, C. Xu, B. Dai, J. Zhang, *Catal. Commun.* **2019**, 120, 33-37.

<sup>305</sup> (a) Z. Zhang, L. Wu, J. Liao, W. Wu, H. Jiang, J. Li, J. Li, *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 7594-7603; (b) R. Kusakabe, Y. Ito, M. Kamimura, T. Shirai, K. Takahashi, T. Mochida, K. Kato, *Asian J. Org. Chem.* **2017**, 6, 1086-1090.

<sup>306</sup> (a) J. W. Hartman, W. C. Hiscox, P. W. Jennings, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7613-7614; (b) F. Trentin, A. M. Chapman, A. Scarso, P. Sgarbossa, R. A. Michelin, G. Strukul, D. F. Wass, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 1095-1104.

<sup>307</sup> (a) M. Beller, J. Seayad, A. Tillack, H. Jiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3368-3398; (b) L. Hintermann, A. Labonne, *Synthesis* **2007**, 1121-1150; (c) R. Salvio, M. Bassetti, *Inorg. Chim. Acta* **2021**, 522, 120288.

con la hidratación de alquenos que ha sido ampliamente estudiada.<sup>308</sup> En la bibliografía únicamente destaca el empleo de la enzima acetileno hidratasa (EC 4.2.1.112),<sup>309</sup> la cual cataliza la adición de una molécula de agua al acetileno para generar acetaldehído.

### II.5.1 Hidratación de alquinos catalizada por especies de Ru

La gran mayoría de catalizadores metálicos empleados en procesos de hidratación de alquinos presentan una regioselectividad de tipo Markovnikov, sin embargo, las especies de Ru, generalmente, exhiben la selectividad contraria. El primer ejemplo acerca del empleo de un catalizador de Ru en un proceso de hidratación de alquinos con selectividad anti-Markovnikov fue descrito por Tokunaga y Wakatsuki en 1998.<sup>310</sup> Desde ese momento se ha descrito una gran variedad de aproximaciones centradas en el empleo de catalizadores de Ru para obtener productos con esta selectividad.<sup>307</sup>

La selectividad particular que presentan la gran mayoría de los catalizadores de Ru(II) se debe a su facilidad para generar vinilidenos cuando se emplean alquinos terminales como sustratos. El mecanismo de reacción que sigue esta transformación (Esquema 56) se inicia con la coordinación del alquino al catalizador de rutenio empleado. Posteriormente el alquino activado por la especie de Ru(II) experimenta una reacción de protonación, generando un intermedio vinil Ru(IV) (**A**). Este intermedio **A** forma un vinilideno de Ru(IV) (**B**) mediante una migración de hidruro proveniente de la posición  $\alpha$ . A continuación, se produce el ataque nucleófilo de un grupo hidroxilo al orbital vacío del carbono  $\alpha$ , generando un intermedio  $\alpha$ -hidroxilvinilo (**C**), el cual isomeriza rápidamente al intermedio de tipo acil rutenio (**D**). Finalmente, gracias a una reacción de eliminación reductora se completa el ciclo catalítico liberando el aldehído deseado al medio de reacción regenerando la especie activa de rutenio. Durante el transcurso de este ciclo catalítico se puede producir una reacción secundaria que puede ser entendida formalmente como una

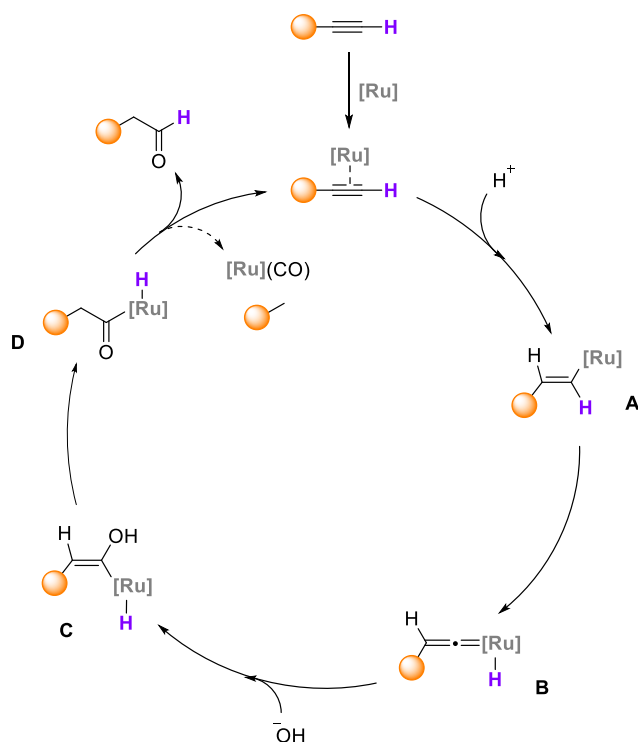
<sup>308</sup> (a) J. Jin, U. Hanefeld, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2502-2510; (b) V. Resch, U. Hanefeld, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, 5, 1385-1399; (c) M. Engleder, H. Pichler, *App. Microb. Biotechnol.* **2018**, 102, 5841-5858; (d) R. M. Demming, S. C. Hammer, B. M. Nestl, S. Gergel, S. Fademrecht, J. Pleiss, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 173-177.

<sup>309</sup> (a) B. M. Rosner, B. Schink, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 5767-5772; (b) R. U. Meckenstock, R. Krieger, S. Ensign, P. M. H. Kroneck, B. Schink, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 264, 176-182; (c) G. B. Seiffert, G. M. Ullmann, A. Messerschmidt, B. Schink, P. M. H. Kroneck, O. Einsle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 3073-3077.

<sup>310</sup> M. Tokunaga, Y. Wakatsuki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2867-2869.

## Bloque II. Parte II. Introducción

descarboxilación del intermedio acil rutenio **D**, observándose como subproductos un complejo carbonílico de Ru(II) estable, y un alcano con un carbono menos que el producto de partida. La regioselectividad de este proceso se origina en la adición del protón al alquino de partida coordinado al catalizador de Ru, ya que si la adición se produce en el carbono terminal del alquino, se generaría un intermedio vinil rutenio geminal, el cual se encontraría estéricamente desfavorecido debido a la presencia del catalizador de Ru y el resto de la molécula.<sup>311</sup>



**Esquema 56.** Mecanismo de la reacción de hidratación anti-Markovnikov de un alquino terminal empleando catalizadores de Ru.

### II.5.2 Hidratación de alquinos catalizada por especies de Au

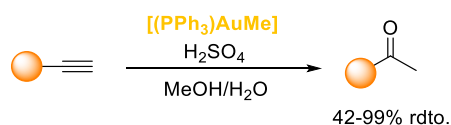
Las reacciones de hidratación de alquinos empleando catalizadores de Au han sido ampliamente estudiadas por diversos grupos de investigación, debido a la capacidad que presentan estas especies para catalizar la transformación deseada bajo

<sup>311</sup> M. Tokunaga, T. Suzuki, N. Koga, T. Fukushima, A. Horiuchi, Y. Wakatsuki, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11917-11924.



condiciones suaves de reacción y con una amplia tolerancia a la presencia de distintos grupos funcionales.<sup>77a,104a</sup> Dentro de los múltiples ejemplos descritos en este ámbito, cabe destacar dos ejemplos particularmente interesantes.

La primera reacción descrita de hidrofuncionalización de alquinos empleando un catalizador de Au(I) y un nucleófilo oxigenado fue propuesta por Teles y colaboradores en el año 1998.<sup>108</sup> Sin embargo, no fue hasta el año 2002 cuando se describió el primer ejemplo de reacciones de hidratación de alquinos empleando especies de Au(I).<sup>312</sup> En este trabajo se empleó  $[(PPh_3)AuMe]$  como catalizador, en presencia de ácido sulfúrico como agente activante, obteniéndose generalmente elevados rendimientos de las correspondientes cetonas debido a la selectividad de tipo Markovnikov de este proceso (Esquema 57).



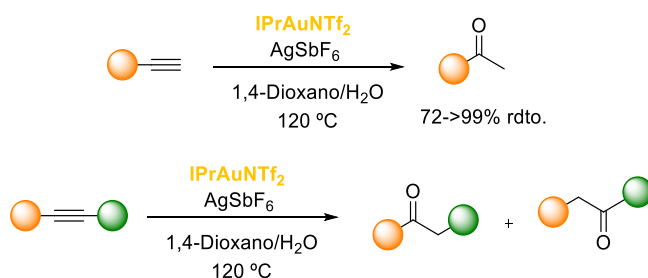
**Esquema 57.** Primer ejemplo de una reacción de hidratación de alquinos catalizada por una especie de Au.

Posteriormente en 2009, Nolan y colaboradores describieron por primera vez el uso de un catalizador de Au(I) de tipo NHC en este tipo de reacciones, empleando para ello bajas cargas de catalizador en ausencia de aditivos ácidos.<sup>313</sup> En este trabajo, los autores emplearon partes por millón de  $IPrAuNTf_2$  como precatalizador, y  $AgSbF_6$  para generar la especie catalítica, en un medio formado por 1,4-dioxano y agua a 120 °C (Esquema 58). De esta manera fue posible obtener las cetonas deseadas con elevados rendimientos cuando se emplearon alquinos terminales, sin embargo, al ampliarse este estudio a alquinos internos asimétricos, la selectividad del proceso resultó muy pobre.

<sup>312</sup> E. Mizushima, K. Sato, T. Hayashi, M. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4563-4565.

<sup>313</sup> N. Marion, R. S. Ramón, S. P. Nolan, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 448-449.

## Bloque II. Parte II. Introducción



**Esquema 58.** Primera reacción de hidratación de alquinos empleando catalizadores de Au(I) de tipo NHC.

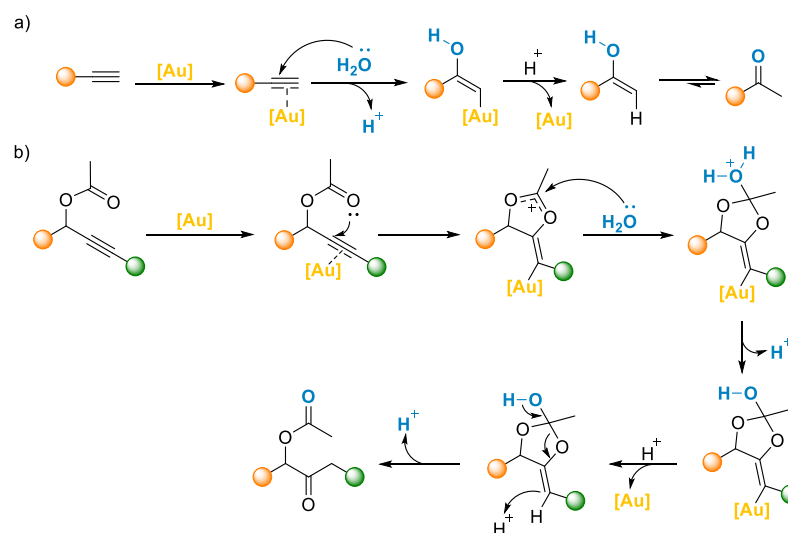
El empleo de catalizadores de Au(I) de tipo NHC, generalmente, permite el uso de menores cargas de catalizador debido al notable efecto donador que presentan estos ligandos, favoreciendo la etapa de protodesaturación, la cual está considerada como la etapa determinante de la velocidad en las reacciones de hidratación.<sup>314</sup> Además, la fortaleza del enlace NHC-Au, permite emplear temperaturas elevadas de reacción sin observarse la descomposición de estos catalizadores.

Las reacciones de hidratación de alquinos que contienen en su estructura un sustituyente de tipo carbonilo, son particularmente interesantes ya que este grupo funcional dirige la regioselectividad del proceso.<sup>315</sup> Así, la elevada selectividad observada en estos procesos de hidratación de alquinos catalizados por especies de Au(I), es debida a que su mecanismo de reacción difiere del mecanismo clásico (Esquema 59, a). Un ejemplo de ello es el trabajo propuesto por Sahoo y colaboradores, en el cual se empleó un catalizador de Au(I) para llevar a cabo la hidratación regioselectiva de ésteres propargílicos.<sup>316</sup> En esta aproximación, la presencia de un éster en la posición propargílica permitió, además de modular la regioselectividad del proceso, aumentar la velocidad de la misma debido a la formación de un intermedio cíclico de 5 miembros al producirse una ciclación 5-*exo* intramolecular entre el carbonilo del grupo éster y la función alquino activada por el catalizador de Au(I) (Esquema 59, b). Posteriormente, una molécula de agua realiza un ataque nucleófilo a la posición acetálica del ciclo, generando el compuesto carbonílico deseado después de un proceso de protodesaturación.

<sup>314</sup> C. H. Leung, M. Baron, A. Biffis, *Catalysts* **2020**, *10*, 1210.

<sup>315</sup> T. R. Pradhan, J. K. Park, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 4833-4860.

<sup>316</sup> N. Ghosh, S. Nayak, A. K. Sahoo, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 500-511.



**Esquema 59.** Mecanismos de reacción de hidratación favorecida por un catalizador de oro(I) empleando como sustrato de partida un alquino a) o un éster propargílico b).

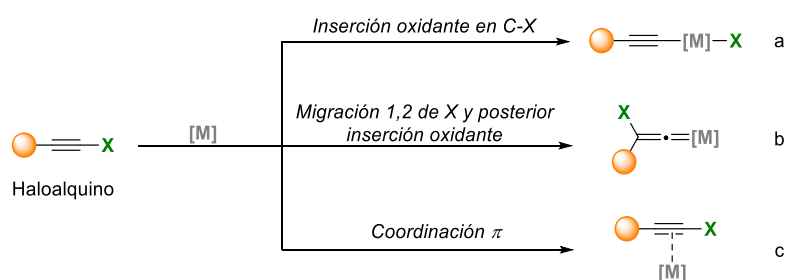
Como se observa en gran cantidad de ejemplos descritos en la bibliografía, la regioselectividad de las reacciones de hidrofuncionalización de alquinos catalizadas por especies de Au suele ser muy pobre cuando se emplean alquinos internos asimétricos como sustratos. Este efecto es especialmente acusado si en el alquino de partida no está presente ningún grupo funcional que por efecto electrónico o estérico pueda modular la regioselectividad del proceso.<sup>117</sup>

## II.6 Haloalquinos: Estructura y reactividad

Los haloalquinos son un tipo de alquinos especialmente activados y polarizados debido a la presencia de un átomo de halógeno en su estructura. La presencia del halógeno y la hibridación *sp* que presenta el triple enlace, hace que los haloalquinos sean sustratos muy versátiles en síntesis orgánica, especialmente cuando se combinan con distintos tipos de catalizadores metálicos. El motivo fundamental por el que ofrecen una gran versatilidad sintética se fundamenta en los distintos intermedios de reacción que pueden generar. Así, en presencia de catalizadores metálicos, pueden evolucionar mediante una inserción oxidante del metal en el enlace C–X (Esquema 60, a); mediante una migración 1,2 del haluro seguida de una inserción oxidante del metal, para generar intermedios de tipo

## Bloque II. Parte II. Introducción

vinilideno (Esquema 60, b); o finalmente, mediante la coordinación del catalizador metálico al sistema  $\pi$  del triple enlace (Esquema 60, c).



**Esquema 60.** Intermedios generados a partir de la activación de haloalquinos en presencia de catalizadores metálicos.

Las posibilidades sintéticas de los haloalquinos se han recogido en diversas revisiones bibliográficas,<sup>317</sup> pudiendo experimentar reacciones de acoplamiento cruzado, cicloadición, inserción C–H, o hidrofuncionalización, entre otras. De entre todas ellas, esta Tesis Doctoral se centrará en la reacción de hidratación de haloalquinos, la cual se describe en mayor profundidad a continuación.

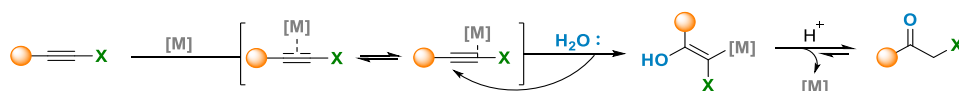
### II.6.1 Reacciones de hidratación de haloalquinos

La reacción de hidratación de haloalquinos es muy interesante desde el punto de vista sintético ya que transcurren con una elevada regioselectividad debido a la polarización que presentan estas moléculas (Esquema 61), permitiendo acceder fácilmente a un tipo de compuestos de gran interés como son las  $\alpha$ -halometil cetonas.<sup>318</sup> Esta aproximación es particularmente interesante ya que la síntesis de halometil cetonas mediante métodos clásicos de halogenación, y más concretamente en aquellas de tipo alifático, ofrece pobres regioselectividades y problemas de polihalogenación.<sup>319</sup>

<sup>317</sup> (a) W. Wu, H. Jiang, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2483-2504; (b) D. Petko, S. Koh, W. Tam, *Curr. Org. Synth.* **2019**, *16*, 546-582; (c) V. Cadierno, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, *2020*, 886-898.

<sup>318</sup> (a) A. W. Erian, S. M. Sherif, H. M. Gaber, *Molecules* **2003**, *8*, 793-865; (b) V. Fülöpová, M. Soral, *Synthesis* **2016**, *48*, 3684-3695.

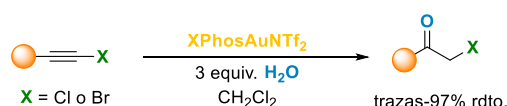
<sup>319</sup> R. R. Gallucci, R. Going, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2532-2538.



**Esquema 61.** Regioselectividad en la reacción de hidratación de haloalquinos catalizada por especies metálicas.

Al igual que en las reacciones de hidratación de alquinos, la adición de una molécula de agua a un haloalquino activado puede ser catalizada por ácidos de Brønsted,<sup>320</sup> en especial cuando se combinan junto con catalizadores de Ag,<sup>321</sup> Fe,<sup>322</sup> In,<sup>323</sup> Cu,<sup>324</sup> o Ce,<sup>325</sup> sin embargo, los catalizadores de oro han jugado un papel destacado a la hora de dar lugar a este tipo de reactividad.

En 2013, He y colaboradores describieron el primer ejemplo de una reacción de hidratación de haloalquinos catalizada por especies de Au(I).<sup>326</sup> En este trabajo los autores emplearon un catalizador de Au(I) de tipo fosfina (XPhosAuNTf<sub>2</sub>) como catalizador, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como disolvente y en presencia de 3 equivalentes de agua para producir la reacción de hidratación a temperatura ambiente. De esta manera fue posible obtener una amplia familia de α-halometil cetonas generalmente con elevados rendimientos aislados (Esquema 62).



**Esquema 62.** Reacción de hidratación de haloalquinos empleando XPhosAuNTf<sub>2</sub> como catalizador de oro(I).

A pesar de que He y colaboradores dieron generalidad a este tipo de hidrataciones de haloalquinos empleando catalizadores de Au(I),<sup>324</sup> un año antes y mientras estudiaban la reacción de halogenación de alquinos terminales, Sheppard y

<sup>320</sup> M. Ye, Y. Wen, H. Li, Q. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 4983-4986.

<sup>321</sup> Z.-W. Chen, D.-N. Ye, M. Ye, Z.-G. Zhou, S.-H. Li, L.-X. Liu, *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 1373-1375.

<sup>322</sup> J. Park, J. Yeon, P. H. Lee, K. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 4414-4417.

<sup>323</sup> (a) M. Zeng, R.-X. Huang, W.-Y. Li, X.-W. Liu, F.-L. He, Y.-Y. Zhang, F. Xiao, *Tetrahedron* **2016**, 72, 3818-3822; (b) K. Suta, M. Turks, *ACS Omega* **2018**, 3, 18065-18077.

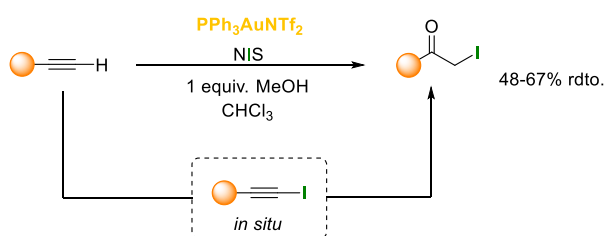
<sup>324</sup> H. Zou, W. He, Q. Dong, R. Wang, N. Yi, J. Jiang, D. Pen, W. He, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 116-121.

<sup>325</sup> H. Zou, J. Jiang, N. Yi, W. Fu, W. Deng, J. Xiang, *Chin. J. Chem.* **2016**, 34, 1251-1254.

<sup>326</sup> L. Xie, Y. Wu, W. Yi, L. Zhu, J. Xiang, W. He, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 9190-9195.

## Bloque II. Parte II. Introducción

colaboradores ya habían descrito por primera vez la hidratación de varios iodoalquinos utilizando especies de Au(I).<sup>327</sup> Así, al tratar distintos alquinos terminales con *N*-iodosuccinimida (NIS) en presencia del catalizador  $\text{PPh}_3\text{AuNTf}_2$  y 1 equivalente de MeOH, se obtuvieron las correspondientes  $\alpha$ -iodometil cetonas, mediante la reacción de hidratación del iodoalquino generado *in situ* en el medio de reacción (Esquema 63).



**Esquema 63.** Síntesis de  $\alpha$ -iodometil cetonas mediante la reacción de hidratación de iodoalquinos generados *in situ* en el medio de reacción.

Desde el descubrimiento de esta reactividad para obtener de manera sencilla  $\alpha$ -halometil cetonas empleando especies de Au(I) como catalizadores, se han propuesto un gran número de trabajos, los cuales se encuentran recogidos y discutidos en diversas revisiones bibliográficas.<sup>317</sup> A continuación, se prestará especial atención a la posibilidad de combinar estos procesos de hidratación de alquinos con biotransformaciones sobre las cetonas resultantes a través de procesos secuenciales o en cascada.

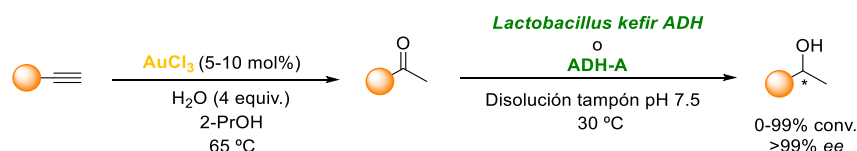
### II.7 Procesos concurrentes combinando reacciones de hidratación catalizadas por Au(I) y procesos enzimáticos

Como se ha mostrado en la sección previa, la reacción de hidratación de alquinos es una herramienta muy útil para la síntesis de compuestos carbonílicos, especialmente cuando se emplean especies de Au(I) como catalizadores, ya que estas transformaciones se pueden llevar a cabo bajo condiciones suaves de reacción y con una amplia tolerancia a la presencia de diversos grupos funcionales. Por estos motivos, la combinación *one-pot* de la reacción de hidratación de alquinos catalizada

<sup>327</sup> P. Starkov, F. Rota, J. M. D'Oyley, T. D. Sheppard, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 3217-3224.

por Au junto con una etapa biocatalítica resulta un área de investigación interesante, aunque ha sido escasamente descrita en la bibliografía.

En el año 2018, Mihovilovic y colaboradores describieron un proceso secuencial para la síntesis de varios derivados de 1-ariletanol en el que se combinaba la hidratación de alquinos con una segunda etapa de biorreducción empleando ADHs.<sup>328</sup> Así, se usó AuCl<sub>3</sub> como catalizador, 2-PrOH como disolvente y 4 equiv. de H<sub>2</sub>O para llevar a cabo la reacción de hidratación de distintos alquinos terminales a 65 °C, obteniendo los correspondientes derivados de acetofenona con conversiones entre moderadas y excelentes (49-99%). Con el fin de encontrar reacciones compatibles para un posterior correcto funcionamiento de la enzima, tras finalizar esa primera etapa se añadió al medio de reacción una disolución tampón a pH 7.5, el cofactor pirimidínico correspondiente, y la ADH de *Lactobacillus kefir* o de *Rhodococcus ruber* (Esquema 64), las cuales permitieron acceder de manera independiente a ambos enantiómeros de una serie de 10 alcoholes.



**Esquema 64.** Proceso secuencial combinando una reacción de hidratación de alquinos mediada por AuCl<sub>3</sub> y una etapa de biorreducción catalizada por una ADH.

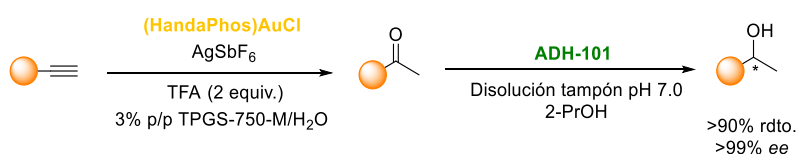
Lipshutz y colaboradores describieron un proceso secuencial de hidratación de alquinos empleando un catalizador de Au(I) y una ADH con el fin de obtener diferentes alcoholes ópticamente activos.<sup>329</sup> Destacó en este caso el uso de un agente surfactante derivado del tocoferol, el TPGS-750-M, con el fin de generar micelas en el medio de reacción que constituyeran nanoreactores para llevar a cabo la catálisis metálica en medio acuoso sin necesidad de añadir ningún cosolvente orgánico. Para la reacción de hidratación de alquinos se usaron únicamente partes por millón de (HandaPhos)AuCl y AgSbF<sub>6</sub>, además del agente surfactante y dos equivalentes de ácido trifluoroacético. Una vez finalizada la reacción de hidratación se añadió la cetorreductasa comercial ADH-101, una disolución tampón a pH 7.0, 2-PrOH y

<sup>328</sup> P. Schaaf, V. Gojic, T. Bayer, F. Rudroff, M. Schnürch, M. D. Mihovilovic, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 920-924.

<sup>329</sup> M. Cortes-Clerget, N. Akporji, J. Zhou, F. Gao, P. Guo, M. Parmentier, F. Gallou, J.-Y. Berthon, B. H. Lipshutz, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2169.

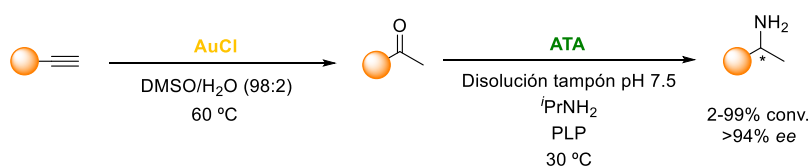
## Bloque II. Parte II. Introducción

NADH, obteniendo tres alcoholes enantiopuros con rendimientos superiores al 90% (Esquema 65).



**Esquema 65.** Proceso secuencial combinando un catalizador de Au(I) y una ADH en presencia de un agente surfactante para la síntesis de alcoholes ópticamente activos.

Recientemente, Rueping y colaboradores han descrito un proceso secuencial combinando la utilización de una especie de Au(I) para catalizar la hidratación de varios alquinos, seguida de una etapa de biotransaminación empleando ATAs.<sup>330</sup> En este caso, el AuCl fue elegido como catalizador en un medio predominantemente orgánico (98% DMSO) a 60 °C. Una vez finalizada la reacción de hidratación, se rebajó la temperatura a 30 °C y se añadió al medio la correspondiente transaminasa, isopropilamina, PLP y una disolución tampón a pH 7.5. Gracias a esta estrategia fue posible transformar seis alquinos terminales en las correspondientes aminas ópticamente activas con conversiones comprendidas entre el 2 y 99%, y elevados excesos enantioméricos (Esquema 66).



**Esquema 66.** Proceso secuencial para la síntesis de aminas ópticamente activas combinando AuCl y transaminasas.

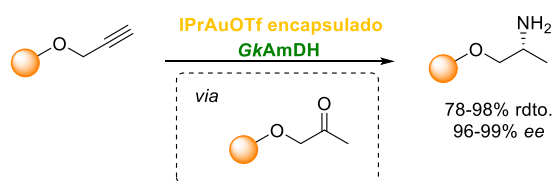
Liu y colaboradores han descrito un proceso en cascada combinando un catalizador de Au(I) encapsulado y una amino deshidrogenasa de *Geobacillus kaustophilus* (GkAmDH) con el fin de sintetizar aminas ópticamente activas a partir de éteres propargílicos.<sup>331</sup> Para evitar la inactivación mutua entre el catalizador de Au(I) y la enzima empleada, los autores encapsularon el catalizador IPrAuOTf dentro de una cavidad de nanopartículas de sílica mesoporosa. De esta manera, fue

<sup>330</sup> S. Mathew, A. Sagadevan, D. Renn, M. Rueping, *ACS Catal.* **2021**, *11*, 12565-12569.

<sup>331</sup> F. Chang, C. Wang, Q. Chen, Y. Zhang, G. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202114809.

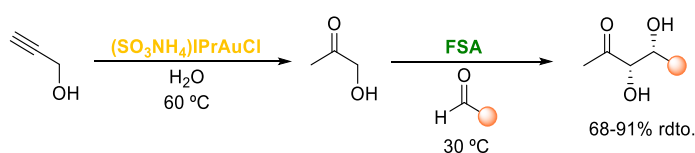


posible combinar una reacción de hidratación de alquinos y una bioaminación, sintetizando los enantiómeros *R* de distintas aminas con elevados rendimientos y excesos enantioméricos (Esquema 67).



**Esquema 67.** Síntesis estereoselectiva de aminas mediante un proceso en cascada concurrente combinando un catalizador de Au(I) encapsulado y una AmDH.

Muy recientemente, Guérard-Hélaine y colaboradores describieron una aproximación secuencial basada en la combinación de un catalizador de Au(I) de tipo NHC y una aldolasa.<sup>332</sup> En esta contribución se ha descrito la reacción de hidratación del prop-2-in-1-ol para formar la 1-hidroxiopropan-2-ona a 60 °C, para a continuación desarrollar la reacción de condensación aldólica entre la aciloína generada y diferentes aldehídos catalizada por la fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA). Tras una extensa optimización de las condiciones de reacción, se obtuvieron una serie de monosacáridos con buenos rendimientos aislados (Esquema 68).



**Esquema 68.** Aproximación secuencial combinando la hidratación del prop-2-in-1-ol catalizada por Au(I) y una reacción aldólica enzimática.

Como se ha mostrado a lo largo de esta introducción, recientemente varios grupos de investigación se han centrado en el estudio de la combinación *one-pot* de reacciones catalizadas por especies de Au(I) y distintas reacciones enzimáticas. Sin embargo, todas ellas se han llevado a cabo de manera secuencial o empleando estrategias de compartimentalización para evitar posibles inactivaciones e

<sup>332</sup> C. Gastaldi, G. Mekhloufi, C. Forano, A. Gautier, C. Guérard-Hélaine, *Green Chem.* **2022**, *24*, 3634-3639.

*Bloque II. Parte II. Introducción*

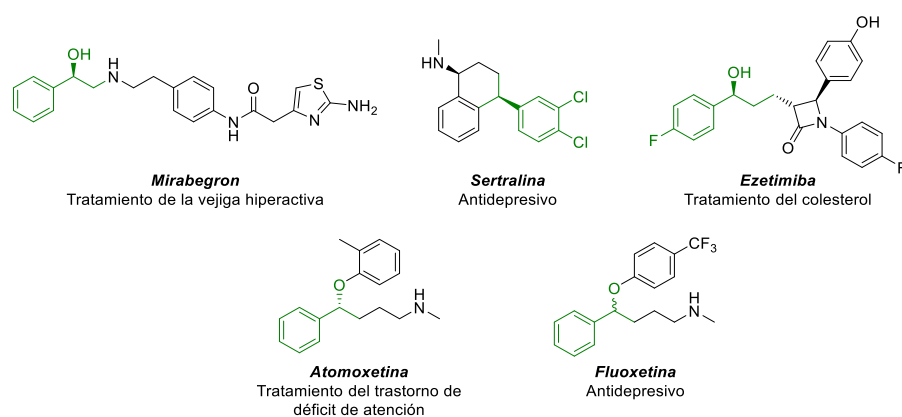
incompatibilidades entre las especies catalíticas involucradas en la cascada quimioenzimática.

*Antecedentes*



### II.8. Síntesis de halohidrinas ópticamente activas

Las halohidrinas, especialmente las que se encuentran en forma ópticamente activa, son consideradas compuestos de gran interés debido a su empleo como precursores en la síntesis de un gran número de compuestos biológicamente activos.<sup>333</sup> En este aspecto, son precursoras de fármacos tales como el *Mirabegron*, la *Sertralina*, la *Ezetimiba*, la *Atomoxetina* o la *Fluoxetina*, entre otros (Figura 15).



**Figura 15.** Estructura de fármacos en los que han sido empleadas halohidrinas (enantiopuras) como productos de partida.

<sup>333</sup> F. Xue, C. Li, Q. Xu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 3411-3421.

## Bloque II. Parte II. Antecedentes

Mientras que la preparación de halohidrinas en su forma racémica ha sido extensamente estudiada, pudiendo realizarse empleando distintas metodologías como reacciones de adición de un reactivo halogenado (XCH<sub>2</sub>X) sobre aldehídos,<sup>334</sup> apertura de epóxidos,<sup>335</sup> o hidrohalogenación de alquenos,<sup>336</sup> la síntesis estereoselectiva de halohidrinas no es trivial. Algunas de estas aproximaciones se fundamentan en la resolución cinética de epóxidos empleando catalizadores de Co y ligandos quirales<sup>337</sup> o de las propias halohidrinas racémicas usando lipasas,<sup>338</sup> en la transformación de precursores enantiopuros comerciales,<sup>339</sup> en reacciones de hidroxilación asimétrica utilizando citocromos P450,<sup>340</sup> o mediante el empleo de aldolasas.<sup>341</sup> Sin embargo, la estrategia más extendida para lograr la síntesis estereoselectiva de este tipo de compuestos se centra en la biorreducción de  $\alpha$ -halometil cetonas usando ADHs como catalizadores bajo condiciones suaves de reacción. Además, este proceso se encuentra termodinámicamente favorecido al existir una interacción por enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y el halógeno presentes en la halohidrina (Esquema 69), por lo que, generalmente, solo es necesario

<sup>334</sup> (a) C. Einhorn, C. Allavena, J.-L. Luche, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 333-334; (b) M. Lautens, M. L. Maddess, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1883-1886; (c) R. H. V. Nishimura, F. T. Toledo, J. L. C. Lopes, G. C. Clososki, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 287-290; (d) T. von Keutz, D. Cantillo, C. O. Kappe, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 7537-7541.

<sup>335</sup> (a) G. Sabitha, R. S. Babu, M. Rajkumar, C. S. Reddy, J. S. Yadav, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3955-3958; (b) Y. Nakamura, T. Matsumoto, F. Nomoto, M. Ueda, H. Fukuda, A. Kondo, *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22*, 998-1002; (c) V. S. C. de Andrade, M. C. S. de Mattos, *Synthesis* **2016**, *48*, 1381-1388; (d) Y. Toda, K. Tanaka, R. Matsuda, T. Sakamoto, S. Katsumi, M. Shimizu, F. Ito, H. Suga, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 3591-3594.

<sup>336</sup> (a) B. Damin, J. Garapon, B. Sillion, *Synthesis* **1981**, 362-363; (b) G. F. Mendonça, A. M. Sansverino, M. C. S. de Mattos, *Synthesis* **2003**, 45-48.

<sup>337</sup> (a) J. M. Ready, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2687-2688; (b) S. S. Thakur, W.-J. Li, C.-K. Shin, G.-J. Kim, *Chirality* **2006**, *18*, 37-43; (c) S. S. Thakur, S.-W. Chen, W. Li, C.-K. Shin, S.-J. Kim, Y.-M. Koo, G.-J. Kim, *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691*, 1862-1872; (d) D. E. White, P. M. Tadross, Z. Lu, E. N. Jacobsen, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 4165-4180.

<sup>338</sup> (a) D. Rotticci, C. Orrenius, K. Hult, T. Norin, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 359-362; (b) T. Ema, N. Ura, M. Yoshii, T. Korenaga, T. Sakai, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9583-9591; (c) I. M. Ferreira, R. H. V. Nishimura, A. B. A. Souza, G. C. Clososki, S. A. Yoshioka, A. L. M. Porto, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5062-5065.

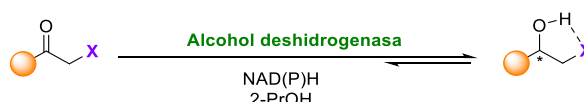
<sup>339</sup> (a) M. Murakami, T. Aoki, W. Nagata, *Synlett* **1990**, 684-686; (b) Y. Nakayama, G. B. Kumar, Y. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 707-715; (c) E. Greiner et al. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1766-1772.

<sup>340</sup> H.-B. Cui, L.-Z. Xie, N.-W. Wan, Q. He, Z. Li, Y.-Z. Chen, *Green Chem.* **2019**, *21*, 4324-4328.

<sup>341</sup> (a) W. A. Greenberg, A. Varvak, S. R. Hanson, K. Wong, H. Huang, P. Chen, M. J. Burk, *Proc. Natl. Acad. USA* **2004**, *101*, 5788-5793; (b) S. Jennewein, M. Schürmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 537-548; (c) X.-C. Jiao, J. Pan, G.-C. Xu, X.-D. Kong, Q. Chen, Z.-J. Zhang, J.-H. Xu, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 4048-4054; (d) K. Xuan, G. Yang, Z. Wu, Y. Xu, R. Zhang, *Process Biochem.* **2020**, *92*, 113-119.

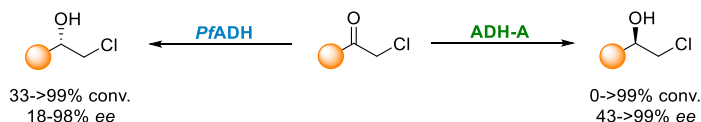
## Bloque II. Parte II. Antecedentes

el empleo de un ligero exceso del donador de hidrógeno requerido en el proceso de biorreducción (por ejemplo 2-PrOH).<sup>342</sup>



**Esquema 69.** Interacción intramolecular entre el grupo hidroxilo y el halógeno presentes en la halohidrina que las estabiliza favoreciendo los procesos de reducción.

A continuación, se destacan algunos ejemplos dentro de este campo. En el año 2005, Kroutil y colaboradores describieron la biorreducción de distintas  $\alpha$ -clorometil cetonas, tanto de naturaleza aromática como alifática, obteniendo generalmente buenas conversiones y excesos enantioméricos de las clorohidrinan correspondientes mediante el uso de ADHs estereocomplementarias como la de *Pseudomonas fluorescens* (PfADH) y la ADH-A (Esquema 70).<sup>343</sup>



**Esquema 70.** Biorreducción de  $\alpha$ -clorometil cetonas empleando la PfADH y la ADH-A.

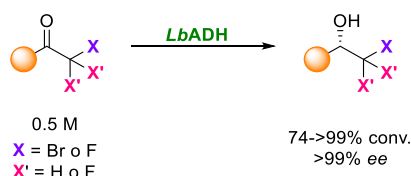
Nuestro grupo de investigación describió, en el año 2013, la síntesis de distintas  $\alpha$ -fluoro y  $\alpha$ -bromohidrinan empleando la ADH-A y la LbADH a elevadas concentraciones de sustrato (hasta 500 mM).<sup>344</sup> Destacó, por ejemplo, el hecho de que la LbADH permitió acceder a una familia de doce halohidrinan enantiopuras con elevadas conversiones (74-100%), a una concentración de sustrato de hasta 500 mM manteniendo la concentración del cofactor a 1 mM (Esquema 71).

<sup>342</sup> (a) F. R. Bisogno, I. Lavandera, W. Kroutil, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1730-1732; (b) F. R. Bisogno, E. García-Urdiales, H. Valdés, I. Lavandera, W. Kroutil, D. Suárez, V. Gotor, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11012-11019.

<sup>343</sup> T. M. Poessl, B. Kosjek, U. Ellmer, C. C. Gruber, K. Edegger, K. Faber, P. Hildebrandt, U. T. Bornscheuer, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1827-1834.

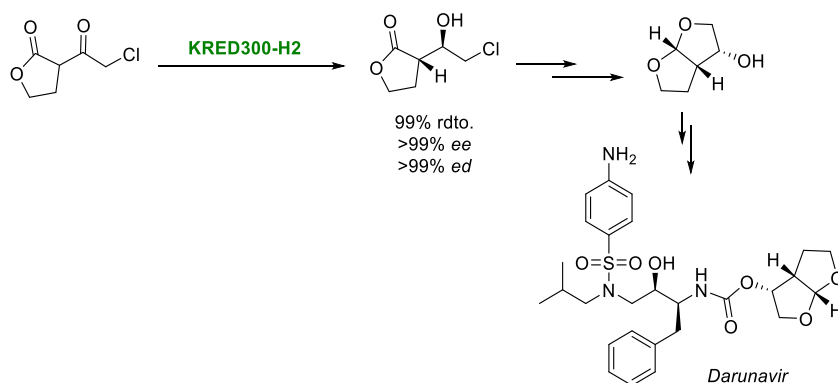
<sup>344</sup> W. Borzęcka, I. Lavandera, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7312-7317.

## Bloque II. Parte II. Antecedentes



**Esquema 71.** Biorreducción de  $\alpha$ -fluoro- y  $\alpha$ -bromometil cetonas a elevadas concentraciones de sustrato.

Más recientemente, Hyster y colaboradores describieron la resolución cinética dinámica de una  $\alpha$ -clorometil cetona precursora del fármaco anti-VIH Darunavir, mediante la acción de una ADH comercializada por la empresa Prozomix.<sup>345</sup> La KRED300-H2 permitió llevar a cabo la resolución cinética dinámica de una lactona conteniendo una cetona  $\alpha$ -clorada, obteniendo la clorohidrina correspondiente con excelentes rendimientos y selectividades, la cual se transformó a través de varios pasos de reacción en un bicyclo fusionado que se encuentra presente en la estructura del fármaco *Darunavir* (Esquema 72).



**Esquema 72.** DKR a través de un proceso de biorreducción catalizada por una ADH para obtener una clorohidrina clave en la síntesis del *Darunavir*.

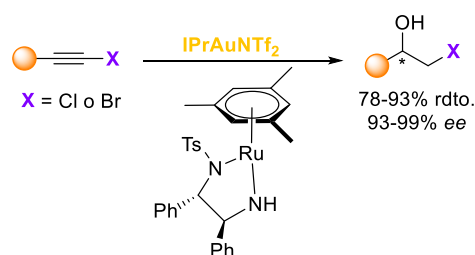
Como se ha mostrado a lo largo de estos Antecedentes, la gran mayoría de aproximaciones sintéticas para obtener halohidrinas se fundamentan en la biorreducción de las correspondientes  $\alpha$ -halometil cetonas, las cuales suelen plantear problemas en su síntesis y aislamiento. Para solventar este problema, Liu y

<sup>345</sup> P. S. Riehl, J. Lim, J. D. Finnigan, S. J. Charnock, T. K. Hyster, *Org. Process Res Dev.* **2022**, *26*, 2096-2101.



## Bloque II. Parte II. Antecedentes

colaboradores describieron un proceso en cascada consistente en la hidratación de haloalquinos empleando un catalizador de NHC-Au(I) [IPrAuNTf<sub>2</sub>], y la inmediata reacción de hidrogenación asimétrica de las halometilcetonas usando un catalizador de rutenio quiral (Esquema 73).<sup>346</sup> Más recientemente, los mismos autores describieron una aproximación similar inmovilizando los catalizadores utilizados en sílica mesoporosa, permitiendo así su reciclaje y reutilización, observando resultados similares a los obtenidos cuando los catalizadores se encontraban en fase homogénea.<sup>347</sup>



**Esquema 73.** Proceso en cascada para la síntesis de halohidrinas ópticamente activas mediante la combinación de catalizadores de Au(I) y de Ru(II) a través de procesos de hidratación e hidrogenación asimétrica, respectivamente.

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos expuestos sobre la síntesis de halohidrinas ópticamente activas, se ha propuesto en el Capítulo 4:

- Estudiar y optimizar la reacción de hidratación de haloalquinos empleando catalizadores de Au(I) en medio acuoso, de manera que sea posible diseñar un proceso sintético sencillo para la obtención de  $\alpha$ -halometil cetonas.
- Encontrar ADHs adecuadas para la biorreducción de las  $\alpha$ -halometil cetonas generadas en las condiciones de reacción optimizadas para el paso metálico de hidratación de los haloalquinos.

<sup>346</sup> Q. Ye, T. Cheng, Y. Zhao, J. Zhao, R. Jin, G. Liu, *ChemCatChem* **2015**, 7, 1801-1805.

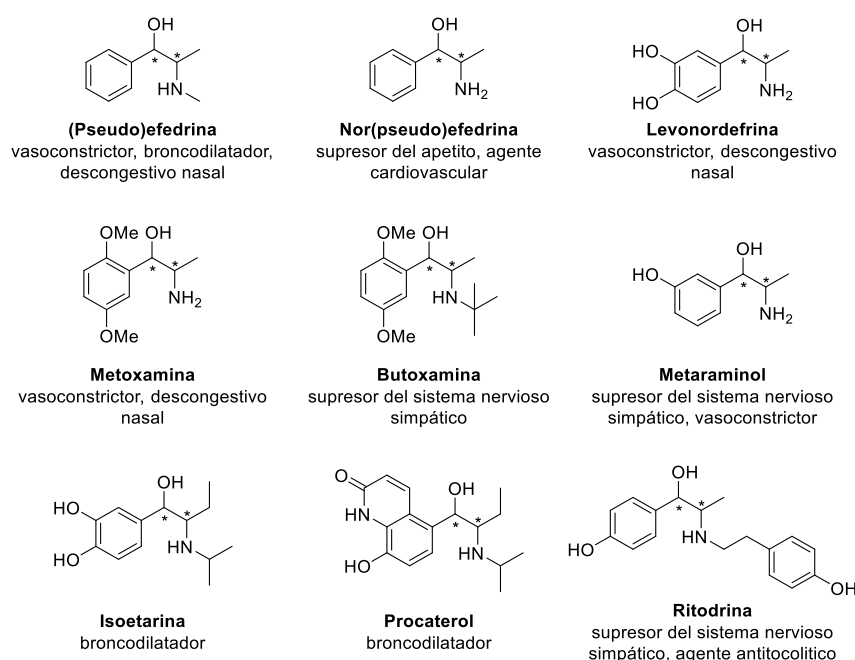
<sup>347</sup> X. Xia, J. Meng, H. Wu, T. Cheng, G. Liu, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 1638-1641.

## Bloque II. Parte II. Antecedentes

- Analizar la compatibilidad de ambos catalizadores, y diseñar una metodología concurrente para sintetizar halohidrinas ópticamente activas a partir de los correspondientes haloalquinos.

### II.9. Efedrinas y derivados

Las efedrinas son un tipo de fenilpropanolaminas pertenecientes a la familia de los alcaloides de tipo anfetamina. Este tipo de compuestos presentan una estructura de tipo 1,2-aminoalcohol que se encuentra presente en un gran número de productos naturales y fármacos como antibióticos, hormonas, o inhibidores enzimáticos (Figura 16).<sup>348</sup> Es por ello por lo que, debido a su importancia farmacológica, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha incluido en la lista de las medicinas esenciales para la vida humana.<sup>349</sup>

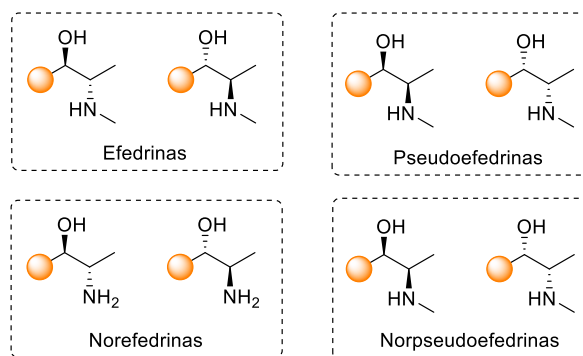


**Figura 16.** Ejemplos de fármacos y productos naturales en los cuales se encuentra la estructura de 1,2-aminoalcohol presente en las fenilpropanolaminas.

<sup>348</sup> (a) M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824; (b) T. Sehl, Z. Mauger, D. Rother, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *114*, 65-71.

<sup>349</sup> E. Cigan, B. Eggbauer, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *RSC Adv.* **2021**, *11*, 28223-28270.

Dentro de este tipo de fenilpropanolaminas se puede diferenciar entre los 1,2-aminoalcoholes de tipo efedrina, si la función amina de la molécula se encuentra monometilada, o los de tipo norefedrina, donde el grupo amino se encuentra libre. Además, en el caso de que se trate de los diastereoisómeros *syn*, se les conoce como pseudoefedrinas o norpseudoefedrinas, respectivamente (Figura 17). Además de por sus notables propiedades biológicas, este tipo de aminoalcoholes, al igual que los derivados de tipo diol o diamina, también han sido frecuentemente empleados como ligandos o auxiliares quirales en muy diversas reacciones químicas.<sup>350</sup>



**Figura 17.** Estructura de compuestos de tipo efedrina, pseudoefedrina, norefedrina y norpseudoefedrina.

## II.10 Síntesis de efedrinas y derivados

De manera natural, las fenilpropanolaminas pueden ser aisladas como una mezcla de diastereoisómeros de las hojas de las plantas de *Celastraceae* y *Ephedraceae*.<sup>351</sup> Sin embargo, la síntesis química de este tipo de compuestos generalmente requiere del empleo de reactivos en cantidades supraestequiométricas, ofreciendo una mala relación entre rendimiento y selectividad, ya que reacciones con elevado rendimiento ofrecen pobres selectividades, y viceversa.<sup>348b,352</sup> Es por ello, que el empleo de rutas biocatalíticas ha sido clave en la síntesis de un gran número

<sup>350</sup> (a) D. J. Ager, I. Prakash, D. R. Schaad, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 835-875; (b) A. Cruz, I. I. Padilla-Martínez, M. E. Bautista-Ramírez, *Curr. Org. Synth.* **2018**, *15*, 38-83.

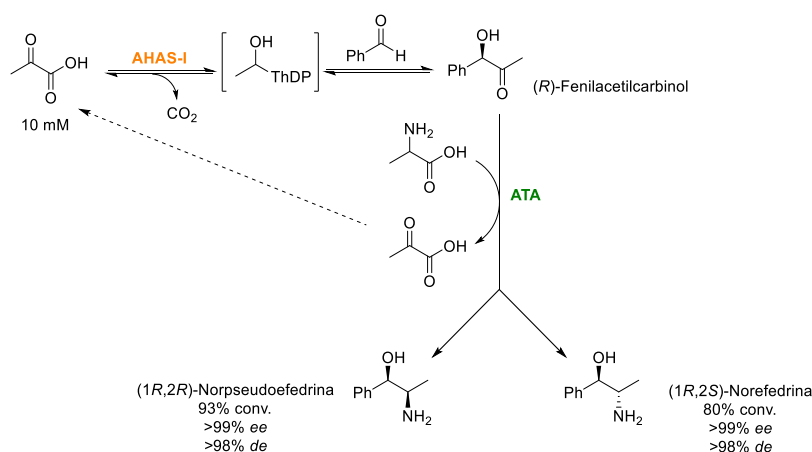
<sup>351</sup> (a) G. Grue-Soerensen, I. D. Spenser, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6195-6200; (b) R. Krizevski, N. Dudai, E. Bar, E. Lewinsohn, *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *114*, 432-438.

<sup>352</sup> (a) J. A. Groeper, S. R. Hitchcock, G. M. Ferrence, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2884-2889; (b) T. J. Donohoe, C. K. A. Callens, A. Flores, A. R. Lacy, A. H. Rathi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 58-76; (c) O. K. Karjalainen, A. M. P. Koskinen, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4311-4326.

## Bloque II. Parte II. Antecedentes

de alcaloides,<sup>349,353</sup> entre los que se encuentran las fenilpropanolaminas y sus derivados, especialmente de tipo diol, como se detalla a continuación.

En 2013, Rother y colaboradores describieron la síntesis estereoselectiva de norefedrinas mediante una aproximación secuencial centrada en el uso de una sintasa y una transaminasas.<sup>354</sup> En esta contribución se describió la transformación del ácido pirúvico en (*R*)-fenilacetilcarbinol mediante la utilización de una sintasa dependiente de difosfato de tiamina (ThDP) como cofactor, la cual catalizó su descarboxilación y posterior reacción aldólica con el benzaldehído. Posteriormente, para la etapa de biotransaminación, los autores emplearon alanina como donador del grupo amino, ya que de esta manera el ácido pirúvico generado como subproducto era reciclado directamente, al ser empleado como sustrato de partida en el proceso secuencial. Mediante esta aproximación secuencial se logró obtener la (*1R,2S*)-norefedrina y la (*1R,2R*)-norpseudoefedrina con conversiones del 80% y 93% respectivamente, en ambos casos de manera enantio- y diastereopura (Esquema 74). En una aproximación similar, el mismo grupo de investigación describió la síntesis de los correspondientes dioles derivados de norefedrina usando en este caso una ADH en lugar de una ATA.<sup>355</sup>



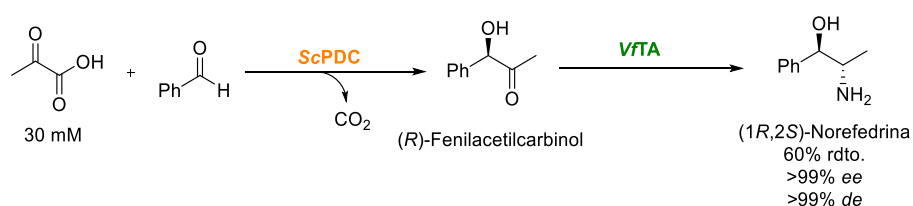
<sup>353</sup> R. Roddan, E. M. Carter, B. Thair, H. C. Hailes, *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39*, 1375-1382.

<sup>354</sup> T. Sehl, H. C. Hailes, J. M. Ward, R. Wardenga, E. von Lieres, H. Offermann, R. Westphal, M. Pohl, D. Rother, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6772-6775.

<sup>355</sup> J. Wachtmeister, A. Jakoblinert, D. Rother, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 1744-1753.

**Esquema 74.** Proceso secuencial para la síntesis de derivados de nor(pseudo)efedrina empleando una sintasa y una transaminasa.

De manera parecida y relacionada con la síntesis de las norefedrina, Chen y colaboradores describieron una aproximación secuencial basada en el empleo de una descarboxilasa y una transaminasa para obtener la (1*R*,2*S*)-norefedrina.<sup>356</sup> En una primera etapa del proceso se llevó a cabo la reacción de descarboxilación del ácido pirúvico y la formación del (*R*)-fenilacetilcarbinol mediante el uso de la piruvato descarboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ScPDC), y en la segunda etapa del proceso, la transaminasa de *Vibrio fluvialis* (VfTA) catalizó la reacción estereoselectiva de biotransaminación. Mediante esta aproximación secuencial fue posible obtener la (1*R*,2*S*)-norefedrina con un rendimiento del 60% y total enantio- y diastereoselectividad (Esquema 75).



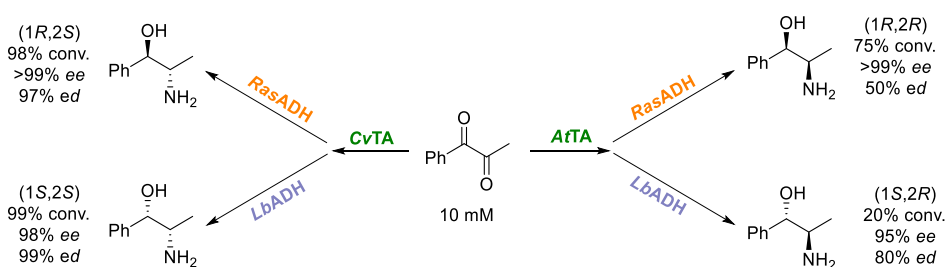
**Esquema 75.** Síntesis de la (1*R*,2*S*)-norefedrina combinando de manera secuencial una descarboxilasa y una transaminasa.

En 2014, Rother y colaboradores describieron la síntesis estereoselectiva de la nor(pseudo)efedrina combinando el uso secuencial de una ADH y una transaminasa.<sup>357</sup> De esta manera, la 1-fenilpropano-1,2-diona se transformó por una ATA (*S*)-selectiva, la TA de *Chromobacterium violaceum* (CvTA), o una (*R*)-selectiva proveniente de *Aspergillus terreus* (AtTA) en la correspondiente  $\alpha$ -amino cetona intermedia. Su posterior biorreducción empleando la RasADH o la LbADH, condujo a los isómeros de la nor(pseudo)efedrina con conversiones de moderadas a elevadas y selectividades de bajas a excelentes (Esquema 76).

<sup>356</sup> X. Wu, M. Fei, W. Chen, Z. Wang, Y. Chen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 7399-7408.

<sup>357</sup> T. Sehl, H. C. Hailes, J. M. Ward, U. Menyes, M. Pohl, D. Rother, *Green Chem.* **2014**, *16*, 3341-3348.

## Bloque II. Parte II. Antecedentes



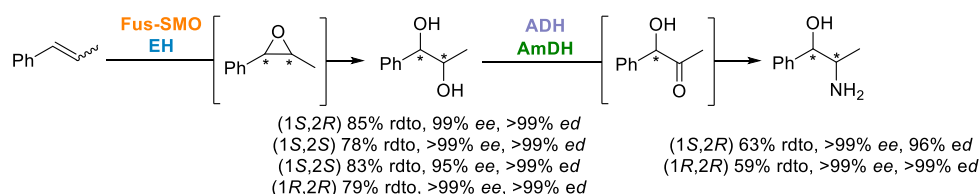
**Esquema 76.** Síntesis estereoselectiva de nor(pseudo)efedrinas mediante la combinación secuencial de transaminasas y alcohol deshidrogenasas.

Más recientemente, el grupo de investigación de Mutti ha descrito la transformación secuencial del  $\beta$ -metilestireno en norefedrina y sus derivados de tipo diol.<sup>358</sup> Esta aproximación se basa en el empleo de una estireno monooxigenasa fusionada con una epóxido hidrolasa (Fus-SMO + EH) para transformar el  $\beta$ -metilestireno en el correspondiente epóxido, el cual experimentó un ataque nucleófilo de una molécula de agua catalizada por la EH presente en la fusión enzimática. Así, fue posible obtener los cuatro enantiómeros posibles del diol deseado con elevados rendimientos y selectividades dependiendo de las enzimas expresadas (Esquema 77). La posterior adición de una ADH y una AmDH, permitió la oxidación del grupo hidroxilo no bencílico, generando el fenilacetilcarbinol, que tras su aminación dio lugar a la nor(pseudo)efedrina. En estos dos últimos pasos de la reacción, el cofactor pirimidínico requerido por ambos biocatalizadores se recicló internamente gracias a la acción conjunta de las dos enzimas. De esta manera fue posible obtener el isómero (1S,2R) de la norefedrina con un rendimiento global del 63%, y el isómero (1R,2R) con un 59%, en ambos casos con purezas ópticas elevadas. El mismo grupo de investigación describió en el año 2021 la síntesis de todos los isómeros de este tipo de fenilpropanolaminas mediante un proceso secuencial similar, obteniendo los aminoalcoholes deseados con rendimientos moderados (53-71%) y elevadas selectividades.<sup>359</sup>

<sup>358</sup> M. L. Corrado, T. Knaus, F. G. Mutti, *Green Chem.* **2019**, *21*, 6246-6251.

<sup>359</sup> M. L. Corrado, T. Knaus, F. G. Mutti, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 2345-2350.

## Bloque II. Parte II. Antecedentes



**Esquema 77.** Aproximación secuencial para la síntesis estereoselectiva de norefedrinas y derivados de tipo diol, mediante el empleo de una estireno monooxigenasa, una epóxido hidrolasa, una alcohol deshidrogenasa y una amino deshidrogenasa.

A pesar de que existen varias aproximaciones biocatalíticas para la síntesis estereoselectiva de efedrinas y derivados, la gran mayoría de ellas son procesos secuenciales en los que se emplean bajas concentraciones del sustrato de partida, y muchas veces, los productos obtenidos no son aislados. Por ello, y basados en la experiencia de nuestro grupo de investigación en la combinación de especies de Au(I) y enzimas utilizadas en los Capítulos 2 y 3 de esta Tesis Doctoral, los objetivos que nos proponemos en el Capítulo 5 son:

- La optimización y el diseño de la reacción de hidratación de ésteres propargílicos terminales empleando catalizadores de Au(I) en un medio acuoso.
- El estudio de las reacciones de biorreducción y biotransaminación, usando ADHs y ATAs, respectivamente, del cetoéster generado mediante la catálisis de Au(I).
- El diseño de un proceso en cascada que permita sintetizar norefedrinas y derivados de tipo 1,2-diols a partir de los ésteres propargílicos terminales, mediante la combinación de catalizadores de Au(I) y enzimas.
- Extender este proceso a una amida propargílica, estudiando inicialmente la reacción de hidratación utilizando catalizadores de Au(I) en un medio acuoso.
- El estudio de las reacciones de biorreducción y biotransaminación de la cetoamida generada y el diseño de un proceso en cascada que permita

*Bloque II. Parte II. Antecedentes*

obtener 1,2-aminoalcoholes complementarios a los obtenidos anteriormente, así como 1,2-diaminas.



## **Capítulo 4**

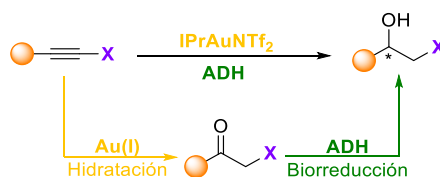
*Síntesis de halohidrinas ópticamente  
activas a partir de haloalquinos  
mediante un proceso en cascada de  
hidratación y biorreducción*



## *Resultados y discusión*



En esta sección se describe el diseño de un proceso en cascada para la síntesis de distintas halohidrininas de manera ópticamente activa a partir de haloalquinos, gracias a la acción de un catalizador NHC de Au(I) en medio acuoso con el que se ha llevado a cabo la hidratación de dichos sustratos. Así, las  $\alpha$ -halometil cetonas generadas se han reducido de manera estereoselectiva empleando ADHs.<sup>360</sup> El uso de enzimas estereocomplementarias permitió obtener ambos enantiómeros de estos compuestos de interés con elevados rendimientos aislados (Esquema 78).



**Esquema 78.** Síntesis de halohidrininas ópticamente activas mediante un proceso en cascada combinando especies de Au(I) y ADHs.

Esta Tesis Doctoral se presenta como un compendio de publicaciones, por lo que la numeración de los compuestos, así como la de los esquemas, figuras y tablas, se refieren al trabajo en el que se ha descrito esta investigación, y que se muestra al final de esta sección.

<sup>360</sup> S. González-Granda, L. Escot, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 2552-2560.

## Capítulo 4. Resultados y discusión

### 4.1 Estudio y optimización de la reacción de hidratación de haloalquinos catalizada por especies de Au(I)

En primer lugar, se realizó un estudio de la reacción de hidratación del cloroetilbenceno (**1a**) como haloalquino modelo, utilizando distintos catalizadores de Au(I), con ligandos tanto de tipo fosfina, como fosfito o NHC (Tablas 1 y S2). Inicialmente se usó MeCN como cosolvente de reacción, y 2 equivalentes de 2-PrOH, el cual, a su vez, permitirá regenerar el cofactor pirimidínico en la etapa de biorreducción que se pretende desarrollar en cascada. Los mejores resultados en este estudio preliminar se obtuvieron al usar tanto IPrAuNTf<sub>2</sub> como BrettPhosAuNTf<sub>2</sub>, obteniendo la  $\alpha$ -clorometil cetona **2a** con conversiones mayores al 82% (Tabla S2), eligiendo para posteriores estudios el IPrAuNTf<sub>2</sub> debido a su precio más económico.

Una vez identificado el mejor catalizador de Au(I) para promover esta transformación se realizó un estudio del cosolvente de la reacción (Tablas 1 y S3). El empleo de éteres cíclicos como el THF o el 2-Me-THF condujeron a rendimientos aislados elevados de la cetona **2a**, seleccionando el 2-Me-THF como cosolvente de la reacción debido a que está considerado como un disolvente más sostenible al provenir de fuentes naturales y resultar menos peligroso que el THF. Es necesario destacar que durante el estudio de la reacción de hidratación del cloroalquino modelo **1a** se observó la formación de dos subproductos, uno de ellos, un éter de vinilo, cuya formación se explica a través del ataque nucleófilo de una molécula de 2-PrOH al cloroalquino **1a** activado por el catalizador de Au(I),<sup>361</sup> y el producto de dimerización del propio cloroalquino **1a**.

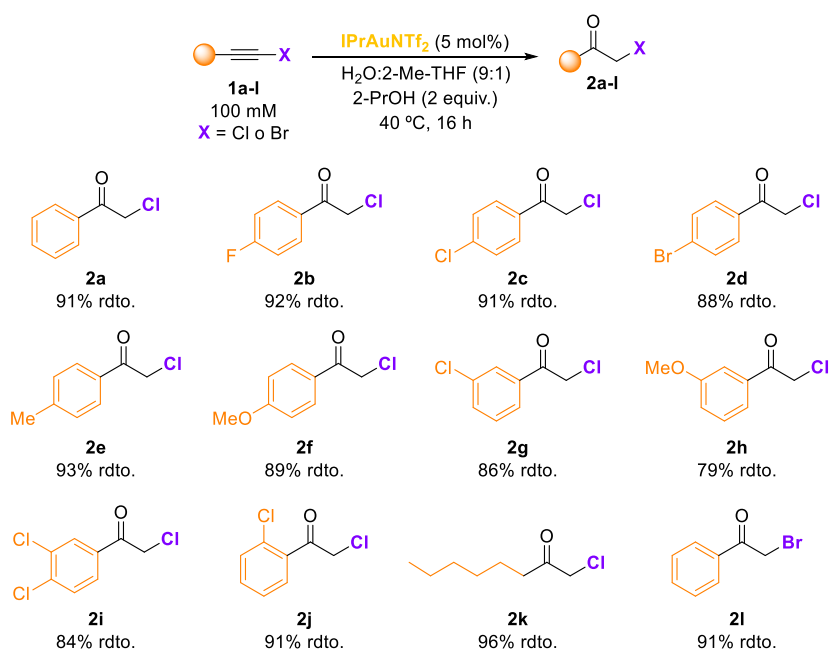
Posteriormente, se optimizaron las condiciones de la reacción de hidratación del compuesto **1a** tratando de minimizar la formación de los subproductos observados. Los mejores resultados se obtuvieron al emplear un 5 mol% de IPrAuNTf<sub>2</sub> como catalizador, 2-Me-THF como cosolvente (10% v/v), 2 equiv. de 2-PrOH, 40 °C y 16 h de reacción. De esta manera se logró sintetizar la  $\alpha$ -clorometil cetona **2a** con un rendimiento aislado tras columna cromatográfica del 93% (entrada 1, Tabla 2).

Una vez optimizadas las condiciones de la reacción de hidratación del sustrato modelo **1a**, se extendió este procedimiento a la síntesis de distintas  $\alpha$ -

---

<sup>361</sup> C. Liu, Y. Xue, L. Ding, H. Zhang, F. Yang, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 6537-6540.

halometil cetonas (Esquema 79). Para ello se emplearon como sustratos diferentes haloalquinos previamente sintetizados mediante la reacción de Corey-Fuchs. Gracias a la metodología de hidratación propuesta se lograron sintetizar doce  $\alpha$ -halometil cetonas con elevados rendimientos aislados tras columna cromatográfica (79-96%). La metodología propuesta resultó ser muy general, ofreciendo buenos resultados al emplear derivados aromáticos con sustituyentes electrón atractores o donadores en el anillo aromático (**1a-j**), cloroalquinos alifáticos (**1k**), y también cuando se consideró un bromoalquino (**1l**).



Esquema 79.  $\alpha$ -Halocetonas sintetizadas mediante el procedimiento propuesto.

## 4.2 Estudio del proceso de biorreducción de la $\alpha$ -clorometil cetona **2a**

Antes de pasar a estudiar el proceso quimioenzimático en cascada, y con el fin de encontrar enzimas activas y selectivas para la reducción de la cetona modelo **2a**, se realizó un screening enzimático utilizando las condiciones de reacción óptimas para llevar a cabo la etapa de hidratación, es decir, en presencia de 2-Me-THF como cosolvente, 2 equiv. de 2-PrOH y 40 °C. Para este estudio se emplearon veintitrés ADHs, tanto producidas en nuestro grupo de investigación tras sobreexpresión en *E.*

#### Capítulo 4. Resultados y discusión

*coli* como adquiridas comercialmente, identificando la *LbADH* y la *ADH-A* como las mejores para llevar a cabo esta transformación (Tabla S5). Cabe destacar que estos procesos dieron lugar a conversiones cuantitativas ya que la reducción se encuentra muy favorecida termodinámicamente, por lo que no fue necesario añadir un gran exceso del 2-PrOH, utilizado como donador de hidrógeno.

#### 4.3 Diseño y optimización de una aproximación en cascada para la síntesis estereoselectiva de las halohidrinas **3a-I**

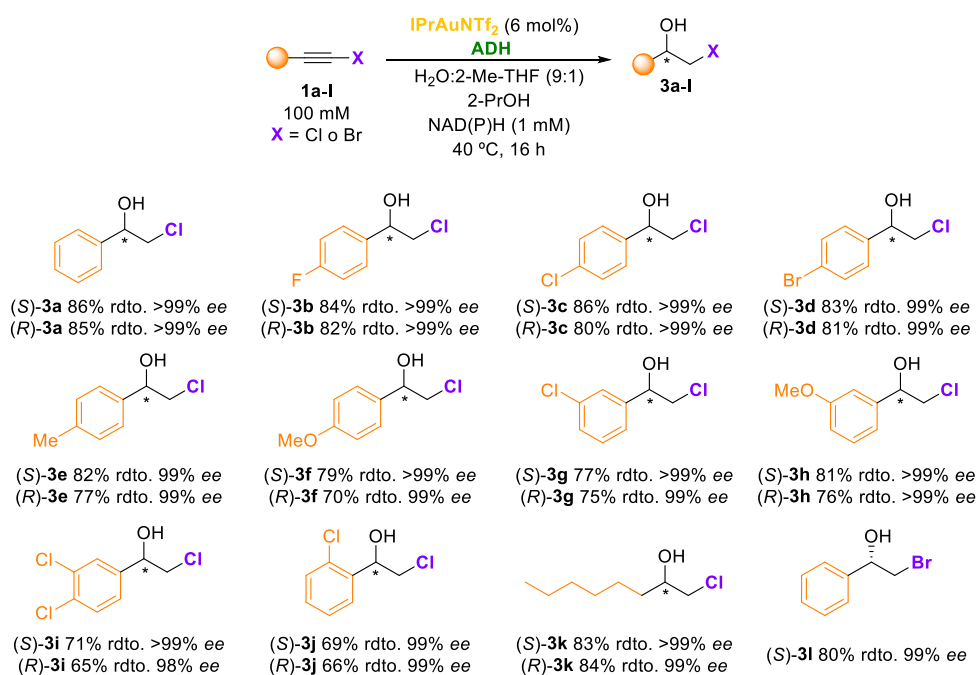
Una vez estudiadas ambas reacciones por separado, y teniendo en cuenta la compatibilidad entre el catalizador IPrAuNTf<sub>2</sub> y las ADHs, se estudió la posibilidad de diseñar un proceso en cascada que permitiera transformar haloalquinos en halohidrinas ópticamente activas. Para este fin, se seleccionó inicialmente el cloroalquino modelo **1a** como sustrato de partida y la *LbADH* como enzima. Tras evaluar la influencia de diversos parámetros de reacción como la concentración de sustrato, la carga de catalizador de Au(I), la cantidad de ADH y de 2-Me-THF (% v/v), el exceso de 2-PrOH, la temperatura y el tipo de agitación (Tablas 3, S7, S8 y S9), se consiguió sintetizar la halohidrina (*S*)-**3a** con un rendimiento aislado tras columna cromatográfica del 87% y una excelente selectividad (>99% *ee*).

Posteriormente se evaluó la posibilidad de sintetizar la halohidrina (*R*)-**3a** empleando en este caso la *ADH-A* que presenta una selectividad opuesta (Tabla S10). En este caso se utilizó una aproximación similar, pero fue necesario incrementar el exceso de 2-PrOH hasta los 3 equiv. para obtener la halohidrina con elevado rendimiento aislado (85%) y estereoselectividad (>99% *ee*).

Una vez optimizada la síntesis de ambos enantiómeros de la halohidrina modelo **3a**, se aplicó esta metodología a la síntesis de las halohidrinas **3b-I** utilizando los haloalquinos previamente sintetizados (Esquema 80). El uso de un 6 mol% de IPrAuNTf<sub>2</sub>, 2 o 3 equiv. de 2-PrOH, 10% de 2-Me-THF, la correspondiente ADH, 40 °C y 24 h de reacción permitió acceder a los compuestos deseados con buenos rendimientos (65-86%) y selectividades (>97% *ee*). Es necesario destacar que en el caso del compuesto **1j** fue necesario aumentar la cantidad de 2-PrOH empleada hasta 5% v/v para obtener buenas conversiones, y en el caso de la bromohidrina **1l** tan solo fue posible acceder al enantiómero (*S*)-**3l**, ya que la reacción con la *ADH-A* ofreció



una mezcla compleja de reacción, no encontrándose ninguna otra ADH de selectividad Prelog que permitiera acceder al enantiómero *R*.



**Esquema 80.** Halohidrinas ópticamente activas sintetizadas mediante la aproximación concurrente propuesta.

#### 4.4 Diseño de un proceso *one-pot* para la síntesis estereoselectiva del epóxido **4a**

Finalmente, se diseñó un proceso *one-pot* para la síntesis estereoselectiva del epóxido **4a** mediante la adición de una base al medio de reacción una vez terminada la cascada para obtener **3a**. Así, se estudió la influencia de los equivalentes de NaOH necesarios para producir la formación del epóxido deseado en H<sub>2</sub>O:2-Me-THF (9:1 v/v) a 40 °C, de manera que fueron necesarios tan solo 1.2 equiv. de esta base para lograr la conversión completa de la halohidrina **3a** hacia el producto deseado tras 3 h de reacción (Figura 4 y Tabla S12).

Puesto que la adición de la base desde un principio proporcionó una mezcla compleja de productos en la que se pudo identificar una gran cantidad del cloroalquino de partida **1a** sin reaccionar, se optó por una metodología secuencial

#### Capítulo 4. Resultados y discusión

para la síntesis estereoselectiva del epóxido **4a**, de manera que tras finalizar la reacción en cascada hacia la halohidrina **3a**, se adicionaron los 1.2 equiv. de NaOH al medio de reacción (Esquema 2 y Tabla S13). De esta manera, tras 3 h más de reacción, se lograron obtener ambos enantiómeros del óxido de estireno (**4a**) con elevados rendimientos aislados (88-92%) y selectividades (>96% *ee*).

Para finalizar este capítulo se puede concluir que se ha:

- Identificado al catalizador IPrAuNTf<sub>2</sub> para llevar a cabo la reacción de hidratación regioselectiva de haloalquinos en medio acuoso, el cual, tras la optimización de las condiciones de reacción, ha permitido acceder a doce  $\alpha$ -halometil cetonas (**2a-1**) con buenos rendimientos (79-96%).
- Estudiado el empleo de diversas ADHs, identificando la ADH-A y la *Lb*ADH como biocatalizadores estereocomplementarios para la biorreducción de las cetonas **2a-1**.
- Puesto a punto un proceso en cascada que permitió sintetizar de manera estereoselectiva varias halohidrininas a partir de los haloalquinos, mediante la acción conjunta de un catalizador de Au(I) y una ADH. Gracias a esta metodología fue posible sintetizar doce halohidrininas con buenos rendimientos aislados (65-86%) y selectividades (>97% *ee*).
- Diseñado un proceso secuencial sencillo que permitió la transformación del cloroetilbenceno (**1a**) en los dos enantiómeros del óxido de estireno (**4a**) por separado, mediante la adición de NaOH al medio de reacción tras finalizar el proceso en cascada concurrente propuesto, ya sea empleando la ADH-A o la *Lb*ADH (88-92% rdt. y >96% *ee*).

*Artículo de investigación*



# Unmasking the Hidden Carbonyl Group Using Gold(I) Catalysts and Alcohol Dehydrogenases: Design of a Thermodynamically-Driven Cascade toward Optically Active Halohydrins

Sergio González-Granda, Lorena Escot, Iván Lavandera,\* and Vicente Gotor-Fernández\*

Cite This: *ACS Catal.* 2022, 12, 2552–2560

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

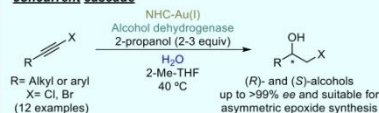
Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** A concurrent cascade combining the use of a gold(I) N-heterocyclic carbene (NHC) and an alcohol dehydrogenase (ADH) is disclosed for the synthesis of highly valuable enantiopure halohydrins in an aqueous medium and under mild reaction conditions. The methodology consists of the gold-catalyzed regioselective hydration of easily accessible haloalkynes, followed by the stereoselective bioreduction of the corresponding  $\alpha$ -halomethyl ketone intermediates. Thus, a series of alkyl- and aryl-substituted haloalkynes have been selectively converted into chloro- and bromohydrins, which were obtained in good to high yields (65–86%). Remarkably, the use of stereocomplementary commercial or made-in-house overexpressed alcohol dehydrogenases in *Escherichia coli* has allowed the synthesis of both halohydrin enantiomers with remarkable selectivities (98  $\rightarrow$  99% *ee*). The outcome success of this method was due to the thermodynamically driven reduction of the ketone intermediates, as just a small excess of the hydrogen donor (2-propanol, 2-PrOH) was necessary. In the cases that larger quantities of 2-PrOH were applied, higher amounts of other by-products (e.g., a vinyl ether derivative) were detected. Finally, as an extension of this cascade transformation and exploration of the synthetic potential of chiral halohydrins, the synthesis of both enantiomers of styrene oxide has been developed in a one-pot sequential manner in very high yields (88–92%) and optical purities (97  $\rightarrow$  99% *ee*).

**KEYWORDS:** alkyne hydration, biocatalysis, bioreduction, cascade reactions, enzymes, gold catalysis, halohydrins

## concurrent cascade



Downloaded via UNIV DE LISB on October 18, 2022 at 09:43:34 (UTC).  
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

## INTRODUCTION

$\alpha$ -Halomethyl ketones constitute one of the most important classes of organic intermediates based on their multiple synthetic possibilities due to the susceptibility of the carbonyl group to be reduced with reducing agents, react with different nucleophile classes,<sup>1–3</sup> and also their ability to become carboxylic acid precursors through the Favorskii rearrangement.<sup>4</sup> Two traditional approaches have been described for their synthesis, consisting of the development of  $\alpha$ -halogenation of the corresponding ketones<sup>1</sup> or alternatively the chemical modification of olefins and alkynes.<sup>5</sup> Unfortunately, the halogenation of ketones with molecular halogens, metal halides, or *N*-halosuccinimides usually suffers from serious drawbacks due to the occurrence of low regioselectivity or polyhalogenation transformations, and therefore special efforts have been made in recent years toward the selective modification of C–C multiple bonds under mild reaction conditions.

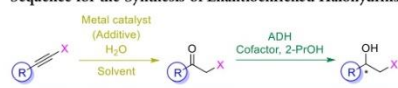
Remarkably, alkynes are adequate carbonyl surrogates, their hydration receiving considerable attention because it proceeds with a complete atom efficiency for terminal alkynes, dialkylalkynes, diarylalkynes, arylalkylalkynes and even hetero-substituted ones.<sup>6–11</sup> Interestingly, haloalkynes are easily accessible through C–H metalation or deprotonation of the

corresponding terminal alkynes and subsequent halogenation employing different halogenation reagents. On the other hand, the catalytic addition of water to these unsaturated compounds involves the tautomerization of initially formed enol-type species that is especially favored when considering these haloalkynes as substrates because the C–X bond is highly polarized.<sup>8</sup> In this context, the production of  $\alpha$ -halomethyl ketones through regioselective haloalkyne hydration has been traditionally catalyzed by Bronsted acids<sup>12</sup> and metal species, the latter being considered as the first choice strategy (Scheme 1). Thus, the usefulness of a wide range of metal species has been reported to accelerate this transformation, including cerium,<sup>13</sup> copper,<sup>14</sup> indium,<sup>15</sup> iron,<sup>16</sup> or silver<sup>17</sup> catalysts.

Au(I) catalysts have emerged in the past decade as valuable tools<sup>18</sup> for alkyne hydration,<sup>19</sup> allowing chemoselective transformations when other functional groups are present.<sup>20–24</sup> In

Received: November 14, 2021  
Revised: January 10, 2022  
Published: February 4, 2022



**Scheme 1. Alkyne Hydration–Stereoselective Bioreduction Sequence for the Synthesis of Enantioenriched Halohydrins**

an inspiring work, He and co-workers reported the first general hydration of aliphatic and (hetero)aromatic 1-haloalkynes using XPhosAuNTf<sub>2</sub> and 3 equiv of water.<sup>20</sup> The hydration of similar haloalkynes (X = Br, Cl, and I) was later successfully achieved by using an immobilized gold(I) catalyst (MCM-41-PPh<sub>3</sub>AuNTf<sub>2</sub>).<sup>21</sup> Terminal halo-substituted propargyl carboxylates have also become adequate hydration substrates using a Ph<sub>3</sub>PAuNTf<sub>2</sub>/AgSbF<sub>6</sub> catalytic system and also 3 equiv of water.<sup>22</sup> More recently, Cazin and co-workers described the hydration of aromatic 1-iodoalkynes using IPrAuNTf<sub>2</sub> and 2 equiv of water as part of a one-pot sequential iodination–hydration sequence,<sup>23</sup> results that complement the investigations previously reported by Sheppard and co-workers in a similar multistep synthesis.<sup>24</sup> Also, Liu and co-workers have demonstrated the potential of this methodology combining the gold(I)-mediated hydration of haloalkynes with a Ru-catalyzed hydrogen transfer reaction to obtain enantioenriched halohydrins in 1,2-dichloroethane at 20 °C.<sup>25,26</sup>

Chiral halohydrin derivatives are extremely versatile intermediates in organic chemistry, as they can be easily functionalized to provide different families of biologically active compounds and synthetic drugs.<sup>27–30</sup> Among the reported synthetic approaches to obtain these derivatives in enantioenriched form, enzyme-catalyzed reactions present an elegant sustainable strategy.<sup>31</sup> In fact, the bioreduction of  $\alpha$ -

halomethyl ketones using alcohol dehydrogenases (ADHs) can be highlighted<sup>32–36</sup> since it is a highly thermodynamically favored reaction, requiring just a small excess of the hydrogen donor, 2-propanol (2-PrOH), used as a cosubstrate for cofactor recycling purposes.<sup>37–39</sup> Therefore, shifting the reaction toward alcohol formation is highly favored, to the detriment of the reverse alcohol oxidation.

The quest for cooperative multicatalytic transformations presents the combination of metal and enzyme catalysis as an advantageous strategy for increasing molecular complexity at the same time that chirality can be induced under mild reaction conditions,<sup>40–44</sup> including transformations involving ADHs.<sup>45</sup> Thus, finding suitable reaction conditions for the combined action of gold and enzyme catalysis would make plausible the development of a straightforward synthesis of chiral halohydrins starting from haloalkynes in an aqueous medium under very mild conditions, as depicted in Scheme 1.

In this field, the development of multicatalytic transformations involving gold species and enzymes such as lipases, ADHs, monoamine oxidases, and transaminases has received increasing attention in recent years. Groundbreaking findings have covered the development of various multicatalytic approaches, including a nonselective alkylation of tetrahydroquinolines catalyzed by the combined action of an evolved monoamine oxidase and HAuCl<sub>4</sub>,<sup>46</sup> and also a few stereoselective multistep transformations using Au(I) or Au(III) catalysts. For instance, cycloisomerization transformations have been elegantly implemented together with lipase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution procedures,<sup>47,48</sup> or ADH-mediated bioreduction processes.<sup>49</sup> Interestingly, hydration–bioreduction routes have also been reported, transforming terminal alkynes in optically active 1-arylethan-1-ols and aliphatic alcohols in sequential protocols.<sup>50,51</sup> In this

**Table 1. Hydration of 1a Using 2-PrOH and a Gold(I) Catalyst under Different Reaction Conditions (Solvent, 2-PrOH Concentration, and Temperature)<sup>a</sup>**

entry	catalyst	cosolvent <sup>b</sup> (%)	2-PrOH <sup>b</sup>	T (°C)	1a <sup>c</sup> (%)	2a <sup>c</sup> (%)	by-products <sup>c</sup> (%)
1	IPrAuNTf <sub>2</sub>	MeCN (16.7)	16.7%	40	1	35	64
2	IPrAuNTf <sub>2</sub>		20%	40	<1	15	85
3	IPrAuNTf <sub>2</sub>		2 equiv	40	<1	88	12
4	IPrAuNTf <sub>2</sub>	MeCN (20)	2 equiv	40	1	82	17
5	JohnPhosAuNTf <sub>2</sub>	MeCN (20)	2 equiv	40	<1	81	19
6	BrettPhosAuNTf <sub>2</sub>	MeCN (20)	2 equiv	40	<1	85	15
7	IPrAuNTf <sub>2</sub>	THF (20)	2 equiv	40	<1	99 (93)	1
8	IPrAuNTf <sub>2</sub>	THF (20)	2 equiv	30	3	96 (85)	1
9	IPrAuNTf <sub>2</sub>	2-Me-THF (20)	2 equiv	40	<1	99 (94)	1
10	IPrAuNTf <sub>2</sub>	THF (15)	2 equiv	40	<1	99 (91)	1
11	IPrAuNTf <sub>2</sub>	THF (10)	2 equiv	40	<1	99 (93)	1
12	IPrAuNTf <sub>2</sub>	2-Me-THF (10)	2 equiv	40	<1	99 (93)	1
13	IPrAuNTf <sub>2</sub>	2-Me-THF <sup>d</sup> (10)	2 equiv	40	<1	99 (89)	1

<sup>a</sup>Reaction conditions: 1a (100 mM), gold catalyst (5 mol %), H<sub>2</sub>O (66.6–98.4% v/v), cosolvent (0–20% v/v), 2-PrOH (1.6–20% v/v) for 16 h. <sup>b</sup>Percentages of cosolvents are given in % v/v, while for 2-PrOH they are either as % v/v or equivalents with respect to the haloalkyne. <sup>c</sup>Percentages of product were measured by GC analysis of the reaction crude. Isolated yields of ketone 2a in parentheses after column chromatography purification. <sup>d</sup>A 2% w/v of TPGS-750-M surfactant was added.

context, Mihovilovic and co-workers have sequentially combined the action of AuCl<sub>3</sub> in 2-PrOH using 4 equiv of water for alkyne hydration at 65 °C with the bioreduction of the resulting 1-arylethan-1-one intermediates at 30 °C,<sup>50</sup> while Lipshutz' group described a one-pot sequential protocol including the use of (HandaPhos)AuCl in the presence of a silver salt, trifluoroacetic acid, and a surfactant in water for the hydration step, adding the ADH, cofactor, buffer, and additional surfactant for the reductive step once the alkyne was consumed.<sup>51</sup> Very recently, Rueping and co-workers have developed a hydration–biotransamination sequential approach to transform terminal arylacetylenes into optically active 1-arylethan-1-amine, combining gold(I) chloride and a stereoselective transaminase in a sequential manner since the substrate concentration had to be diminished and the temperature decreased after the hydration step.<sup>52</sup>

Being aware of the difficulties to develop multicatalytic transformations when considering an alkyne hydration and biotransformation sequences in a concurrent cascade mode,<sup>50–52</sup> herein we have focused on the exploitation of the compatibility of an N-heterocyclic carbene (NHC)–gold(I) complex, namely, [1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene] [bis(trifluoromethanesulfonyl)imide]gold(I) (IPrAuNTf<sub>2</sub>) with ADHs, recently reported as the first example of a concurrent cascade involving a gold species and these oxidoreductases.<sup>53</sup> In that case, the Meyer-Schuster rearrangement of various racemic propargylic alcohols followed by stereoselective bioreduction of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone intermediates was reported to afford enantiopure allylic alcohols. Now the exploitation of this synergic combination of a NHC–gold(I) catalyst and stereoselective ADHs is expanded, searching for adequate conditions to develop a novel one-pot approach for the straightforward synthesis of pharmaceutically relevant optically active haloalcohols from haloalkynes.

## RESULTS AND DISCUSSION

Herein, the most representative results are presented: (i) the gold(I)-catalyzed hydration process of (chloroethynyl)benzene (**1a**) and the scope of the reaction using other haloalkynes **1b–1i**; (ii) the bioreduction of 2-chloro-1-phenylethan-1-one (**2a**) using different ADHs; (iii) next, the development and scope of the stereodivergent concurrent cascade consisting in the alkyne-hydration sequence; (iv) and finally an application of this methodology for creating new molecular diversity in a one-pot sequential transformation toward an optically active epoxide.

**NHC–Gold(I) Catalyzed Hydration of (Chloroethynyl)benzene (**1a**) and Reaction Scope.** For this study, (chloroethynyl)benzene (**1a**) was selected as a benchmark substrate since it can be prepared in a straightforward manner through selective halogenation at the terminal position of phenylacetylene with *N*-chlorosuccinimide.<sup>54</sup> On the basis of the excellent reactivity displayed by IPrAuNTf<sub>2</sub> in the Meyer-Schuster rearrangement of propargylic alcohols in an aqueous medium,<sup>53</sup> the hydration of haloalkyne **1a** was investigated using 5 mol % of the gold catalyst at 40 °C in water as a reaction medium (Table 1). The addition of 2-PrOH was considered at this point with a dual role, first as an organic cosolvent to improve the substrate solubility but also as a cosubstrate for cofactor recycling purposes in a coupled-substrate fashion when considering the subsequent bioreduction process.

First, variable amounts of 2-PrOH were considered (1.6–20%, see also Table S1 of the Supporting Information), leading to the desired 2-chloro-1-phenylethan-1-one (**2a**) with the concomitant formation of some by-products in significant amounts. These side-reaction products were identified as a mixture of the vinyl ether resulting from the gold-catalyzed nucleophilic addition of 2-PrOH to the chloroalkyne<sup>55</sup> and the dimeric product displayed in the scheme from Table 1 obtained after the addition of the enol tautomer from **2a** to **1a**. High 2-PrOH contents preferably favored the formation of the vinyl ether, but unfortunately a complex mixture was identified in the NMR analyses, from this point focusing exclusively on the optimization of the reaction conditions to the formation of ketone **2a**.

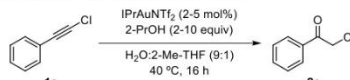
Usually, when bioreductions are performed using 2-PrOH as the cosubstrate, a huge molar excess regarding the ketone substrate is necessary to drive the equilibrium into the desired alcohol product. However, when carbonyl compounds present an electron-withdrawing group at the  $\alpha$  position such as a halogen atom, the reduction is highly thermodynamically favored.<sup>37–39</sup> Taking advantage of this singularity, the hydration reaction of **1a** was carried out in the presence of only 2 equiv of 2-PrOH at 40 °C, finding high percentages of ketone **2a** either in the absence or presence of acetonitrile as the cosolvent (82–88%, entries 3 and 4) due to the drop of the by-product formation.

From a total of six gold(I) catalysts comprising the presence of different ligands and anions (see Table S2 for gold catalyst screening), JohnPhosAuNTf<sub>2</sub> and BrettPhosAuNTf<sub>2</sub> also turned out to be efficient species leading to **2a** as the main product (81–85%, entries 5 and 6). Further optimization of the reaction conditions was performed with IPrAuNTf<sub>2</sub> because of its lower price in comparison to that of BrettPhosAuNTf<sub>2</sub>, focusing on the selection of a suitable cosolvent to favor the solubility of the starting material (entries 7–13) and minimize the side product formation. After optimization of the organic cosolvent and reaction temperature (see further experiments in Table S3), the use of ethers such as water-miscible tetrahydrofuran (THF, entry 7) and also the more environmentally benign, renewable, and water-immiscible 2-methyltetrahydrofuran (2-Me-THF, entry 9)<sup>56</sup> turned out to be the best choice, exclusively leading to the formation of **2a**. Interestingly, the reaction maintained its perfect regioselectivity in THF at 30 and 40 °C, but was faster at a higher temperature (96–99%, entries 7 and 8), being also synthetically useful at different cosolvent ratios (10–20%, entries 9–12), while its combination with a surfactant<sup>51</sup> also allowed the isolation of **2a** in very high yields (entry 13).

In Table 2 the hydration of **1a** was further studied, analyzing now the influence of the catalyst loading (2–5 mol %, entries 1–4) and the amount of 2-propanol (2–10 equiv, entries 1 and 5–8). On the one hand, a significant formation of by-products was observed when reducing the IPrAuNTf<sub>2</sub> loading from 5 to 2 mol % (up to 17% of undesired products, entry 4), so 5 mol % of IPrAuNTf<sub>2</sub> was selected to favor the main hydration reaction. On the other hand, higher amounts of 2-PrOH favored the progressive formation of by-products (up to 6%), finding the best reaction conditions when combining 5 mol % IPrAuNTf<sub>2</sub> and 2 equiv of 2-PrOH (93% isolated yield of **2a**). Therefore, these conditions were selected for the design of a one-pot hydration–bioreduction cascade.

Next, haloalkynes **1b–1i** were synthesized following the reported procedures<sup>54,57</sup> to explore the scope of the

**Table 2. Effect of IPrAuNTf<sub>2</sub> and 2-Propanol Amounts in the Hydration of 1a at 40 °C for 16 h**



entry	IPrAuNTf <sub>2</sub> (mol %)	2-PrOH (equiv)	2a <sup>a</sup> (%)	by-products <sup>b</sup> (%)
1	5	2	99 (93)	1
2	4	2	97 (89)	3
3	3	2	85 (80)	15
4	2	2	83 (74)	17
5	5	3	98 (91)	2
6	5	5	97 (91)	3
7	5	7	95 (87)	5
8	5	10	94 (84)	6

<sup>a</sup>Percentages of products were measured by GC analysis of the reaction crude. Isolated yields of ketone 2a in parentheses after chromatographic purification.

IPrAuNTf<sub>2</sub>-catalyzed hydration reaction under a compatible setup with a bioreduction process. The use of 5 mol % IPrAuNTf<sub>2</sub>, 2 equiv of 2-propanol, and 2-Me-THF as cosolvent (10% v/v) was selected for the synthesis of a total of 12  $\alpha$ -halomethyl ketones 2a–2l, which occurred with high to excellent selectivities in over 85% conversion (Figure 1) and isolated after column chromatography in very high yields (79–96%). It must be stated that a column chromatography purification was required for the separation of the remaining starting material and resulting by-products, although they appeared to a low extent.

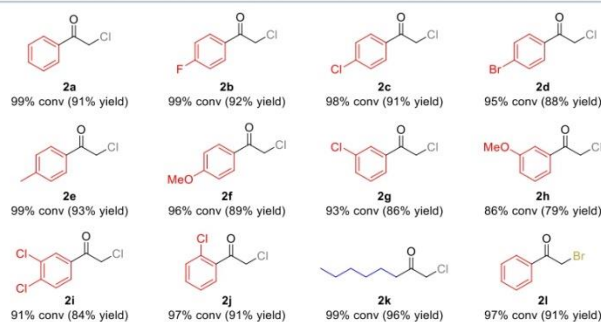
#### Bioreduction of 2-Chloro-1-phenylethan-1-one (2a).

A total of 23 alcohol dehydrogenases were screened to find stereoselective enzymes that were able to produce both 2-chloro-1-phenylethan-1-ol (3a) enantiomers under suitable conditions for the gold(I)-catalyzed hydration step previously optimized. To this aim, 2-Me-THF (20% v/v), 40 °C, and only 2 equiv of 2-PrOH (Table S5) were selected. On the one hand, 4 reductases led to the enantiopure (S)-3a in quantitative conversions: (a) Commercially available KRED-P1-A04,

KRED-P1-A12, and KRED-P2-H07 from a Codexis screening kit; (b) lyophilized cells of *E. coli* overexpressing ADH from *Lactobacillus brevis* (LbADH),<sup>58,59</sup> an enzyme that was already described as an efficient catalyst in the bioreduction of  $\alpha$ -halomethyl ketones.<sup>60</sup> On the other hand, only the ADH from *Rhodococcus ruber* (ADH-A)<sup>61,62</sup> led to the enantiopure (R)-3a in 98% conversion, which was also previously found to be a good candidate for the production of optically active halohydrins.<sup>63–66</sup>

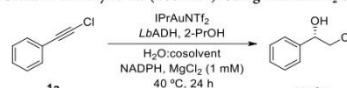
**Design of a Stereodivergent Concurrent Chemo-enzymatic Cascade toward Halohydrins 3a–3l through a Hydration–Bioreduction Sequence.** Encouraged by the excellent results obtained in the individual gold-catalyzed hydration of alkynes 1a–1l and the bioreduction of  $\alpha$ -chloromethyl ketone 2a, and on the basis of our recent successful experience in the combination of IPrAuNTf<sub>2</sub> and ADHs,<sup>53</sup> the concurrent hydration–bioreduction cascade was next attempted. Because of the requirements of both catalysts, a few parameters were considered in selecting the formation of 3a as the final goal. Importantly, the use of an aqueous system was pursued with the addition of few 2-propanol equivalents since both possess a decisive role in the global process and do not present serious drawbacks for the metal-catalyzed alkyne hydration, as demonstrated before. The concomitant use of stereocomplementary LbADH and ADH-A together with the NHC–gold(I) catalyst was next investigated, a selection of the most important results of this combination with LbADH being described in Table 3.

With the goal of maintaining a low gold loading, 6 mol % IPrAuNTf<sub>2</sub> was found to be the optimum one (entries 1 and 2), while the use of 2-Me-THF (entries 3 and 4) offered a slight improvement over the use of THF, leading to a 96% conversion (87% isolated yield) when the cosolvent ratio was reduced to 10% v/v and 2-PrOH to 2 equiv (entry 5). Additional experiments can be found in Table S7, where it can also be observed that the magnetic stirring represents a notable advantage in comparison to the orbital shaking, usually employed in biocatalyzed processes, while no significant improvements were observed when increasing the NADPH concentration from 1 to 2 mM. Interestingly, ADH-A allowed the stereocomplementary synthesis of the (R)-3a enantiomer,



**Figure 1.** Scope of the gold-catalyzed hydration of alkynes 1a–1l. Reaction conditions: 1a–1l (100 mM in H<sub>2</sub>O/2-Me-THF 9:1 v/v), IPrAuNTf<sub>2</sub> (5 mol %), 2-PrOH (2 equiv), 16 h, and 40 °C.



Table 3. Hydration–Bioreduction Cascade of Alkyne **1a** (100 mM) Using IPrAuNTf<sub>2</sub> and LbADH<sup>a</sup>

entry	IPrAuNTf <sub>2</sub> (mol %)	2-PrOH (equiv)	cosolvent (% v/v)	<b>1a</b> <sup>b</sup> (%)	<b>2a</b> <sup>b</sup> (%)	by-products <sup>b</sup> (%)	<b>3a</b> <sup>c</sup> (%)	( <i>S</i> )- <b>3a</b> ee <sup>c</sup> (%)
1	5	3	THF (20)	3	<1	6	91	>99
2	6	3	THF (20)	<1	1	7	92	>99
3	6	3	2-Me-THF (20)	<1	<1	6	94	>99
4	6	2.5	2-Me-THF (10)	<1	<1	7	93	>99
5	6	2	2-Me-THF (10)	<1	<1	4	96 (87)	>99

<sup>a</sup>A general procedure is described in the Experimental Section. <sup>b</sup>Product percentages were determined by GC analysis using calibration curves. Isolated yield of (*S*)-**3a** in parentheses. <sup>c</sup>Enantiomeric excess values were determined by HPLC.

reaching 94% conversion and 85% of isolated enantiopure product when employing 3 equiv of 2-PrOH, 1 mM NADPH, and 2-Me-THF (10% v/v) after 24 h at 40 °C.

During a search for a higher process efficiency, additional experiments were performed at different substrate concentrations ranging from 100 to 300 mM alkyne **1a**. In all cases, the hydration of **1a** smoothly proceeded under optimized reaction conditions, reaching full conversion (Table S8), although the conversion was affected when considering the cascade approach, observing a decrease at higher concentrations moving from 96% alcohol (*S*)-**3a** at 100 mM to 84% at 250 mM (Figure 2 and Table S9) due to the formation of the

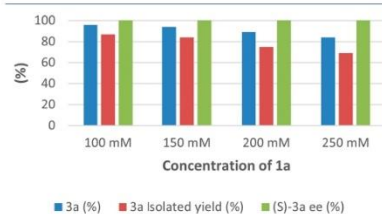


Figure 2. Influence of the alkyne **1a** (0.1 mmol) concentration in the hydration–bioreduction cascade using IPrAuNTf<sub>2</sub> (6 mol %), *E. coli*/LbADH (20 mg), 2-PrOH (2 equiv), and 2-Me-THF (10% v/v) as cosolvent for 24 h at 40 °C.

side products to a higher extent. Remarkably, the stereoselectivity remained perfect in all cases, obtaining the enantiopure halohydrin regardless of the selected conditions.

Because of the importance of chiral halohydrins as key pharmaceutical precursors,<sup>27–30</sup> and for the purpose of investigating the generality of the reported chemoenzymatic approach, the hydration–bioreduction cascade was attempted with a series of aryl acetylenes considering a synthetically useful 100 mM substrate concentration, and variable pattern substitutions in the aromatic ring including halogen atoms at different positions (**1b–1d**, **1g**, **1i**, and **1j**), the use of electron-donating substituents (**1e**, **1f**, and **1h**), and also the employment of (bromoethynyl)benzene (**1l**) to produce a bromohydrin. Special emphasis must be made in the selection of an aliphatic substrate such as 1-chlorooct-1-yne (**1k**) due to the difficulties to chemically develop regioselective halogenations of aliphatic ketone substrates to obtain the correspond-

ing  $\alpha$ -haloketone at the terminal position. The results under the optimized conditions for each substrate and enzyme are depicted in Figure 3 and Table S10, showing high to excellent conversions toward the formation of the corresponding halohydrins (78–98%), which were isolated in moderate to high yields after column chromatography (65–86%) with excellent optical purities (98 to >99% ee). In all cases heterologously overexpressed ADH-A and LbADH were used for the bioreduction of the ketone intermediates, except for the 2-chloro-1-(2-chlorophenyl)ethan-1-one that showed very little activity with these enzymes, so commercially available KRED-P1-A04 and KRED-P1-H08 were used in these cases (see Table S6 for a bioreduction screening with ketone **2j**).

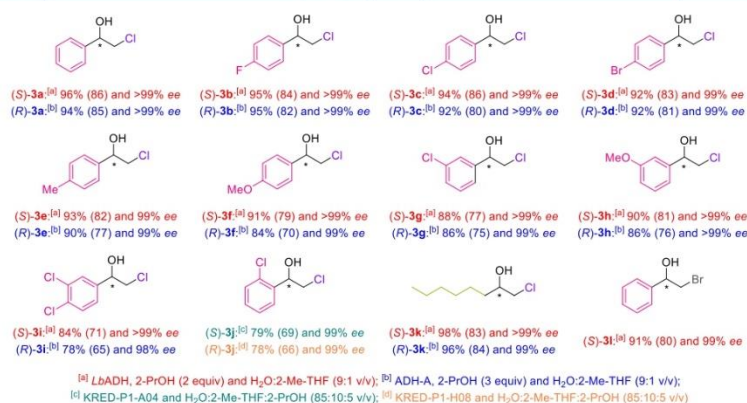
Semipreparative transformations (100 mg) were successfully developed for the production of both 2-chloro-1-phenylethan-1-ol enantiomers (Table S11), yielding (*S*)-**3a** in 82% isolated yield with LbADH and (*R*)-**3a** in 83% isolated yield with ADH-A in enantiopure form.

**Design of a Hydration–Bioreduction–Epoxidation Sequence toward Styrene Oxide Enantiomers.** As described in the Introduction, halohydrins are highly valuable compounds as they can be transformed into other important derivatives. Herein, in a search to exploit the potential of this chemoenzymatic cascade, a preliminary study of styrene oxide (**4a**) formation starting from racemic chlorohydrin **3a** was developed, finding 1.2 equiv of sodium hydroxide as the minimum amount to form **4a** in a quantitative conversion (Figure 4 and Table S12), not detecting other by-products.

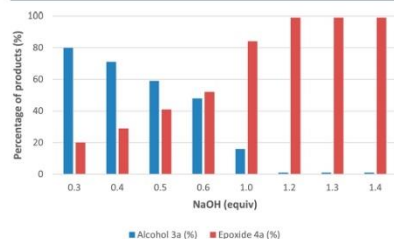
Then the hydration–bioreduction–cyclization sequence was performed in a one-pot sequential process, adding 1.2 equiv of sodium hydroxide to the reaction mixture once **3a** was obtained (Scheme 2). Satisfyingly, the epoxidation process just required 3 additional hours, both styrene oxide enantiomers being obtained in high purity depending on the enzyme of choice (Table S13), (*S*)-**4a** with LbADH (92% isolated yield and >99% ee) and (*R*)-**4a** for ADH-A (88% isolated yield and 97% ee). This simple protocol demonstrates that highly interesting synthetic precursors as chiral epoxides can be easily obtained by combining the action of a metal catalyst and an enzyme.

## CONCLUSIONS

A one-pot concurrent cascade consisting of the NHC–gold(I)-catalyzed hydration of easily accessible haloalkynes followed by a stereoselective bioreduction has allowed the asymmetric synthesis of halohydrins with excellent conversion and stereoselectivity values. Optimization of the hydration step



**Figure 3.** Scope of the concurrent hydration–bioreduction cascade of alkynes **1a–II** (100 mM) after 16 h at 40 °C with IPrAuNTf<sub>2</sub> (6 mol %). Isolated yields appear in parentheses after the conversion values.



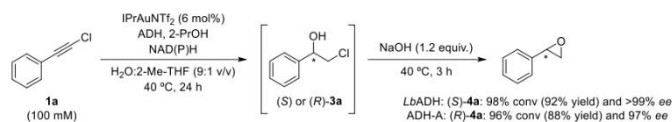
**Figure 4.** Influence of the NaOH amount in the epoxidation of racemic **3a** using H<sub>2</sub>O:2-Me-THF (90:10% v/v) as the solvent in the presence of 2 equiv of 2-PrOH for 3 h at 40 °C.

was necessary to be concurrently accomplished later with the reduction of the resulting  $\alpha$ -halomethyl ketones using stereocomplementary alcohol dehydrogenases. For that reason, the hydration of ethynylbenzene was optimized in an aqueous medium, finding tetrahydrofuran and 2-methyltetrahydrofuran as suitable cosolvents (10% v/v), while IPrAuNTf<sub>2</sub> (5–6 mol %) turned out to be an efficient catalyst for this fully atom-economy reaction. The presence and amount of 2-propanol was crucial to enable the combination of the metal and enzyme catalysts for the development of a cascade process, the use of

only 2–3 equiv allowing the development of the one-pot approach without forming significant amounts of by-products due to the thermodynamically favored reduction of  $\alpha$ -haloketones. Remarkably, alkyl- and aryl-substituted haloalkynes were isolated as the corresponding ketones in good to high yields after column chromatography (79–96%).

The screening of commercial and in-house enzymes overexpressed in *E. coli* has allowed the production of a series of pharmaceutically relevant enantioenriched chlorohydrins and a bromohydrin by employing complementary stereoselective enzymes, this biotransformation being highly selective and fully compatible in one pot with the gold-catalyzed process, even at a relevant 100 mM substrate concentration (65–86% isolated yield and >98% ee). The production of these valuable compounds was possible in a concurrent cascade manner, including different aromatic and aliphatic motifs, the production of 1-chlorooctan-2-ol resulting being especially attractive due to the difficulties in developing regioselective halogenation reactions over aliphatic ketone substrates to synthesize the corresponding halohydrins. Interestingly, the development of an additional cyclization transformation toward both styrene oxide enantiomers was successfully accomplished by the addition of sodium hydroxide to the reaction medium. In this way, a one-pot process allowed the preparation of styrene oxide from (chloroethyl)benzene without loss of the stereochemical information, thus showing the potential of this methodology to be easily expanded to the synthesis of other valuable compounds.

## Scheme 2. Hydration–Bioreduction–Epoxidation Sequence To Provide Both Styrene Oxide Enantiomers from Alkyne **1a**



## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials and Equipment.** All the information regarding the employed instrumentation and the alcohol dehydrogenases employed in this work is extensively described in the Supporting Information, including enzyme sources and bioreduction experiments. Full characterization of  $\alpha$ -halomethyl ketones **2a–2l**, halohydrins **3a–3l**, and styrene oxide **4a** also appears in the Supporting Information.

**General Procedure for the Synthesis of  $\alpha$ -Halomethyl Ketones **2a–2l** through a NHC–Gold(I)-Catalyzed Hydration Reaction.** Distilled H<sub>2</sub>O (0.9 mL), 2-PrOH (15.3  $\mu$ L, 0.2 mmol, 2 equiv), and IPrAuNTf<sub>2</sub> (4.4 mg, 0.005 mmol, 5 mol %) were successively added in this order to a solution of the corresponding haloalkyne **1a–1l** (0.1 mmol) in 2-Me-THF (0.1 mL), and the mixture was stirred at 40 °C for 16 h. After this time, the reaction was extracted with EtOAc (3  $\times$  1 mL), and the combined organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The corresponding reaction crude was purified by column chromatography on silica gel (10% EtOAc/hexane), obtaining the  $\alpha$ -haloketone **2a–2l** with excellent purity (79–96% isolated yield, Figure 1).

**General Procedure for the Concurrent Cascade Hydration–Bioreduction of Haloalkynes **1a–1i**, **1k**, and **1l** Using LbADH.** The corresponding haloalkynes **1a–1i**, **1k**, and **1l** (0.1 mmol), 2-Me-THF (100  $\mu$ L), distilled water (705  $\mu$ L), 2-PrOH (15.3  $\mu$ L, 2 equiv), IPrAuNTf<sub>2</sub> (5.3 mg, 0.006 mmol, 6 mol %), a NADH aqueous solution (100  $\mu$ L, 10 mM), a MgCl<sub>2</sub> aqueous solution (100  $\mu$ L, 10 mM), and lyophilized cells of overexpressed *E. coli*/LbADH (20 mg) were placed into a glass vial. The mixture was kept under magnetic stirring at 40 °C for 24 h, and after this time, the solution was extracted with EtOAc (5  $\times$  1 mL) and the organic layers were combined, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure, measuring then the conversion into the alcohols **3a–3i**, **3k**, and **3l** by GC analysis, while the enantiomeric excess value was calculated by HPLC. Alcohols **3a–3i**, **3k**, and **3l** were purified by column chromatography on silica gel (71–86% isolated yield, Figure 3).

**General Procedure for the Concurrent Cascade Hydration–Bioreduction of Haloalkynes **1a–1i** and **1k** Using ADH-A.** The corresponding alkynes **1a–1i** and **1k** (0.1 mmol), 2-Me-THF (100  $\mu$ L), distilled water (800  $\mu$ L), 2-PrOH (23  $\mu$ L, 3 equiv), IPrAuNTf<sub>2</sub> (5.3 mg, 0.006 mmol, 6 mol %), a NADH aqueous solution (100  $\mu$ L, 10 mM), and lyophilized cells of overexpressed *E. coli*/ADH-A (20 mg) were placed into a glass vial. The mixture was kept under magnetic stirring at 40 °C for 24 h, and after this time, the solution was extracted with EtOAc (5  $\times$  1 mL) and the organic layers were combined, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure, measuring then the conversion into the alcohols **3a–3i** and **3k** by GC analysis, while the enantiomeric excess value was calculated by HPLC. Alcohols **3a–3i** and **3k** were purified by column chromatography on silica gel (65–85% isolated yield, Figure 3).

**General Procedure for the Concurrent Cascade Hydration–Bioreduction of Haloalkyne **1a** Followed by Epoxidation with Sodium Hydroxide.** To obtain each desired enantiomer of **4a**, the previously described experimental protocol has been followed depending on the enzyme

employed (LbADH or ADH-A). After completion of the first part of the transformation, 40  $\mu$ L of an aqueous solution of NaOH (3 M, 1.2 equiv) was added. The mixture was kept under magnetic stirring at 40 °C for 3 h, and after this time, the solution was extracted with EtOAc (5  $\times$  1 mL) and the organic layers were combined, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure, measuring then the conversion into styrene oxide by GC analysis and the enantiomeric excess by HPLC analysis. Epoxide **4a** was purified by column chromatography on silica gel (10% EtOAc/hexane, 88–92% isolated yield, Scheme 2).

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscatal.1c05216>.

Structures of all chemical compounds studied here, chemical synthesis of haloalkynes **1a–1l**, extensive gold- and enzyme-catalyzed transformation screenings and optimizations, development of analytical methods (GC and HPLC) to measure enzymatic activities and selectivities, copies of chromatograms for chiral analyses, and full characterization of all novel products providing copies of <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT, <sup>19</sup>F NMR, and selected bidimensional experiments (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

Vicente Gotor-Fernández – Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de Oviedo, Oviedo 33006 Asturias, Spain; [vicgotfer@uniovi.es](mailto:vicgotfer@uniovi.es); [orcid.org/0000-0002-9998-0656](https://orcid.org/0000-0002-9998-0656);

Iván Lavandera – Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de Oviedo, Oviedo 33006 Asturias, Spain; [orcid.org/0000-0003-4857-4428](mailto:lavanderaivan@uniovi.es);

### Authors

Sergio González-Granda – Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de Oviedo, Oviedo 33006 Asturias, Spain

Lorena Escot – Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de Oviedo, Oviedo 33006 Asturias, Spain

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscatal.1c05216>

### Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MCI, PID2019-109253RB-I00) is gratefully acknowledged. We thank Prof. Wolfgang Kroulitz (University of Graz, Austria) for providing us with alcohol dehydrogenases overexpressed in *E. coli* cells. S.G.-G. thanks the University of Oviedo for a predoctoral fellowship (PAPI-20-PF-12) inside the "Programa de Apoyo y Promoción de la Investigación".

## ABBREVIATIONS

2-Me-THF, 2-methyltetrahydrofuran; ADH, alcohol dehydrogenase; ee, enantiomeric excess; equiv, equivalent; GC, gas chromatography; 2-PrOH, 2-propanol; KRED, ketoreductase; M, molar; NAD(P)H, nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) in its reduced form

## REFERENCES

- (1) Erian, A. W.; Sherif, S. M.; Gaber, H. M. The Chemistry of  $\alpha$ -Haloketones and Their Utility in Heterocyclic Synthesis. *Molecules* **2003**, *8*, 793–865.
- (2) De Kimppe, N.; Verhé, R. *The Chemistry of  $\alpha$ -Haloketones,  $\alpha$ -Halosaldehydes and  $\alpha$ -Haloamines*; Wiley: New York, 2010.
- (3) Fülöpová, V.; Soral, M. Solid-Phase Synthesis of Heterocycles with  $\alpha$ -Haloketones as the Key Building Blocks. *Synthesis* **2016**, *48*, 3684–3695.
- (4) Guijarro, D.; Yus, M. The Favorskii Rearrangement: Synthetic Applications. *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 1713–1735.
- (5) Cadierno, V. Metal-Catalyzed Hydrofunctionalization Reactions of Haloalkynes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, *2020*, 886–898.
- (6) Beller, M.; Seayad, J.; Tillack, A.; Jiao, H. Catalytic Markovnikov and anti-Markovnikov Functionalization of Alkenes and Alkynes: Recent Developments and Trends. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 3368–3398.
- (7) Alonso, F.; Beletskaya, I. P.; Yus, M. Transition-Metal-Catalyzed Addition of Heteroatom-Hydrogen Bonds to Alkynes. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3079–3159.
- (8) Hintermann, L.; Labonne, A. Catalytic Hydration of Alkynes and Its Application in Synthesis. *Synthesis* **2007**, *2007*, 1121–1150.
- (9) Brenzovich, W. E., Jr. Gold in Total Synthesis: Alkynes as Carbonyl Surrogates. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 8933–8935.
- (10) Goodwin, J. A.; Aponick, A. Regioselectivity in the Au-Catalyzed Hydration and Hydroalkoxylation of Alkynes. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8730–8741.
- (11) Zuccaccia, D.; Del Zotto, A.; Baratta, W. The Pivotal Role of the Counterion in Gold Catalyzed Hydration and Alkoxylation of Alkynes. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *396*, 103–116.
- (12) Ye, M.; Wen, Y.; Li, H.; Fu, Y.; Wang, Q. Metal-Free Hydration of Aromatic Haloalkynes to  $\alpha$ -Halomethyl Ketones. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 4983–4986.
- (13) Zou, H.; Jiang, J.; Yi, N.; Fu, W.; Deng, W.; Xiang, J. Highly Efficient Synthesis of  $\alpha$ -Halomethylketones via Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/Acid Co-Catalyzed Hydration of Alkynes. *Chin. J. Chem.* **2016**, *34*, 1251–1254.
- (14) Zou, H.; He, W.; Dong, Q.; Wang, R.; Yi, N.; Jiang, J.; Pen, D.; He, W. First Catalyzed Hydration of Haloalkynes by a Recyclable Catalytic System. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 116–121.
- (15) Zeng, M.; Huang, R.-X.; Li, W.-Y.; Liu, X.-W.; He, F.-L.; Zhang, Y.-Y.; Xiao, F. In(OTf)<sub>3</sub>/Acid Co-Catalyzed Hydration of 1-Haloalkynes to  $\alpha$ -Halomethyl Ketones. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 3818–3822.
- (16) Park, J.; Yeon, J.; Lee, P. H.; Lee, K. Iron-Catalyzed Indirect Hydration of Alkynes in Presence of Methanesulfonic Acid. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 4414–4417.
- (17) Chen, Z.-W.; Ye, D.-N.; Ye, M.; Zhou, Z.-G.; Li, S.-H.; Liu, L.-X. AgF/TFA-Promoted Highly Efficient Synthesis of  $\alpha$ -Haloketones from Haloalkynes. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 1373–1375.
- (18) Lu, Z.; Li, T.; Mudshinge, S. R.; Xu, B.; Hammond, G. B. Optimization of Catalysts and Conditions in Gold(I) Catalysis-Counterion and Additive Effects. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 8452–8477.
- (19) Leung, C. H.; Baron, M.; Biffis, A. Gold-Catalyzed Intermolecular Alkyne Hydrofunctionalizations—Mechanistic Insights. *Catalysts* **2020**, *10*, 1210.
- (20) Xie, L.; Wu, Y.; Yi, W.; Zhu, L.; Xiang, J.; He, W. Gold-Catalyzed Hydration of Haloalkynes to  $\alpha$ -Halomethyl Ketones. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9190–9195.
- (21) Hu, S.; Liu, D.; Yan, C.; Cai, Y. M. An Efficient Heterogeneous Gold(I)-Catalyzed Hydration of Haloalkynes Leading to  $\alpha$ -Halomethyl Ketones. *Synth. Commun.* **2018**, *48*, 2983–2991.
- (22) Ghosh, N.; Nayak, S.; Prabagar, B.; Sahoo, A. K. Regioselective Hydration of Terminal Halo-Substituted Propargyl Carboxylates by Gold Catalyst: Synthesis of  $\alpha$ -Acetoxy  $\alpha$ -Halo Ketones. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2453–2462.
- (23) Gómez-Herrera, A.; Hashim, I. I.; Porré, M.; Nahra, F.; Cazin, C. S. J. Au(I)-Catalyzed Hydration of 1-Iodoalkynes Leading to  $\alpha$ -Iodoketones. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 6790–6794.
- (24) Starkov, P.; Rota, F.; D'Oyley, J. M.; Sheppard, T. D. Catalytic Electrophilic Halogenation of Silyl-Protected and Terminal Alkynes: Trapping Gold(I) Acetylides vs. a Bronsted Acid-Promoted Reaction. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3217–3224.
- (25) Ye, Q.; Cheng, T.; Zhao, Y.; Zhao, J.; Jin, R.; Liu, G. One-Pot Cascade Hydration-Asymmetric Transfer Hydrogenation as a Practical Strategy to Construct Chiral  $\beta$ -Adrenergic Receptor Blockers. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 1801–1805.
- (26) Xia, X.; Meng, J.; Wu, H.; Cheng, T.; Liu, G. Integration of Multiple Active Sites on Large-Pore Mesoporous Silica for Enantioselective Tandem Reactions. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 1638–1641.
- (27) Johnston, E. V.; Bogár, K.; Bäckvall, J.-E. Enantioselective Synthesis of (R)-Bufuralol via Dynamic Kinetic Resolution in the Key Step. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4596–4599.
- (28) Mangas-Sánchez, J.; Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Malpartida, F.; Gotor, V. Asymmetric Chemoenzymatic Synthesis of Miconazole and Econazole Enantiomers. The Importance of Chirality in Their Biological Evaluation. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2115–2122.
- (29) Lund, I. T.; Bockmann, P. L.; Jacobsen, E. E. Highly Enantioselective CALB-Catalyzed Kinetic Resolution of Building Blocks for  $\beta$ -Blocker Atenolol. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7288–7292.
- (30) Luo, Y.; Chen, Y.; Ma, H.; Tian, Z. H.; Zhang, Y.; Zhang, J. Enhancing the Biocatalytic Manufacture of the Key Intermediate of Atorvastatin by Focused Directed Evolution of Halohydrin Dehalogenase. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42064.
- (31) Xue, F.; Li, C.; Xu, Q. Biocatalytic Approaches for the Synthesis of Optically Pure *vic*-Halohydrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 3411–3421.
- (32) Seisser, B.; Lavandera, I.; Faber, K.; Spelberg, J. H. L.; Kroutil, W. Stereo-Complementary Two-Step Cascades Using a Two-Enzyme System Leading to Enantiopure Epoxides. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1399–1404.
- (33) Schrittwieser, J. H.; Lavandera, I.; Seisser, B.; Mautner, B.; Lutje Spelberg, J. H.; Kroutil, W. Shifting the Equilibrium of a Biocatalytic Cascade Synthesis to Enantiopure Epoxides Using Anion Exchangers. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 483–488.
- (34) Bisogno, F. R.; Cuetos, A.; Orden, A. A.; Kurina-Sanz, M.; Lavandera, I.; Gotor, V. Chemo- and Stereodivergent Preparation of Terminal Epoxides and Bromohydrins through One-Pot Biocatalyzed Reactions: Access to Enantiopure Five- and Six-Membered N-Heterocycles. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1657–1661.
- (35) Borzęcka, W.; Lavandera, I.; Gotor, V. Synthesis of Enantiopure Fluorohydrins Using Alcohol Dehydrogenases at High Substrate Concentrations. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7312–7317.
- (36) Kędziora, K.; Bisogno, F. R.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; Montejo-Bernardo, J.; García-Granda, S.; Kroutil, W.; Gotor, V. Expanding the Scope of Alcohol Dehydrogenases towards Bulkier Substrates: Stereo- and Enantioselective for  $\alpha,\alpha$ -Dihalogenated Ketones. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1066–1072.
- (37) Lavandera, I.; Kern, A.; Resch, V.; Ferreira-Silva, B.; Glieder, A.; Fabian, W. M. F.; de Wildeman, S.; Kroutil, W. One-Way Biohydrogen Transfer for Oxidation of *sec*-Alcohols. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155–2158.
- (38) Bisogno, F. R.; Lavandera, I.; Kroutil, W.; Gotor, V. Tandem Concurrent Processes: One-Pot Single-Catalyst Biohydrogen Transfer for the Simultaneous Preparation of Enantiopure Secondary Alcohols. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1730–1732.
- (39) Bisogno, F. R.; García-Urdiales, E.; Valdés, H.; Lavandera, I.; Kroutil, W.; Suárez, D.; Gotor, V. Ketone-Alcohol Hydrogen-Transfer Equilibria: Is the Biooxidation of Halohydrins Blocked? *Chem.—Eur. J.* **2010**, *16*, 11012–11019.

- (40) Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D.; Gröger, H.; Snajdrova, R.; Iding, H.; Bornscheuer, U. T. Opportunities and Challenges for Combining Chemo- and Biocatalysis. *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12–22.
- (41) Rios-Lombardia, N.; Garcia-Álvarez, J.; González-Sabin, J. One-Pot Combination of Metal- and Bio-Catalysis in Water for the Synthesis of Chiral Molecules. *Catalysts* **2018**, *8*, 75.
- (42) Heuson, E.; Dumeignil, F. The Various Levels of Integration of Chemo- and Bio-Catalysis towards Hybrid Catalysis. *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10*, 7082–7100.
- (43) Doyon, T. L.; Narayan, A. R. H. Synthetic Utility of One-Pot Chemoenzymatic Reaction Sequences. *Synlett* **2020**, *31*, 230–236.
- (44) Huang, X.; Cao, M.; Zhao, H. Integrating Biocatalysis with Chemocatalysis for Selective Transformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 161–170.
- (45) de Gonzalo, G.; Paul, C. E. Recent Trends in Synthetic Enzymatic Cascades Promoted by Alcohol Dehydrogenases. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, *32*, 100548.
- (46) Odachowski, M.; Greaney, M. F.; Turner, N. J. Concurrent Biocatalytic Oxidation and C–C Bond Formation via Gold Catalysis: One-Pot Alkylation of N-Alkyl Tetrahydroisoquinolines. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 10032–10035.
- (47) Asikainen, M.; Krause, R. Tandem Enzyme/Gold-Catalysis: From Racemic  $\alpha$ -Allenic Acetates to Enantiomerically Enriched 2,5-Dihydrofurans in One Pot. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2305–2309.
- (48) Wang, Z. J.; Clary, K. N.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N.; Toste, F. D. A Supramolecular Approach to Combining Enzymatic and Transition Metal Catalysis. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 100–103.
- (49) Rodríguez-Álvarez, M. J.; Rios-Lombardia, N.; Schumacher, S.; Perez-Iglesias, D.; Moris, F.; Cadierno, V.; Garcia-Álvarez, J.; González-Sabin, J. Combination of Metal-Catalyzed Cycloisomerizations and Biocatalysis in Aqueous Media: Asymmetric Construction of Chiral Alcohols, Lactones, and  $\gamma$ -Hydroxy-Carbonyl Compounds. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 7753–7759.
- (50) SchAAF, P.; Gojic, V.; Bayer, T.; Rudroff, F.; Schnurch, M.; Mihovilovic, M. D. Easy Access to Enantiopure (S)- and (R)-Aryl Alkyl Alcohols by a Combination of Gold(III)-Catalyzed Alkyne Hydration and Enzymatic Reduction. *ChemCatChem* **2018**, *10*, 920–924.
- (51) Cortes-Clerget, M.; Akporji, N.; Zhou, J.; Gao, F.; Guo, P.; Parmentier, M.; Gallou, F.; Berthon, J.-Y.; Lipshutz, B. H. Bridging the Gap between Transition Metal- and Bio-Catalysis via Aqueous Micellar Catalysis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2169.
- (52) Mathew, S.; Sagadevan, A.; Renn, D.; Rueping, M. One-Pot Chemoenzymatic Conversion of Alkynes to Chiral Amines. *ACS Catal.* **2021**, *11*, 12565–12569.
- (53) González-Granda, S.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V. Alcohol Dehydrogenases and N-Heterocyclic Carbene Gold(I) Catalysts: Design of a Chemoenzymatic Cascade towards Optically Active  $\beta\beta$ -Disubstituted Allylic Alcohols. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 13945–13951.
- (54) Nicolai, S.; Sedigh-Zadeh, R.; Waser, J. Pd(0)-Catalyzed Alkene Oxy- and Aminoalkylation with Aliphatic Bromoacetylenes. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 3783–3801.
- (55) Liu, C.; Xue, Y.; Ding, L.; Zhang, H.; Yang, F. Au-Catalyzed Addition of Nucleophiles to Chloroalkynes: A Regio- and Stereoselective Synthesis of (Z)-Alkenyl Chlorides. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 6537–6540.
- (56) Pace, V.; Hoyos, P.; Castoldi, L.; Dominguez de María, P.; Alcántara, A. R. 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry. *ChemSusChem* **2012**, *5*, 1369–1379.
- (57) McIntosh, M. L.; Johnston, R. C.; Pattawong, O.; Ashburn, B. O.; Naffziger, M. R.; Cheong, P. H.-Y.; Carter, R. G. Synthesis and Computational Analysis of Densely Functionalized Triazoles Using *o*-Nitrophenylalkynes. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1101–1112.
- (58) Wolberg, M.; Hummel, W.; Wandrey, C.; Müller, M. Highly Regio- and Enantioselective Reduction of 3,5-Dioxocarboxylates. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306–4308.
- (59) Leuchs, S.; Greiner, L. Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*: A Versatile Robust Catalyst for Enantioselective Transformations. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, *25*, 267–281.
- (60) Rodríguez, C.; Borzucka, W.; Sattler, J. H.; Kroutil, W.; Lavandera, I.; Gotor, V. Steric vs. Electronic Effects in the *Lactobacillus brevis* ADH-Catalyzed Bioreduction of Ketones. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 673–681.
- (61) Stampfer, W.; Kosjek, B.; Moitz, C.; Kroutil, W.; Faber, K. Biocatalytic Asymmetric Hydrogen Transfer. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014–1017.
- (62) Paul, C. E.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; Kroutil, W.; Gotor, V. *Escherichia coli*/ADH-A: An All-Inclusive Catalyst for the Selective Biooxidation and Deracemisation of Secondary Alcohols. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3875–3881.
- (63) Edegger, K.; Gruber, C. C.; Poessl, T. M.; Wallner, S. R.; Lavandera, I.; Faber, K.; Niehaus, F.; Eck, J.; Oehrlin, R.; Hafner, A.; Kroutil, W. Biocatalytic Deuterium- and Hydrogen-Transfer Using Over-Expressed ADH-A: Enhanced Stereoselectivity and  $^2\text{H}$ -Labeled Chiral Alcohols. *Chem. Commun.* **2006**, 2402–2404.
- (64) de Gonzalo, G.; Lavandera, I.; Faber, K.; Kroutil, W. Enzymatic Reduction of Ketones in “Micro-aqueous” Media Catalyzed by ADH-A from *Rhodococcus ruber*. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2163–2166.
- (65) de Gonzalo, G.; Lavandera, I.; Durchschein, K.; Wurm, D.; Faber, K.; Kroutil, W. Asymmetric Biocatalytic Reduction of Ketones Using Hydroxyfunctionalised Water-Miscible Ionic Liquids as Solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2541–2546.
- (66) Kędzióra, K.; Diaz-Rodríguez, A.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. Laccase/TEMPO-Mediated System for the Thermodynamically Disfavored Oxidation of 2,2-Dihalo-1-phenylethanol Derivatives. *Green Chem.* **2014**, *16*, 2448–2453.

## Recommended by ACS

### Asymmetric Reductive Amination/Ring-Closing Cascade: Direct Synthesis of Enantioenriched Biaryl-Bridged NH Lactams

Yao Zhang, Qin Yin, et al.

AUGUST 11, 2020  
ORGANIC LETTERSREAD 

### Direct Enantioselective C(sp<sup>3</sup>)-H Acylation for the Synthesis of $\alpha$ -Amino Ketones

Xiaomin Shu, Haohua Huo, et al.

OCTOBER 30, 2020  
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETYREAD 

### Asymmetric Hydrogenation of Oximes Synergistically Assisted by Lewis and Brønsted Acids

Fangyuan Wang, Xumu Zhang, et al.

SEPTEMBER 27, 2022  
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETYREAD 

### TEMPO-Enabled Electrochemical Enantioselective Oxidative Coupling of Secondary Acyclic Amines with Ketones

Zhen-Hua Wang, Tian-Sheng Mei, et al.

SEPTEMBER 17, 2021  
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETYREAD [Get More Suggestions >](#)



## **Capítulo 5**

*Síntesis quimioenzimática de 1,2-aminoalcoholes, 1,2-dioles y 1,2-diaminas derivados de efedrinas mediante la combinación de catalizadores de Au(I) y enzimas*

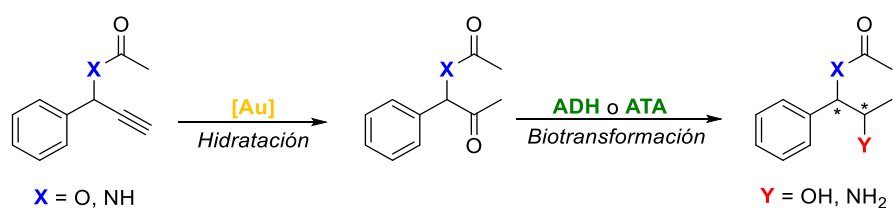




## *Resultados y discusión*



En este capítulo se describe el diseño de distintos procesos en cascada para la síntesis de derivados de norefedrina de tipo 1,2-aminoalcohol, diol y diamina, gracias a la acción de un catalizador NHC de Au(I) en medio acuoso y diferentes enzimas.<sup>362</sup> La metodología propuesta consiste en una primera etapa de hidratación catalizada por Au(I) de un éster o una amida propargílica, de manera que el compuesto de tipo  $\alpha$ -cetoéster o  $\alpha$ -cetoamida generado sea transformado en una segunda etapa por una ADH o una ATA, permitiendo acceder de esta manera a los compuestos deseados (Esquema 81).



**Esquema 81.** Síntesis de derivados de nor(pseudo)efedrina de tipo 1,2-aminoalcohol, diol y diamina mediante procesos en cascada Au(I)-enzima.

Esta Tesis Doctoral se presenta como un compendio de publicaciones, por lo que la numeración de los compuestos, así como la de los esquemas, figuras y tablas, se refieren al trabajo en el que se ha descrito esta investigación, y que se muestra al final de esta sección.

<sup>362</sup> S. González-Granda, G. Steinkellner, K. Gruber, I. Lavandera and V. Gotor-Fernández. *Enviado para su publicación en Nat. Catal.* (Manuscrito ID : 22108036)

## Capítulo 5. Resultados y discusión

### 5.1 Optimización de la reacción de hidratación del éster propargílico **1**

En primer lugar, se realizó el estudio y optimización de la reacción de hidratación catalizada por una especie de Au(I) del éster propargílico racémico **1**. Para ello, el alquino *rac-1* se trató con IPrAuNTf<sub>2</sub> en un medio H<sub>2</sub>O:cosolvente (4:1 v/v), observándose que mediante el empleo de un 2 mol% del catalizador de Au(I), y 2-PrOH o 2-Me-THF como cosolventes de la reacción, a 40 °C, era posible obtener el cetoéster *rac-3* de manera cuantitativa tras 6 horas de reacción (Tabla S1 del material suplementario).

Una vez optimizada la reacción de hidratación del éster propargílico *rac-1*, se realizó, bajo condiciones idénticas de reacción, la hidratación de sus enantiómeros (*S-1* y *R-1*) (obtenidos a través de un simple proceso de resolución cinética de acetilación utilizando una lipasa), con el fin de observar si durante el transcurso de la reacción se producía una pérdida de la información quiral prefijada. Afortunadamente, la reacción de hidratación transcurrió sin observarse descenso alguno de su exceso enantiomérico, permitiendo obtener de esta manera ambos enantiómeros del cetoéster **3** con elevada selectividad (Tabla S2).

### 5.2 Estudio del proceso de biotransaminación del cetoéster **3**

Una vez desarrollada una metodología que permitiera acceder fácilmente al cetoéster **3**, tanto de manera racémica como ópticamente activa, se realizó un estudio del proceso de biotransaminación de este compuesto, empleando para ello en primer lugar su versión racémica. De esta manera, fueron estudiadas treinta y nueve transaminasas, utilizando <sup>i</sup>PrNH<sub>2</sub> o alanina como donadores de amino (Tabla S3). Tras finalizar la reacción enzimática fue necesario realizar un proceso de acetilación química empleando DMAP y anhídrido acético, al observarse diversos subproductos debido a la migración del grupo acetilo. De esta manera fue posible transformar todos estos subproductos en el compuesto diacetilado **5b**, e identificar la *E. coli/CvTA*, y la transaminasa comercial ATA-303 como las mejores enzimas para realizar esta transformación. A pesar de observarse elevadas conversiones y excesos enantioméricos del producto **5b**, la diastereoselectividad obviamente fue muy pobre en todos los casos. La solución a este problema se logró mediante el empleo del compuesto de partida en su forma ópticamente activa.

### 5.3 Diseño y optimización del proceso secuencial para la síntesis del 1,2-aminoalcohol **5b**

Antes de realizar el proceso secuencial que permitiera transformar de manera sencilla el éster propargílico **1** en el compuesto **5b**, se realizó una optimización de la reacción de biotransaminación, estudiando para ello tanto el porcentaje de cosolvente, como la cantidad de enzima y de donador de amina empleados (Tablas S4 y S5).

Una vez realizada esta optimización previa, se diseñó el proceso secuencial para la síntesis de los cuatro isómeros del compuesto **5b**. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la reacción de hidratación de ambos enantiómeros del éster propargílico **1**, empleando IPrAuNTf<sub>2</sub> (2 mol%) y 2-PrOH (10% v/v) como cosolvente. Una vez finalizada la reacción de hidratación, se añadió al medio de reacción la transaminasa correspondiente y la disolución reguladora de pH, conteniendo PLP e isopropilamina. Tras 24 h de reacción a 40 °C, fue posible obtener los cuatro isómeros del compuesto **5b** con conversiones de moderadas a elevadas, y elevadas selectividades (Tablas S6 y S8).

Adicionalmente, se realizó el proceso secuencial a escala semipreparativa (100 mg), permitiendo obtener el compuesto (1*R*,2*S*)-**5b** y el (1*R*,2*R*)-**5b** con un 79 y un 85% de rendimiento aislado, respectivamente, tras columna cromatográfica.

### 5.4 Estudio del proceso de biorreducción del cetoester **3**

Una vez diseñado y optimizado el proceso secuencial para la síntesis de los cuatro diastereoisómeros del compuesto **5b**, el siguiente paso fue la síntesis de los derivados de tipo diol **6b**. Para ello, en primer lugar, se realizó el estudio del proceso de biorreducción del cetoester *rac*-**3**. De esta manera se estudiaron 26 ADHs, observándose el mismo problema de formación de subproductos debido a la migración del grupo acetilo. Nuevamente, tras realizar el proceso de acetilación empleando DMAP y anhídrido acético tras finalizar la reacción enzimática, se consiguió identificar la *E. coli*/ADH-A, la *E. coli*/ADH-T y la enzima comercial evo-1.1.200 como las mejores para catalizar esta transformación de manera estereocomplementaria. El uso de estas enzimas permitió obtener con elevadas conversiones y excesos enantioméricos el compuesto **6b**, sin embargo, las

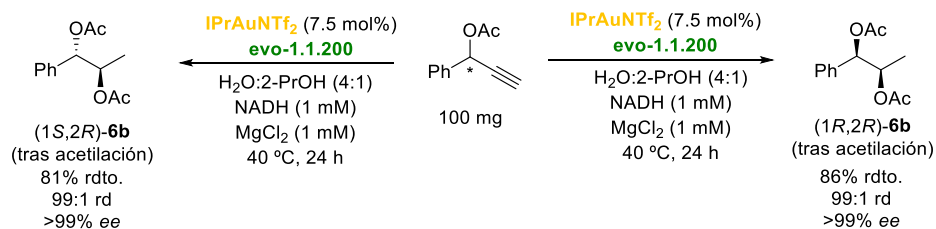
## Capítulo 5. Resultados y discusión

diastereoselectivades fueron nuevamente muy pobres (Tabla S9). Con el fin de solventar esta limitación, se estudió la posible influencia de la temperatura y el pH del medio de reacción en la diastereoselectividad del proceso, sin embargo, no se obtuvo mejora alguna (Tabla S10), por lo que nuevamente se optó por emplear el sustrato de partida en su forma enantiopura.

### 5.5 Diseño y optimización del proceso en cascada concurrente para la síntesis del diol **6b**

Gracias a la experiencia previa de nuestro grupo de investigación en el diseño de procesos en cascada concurrente combinando especies de Au(I) y enzimas, se optimizó un proceso en cascada para la síntesis de los cuatro diastereoisómeros del diol **6b**. Para ello, el éster propargílico **1** en sus formas enantiopuras *S* o *R*, se disolvió en un medio H<sub>2</sub>O:2-PrOH (4:1 v/v), y se adicionó IPrAuNTf<sub>2</sub> (7.5 mol%), la ADH correspondiente y el cofactor pirimidínico NADH. Tras 24 h a 45 °C, se lograron obtener los cuatro isómeros del compuesto **6b** con conversiones de buenas a elevadas, y elevadas selectividades (Tablas S12).

Con el fin de demostrar la aplicabilidad de la metodología propuesta, se realizó el proceso en cascada concurrente a escala semipreparativa (100 mg). Empleando una aproximación similar, fue posible obtener el diéster (1*S*,2*R*)-**6b** y (1*R*,2*R*)-**6b** con un 81 y un 86% de rendimiento aislado, respectivamente, tras columna cromatográfica (Esquema 82).



**Esquema 82.** Proceso en cascada a escala semipreparativa para la síntesis de los diastereoisómeros (1*S*,2*R*)-**6b** y (1*R*,2*R*)-**6b**.

### 5.6 Optimización de la reacción de hidratación de la amida propargílica **2**

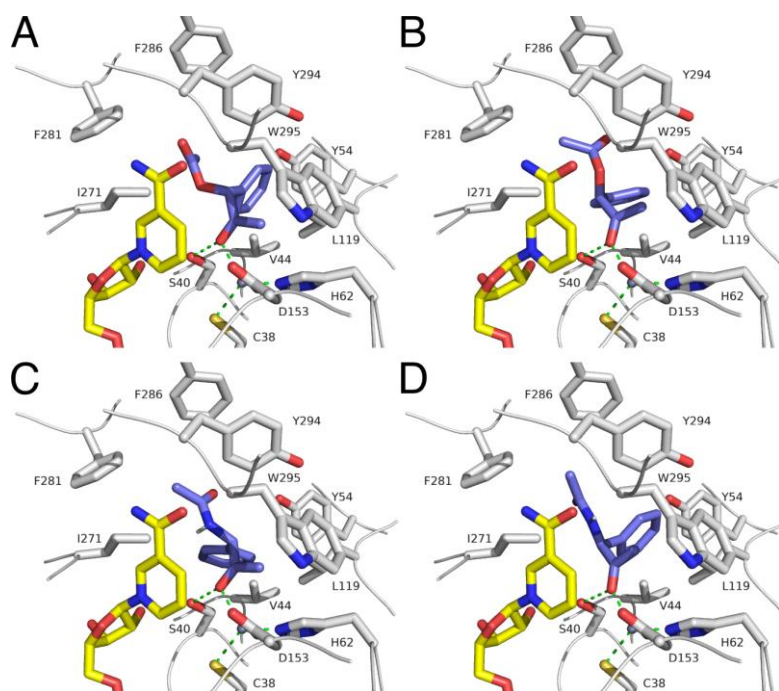
Una vez optimizada la síntesis de los derivados de nor(pseudo)efedrina de tipo 1,2-aminoalcohol y 1,2-diol, el siguiente paso fue la síntesis de los derivados de tipo 1,2-aminoalcohol complementarios y 1,2-diamina. Para ello, en primer lugar, se realizó el estudio de la reacción de hidratación catalizada por IPrAuNTf<sub>2</sub> de la amida propargílica *rac-2*. Empleando las condiciones de reacción previamente optimizadas para la hidratación del éster *rac-1*, tan solo fue posible obtener una conversión del 15% (Tabla S14). Este importante descenso en la conversión obtenida fue debido a un problema de solubilidad del sustrato en el medio de reacción, sin embargo, al sustituir el 2-PrOH empleado como cosolvente por 2-Me-THF (10% v/v), se logró obtener la cetoamida *rac-4* con conversión completa y un rendimiento aislado del 87% tras columna cromatográfica.

### 5.7 Estudio del proceso de biorreducción de la cetoamida **4**

Una vez optimizada la reacción de hidratación de la cetoamida *rac-4*, se realizó un estudio de veintisiete ADHs con el fin de identificar cuales eran capaces de catalizar la biorreducción de este compuesto. En este caso, tras finalizar la reacción enzimática no se observó migración alguna del grupo acetilo, debido a la mayor estabilidad de la amida frente al éster. Desafortunadamente, tan solo se observó conversión para los casos de la *E. coli*/ADH-A y de la evo-1.1.200 (19 y 40%, respectivamente, Tabla S15). En el caso de la evo-1.1.200 se logró obtener además el compuesto *anti-4* con elevada enantio y diastereoselectividad.

Con motivo de los modestos resultados obtenidos en el estudio de la reacción de biorreducción en comparación con el cetoéster *rac-3*, se realizaron experimentos de *docking* con la ADH-A con el fin de buscar una explicación a este hecho (Figura 18). Desafortunadamente los experimentos de *docking* realizados no consiguieron dar una razón clara acerca de la diferencia de reactividad entre los compuestos **3** y **4** al emplear la ADH-A como catalizador. Sin embargo, gracias a estos estudios se corroboró la configuración del centro quiral obtenido con la ADH-A, que resultó ser el enantiómero *S*.

## Capítulo 5. Resultados y discusión



**Figura 18.** Interacción entre los compuestos (*R*)-**3** (A), (*S*)-**3** (B), (*R*)-**4** (C), y (*S*)-**4** (D) y el centro activo de la ADH-A. En azul oscuro se muestra el compuesto de partida, en amarillo el cofactor NADH, y los aminoácidos claves en blanco. Figuras generadas empleando el programa PyMOL.

Debido a la elevada diastereoselectividad observada en la reacción enzimática con el sustrato racémico **4**, se incubó la cetoamida (*S*)-**4** (obtenido a través de un proceso de resolución cinética de acilación con una lipasa) en disoluciones tampón de diferentes pHs con el fin de observar si este compuesto estaba racemizando en el medio de reacción. Tras observar los resultados obtenidos (Tabla S16), se pudo constatar la racemización del sustrato de partida a pHs comprendidos entre 7.5 y 9.5, de manera que tras incubar el sustrato (*S*)-**4** a pH 9.5, tras tan solo 1 h, se produjo la pérdida total de la información quiral, recuperando el compuesto *rac*-**4**. Debido a ello, fue posible diseñar un proceso de DKR partiendo del sustrato de partida en su forma racémica.



### 5.8 Diseño de un proceso secuencial para la síntesis del 1,2-aminoalcohol (1*S*,2*R*)-**7a**

Una vez observado que simplemente modulando el pH del medio de reacción se conseguía racemizar a la  $\alpha$ -cetoamida **4**, el siguiente paso fue el diseño y optimización de un proceso secuencial que permitiera transformar la amida propargílica *rac*-**2** en el compuesto **7a**. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la reacción de hidratación del derivado *rac*-**2** empleando IPrAuNTf<sub>2</sub> (2 mol%) como catalizador y 2-Me-THF como cosolvente (10% v/v). Tras 6 h a 45 °C, se adicionó una disolución tampón de pH 8.5, 2-PrOH, NADH y la enzima evo-1.1.200. Esta nueva etapa se mantuvo durante 48 h a 30 °C, de manera que se logró obtener la hidroxiamida (1*S*,2*R*)-**7a** con una conversión del 67% y una elevada selectividad (Tabla 4). Adicionalmente se realizó el proceso secuencial propuesto en condiciones dinámicas para la síntesis de (1*S*,2*R*)-**7a** a una escala semipreparativa de 64 mg, obteniéndose el compuesto deseado con un rendimiento aislado del 57% tras columna cromatográfica.

### 5.9 Estudio del proceso de biotransaminación de la cetoamida **4**

Con el fin de desarrollar una metodología que permitiera obtener derivados de tipo 1,2-diamina de nor(pseudo)efedrina, en primer lugar, se llevó a cabo un estudio de la reacción de biotransaminación de la cetoamida *rac*-**4**. Para ello se emplearon treinta y tres transaminasas diferentes, observándose que tan solo cuatro de ellas (ATA-412, ATA-025, ATA-024, y ATA-033) eran capaces de catalizar esta transformación con elevadas conversiones y selectividades (Tabla S19). Es necesario destacar que, nuevamente en este caso, tras finalizar la reacción enzimática fue necesario acetilar químicamente los crudos obtenidos debido a la formación de varios subproductos formados tras la migración del grupo acetilo.

### 5.10 Diseño y estudio del proceso secuencial para la síntesis de (1*S*,2*R*)-**8b**

Una vez identificadas las ATAs que producían la transformación deseada, se eligió la ATA-033 como la ideal debido a que dio lugar a los mejores valores de conversión y selectividad (Tabla S20). Posteriormente, se diseñó y optimizó un proceso secuencial en condiciones dinámicas para la síntesis de la diamida **8b**. Para

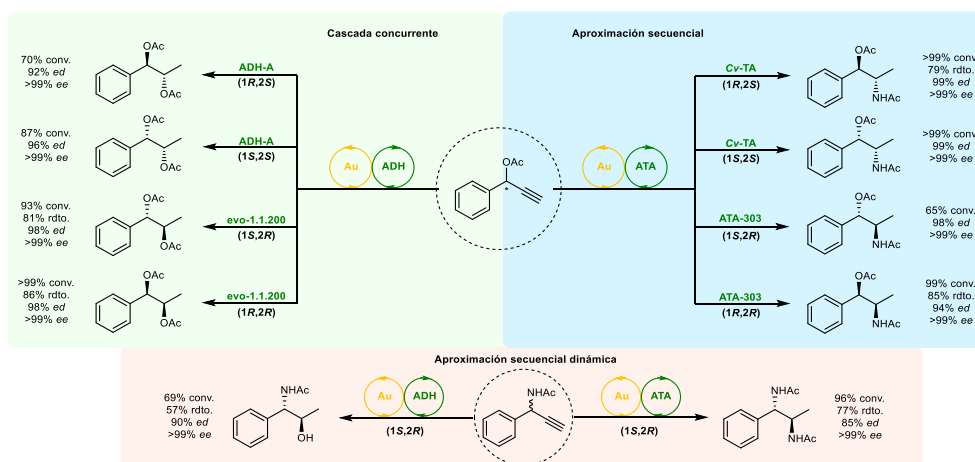
## Capítulo 5. Resultados y discusión

ello, se realizó la reacción de hidratación de la amida propargílica *rac*-**2**, y tras 6 h, se adicionó al medio de reacción la transaminasa ATA-033, una disolución tampón de pH 9.5, el donador de amina y PLP. De esta manera, y tras un proceso de acetilación química, fue posible obtener tras 24 h a 45 °C, el compuesto (1*S*,2*R*)-**8b** con elevada conversión y selectividad (Tabla 4). Cuando la reacción se realizó a una escala de 64 mg del sustrato de partida, se consiguió obtener el compuesto deseado con un 77% de rendimiento aislado tras columna cromatográfica, con un elevado exceso enantiomérico y una buena diastereoselectividad (85:15).

Para finalizar este capítulo se puede concluir que se ha:

- Diseñado una metodología sencilla que permitió llevar a cabo la hidratación de ésteres y amidas propargílicas empleando IPrAuNTf<sub>2</sub> como catalizador en condiciones suaves de reacción.
- Estudiado distintas biotransformaciones sobre el cetoéster **3** y la cetoamida **4** empleando ADHs y ATAs para obtener compuestos derivados de las norefedrinas con elevadas selectividades.
- Desarrollado un proceso secuencial para la síntesis de derivados de nor(pseudo)efedrina empleando IPrAuNTf<sub>2</sub> y ATAs, de manera que ha sido posible obtener los cuatro diastereoisómeros del compuesto deseado con conversiones de moderadas a elevadas, y elevadas selectividades (Figura 19).
- Diseñado un proceso en cascada concurrente combinando IPrAuNTf<sub>2</sub> y ADHs para la síntesis de los cuatro isómeros de los derivados de tipo 1,2-diol.
- Desarrollado dos procesos secuenciales para la síntesis de los derivados de tipo 1,2-aminoalcohol y 1,2-diamina, mediante una estrategia que combinó la reacción de hidratación de amidas propargílicas y un proceso de DKR catalizado por ADHs o ATAs.

## Capítulo 5. Resultados y discusión



**Figura 19.** Compuestos obtenidos mediante las metodologías propuestas en este capítulo.



*Artículo de investigación*



1 Gold and biocatalysis for the stereodivergent  
2 synthesis of nor(pseudo)ephedrine derivatives:  
3 Cascade design toward amino alcohols, diols, and  
4 diamines

5 *Sergio González-Granda,<sup>a</sup> Georg Steinkellner,<sup>b</sup> Karl Gruber,<sup>b</sup> Iván Lavandera<sup>a,\*</sup> and Vicente*  
6 *Gotor-Fernández<sup>a,\*</sup>*

7 <sup>a</sup> Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de Oviedo, Avenida Julián Clavería  
8 8, 33006 Oviedo, Asturias (Spain)

9 <sup>b</sup> Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, Humboldtstraße 50/3, 8010 Graz  
10 (Austria)

11 E-mail corresponding authors: [lavanderaivan@uniovi.es](mailto:lavanderaivan@uniovi.es) (I.L.); [vicgotfer@uniovi.es](mailto:vicgotfer@uniovi.es) (V.G.-F.)

12

13 **KEYWORDS.** Amino alcohols, Diols, Diamines, Bioreduction, Biotransamination, Enzymes,  
14 Norephedrine, Gold catalysis, Hydration.

15

16 **ABSTRACT**

17 The combination of gold(I) and enzyme catalysis has provided access to a series of  
18 nor(pseudo)ephedrine derivatives in a regio- and stereoselective manner. The approach involves  
19 developing IPrAuNTf<sub>2</sub>-catalyzed hydration of 1-phenylprop-2-yn-1-yl acetate or *N*-(1-

20 phenylprop-2-yn-1-yl)acetamide, followed by (dynamic) asymmetric biotransamination or  
21 bioreduction of the corresponding keto ester or keto amide intermediates. Enzyme actions were  
22 completely selective towards modifying the methyl ketones in a highly stereoselective manner,  
23 allowing the synthesis of enantio- and diastereomerically enriched products using either racemic  
24 or optically active starting materials. Thus, a series of amino alcohol, diol, and diamine derivatives  
25 were produced from propargyl esters or amides, the biocatalyst of choice determining the  
26 (stereo)selectivity of the overall cascade process and providing access to nor(pseudo)ephedrine  
27 compounds in a straightforward manner.

28

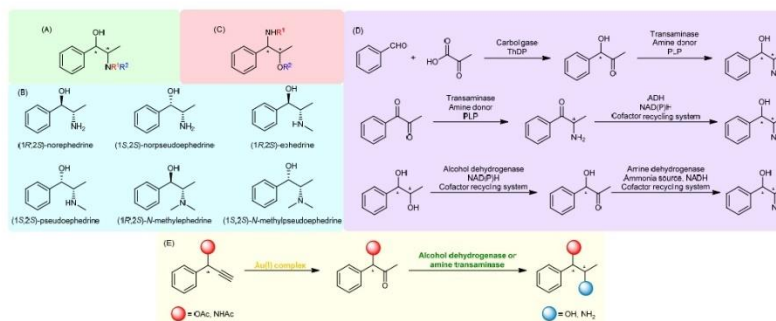
## 29 INTRODUCTION

30 Alkaloids are naturally occurring chemical compounds produced by a large variety of organisms  
31 such as animals, bacteria, fungi, or plants, most of which display remarkable pharmacological  
32 activities<sup>1-3</sup>. The presence of at least a nitrogen atom with a basic character was included in the  
33 original definition of the alkaloid term. However, more recently, the neutral or even weakly acidic  
34 character of this chemical motif has also been considered when classifying other families of  
35 nitrogen-containing secondary metabolites. Another important structural key element is their  
36 chirality; the presence of one or more stereogenic centers determines the biological response of  
37 this family of compounds.

38 Isolation from crude extracts of natural sources is the preferred strategy to obtain alkaloids.  
39 However, the chemical syntheses of many of them have also been achieved even on an industrial  
40 scale. Remarkably, the use of enzymes for their asymmetric synthesis has been gaining major  
41 attention in recent years<sup>4</sup>, with various enzyme families providing straightforward access by means  
42 of stepwise chemoenzymatic strategies or multienzymatic cascades<sup>5-7</sup>.



43 Ephedrine-type alkaloids, also known as phenylpropylamino alkaloids (Fig. 1A), constitute a  
 44 representative family of these naturally nitrogen-containing compounds, which can mimic the  
 45 action of adrenaline, therefore finding multiple applications in medicinal chemistry (anesthesia,  
 46 bronchial dilation, nasal congestion...). In addition, ephedra constituents have served as valuable  
 47 building blocks and chiral auxiliaries with remarkable applications in stereoselective synthesis<sup>8,9</sup>.  
 48 Importantly, the absolute configuration of their stereogenic centers and the substituents present in  
 49 key residues determine their biological profiles<sup>10</sup>, including in this ephedrine alkaloid family  
 50 (1*R*,2*S*)-norephedrine, (1*S*,2*S*)-norpseudoephedrine, (1*R*,2*S*)-ephedrine, (1*S*,2*S*)-pseudoephedrine,  
 51 (1*R*,2*S*)-*N*-methylephedrine and (1*S*,2*S*)-*N*-methylpseudoephedrine, among others (Fig. 1B). In  
 52 addition, the position of the nitrogen and oxygen atoms is another engineering vector, with the 1-  
 53 amino-1-arylpropan-2-ol family being useful building blocks in organic synthesis as occurs with  
 54 other 1,2-amino alcohol families (Fig. 1C).



55  
 56 **Fig. 1.** Ephedrine-type alkaloids: (A) General structure; (B) Representative examples; (C) General  
 57 structure of related 1-amino-1-phenylpropan-2-ols; (D) Reported multienzymatic cascades  
 58 towards ephedrine derivatives; (E) Gold(I)-ADH cascade approach proposed in this contribution.  
 59

60 In this context, the use of multienzymatic cascades provides access to a wide number of products,  
61 highlighting the stereoselective action of alcohol dehydrogenases (ADHs), carbonylases, amine  
62 transaminases (ATAs), and imine reductases to produce optically active amino alcohols<sup>5</sup>. Few  
63 research groups have been especially active in this field, reporting stereocontrolled domino  
64 reactions combining the use of ATAs either with ADHs or carbonylases to prepare all four possible  
65 diastereoisomers of nor(pseudo)ephedrine (Fig. 1D, first and second reactions)<sup>11-14</sup>. More recently,  
66 Multi and co-workers have demonstrated the efficient combination of the regioselective diol  
67 oxidation of one of the hydroxyl groups and the formation of the corresponding chiral amino  
68 alcohols using either amine dehydrogenases<sup>15</sup> or ATAs (Fig. 1D, third reaction)<sup>16</sup>. In general, these  
69 strategies are developed sequentially to avoid simultaneous enzyme inactivation for both steps and  
70 are usually conducted at low substrate concentrations (up to 50 mM).

71 The combination of transition metal catalysis and biotransformations has opened a myriad of  
72 possibilities, expanding the repertoire of the synthetic chemist, especially in the last decade due to  
73 the synergy between both technologies under similar reaction conditions<sup>17-21</sup>. In this context, gold  
74 species have emerged as ideal catalysts of cycloisomerization, hydration, and rearrangement  
75 reactions in an aqueous medium, which can be successfully coupled with the action of  
76 stereoselective lipases<sup>22,23</sup>, ADHs<sup>23-28</sup>, ATAs<sup>29,30</sup>, and amine dehydrogenases<sup>31</sup> to produce chiral  
77 furans, alcohols, and amines. Herein, we present our latest results to expand the cooperative action  
78 between gold complexes and enzymes for the synthesis of nor(pseudo)ephedrine derivatives  
79 through concurrent catalysis. Initially, we will look for adequate conditions to merge gold(I) N-  
80 heterocyclic carbenes (NHC) with ATAs to expand later the potential of this chemoenzymatic  
81 approach to using ADHs (Fig. 1E). The possibility to work at least at 100 mM substrate  
82 concentration for the hydration step, the simple scalability of the processes, and starting from

83 easily accessible propargylic amides or esters in both racemic and enantiopure forms, will pave  
84 the way to design (dynamic) regio- and stereodivergent processes in an efficient manner.

85

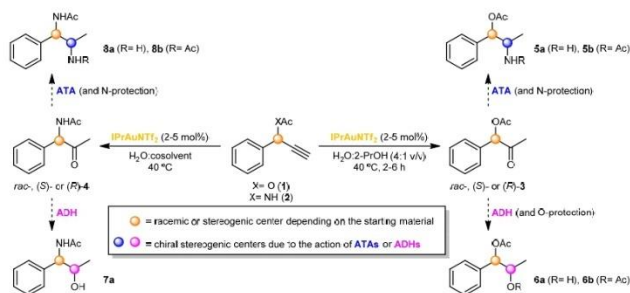
## 86 **RESULTS**

### 87 **Gold-catalyzed hydration of propargylic ester **1** and amide **2****

88 Gold species are powerful catalysts for the electrophilic activation of alkynes towards a broad  
89 family of nucleophiles<sup>32-34</sup>, the hydration of propargylic derivatives representing a straightforward  
90 reaction to prepare carbonyl compounds that are ideal substrates for enzymes in the quest for novel  
91 optically active derivatives. Herein, we ambition the gold-catalyzed hydration of 1-phenylprop-2-  
92 yn-1-yl acetate (**1**) and *N*-(1-phenylprop-2-yn-1-yl)acetamide (**2**) to obtain 2-oxo-1-phenylpropyl  
93 acetate (**3**) and *N*-(2-oxo-1-phenylpropyl)acetamide (**4**), respectively, opening a wide range of  
94 possibilities for the regio- and stereodivergent synthesis of nor(pseudo)ephedrine derivatives by  
95 using ADHs or ATAs in a cascade manner (Fig. 1E).

96 To develop a regioselective access towards ketone derivatives **3** and **4**, the gold(I) *N*-heterocyclic  
97 carbene complex [1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazole-2-  
98 ylidene][bis(trifluoromethanesulfonyl)imide] gold(I) (IPrAuNTf<sub>2</sub>) was selected as catalyst for the  
99 hydration of propargylic acetate **1** and acetamide **2** (Fig. 2). Initial reaction conditions involved  
100 the use of propan-2-ol (2-PrOH) as organic cosolvent but also as hydrogen donor in the subsequent  
101 ADH-catalyzed bioreduction step for cofactor recycling purposes and a compromise temperature  
102 of 40 °C since both gold(I) and enzyme can be simultaneously active under these conditions<sup>27,28</sup>.  
103 Interestingly, the amount of IPrAuNTf<sub>2</sub> could be reduced to 2 mol% for the synthesis of racemic  
104 keto ester **3** in quantitative conversion after 6 h (see Table S1 in the ESI for a complete study of  
105 the catalyst loading and reaction times), expanding the potential of gold(I) catalysis previously

106 disclosed using other gold(I) species<sup>35-39</sup>. Remarkably, under identical conditions, the hydration of  
 107 enantiopure (*R*)- or (*S*)-**1**, obtained after lipase-catalyzed enantioselective acetylation of the  
 108 propargylic alcohol precursor, occurred without any loss of optical activity (see Table S2), thus  
 109 obtaining enantiopure (*S*)- and (*R*)-**3** and opening the possibility to obtain (nor)ephedrine  
 110 derivatives with two stereogenic centers.



111

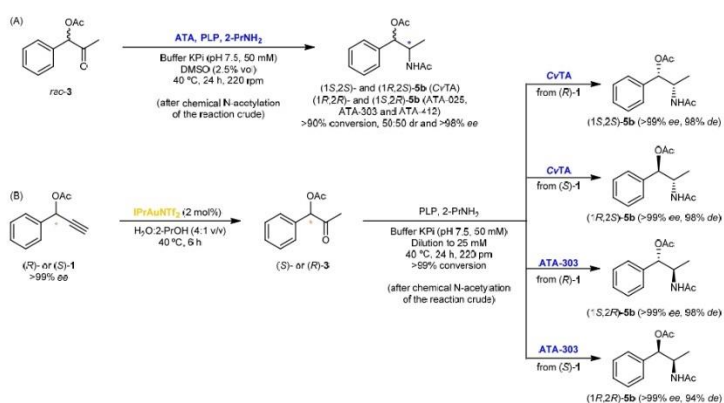
112 **Fig. 2.** IPrAuNTf<sub>2</sub>-catalyzed hydration of propargylic ester **1** and amide **2** (continuous arrows) and  
 113 subsequent asymmetric enzymatic reactions (dashed arrows).

114

115 **Development of a chemoenzymatic hydration-biotransamination sequence towards amido**  
 116 **esters 5b**

117 A total of 37 ATAs were screened with keto ester *rac*-**3** to prepare amino ester **5a** in a highly  
 118 stereoselective manner using either alanine enantiomers (Ala) or isopropylamine (2-PrNH<sub>2</sub>) as  
 119 amine donors (see Table S3). The use of ATAs with 2-PrNH<sub>2</sub> provided a number of enzyme  
 120 candidates to attempt the gold-ATA cascade strategy; for instance, the one from *Chromobacterium*  
 121 *violaceum* (*E. coli*/CvTA) provided (after chemical acetylation) an equimolecular mixture of *syn*-  
 122 (*1S,2S*) and *anti*-(*1R,2S*)-**5b** diastereoisomers in enantiopure form, while the commercial ATA-

123 025, ATA-303, and ATA-412 led to the stereocomplementary antipodes [*syn*-(1*R*,2*R*) and *anti*-  
 124 (1*S*,2*R*)-5b] with the same ratio and conversions over 90% (Fig. 3A). It was observed that no  
 125 racemization occurred at the benzylic position under these mild reaction conditions.



126  
 127 **Fig. 3.** (A) ATA screening for the biotransamination of racemic keto ester **3**, and (B) IPrAuNTf<sub>2</sub>-  
 128 ATA sequential cascade from enantiopure (*R*)- or (*S*)-**1** for the stereodivergent syntheses of  
 129 nor(pseudo)ephedrine derivatives **5b**.

130  
 131 (*S*)-Selective CvTA and (*R*)-selective ATA-303 were selected as suitable candidates for the  
 132 gold(I)-ATA cascades to produce all possible diastereoisomers of amino ester **5a**. Before  
 133 developing them, as depicted in Fig. 3B, biotransamination reaction conditions were optimized  
 134 (Tables S4 and S5 for CvTA, and Table S7 for ATA-303), considering the influence of the  
 135 cosolvent percentage (10-20% vol of 2-PrOH), enzyme loading (1.5-38 mg of CvTA for 0.05 mmol  
 136 of **3**) and the amine donor concentration (50-1000 mM of 2-PrNH<sub>2</sub>). This strategy allowed us to  
 137 produce all four possible enantiopure diacetylated 1,2-amino alcohols **5b** after chemical protection

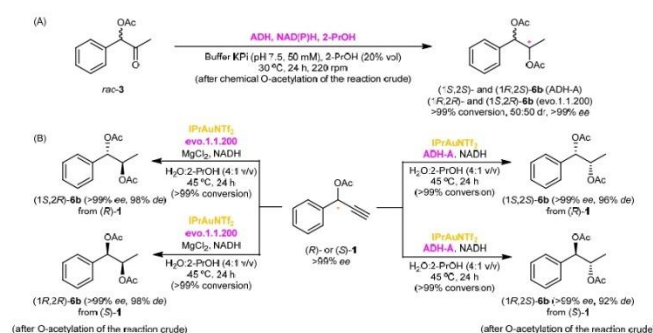
138 of the intermediate **5a**, to simplify the analytical measurement of the final mixture obtained due to  
139 the intra- and intermolecular migration of the acetyl group from the ester to the amino group.  
140 The cascade approach was developed sequentially, performing the hydration step of acetate  
141 enantiomer (*R*)- or (*S*)-**1** (100 mM) for 6 h at 40 °C<sup>40</sup>, while for the biotransamination of  
142 enantiopure keto ester intermediate **3**, its dilution to 25 mM was necessary for the quantitative  
143 conversion into enantiopure **5b** after chemical acetylation (Fig. 3B and Tables S6 and S8).  
144 This procedure was successfully performed on a preparative scale (100 mg) from (*S*)-**1** to isolate  
145 (*1R,2S*)-**5b** and (*1R,2R*)-**5b** in 79 and 85% isolated yield, respectively, after liquid-liquid extraction  
146 and column chromatography. The assignment of the absolute configuration of all diastereoisomers  
147 was performed based on the selectivity of CAL-B towards the preferential acetylation of the (*R*)-  
148 enantiomer<sup>41</sup>, while for the second stereocenter, <sup>1</sup>H-NMR analysis of the reaction crudes allowed  
149 to unequivocally assign the stereochemistry of the so-obtained compounds.

150

#### 151 **Development of a hydration-bioreduction cascade towards diesters **6b****

152 The possibility of achieving all possible diastereoisomers of **5b** encouraged us to propose a  
153 complementary approach towards diacetylated diol **6b**, in this case, replacing the ATA-catalyzed  
154 biotransamination step with an ADH-catalyzed bioreduction. Therefore, 26 ADHs were screened  
155 towards the reduction of keto ester **3** (Table S9), finding 4 suitable enzymes to obtain the *syn*- and  
156 *anti*-**6b** diester diastereoisomers after chemical acetylation), which were (*S*)-selective *E.*  
157 *coli*/ADH-T, *E. coli*/ADH-A, and commercial KRED-P1-A12, while to access the opposite  
158 enantiomer, commercial evo.1.1.200 was required (Fig. 4A). After optimization of the reaction  
159 conditions in terms of pH and temperature, it was observed that for ADH-T, pH 9.0 and 40 °C  
160 were necessary to attain a quantitative conversion, while for ADH-A, the use of 45 °C at pH 7.5

161 was sufficient to furnish an equimolar mixture of both *syn* and *anti*-diastereoisomers of diester  
 162 **6b**, obtained after chemical O-acetylation, with total enantioselectivity (Table S10).



163  
 164 **Fig. 4.** (A) ADH screening with *rac-3*, and (B) IPrAuNTf<sub>2</sub>-ADH cascade for the stereodivergent  
 165 syntheses of nor(pseudo)ephedrine diester analogs **6b** starting from (*R*)- or (*S*)-**1**.

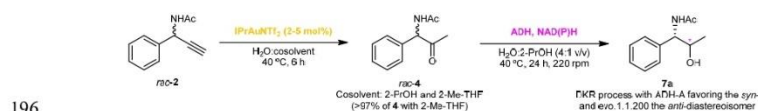
166  
 167 At this point, the overall gold(I)-ADH cascade was attempted to produce the four diastereoisomers  
 168 in full conversion, starting from the corresponding enantiopure propargyl ester (*S*)- and (*R*)-**1**.  
 169 Optimization of the reaction conditions in terms of substrate concentration, IPrAuNTf<sub>2</sub> and ADH  
 170 loading, shaking type, reaction vessel, temperature, and reaction time led to the successful  
 171 achievement of the overall cascade process for the (*S*)-selective ADH-A (Tables S11 and S12) and  
 172 (*R*)-selective evo.1.1.200 (Table S13). Remarkably, the concurrent stereodivergent approach  
 173 adding all the reagents from the beginning was achieved, without modification of the reaction  
 174 conditions along the multicyclic strategy, in contrast to the previous sequential gold(I)-ATA  
 175 cascade (Fig. 4B). Semipreparative transformations at a 100 mg substrate scale were demonstrated  
 176 to obtain enantio- and diastereomerically pure **6b**, yielding the (1*S*,2*R*)-diastereoisomer in 93%  
 177 conversion (81% isolated yield) and the (1*R*,2*R*) isomer in quantitative conversion (86% isolated

178 yield) after 24 h at 40 °C, and purification by column chromatography. Absolute configurations  
179 were assigned by comparison with the optical rotation values and HPLC retention times detailed  
180 in the literature using other alternative synthetic strategies<sup>42,43</sup>.

181

### 182 Propargylic acetamide **2** as substrate for chemoenzymatic cascades

183 Once the versatility of racemic and enantiopure forms of propargyl acetate **1** was demonstrated for  
184 synthesizing amino alcohol and diol ephedrine derivatives, the next step was to explore the  
185 possibility of employing propargyl acetamide **2** for the preparation of structural amino alcohol  
186 regioisomers and diamine derivatives. Compared to the gold-catalyzed hydration of esters, the  
187 transformation over N-protected amines has been unexplored, with the use of amides currently  
188 remaining a challenge<sup>44</sup>. Therefore, the IPrAuNTf<sub>2</sub>-catalyzed hydration of racemic amide **2** (100  
189 mM) was studied in water using different catalyst loadings (2-5 mol%) and organic cosolvents (2-  
190 PrOH and 2-Me-THF, Fig. 5A and Table S14). As expected, the amount of catalyst allowed to  
191 increase the conversion when using 2-PrOH (15-43%), although far from being synthetically  
192 useful due to the low solubility of the amide in this cosolvent. However, adding 2-Me-THF highly  
193 improved the solubility of **2** and, therefore, the conversion, being quantitative at 10% vol after 6 h  
194 at 40 °C, and allowing to recover the racemic keto amide **4** in 87% yield after extraction and  
195 chromatography purification on a 2 mmol-substrate scale.



197 **Fig. 5.** Optimization of the gold-ADH cascade from propargylic amide **2**: A) IPrAuNTf<sub>2</sub>-catalyzed  
198 hydration of *rac*-**2**; and B) ADH-catalyzed dynamic asymmetric reduction of keto amide *rac*-**4**.

199



200 In this case, the bioreduction using 26 ADHs was not as successful as the one achieved for the  
201 keto ester **3** since only ADH-A and evo.1.1.200 were active under standard conditions (19% and  
202 40%, respectively, Table S15), although gratifyingly with outstanding stereoselection, the *syn*-  
203 diastereoisomer being favored for ADH-A (75:25) and the *anti*-isomer for evo.1.1.200 (3:97).

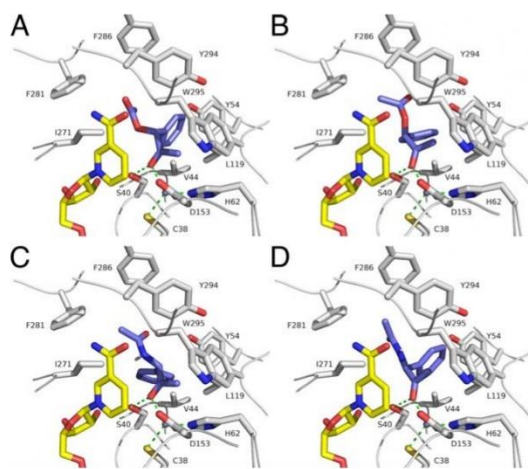
204

#### 205 **Docking studies**

206 We docked compounds **3** and **4** – both enantiomers in each case – into the structure of ADH-A  
207 from *Rhodococcus ruber*<sup>45</sup> using the program AutoDock-Vina<sup>46,47</sup> and the Catalobase platform  
208 (www.innophore.com). For both compounds, the calculations predicted the lowest energy binding  
209 modes to have the carbonyl oxygen atom of the ester or amide moiety bound to the active site zinc,  
210 thereby precluding the reduction of the keto-group. Arguably productive binding modes with the  
211 keto group attached to the metal ion (Fig. 6) had slightly less favorable binding energies. However,  
212 these values were at most 0.7 kcal/mol above the minimum.

213 In addition to the coordination to zinc, the carbonyl oxygen was hydrogen bonded to Ser-40 in  
214 these structures. The methyl group was located near the indole ring of Trp-295. This amino acid  
215 residue restricts the available space in this active site region and rules out the binding of substrates  
216 with larger substituents. On the other hand, the bulkier phenyl ring occupied a larger pocket created  
217 by residues Phe-43, Val-44, Met-47, Tyr-54, and Leu-119. The ester and amide groups pointed  
218 towards residues Ile-271, Phe-281, Phe-286, and Tyr-294. The distances between the C4 atom of  
219 the nicotinamide and the carbonyl carbon atom of the substrate ranged from 3.1 to 3.4 Å, which  
220 was well compatible with hydride transfer to the ketone *Re*-face. The resulting *S*-configuration of  
221 the secondary alcohols was consistent with the experimentally determined stereoselectivity of the  
222 enzyme. Regarding the distinction between both ketone enantiomers by the enzyme, the docking

223 calculations did not provide any clear differences since reasonable binding modes with comparable  
224 binding energies were obtained for both enantiomers of compound **3** (Fig. 6A and 6B), which is  
225 consistent with the good activities found for both enantiomers. However, the inability of ADH-A  
226 to convert amide **4** could unfortunately not readily be explained by these binding modes (Fig. 6C  
227 and 6D). Also, the Gibbs free energies for the isodesmic transformations between the 2-  
228 propanol/acetone and the alcohol/ketone counterpart were studied to check if the different  
229 reactivity of ketones **3** and **4** could be attributed to the thermodynamics of the reactions. Still, in  
230 aqueous solution and the gas phase, the free energy differences estimated for all these processes  
231 indicated a thermodynamically favored reduction of both ketone substrates (Section XXVI in the  
232 ESI).



233  
234 **Fig. 6.** Predicted binding modes of (*R*)-**3** (A), (*S*)-**3** (B), (*R*)-**4** (C), and (*S*)-**4** (D) to the enzyme  
235 ADH-A from *Rhodococcus ruber*. Substrate molecules are shown in dark blue, the nicotinamide  
236 cofactor in yellow, and the surrounding amino acid residues in white. The zinc ion is depicted as

237 a grey sphere. Interactions are indicated by dashed lines. This figure was generated using the  
238 program PyMOL (<https://pymol.org>).

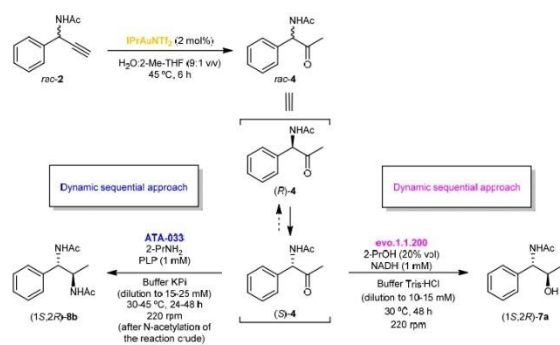
239

240 **Development of a stereoselective dynamic strategy towards hydroxy amide 7a and the**  
241 **diamide 8b**

242 Interestingly, quick racemization of the substrate was observed when incubating the enantiopure  
243 (*S*)-**4** at different pH values in a 100 mM Tris HCl buffer (with 2.5% of 2-Me-THF) along the time,  
244 indicating the more acidic character of the benzylic hydrogen in keto amide **4** compared to keto  
245 ester **3**. Thus, while at pH 5, negligible racemization was observed, almost racemic **4** was  
246 recovered at higher pHs (7.5-9.5), even after only 1 h at pH 9.5 (Table S16). Although these results  
247 hampered the possibility of accessing all possible diastereoisomers of **7a**, a dynamic kinetic  
248 resolution (DKR) can be accomplished, allowing the use of the racemic propargylic amide as  
249 substrate. Using evo.1.1.200 (Table S17), the DKR was analyzed in depth by varying the pH (8.5  
250 and 9.5), temperature (30 and 45 °C), reaction time (24 and 48 h), and amide **4** concentration (15  
251 and 25 mM) leading to a conversion slightly superior to 50% and furnishing both *syn*- and *anti*-**7**  
252 diastereoisomers in enantiopure form (>99% *ee*), although clearly favoring the formation of the  
253 *anti* isomer (up to 94:6 ratio). In this particular case, the final acetylation protocol was not  
254 necessary since the migration of the acetyl moiety from the amide towards the alcohol was not  
255 observed, remaining as a stable compound.

256 All these results encouraged us to explore the chemoenzymatic dynamic strategy towards the  
257 hydroxy amide **7a** and the diamide **8b**, combining the IPrAuTf<sub>2</sub>-catalyzed hydration of **2** for 6 h,  
258 and the subsequent addition of an ADH (evo.1.1.200) or a transaminase (ATA-033, selected after

259 screening shown on Table S19), and suitable reaction conditions including the dilution of the keto  
 260 amide intermediate **4** (Table 1).  
 261 **Table 1.** IPrAuNTf<sub>2</sub>-enzyme cascades for the chemoenzymatic synthesis of hydroxy amide  
 262 (1*S*,2*R*)-**7a** and diacetamide (1*S*,2*R*)-**8b** from racemic propargylic acetamide **2** (100 mM).



263

Entry	Enzyme <sup>a</sup>	Dilution (mM) <sup>b</sup>	T (°C) <sup>b</sup>	t (h) <sup>b</sup>	<b>4</b> (%) <sup>c</sup>	<b>7a</b> or <b>8b</b> (%) <sup>c</sup>	<b>7a</b> or <b>8b</b> <i>syn:anti</i> (%) <sup>c</sup>	<i>ee<sub>syn</sub></i> (%) <sup>d</sup>	<i>ee<sub>anti</sub></i> (%) <sup>d</sup>
1	evo.1.1.200 (10)	15	30	48	74	26 ( <b>7a</b> )	6:94	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )	99 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )
2	evo.1.1.200 (10+5)	15	30	48	49	51 ( <b>7a</b> )	5:95	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )	>99 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )
3	evo-1.1.200 (10+5)	10	30	48	33	67 ( <b>7a</b> )	5:95	>99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )	>99 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )
4	ATA-033	25	45	24	4	96 ( <b>8b</b> )	15:85	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )	>99 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )
5	ATA-033	25	45	48	3	97 ( <b>8b</b> )	25:75	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )	>99 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )
6	ATA-033	25	30	48	3	97 ( <b>8b</b> )	17:83	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )	>99 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )
7	ATA-033	15	45	48	5	95 ( <b>8b</b> )	15:85	99 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )	>99 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )

264 <sup>a</sup> Amount of enzyme in mg per 0.05 mmol of racemic **2**.

265 <sup>b</sup> Reaction conditions for the enzymatic step once the enzyme was added.

266 <sup>c</sup> Percentage of products and diastereomeric ratios were measured by HPLC analyses (after chemical acetylation for **8b**).

267 <sup>d</sup> Enantiomeric excess values were measured by HPLC analyses (see ESI for further information).

268

269 On the one hand, higher conversion values were found when adding the enzyme in portions since  
270 the reduction step stopped at 26% after 48 h when using 10 mg of the ADH for 0.55 mmol of  
271 substrate. However, adding an extra 5 mg of the ADH after 24 h increased the conversion to 51%  
272 (entries 1 and 2). Also, the dilution of the intermediate to 10 mM instead of 15 mM provided a  
273 significant conversion improvement (67%, entry 3). On the other hand, two ATAs formed the  
274 corresponding amino amide (1*S*,2*R*)-**8a** (ATA-024 and ATA-033, 99% *ee*, 19:81 *syn:anti* ratio,  
275 Table S19), and ATA-033 at pH 9.5 led to 96% conversion and 14:86 *dr* with complete  
276 enantioselectivity (Table S20), with a high dependence of the amount of the amine donor, since  
277 50 equiv. provided the best conversion (0.1-1.0 M 2-PrNH<sub>2</sub>, 54-96% after 24 h at 45 °C, Table  
278 S21).

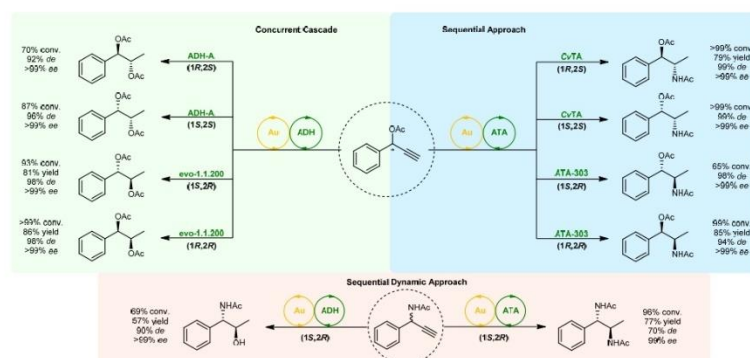
279 The approach gold-ATA was performed sequentially, the hydration being completed after 6 h,  
280 while the biotransamination could be performed at the same temperature or at 30 °C for additional  
281 48 h after dilution of **4** (25 mM, entries 4-7). Satisfyingly under the optimized conditions, the semi-  
282 preparative transformations allowed the synthesis of the hydroxy amide (1*R*,2*S*)-**7a** (95:5 *dr*, >99%  
283 *ee*) and the diamide (1*R*,2*S*)-**8b** (85:15 *dr*, 99% *ee*, after chemical N-acetylation) in 69% and 96%  
284 conversion, with 57% and 77% isolated yield, respectively, after liquid-liquid extraction and  
285 column chromatography. The stereopreference of evo-1.1.200 and ATA-033 allowed us to assign  
286 the absolute configurations of the products (see the ESI for further details).

287

## 288 CONCLUSIONS

289 The combined use of an N-heterocyclic carbene gold(I) species and enzymes from the alcohol  
290 dehydrogenase and amine transaminase classes has been designed and optimized, starting from  
291 easily accessible materials, to obtain nor(pseudo)ephedrine derivatives in a highly selective  
292 manner (Fig. 7). Firstly, IPrAuNTf<sub>2</sub> catalyzes the highly regioselective and straightforward

293 syntheses of a keto ester and a keto amide intermediate, starting from racemic or enantiopure  
 294 propargylic esters or amides, obtained by simple chemical methods, under reaction conditions that  
 295 are compatible with the development of one-pot sequential or concurrent chemoenzymatic  
 296 cascades. The finding of active and stereoselective enzymes provided stereodivergent access to a  
 297 series of protected diol, amino alcohol, or diamine derivatives, the stereodiscrimination being  
 298 dependent on the enzyme of choice. Remarkably, using a propargylic ester precursor led to the  
 299 formation of all possible four diastereoisomers of the protected diol and amino alcohol following  
 300 a concurrent or a sequential approach, respectively, with excellent conversions and  
 301 stereoselectivities (Fig. 7 top).



302

303 **Fig. 7.** Sum-up of the gold(I)-enzyme cascades designed to synthesize nor(pseudo)ephedrine  
 304 derivatives and analogs.

305

306 In the case of the propargylic amide, its racemization under suitable conditions for the gold- and  
 307 enzyme-catalyzed steps opened the possibility of performing a one-pot sequential transformation  
 308 under dynamic conditions, favoring the formation of one diastereoisomer of the corresponding N-

309 protected regiocomplementary amino alcohol or diamine, using either an alcohol dehydrogenase  
310 or an amine transaminase, respectively (Fig. 7 bottom). Overall, a wide panel of  
311 nor(pseudo)ephedrine derivatives and analogs bearing two chiral centers has been achieved in a  
312 straightforward manner taking advantage of the best features of two worlds, gold and enzyme  
313 catalysis, in aqueous medium and under mild reaction conditions, highlighting the tremendous  
314 potential that this combination can provide to the selective synthesis of high-added value  
315 compounds.

316

## 317 **METHODS AND PROTOCOLS**

### 318 **Materials and equipment**

319 [1,3-Bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazole-2-ylidene] [bis(trifluoromethanesulfonyl) imide]  
320 gold(I) (IPrAuNTf<sub>2</sub>), nicotinamide cofactors NADP<sup>+</sup> and NAD<sup>+</sup> and all other chemical reagents  
321 for chemoenzymatic transformations were purchased from Sigma-Aldrich. Regarding the  
322 employed enzymes, *Candida antarctica* lipase type B (CAL-B, Novozyme435<sup>®</sup>) was donated by  
323 Novozymes, evo-1.1.200 ADH was acquired from Evoxx technologies GmbH, while KREDs and  
324 ATA kits, and GDH-105 (48 U/mg) were obtained from Codexis Inc. LDH (300 U/mg) was  
325 purchased from Sigma-Aldrich. Made in-house alcohol dehydrogenases (ADHs) and amine  
326 transaminases (ATAs) were heterologously expressed in *E. coli*, and are listed in the ESI. Cascade  
327 reactions were performed in a vial tube [(3 x 4) cm] under orbital stirring unless otherwise  
328 indicated.

329 NMR spectra were recorded on a Bruker AV300 MHz spectrometer, including <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and  
330 <sup>19</sup>F NMR, as well as monodimensional experiments. All chemical shifts (δ) are given in parts per  
331 million (ppm) and referenced to the residual solvent signal as an internal standard. Gas  
332 chromatography (GC) analyses were performed on an Agilent HP6890 GC chromatograph  
333 equipped with a FID detector using an HP-5 column (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) for the  
334 determination of conversion values, and a CP-Chirasil-DEX CB (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) for  
335 the determination of enantiomeric excess values. High-performance liquid chromatography  
336 (HPLC) analyses were performed on an HP 1100 chromatograph equipped with a VIS-UV detector  
337 for the measurement of enantiomeric excess values.

338 Melting points were measured in a Gallenkamp apparatus, introducing the samples in open  
339 capillary tubes and the measurements are uncorrected. IR spectra were recorded on a Jasco FT/IR-  
340 4700 spectrophotometer, and  $\nu_{\text{max}}$  values are given in  $\text{cm}^{-1}$  for the main absorption bands. High-  
341 resolution mass spectra (HRMS) experiments were carried out by electrospray ionization in  
342 positive mode (ESI<sup>+</sup>) using a Micro ToF Q spectrometer. Thin-layer chromatography (TLC) was  
343 conducted with Merck Silica Gel 60 F254 precoated plates and visualized with a UV lamp, plus  
344 either potassium permanganate, vanillin, or ninhydrin stains. Column chromatographies were  
345 performed using silica gel 60 (230-240 mesh).

#### 346 **General procedure for the gold-catalyzed hydration of propargylic ester 1**

347 Distilled water (400  $\mu\text{L}$ ) and IPrAuNTf<sub>2</sub> were added to a solution of racemic acetate **1** (0.05  
348 mmol, 8.7 mg) in 2-PrOH o 2-Me-THF (100  $\mu\text{L}$ ), and the mixture was stirred at 40 °C for 2 or 6  
349 h. Then, the reaction was extracted with EtOAc (3 x 1 mL), and the organic phases were combined,  
350 dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The conversion was  
351 measured by GC analysis.

#### 352 **General procedure for the gold-catalyzed hydration of propargylic amide 2**

353 Distilled water (400  $\mu\text{L}$ ) was added to a solution of racemic amide **2** (0.05 mmol, 8.6 mg) in  
354 2-Me-THF (100  $\mu\text{L}$ ). Then, IPrAuNTf<sub>2</sub> (2 mol%, 0.001 mmol, 1 mg) was added, and the mixture  
355 was stirred at 40 °C for 6 h. After this time, the reaction was extracted with EtOAc (3 x 1 mL), and  
356 the organic phases were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced  
357 pressure. The conversion was measured by <sup>1</sup>H-NMR analysis of the reaction crude.

#### 358 **General procedure for the gold-ADH cascade of propargylic ester 1**

359 Distilled water (375  $\mu\text{L}$ ) and IPrAuNTf<sub>2</sub> (3.3 mg, 0.00375 mmol, 7.5 mol%) were added to  
360 a solution of acetate (*S*)- or (*R*)-**1** (0.05 mmol, 8.7 mg) in 2-PrOH (100  $\mu\text{L}$ ). Then, a 20 mM  
361 aqueous solution of NADH (25  $\mu\text{L}$ ) and lyophilized cells of *E. coli* overexpressing ADH-A (18  
362 mg) were successively added. The mixture was stirred (220 rpm) for 24 h at 45 °C, and after this  
363 time, the reaction containing **6a** was extracted with EtOAc (4 x 1 mL), combining the organic  
364 layers that were dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. Then, a small stone of DMAP and three  
365 drops of acetic anhydride were added, and the mixture was stirred for 12 h at 45 °C. After this  
366 time, H<sub>2</sub>O was added (4 mL), and the mixture was stirred for 20 min. The organic phase was



367 separated, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and filtered. The product percentages and diastereomeric ratios were  
368 determined by GC analysis, while enantiomeric excess values were determined by HPLC (see  
369 section XXVII in the ESI).

370 **General procedure for the gold-ATA cascade of propargylic ester 1**

371 The enantiopure acetate (*S*)- or (*R*)-**1** (0.05 mmol, 8.7 mg) was dissolved in 2-PrOH (50 μL)  
372 inside a glass vial (3 x 4 cm). Distilled water (450 μL) and IPrAuNTf<sub>2</sub> (1 mg, 0.001 mmol, 2  
373 mol%) were added, and the mixture was stirred at 40 °C for 6 h. Then, a 100 mM phosphate buffer  
374 pH 7.5 (1.5 mL) containing PLP (1 mM) and isopropylamine (250 mM), and *E. coli* overexpressing  
375 C<sub>v</sub>-TA (3 mg) were added. The mixture was stirred for 24 h at 40 °C, and after this time, the  
376 reaction was stopped by adding a 10 M aqueous NaOH solution (250 μL). The mixture was  
377 extracted with EtOAc (3 x 1 mL), and the organic phases containing **5a** were combined, dried over  
378 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and filtered. Then, a small stone of DMAP and three drops of acetic anhydride were  
379 added, and the mixture was stirred for 4 h at 40 °C. After that, H<sub>2</sub>O was added (3 mL), and the  
380 mixture was stirred for 20 min. The organic phase was separated, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and filtered.  
381 The product percentages and diastereomeric ratios were determined by GC analyses, while  
382 enantiomeric excess values were determined by HPLC (see section XXVII in the ESI).

383 **General procedure for the gold-ADH cascade of propargylic amide 2**

384 Distilled H<sub>2</sub>O (450 μL) and IPrAuNTf<sub>2</sub> (2 mol%, 0.01 mmol, 1.0 mg) were added to a  
385 solution of racemic acetamide **2** (0.05 mmol, 8.6 mg) in 2-Me-THF (50 μL) inside a (3 x 4 cm)  
386 vial. The mixture was stirred for 6 h at 45 °C, and then a 50 mM buffer Tris HCl pH 8.5 (3.25 mL),  
387 2-PrOH (1.0 mL), an aqueous 10 mM MgCl<sub>2</sub> solution (0.5 mL), an aqueous 20 mM NADH  
388 solution (250 μL), and evo-1.1.200 (10 mg) were added. After stirring the reaction for 24 h at 220  
389 rpm and 30 °C, freshly evo-1.1.200 (5 mg) was added. Then the reaction was stirred for additional  
390 24 h at 30 °C and 220 rpm. After this time, the mixture containing **7a** was extracted with EtOAc  
391 (4 x 4 mL), the organic phases were combined, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and the  
392 solvents were removed under vacuum. The product percentages were measured by GC analysis,  
393 while the enantiomeric and diastereomeric ratios were determined by HPLC (see Section XXVII  
394 in the ESI).

395 **General procedure for the gold-ATA cascade of propargylic amide 2**

396 Racemic acetamide **2** (0.05 mmol, 8.6 mg) was dissolved in 2-Me-THF (50  $\mu$ L) inside a (3  
397 x 4 cm) vial. Then, distilled H<sub>2</sub>O (450  $\mu$ L) and IPrAuNTf<sub>2</sub> (2 mol%, 0.01 mmol, 1.0 mg) were  
398 successively added, and the mixture was stirred for 6 h at 45 °C. After this time, first a 100 mM  
399 phosphate buffer pH 9.5 (1.5 mL) containing PLP (1 mM) and isopropylamine (1.0 M), and later  
400 ATA-033 (9 mg) were added. After stirring the mixture 24 h at 220 rpm and 45 °C, the reaction  
401 was quenched by addition of an aqueous NaOH 10 M solution (200  $\mu$ L). The mixture containing  
402 **8a** was extracted with EtOAc (4 x 3 mL), the organic phases were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
403 and filtered. Then, DMAP and acetic anhydride were added, and the mixture was stirred for 4 h at  
404 40 °C. After this time, H<sub>2</sub>O was added (2 mL) and the mixture was stirred for 20 min. The organic  
405 phase was separated, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. The product percentages were measured by  
406 GC analyses, while the enantiomeric and diastereomeric ratios were calculated by HPLC (see  
407 Section XXVII in the ESI).

#### 408 **Docking calculations**

409 Docking calculations using AutoDock-Vina<sup>46,47</sup> and the Catalobase platform  
410 ([www.innophore.com](http://www.innophore.com)) were based on the crystal structure of ADH-A from *Rhodococcus ruber*  
411 (PDB-entry: 3JV7)<sup>44</sup>. Polar hydrogen atoms were added to the structure using AutoDockTools,  
412 assuming negatively charged aspartate and glutamate residues and positively charged arginine and  
413 lysine residues. Protonation states of histidine residues were assigned according to possible  
414 interactions with surrounding functional groups. The active site zinc ion is coordinated by Cys-38,  
415 His-62, and Asp-153, and a pseudo atom (atom type TZ) was placed to complete the tetrahedral  
416 coordination of the metal. Substrate carbonyl oxygen atoms (atom type OA) were attracted to this  
417 pseudo atom during docking. The cubic docking box was centered close to the pseudo atom  
418 position and had a side length of 15 Å. The exhaustiveness parameter of AutoDock Vina was set  
419 to 32. In all four cases, nine different binding modes were obtained.

420

#### 421 **DATA AVAILABILITY**

422 Electronic supporting information includes comprehensive screening and optimization of reaction  
423 conditions for gold-catalyzed reactions, biotransformations, and chemoenzymatic processes. Full

424 characterization of synthesized standards and products, also including their analytics and NMR  
425 spectra, have been properly collected.

426

#### 427 **ACKNOWLEDGMENTS**

428 Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MCI, PID2019-  
429 109253RB-I00) and the Asturian Regional Government (AYUD/2021/51542) are gratefully  
430 acknowledged. Technical support from the Scientific-Technical Services (UNIOVI) is  
431 acknowledged. We thank Prof. Wolfgang Kroutil (University of Graz, Austria) for providing us  
432 with alcohol dehydrogenases overexpressed in *E. coli* cells. S.G-G thanks the University of Oviedo  
433 for a predoctoral fellowship (PAPI-21-PF-14) inside the “Programa de Apoyo y Promoción de la  
434 Investigación”.

435

#### 436 **ABBREVIATIONS**

437 ADH: Alcohol dehydrogenase; ATA: Amine transaminase; DKR: Dynamic kinetic resolution;  
438 IPrAuNTf<sub>2</sub>: [1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazole-2-ylidene][bis(trifluoromethanesulfonyl)  
439 imide] gold(I); 2-PrOH: propan-2-ol; 2-PrNH<sub>2</sub>: isopropylamine.

440

#### 441 **AUTHOR INFORMATION**

442 The manuscript was written through the contributions of all authors who have approved the final  
443 version of the manuscript.

#### 444 **Corresponding authors**

445 **Vicente Gotor-Fernández** – *Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de*  
446 *Oviedo, 33006 Oviedo (Asturias, Spain). <https://orcid.org/0000-0002-9998-0656>*

447 **Iván Lavandera** – *Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de Oviedo, 33006*  
448 *Oviedo (Asturias, Spain).* <https://orcid.org/0000-0003-4857-4428>

449

#### 450 Authors

451 **Sergio González-Granda** – *Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de*  
452 *Oviedo, 33006 Oviedo (Asturias, Spain).* <https://orcid.org/0000-0001-6541-7681>

453 **Vicente Gotor-Fernández** – *Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de*  
454 *Oviedo, 33006 Oviedo (Asturias, Spain).* <https://orcid.org/0000-0002-9998-0656>

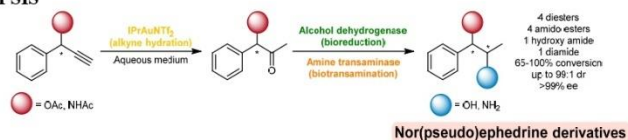
455 **Iván Lavandera** – *Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de Oviedo, 33006*  
456 *Oviedo (Asturias, Spain).* <https://orcid.org/0000-0003-4857-4428>

457 **Georg Steinkellner** – *Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, 8010 Graz, Austria.*  
458 <https://orcid.org/0000-0001-7565-8868>

459 **Karl Gruber** – *Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, 8010 Graz, Austria.*  
460 <https://orcid.org/0000-0002-3485-9740>

461

#### 462 SYNOPSIS



#### 465 REFERENCES

466 1. Cassiano, M.M. *Alkaloids: Properties, Applications and Pharmacological Effects.* Nova Science  
467 Publishers, Inc. (2013).

- 468 2. Aniszewski, T. Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications, 2nd Edition.  
469 Elsevier Science (2014).
- 470 3. Funayama, S. & Cordell, G.A. Alkaloids: A Treasury of Poisons and Medicines. Academic  
471 Press (2014).
- 472 4. Simić, S., Zukić, E., Schmermund, L., Faber, K., Winkler, C.K. & Kroutil, W. Shortening  
473 Synthetic Routes to Small Molecule Active Pharmaceutical Ingredients Employing Biocatalytic  
474 Methods. *Chem. Rev.* **122**, 1052–1126 (2022).
- 475 5. Schrittwieser, J.H. & Resch V. The Role of Biocatalysis in the Asymmetric Synthesis of  
476 Alkaloids. *RSC Adv.* **3**, 17602–17632 (2013).
- 477 6. Cigan, E., Eggbauer, B., Schrittwieser, J.H. & Kroutil, W. The Role of Biocatalysis in the  
478 Asymmetric Synthesis of Alkaloids – an Update. *RSC Adv.* **11**, 28223–28270 (2021).
- 479 7. Roddan, R., Carter, E.M., Thair, B. & Hailes, H.C. Chemoenzymatic Approaches to Plant  
480 Natural Product Inspired Compounds. *Nat. Prod. Rep.* **39**, 1375–1382 (2022).
- 481 8. Ager, D.J., Prakash, I. & Schaad, D.R. 1,2-Amino Alcohols and Their Heterocyclic Derivatives  
482 as Chiral Auxiliaries in Asymmetric Synthesis. *Chem. Rev.* **96**, 835–875 (1996).
- 483 9. Cruz, A., Padilla-Martinez, I.I. & Bautista-Ramirez, M.E. Ephedrine as Chiral Auxiliaries in  
484 Enantioselective Alkylation Reactions of Acyl Ephedrine Amides and Esters: A Review. *Curr.*  
485 *Org. Synth.* **15**, 38–83 (2018).
- 486 10. Krizevski, R., Bar, E., Shalit, O., Sitrit, Y., Ben-Shabat, S. & Lewinsohn, E. Composition and  
487 Stereochemistry of Ephedrine Alkaloids Accumulation in *Ephedra sinica* Stapf. *Phytochemistry*  
488 **71**, 895–903 (2010).
- 489 11. Sehl, T., Hailes, H.C., Ward, J.M., Wardenga, R., von Lieres, E., Offermann, H., Westphal,  
490 R., Pohl, M. & Rother, D. Two Steps in One Pot: Enzyme Cascade for the Synthesis of

491 Nor(pseudo)ephedrine from Inexpensive Starting Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 6772–6775  
492 (2013). (Chirasil-DEX CB) ESI

493 12. Wu, X., Fei, M., Chen, Y., Wang, Z. & Chen, Y. Enzymatic Synthesis of L-Norephedrine by  
494 Coupling Recombinant Pyruvate Decarboxylase and  $\omega$ -Transaminase. *Appl. Microbiol.*  
495 *Biotechnol.* **98**, 7399–7408 (2014).

496 13. Lee, Y.-C., Chen, Y.-Y., Lin, J.-S., Chen, Y.-W., Li, C.-C., Liang, K.-X., Chan, H.-H., Lin,  
497 W.-D. & Kao, C.-H. Stereoselective Synthesis of (1*R*, 2*S*)-Norephedrine by Recombinant Whole-  
498 Cell Biocatalysts Coupling Acetohydroxyacid Synthase I and  $\omega$ -Transaminase. *Process Biochem.*  
499 **73**, 74–81 (2018).

500 14. Sehl, T., Hailes, H.C., Ward, J.M., Menyes, U., Pohl, M. & Rother, D. Efficient 2-Step  
501 Biocatalytic Strategies for the Synthesis of All Nor(pseudo)ephedrine Isomers. *Green Chem.* **16**,  
502 3341–3348 (2014). (efedrinas ver ESI)

503 15. Corrado, M.L., Knaus, T. & Mutti, F.G. High Regio- and Stereoselective Multi-enzymatic  
504 Synthesis of All Phenylpropanolamine Stereoisomers from  $\beta$ -Methylstyrene. *ChemBioChem* **22**,  
505 2345–2350 (2021).

506 16. Corrado, M.L., Knaus, T. & Mutti, F.G. Regio- and Stereoselective Multi-enzymatic  
507 Aminohydroxylation of  $\beta$ -Methylstyrene Using Dioxygen, Ammonia and Formate. *Green Chem.*  
508 **21**, 6246–6251 (2019).

509 17. Rudroff, F., Mihovilovic, M.D., Gröger, H., Snajdrova, R., Iding, H. & Bornscheuer, U.T.  
510 Opportunities and Challenges for Combining Chemo- and Biocatalysis. *Nat. Catal.* **1**, 12–22  
511 (2018).

512 18. Doyon, T.I. & Narayan, A.R.H. Synthetic Utility of One-Pot Chemoenzymatic Reaction  
513 Sequences. *Synlett* **31**, 230–236 (2020).

- 514 19. Huang, X., Cao, M. & Zhao, H. Integrating Biocatalysis with Chemocatalysis for Selective  
515 Transformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **55**, 161–170 (2020).
- 516 20. Bering, L., Thompson, J. & Micklefield, J. New Reaction Pathways by Integrating Chemo-  
517 and Biocatalysis. *Trends Chem.* **4**, 392-408 (2022).
- 518 21. Ascaso-Alegre, C. & Mangas-Sanchez, J. Construction of Chemoenzymatic Linear Cascades  
519 for the Synthesis of Chiral Compounds. *Eur. J. Org. Chem.* e202200093 (2022).
- 520 22. Asikainen, M. & Krause, R. Tandem Enzyme/Gold-Catalysis: From Racemic  $\alpha$ -Allenic  
521 Acetates to Enantiomerically Enriched 2,5-Dihydrofurans in One Pot. *Adv. Synth. Catal.* **351**,  
522 2305–2309 (2009).
- 523 23. Wang, Z.J., Clary, K.N., Bergman, R.G., Raymond, K.N. & Toste, F.D. A Supramolecular  
524 Approach to Combining Enzymatic and Transition Metal Catalysis. *Nat. Chem.* **5**, 100–103 (2013).
- 525 24. Rodríguez-Álvarez, M.J., Ríos-Lombardía, N., Schumacher, S., Pérez-Iglesias, D., Moris, F.,  
526 Cadierno, V., García-Álvarez, J. & González-Sabín, J. Combination of Metal-Catalyzed  
527 Cycloisomerizations and Biocatalysis in Aqueous Media: Asymmetric Construction of Chiral  
528 Alcohols, Lactones, and  $\gamma$ -Hydroxy-Carbonyl Compounds. *ACS Catal.* **7**, 7753–7759 (2017).
- 529 25. Schaaf, P., Gojic, V., Bayer, T., Rudroff, F., Schnürch, M. & Mihovilovic, M.D. Easy Access  
530 to Enantiopure (*S*)- and (*R*)-Aryl Alkyl Alcohols by a Combination of Gold(III)-Catalyzed Alkyne  
531 Hydration and Enzymatic Reduction. *ChemCatChem* **10**, 920–924 (2018).
- 532 26. Cortes-Clerget, M., Akporji, N., Zhou, J., Gao, F., Guo, P., Parmentier, M., Gallou, F., Berthon,  
533 J.-Y. & Lipshutz, B.H. Bridging the Gap between Transition Metal- and Bio-catalysis via Aqueous  
534 Micellar Catalysis. *Nat. Commun.* **10**, 2169 (2019).

- 535 27. González-Granda, S., Lavandera, I. & Gotor-Fernández, V. Alcohol Dehydrogenases and N-  
536 Heterocyclic Carbene Gold(I) Catalysts: Design of a Chemoenzymatic Cascade towards Optically  
537 Active  $\beta,\beta$ -Disubstituted Allylic Alcohols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 13945–13951 (2021).
- 538 28. González-Granda, S., Escot, L., Lavandera, I. & Gotor-Fernández, V. Unmasking the Hidden  
539 Carbonyl Group Using Gold(I) Catalysts and Alcohol Dehydrogenases: Design of a  
540 Thermodynamically-Driven Cascade toward Optically Active Halohydrins. *ACS Catal.* **12**,  
541 2552–2560 (2022).
- 542 29. Mathew, S., Sagadevan, A., Renn, D. & Rueping, M. One-Pot Chemoenzymatic Conversion  
543 of Alkynes to Chiral Amines. *ACS Catal.* **11**, 12565–12569 (2021).
- 544 30. González-Granda, S., Tzouras, N.V., Nolan, S.P., Lavandera, I. & Gotor-Fernández, V.  
545 Merging Gold(I) Catalysis with Amine Transaminases in Cascade Catalysis: Chemoenzymatic  
546 Transformation of Propargylic Alcohols into Enantioenriched Allylic Amines. *Adv. Synth. Catal.*  
547 doi: 10.1002/adsc.202200777.
- 548 31. Chang, F., Wang, C., Chen, Q., Zhang, Y. & Liu, G. A Chemoenzymatic Cascade Combining  
549 a Hydration Catalyst with an Amine Dehydrogenase: Synthesis of Chiral Amines. *Angew. Chem.*  
550 *Int. Ed.* **61**, e202114809 (2022).
- 551 32. Brenzovich Jr., W.E. Gold in Total Synthesis: Alkynes as Carbonyl Surrogates. *Angew. Chem.*  
552 *Int. Ed.* **51**, 8933–8935 (2012).
- 553 33. Dorel, R. & Echavarren, A.M. Gold(I)-Catalyzed Activation of Alkynes for the Construction  
554 of Molecular Complexity. *Chem. Rev.* **115**, 9028–9072 (2015).
- 555 34. Halliday, C.J.V. & Lynam, J.M. Gold–Alkynyls in Catalysis: Alkyne Activation, Gold  
556 Cumulenes and Nuclearity. *Dalton Trans.* **45**, 12611–12626 (2016).



557 35. Ghosh, N., Nayak, S. & Sahoo, A.K. Gold-Catalyzed Regioselective Hydration of Propargyl  
558 Acetates Assisted by a Neighboring Carbonyl Group: Access to  $\alpha$ -Acyloxy Methyl Ketones and  
559 Synthesis of ( $\pm$ )-Actinopolymorphol B. *J. Org. Chem.* **76**, 500–511 (2011).

560 36. Zhou, Y., Liu, Q., Lv, W., Pang, Q., Ben, R., Qian, Y. & Zhao, Y. Indazolin-*s*-ylidene-N-  
561 Heterocyclic Carbene Complexes of Rhodium, Palladium, and Gold: Synthesis, Characterization,  
562 and Catalytic Hydration of Alkynes. *Organometallics* **32**, 3753–3759 (2013).

563 37. Kumar, M., Hammond, G.B. & Xu, B. Cationic Gold Catalyst Poisoning and Reactivation.  
564 *Org. Lett.* **16**, 3452–3455 (2014).

565 38. Du, Y., Yao, F., Zhang, R. & Cai, M. A Heterogeneous Gold(I)-Catalyzed Regioselective  
566 Hydration of Propargyl Acetates toward  $\alpha$ -Acyloxy Methyl Ketones. *J. Organomet. Chem.* **910**,  
567 121136 (2020).

568 39. Cao, Z., Scalabre, A., Nlate, S., Buffière, S., Oda, R., Pouget, E. & Bibal, B. Silica-Supported  
569 Phosphine–Gold Complexes as an Efficient Catalytic System for a Dearomative Spirocyclization.  
570 *Chem. Eur. J.* **27**, 427–433 (2021).

571 40. Enantiopure ester (*R*)-**1** and amide (*R*)-**2** were obtained through lipase-catalyzed resolution of  
572 their corresponding racemates, while the (*S*)-antipodes were synthesized after chemical acetylation  
573 of the unreacted alcohol and amine from the CAL-B classical kinetic resolution. See Experimental  
574 section and ESI for further details and general protocols.

575 41. See, for instance: Chen, P. & Zhu, X. Kinetic Resolution of Propargylic Alcohols via  
576 Stereoselective Acylation Catalyzed by Lipase PS-30. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **97**, 184–188 (2013),  
577 and references cited therein.

578 42. Li, X., Tanasova, M., Vasileiou, C., Borhan, B. Fluorinated Porphyrin Tweezer: A Powerful  
579 Reporter of Absolute Configuration for *erythro* and *threo* Diols, Amino Alcohols, and Diamines.  
580 *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1885-1893 (2008).

581 43. Zhu, J., Sun, X.-T., Wang X.-D. & Wu, L. Enantioselective Dihydroxylation of Alkenes  
582 Catalyzed by 1,4-Bis(9-*O*-dihydroquinidiny)phthalazine-Modified Binaphthyl-Osmium  
583 Nanoparticles. *ChemCatChem* **10**, 1788-1792 (2018).

584 44. Hashmi, A.S.K., Schuster, A.M., Schmuck M. & Rominger, F. Gold-Catalyzed Cyclization of  
585 Nonterminal Propargylic Amides to Substituted Alkylideneoxazolines and -oxazines. *Eur. J. Org.*  
586 *Chem.* 4595-4602 (2011).

587 45. Karabec, M., Lyskowski, A., Tauber, K.C., Steinkellner, G., Kroutil, W., Grogan, G. & Gruber,  
588 K. Structural Insights into Substrate Specificity and Solvent Tolerance in Alcohol Dehydrogenase  
589 ADH-‘A’ from *Rhodococcus ruber* DSM 44541. *Chem. Commun.* **46**, 6314-6316 (2010).

590 46. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A.F. & Forli, S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking  
591 Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings, *J. Chem. Inf. Model.* **61**, 3891-3898  
592 (2021).

593 47. Trott, O. & Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with  
594 a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading, *J. Comp. Chem.* **31**, 455-  
595 461 (2010).

## *Conclusiones generales*



## Conclusiones generales

Como conclusiones generales de esta Tesis Doctoral se puede considerar que se han desarrollado varias metodologías concurrentes y secuenciales para la síntesis estereoselectiva de diversas familias de compuestos orgánicos de interés como alcoholes, aminas, dioles, aminoalcoholes y diaminas. Para ello, se han desarrollado y optimizado métodos multienzimáticos mediante la combinación de lacasas y ADHs (Capítulo 1), o métodos metal-enzima en los Capítulos 2, 3, 4 y 5, donde ha sido clave el acoplamiento de procesos catalizados por especies de oro(I), como el reagrupamiento de Meyer-Schuster o las reacciones de hidratación de alquinos, junto con el empleo de biocatalizadores como ADHs o ATAs.

En el primer capítulo se ha diseñado un proceso multienzimático secuencial combinando la acción del sistema lacasa/TEMPO y una ADH para llevar a cabo la de desracemización de varios alcoholes propargílicos. Para ello se ha optimizado cada una de las etapas, es decir, la reacción de oxidación no selectiva y la reacción de biorreducción asimétrica, al igual que el proceso secuencial global para obtener varios alcoholes propargílicos ópticamente activos. El empleo de ADHs estereocomplementarias, como la de *Ralstonia* sp. o la comercial evo-1.1.200, ha permitido el acceso a ambos enantiómeros de los alcoholes deseados, siendo posible además el escalado de estas reacciones.

En el segundo capítulo se ha descrito el primer ejemplo de un proceso en cascada concurrente que combina la acción de un catalizador de oro(I) y una ADH. Para ello se ha identificado a los complejos carbénicos N-heterocíclicos como el IPrAuNTf<sub>2</sub> como catalizadores eficientes del reagrupamiento de Meyer-Schuster de alcoholes propargílicos en medio acuoso. La optimización de las condiciones de reacción ha permitido el desarrollo de las biorreducciones de las cetonas intermedias en el propio medio de reacción. Finalmente, ha sido posible el desarrollo del proceso global en cascada combinando ambos catalizadores con el fin de transformar diferentes alcoholes propargílicos racémicos en los alcoholes alílicos  $\beta,\beta$ -disustituidos ópticamente activos (>92% *ee*), presentándose como una metodología muy general para la obtención de ambos enantiómeros de los productos en función de la selectividad de la enzima empleada, por ejemplo, la ADH-A proveniente de *Rhodococcus ruber* u otras de origen comercial.

En el tercer capítulo se ha extendido el potencial de la reacción de reagrupamiento de Meyer-Schuster, transformando en este caso los alcoholes propargílicos racémicos en aminas alílicas ópticamente activas. Así, las cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas obtenidas tras el paso catalizado por la especie de oro(I), se han hecho reaccionar con transaminasas. A tal fin, se han identificado enzimas que permitieran

### *Conclusiones generales*

conducir a ambos enantiómeros de las aminas alílicas, y se han optimizado ambas etapas del proceso por separado. Las conversiones moderadas obtenidas al llevar a cabo el proceso global en cascada, condujo a la optimización del proceso de manera secuencial, mediante la adición de la isopropilamina y la correspondiente transaminasa (*ArSTA*, ATA-024, ATA-251, ATA-260, *ArRMut11TA*, ATA-P1-F03, ATA-238, ATA-033 o ATA-251) una vez finalizado el primer paso. De esta manera se han sintetizado ocho aminas alílicas con buenos rendimientos (53-84%) y excesos enantioméricos (>96%).

Pasando al desarrollo de procesos de hidratación regioselectivos de haloalquinos catalizados por especies de oro(I), en el cuarto capítulo se ha desarrollado una metodología en cascada para la síntesis de halohidrinas ópticamente activas. Para ello se ha seleccionado al  $\text{IPrAuNTf}_2$  como catalizador eficiente de la hidratación de los haloalquinos de partida, y se ha desarrollado la posterior biorreducción asimétrica de las  $\alpha$ -halometil cetonas intermedias. Así, se han optimizado tanto ambas reacciones por separado como el proceso en cascada, empleando ADHs de selectividad opuesta, lo cual ha conducido a la preparación de una serie de clorohidrinas aromáticas y alifáticas con buenas conversiones (65-86%) y excelentes excesos enantioméricos (>97% *ee*). Además, se ha llevado a cabo con éxito una metodología *one-pot* para la síntesis de ambos enantiómeros del óxido de estireno (78-82% conversión, >96% *ee*), por simple adición de hidróxido de sodio al medio de reacción tras la finalización de los procesos de hidratación y reducción, usando en el ejemplo realizado, o bien la ADH-A o la *LbADH*.

En el capítulo quinto, se ha descrito la síntesis de derivados de tipo 1,2-diol, 1,2-diamina y 1,2-aminoalcohol de nor(pseudo)efedrina mediante la combinación de procesos de hidratación de un éster o una amida propargílica catalizados por el  $\text{IPrAuNTf}_2$ , seguidos de una biotransformación como una reducción o una transaminación. La optimización del proceso de hidratación ha sido clave, así como la identificación de enzimas que permitieran modificar selectivamente las cetoamidas y cetoésteres intermedios. Finalmente se han desarrollado los procesos concurrentes que permitieron acceder a cuatro dioles, cinco aminoalcoholes y una diamina de la familia de la nor(pseudo)efedrina con buenas conversiones (>65%) y excelentes selectividades (>60% *ed*, >98% *ee*).

De esta manera, a lo largo de esta Tesis Doctoral, se ha puesto de manifiesto la versatilidad sintética de emplear procesos multicatalíticos en cascada para la preparación de compuestos ópticamente activos de manera altamente selectiva.

*Parte experimental*





### *E.1 Catalizadores, reactivos y disolventes*

La lacasa de *Trametes versicolor* fue adquirida a la casa comercial Sigma-Aldrich (0.5 U/mg) y ha sido empleada en procesos de oxidación de alcoholes propargílicos en el Capítulo 1.

Las alcohol deshidrogenasas utilizadas tienen distintas procedencias, y dependiendo de su especificidad han sido empleadas en los Capítulos 1, 2, 4 y 5. Así, se han empleado algunas sobreexpresadas en *E. coli* BL21, que fueron donadas por el Prof. Wolfgang Kroutil (Universidad de Graz, Austria) o la Prof. Martina Pohl (Forschungszentrum Jülich GmbH, Alemania), y otras de fuentes comerciales como Evoxx Technologies (Alemania) o Codexis Inc. (Estados Unidos).

Entre aquellas sobreexpresadas en *E. coli* se incluyen *RasADH*, *LbADH*, *TeSADH*, *ADH-T*, *ADH-A* y *SyADH*. Las células se crecieron en un Erlenmeyer empleando un medio LB con ampicilina como antibiótico (1 L, 100 mg/L) a 30 °C y 120 rpm durante 24 h. A continuación, se añadió ampicilina adicional (50 mg/L), isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 450 mg/L), y en el caso de la *ADH-A*, adicionalmente se añadió  $ZnCl_2$  (100 mg/L), incubando la mezcla durante 24 h a 20 °C y 120 rpm. Finalmente, las células fueron centrifugadas, lavadas, y resuspendidas en una disolución tampón de fosfato de pH 7.5 y de una concentración de 50 mM. En este momento fueron congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas durante 48 h. Posteriormente, las preparaciones enzimáticas obtenidas se almacenaron a 4 °C hasta su uso, donde permanecen estables por periodos largos de almacenamiento.

Las alcohol deshidrogenasas comerciales fueron adquiridas a Codexis Inc. (26 KREDs) como un kit comercial, y la *ADH evo-1.1.200* a la casa Evoxx Technologies GmbH.

### *Parte experimental*

De la misma manera, las transaminasas empleadas en los Capítulos 3 y 5, fueron o bien donadas por el Prof. Wolfgang Kroutil, o bien adquiridas de la casa comercial Codexis Inc. Las transaminasas *CvTA*, *ArSTA*, *ArRTA*, *ArRMut11*, *VfTA* y *AtTA* sobreexpresadas en células de *E. coli* LB21 fueron crecidas y liofilizadas en nuestro laboratorio. Para su crecimiento, se empleó un medio LB con ampicilina como antibiótico (1 L, 120 mg/L) a 37 °C y 120 rpm hasta que la densidad óptica (OD<sub>600</sub>) del cultivo alcanzara un valor aproximado comprendido entre 0.5 y 0.7. En ese momento se añadió ampicilina (30 mg/L) e IPTG (120 mg/L). Posteriormente, el cultivo se incubó durante 16 h a 20 °C y 120 rpm. Finalmente, las células fueron centrifugadas, lavadas, y resuspendidas en una disolución tampón de fosfato de pH 7.5 y de una concentración de 50 mM, además de ser congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas durante 48 h. Posteriormente, los biocatalizadores obtenidos se almacenaron a 4 °C permaneciendo estables durante periodos largos de almacenamiento.

Las transaminasas comerciales fueron adquiridas a Codexis Inc. (28 ATAs), así como la glucosa deshidrogenasa GDH-105 (48 U/mg), mientras que la lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (200 U/mg) y los cofactores [NAD(P)H y PLP] fueron adquiridos a la casa comercial Merck.

La lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B, 7300 PLU/g) inmovilizada por adsorción sobre Lewatit E fue donada por la casa comercial Novozymes (Dinamarca), y empleada en la resolución del alcohol y la amina propargílica racémicos empleados en el Capítulo 5.

Los catalizadores IPrAuNTf<sub>2</sub>, JohnPosAuNTf<sub>2</sub> y BrettPhosAuNTf<sub>2</sub> fueron adquiridos a Sigma Aldrich, mientras que el resto de los catalizadores de Au(I) empleados en esta Tesis Doctoral fueron donados por el Prof. Steven P. Nolan de la Universidad de Gante (Bélgica). Todos los demás reactivos fueron adquiridos a Sigma Aldrich, Acros Organics o Merck, sin que fueran necesarios tratamientos previos para su utilización.

Los disolventes secos empleados fueron sometidos a un tratamiento previo, almacenándose bajo atmósfera de nitrógeno. El TBME, Et<sub>2</sub>O, tolueno, THF y 2-Me-THF se secaron sobre sodio empleando benzofenona como indicador, mientras que el MeCN, MeOH, y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se secaron sobre hidruro de calcio.

## *E.2 Técnicas de análisis*

### *Cromatografía*

Para la cromatografía en capa fina se han empleado placas cromatográficas de gel de sílice Merck Silica Gel 60 F254 (0.25 mm de espesor). Como revelador se utilizaron disoluciones acuosas de  $\text{KMnO}_4$ , vainillina o ninhidrina.

Para la cromatografía de columna se empleó gel de sílice 60 (230-240 Mesh) adquirida a Merck.

Los análisis mediante cromatografía de gases (CG) se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 con nitrógeno como gas portador (14.5 psi), empleando columnas de relleno:

- Aquiral: HP-1, HP-5 y DB-1701 (30 m x 0.32 mm x 0.25 mm),
- Quiral: CP-Chirasil-DEX-CB (0.25 m x 0.25 mm 0.25  $\mu\text{m}$ ).

Los análisis mediante HPLC se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett Packard 1100, con columnas de relleno quiral (25 cm x 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ): Chiracel OD-H, Chiracel OJ-H, Chiralpak IA y Chiralpak AD-H. La detección se efectuó mediante un detector visible de ultravioleta a 210 y 215 nm. Como fase móvil se emplearon mezclas de *n*-hexano/2-PrOH con distintos porcentajes.

### *Espectroscopia infrarroja (IR)*

Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrómetro Jasco FT/IR-4700. Las bandas de tensión se indican en valores de  $\nu$  máxima expresados en  $\text{cm}^{-1}$ .

### *Puntos de fusión*

Los puntos de fusión se han llevado a cabo en un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos, y por ello sus valores no se encuentran corregidos.

### *Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)*

Los experimentos de espectrometría de masas exactas se han realizado en un espectrómetro BrukerMicroTofQ empleando técnicas de ionización por electrospray

### *Parte experimental*

(ESI<sup>+</sup> o ESI<sup>-</sup>), o impacto electrónico (EI<sup>+</sup>). Los valores se refieren a unidades de masa atómica (uma).

### *Resonancia magnética nuclear (RMN)*

Los espectros de resonancia magnética nuclear monodimensionales de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, <sup>19</sup>F-RMN y la secuencia de pulsos DEPT, así como los experimentos bidimensionales de NOESY y HMBC, han sido realizados con espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para <sup>1</sup>H, 272 MHz para <sup>19</sup>F, y 75.5 para <sup>13</sup>C). Los desplazamientos químicos se dan en valores de  $\delta$  en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertzios (Hz), habiendo sido calibrados en base a la señal del disolvente residual no deuterado.

### *Rotación óptica específica*

Para las medidas de las rotaciones ópticas específicas se ha empleado un polarímetro Perkin-Elmer 241. Los valores obtenidos se expresan en unidades  $10^{-1} \text{ cm}^2 \times \text{grado} \times \text{g}^{-1}$ .

### *E.3 Procedimientos experimentales y caracterización de compuestos orgánicos*

Los procedimientos experimentales y caracterización de los compuestos orgánicos desarrollados en esta Tesis Doctoral se encuentran recogidos en las partes experimentales y/o materiales suplementarios de los cinco artículos que constituyen esta Tesis Doctoral presentada como compendio de publicaciones.

