



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química

**DESARROLLO DE PROCESOS
OXIDATIVOS Y SU APLICACIÓN EN
SISTEMAS MULTICATALÍTICOS
EMPLEANDO OXIDORREDUCTASAS Y
TRANSAMINASAS**

Tesis Doctoral

2021

Jesús Albarrán Velo



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química

**DESARROLLO DE PROCESOS
OXIDATIVOS Y SU APLICACIÓN EN
SISTEMAS MULTICATALÍTICOS
EMPLEANDO OXIDORREDUCTASAS Y
TRANSAMINASAS**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en
Química por Jesús Albarrán Velo**



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Desarrollo de procesos oxidativos y su aplicación en sistemas multicatalíticos empleando oxidorreductasas y transaminasas.	Inglés: Development of oxidative processes and their application in muticatalytic systems using oxidoreductases and transaminases.
2.- Autor	
Nombre: Jesús Albarrán Velo	DNI/Pasaporte/NIE: _____
Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química	
Órgano responsable: Departamento de Química Orgánica e Inorgánica	

RESUMEN (en español)

Durante las últimas décadas la Biotransformación se ha desarrollado y establecido como una rama de gran importancia dentro de la Química, y más concretamente en el área que se conoce como Química Sostenible o Química Verde, disciplina que aboga por el cambio de las prácticas tradicionales en los procesos químicos hacia nuevas vías más sostenibles. De esta forma, mediante el empleo de catalizadores de tipo biológico, también conocidos como enzimas, es posible llevar a cabo transformaciones químicas de una forma muy eficiente, bajo condiciones suaves de reacción y con una alta selectividad. Asimismo, otros aspectos que están adquiriendo gran interés durante los últimos años son la utilización de fuentes naturales como precursores de compuestos de gran interés, y el uso de sistemas multicatalíticos para desarrollar procesos sintéticos multietapa de una manera más simple, selectiva y eficiente.

Esta Tesis Doctoral se encuadra dentro de las temáticas comentadas en el párrafo anterior, y para una mejor comprensión, su contenido se ha dividido en una Introducción general y tres capítulos, donde se pone de manifiesto las ventajas y posibilidades de las enzimas en síntesis orgánica.

En la Introducción se desglosa el concepto de Química Sostenible, y las estrategias químicas que se encuadran dentro de ella, destacándose el papel que juega hoy en día la Biotransformación. Para ello, se describe como se clasifican las enzimas en función de su actividad catalítica, y se muestran las características principales de las empleadas en este trabajo: lacasas, alcohol deshidrogenasas y transaminasas. Finalmente, se comenta la importancia de los procesos multicatalíticos, ya sea mediante la combinación de diversas enzimas o combinando metales y enzimas, lo que ha permitido mejorar los procesos desarrollados tradicionalmente etapa a etapa, y que involucran el aislamiento de intermedios de reacción con la consiguiente pérdida de rendimientos globales.

En el Capítulo 1 se estudia la oxidación de dos compuestos modelo derivados de la lignina como son el alcohol veratrílico y el adlerol, para obtener los correspondientes aldehídos. Con este fin, se han empleado dos lacasas comerciales y una serie de mediadores químicos nitrogenados, los cuales han sido sintetizados partiendo de dos productos naturales derivados de la degradación de la lignina, la vainillina y el siringaldehído. Los resultados de esta investigación han sido publicados en el artículo de investigación titulado "*Synthesis of nitrogenated lignin-derived compounds and reactivity with laccases. Study of their application in mild chemoenzymatic oxidative processes*" (RSC Adv. **2017**, 7, 50459-50471).



En el Capítulo 2 se han desarrollado dos procesos secuenciales para lograr la desracemización de diferentes alcoholes alílicos secundarios (hetero)aromáticos, así como su aminación estereoselectiva. Ambos procesos comparten el primer paso de la síntesis que consiste en la oxidación de dichos alcoholes alílicos racémicos, mediante el empleo del sistema quimienzimático compuesto por la lacasa de *Trametes versicolor* y el mediador químico radicalario TEMPO. Posteriormente, las cetonas α,β -insaturadas intermedias han sido transformadas en:

- los propios alcoholes alílicos ópticamente activos, mediante un proceso de biorreducción utilizando alcohol deshidrogenasas y permitiendo así la desracemización de los alcoholes racémicos de partida. Este trabajo se ha publicado en el artículo titulado “*One-pot two-step chemoenzymatic deracemization of allylic alcohols using laccases and alcohol dehydrogenases*” (*Mol. Catal.* **2020**, 493, 111087), y
- las aminas alílicas enantioenriquecidas empleando transaminasas, habiendo sido publicados estos resultados en “*Sequential two-step stereoselective amination of allylic alcohols through the combination of laccases and amine transaminases*” (*ChemBioChem* **2020**, 21, 200-211).

Finalmente, en el Capítulo 3 se ha llevado a cabo la preparación de diferentes 1-(hetero)arilpropan-2-oles y 1-(hetero)arilpropan-2-aminas de forma ópticamente activa partiendo de los correspondientes alil(hetero)arenos, a través de dos procesos secuenciales multicatalíticos. Así, en primer lugar, se ha llevado a cabo la oxidación de Wacker-Tsuji fotocatalizada de diferentes alil(hetero)arenos en medio acuoso, lo que ha permitido acceder a las correspondientes 1-(hetero)arilpropan-2-onas de un modo altamente selectivo. Posteriormente, se ha utilizado una alcohol deshidrogenasa para dar lugar a los distintos alcoholes secundarios de forma estereoselectiva, o bien una transaminasa para sintetizar las correspondientes aminas ópticamente activas. Dependiendo del biocatalizador empleado, se ha podido acceder a ambos enantiómeros de los alcoholes y las aminas. Los resultados de esta investigación han sido recogidos en la publicación titulada “*Markovnikov Wacker-Tsuji Oxidation of Allyl(hetero)arenes and Application in a One-Pot Photo-Metal-Biocatalytic Approach to Enantioenriched Amines and Alcohols*” (*Adv. Synth. Catal.* **2021**, doi: 10.1002/adsc.202100351).

RESUMEN (en Inglés)

During the last decades, Biocatalysis has achieved great recognition inside the Chemistry area, especially in the Sustainable Chemistry field, also known as Green Chemistry, discipline that advocates the change of traditional practices in Chemistry towards more sustainable pathways. Therefore, the use of biological catalysts, also known as enzymes, facilitates the performance of chemical transformations under mild reaction conditions and in a very efficient and selective manner. In addition, the use of natural sources as precursors of highly valuable compounds is also gaining recent interest from an eco-friendly point of view, while the use of multicatalytic systems to develop complex multistep synthetic processes provides simpler, and more selective and efficient ways to produce organic molecules.

This Doctoral Thesis summarizes recent achievements related to the topics previously disclosed, and for a better understanding it has been divided into a general Introduction and three chapters, in which the advantages and possibilities of enzymes in organic synthesis are highlighted.



In the Introduction, the concept of Sustainable Chemistry is introduced along with the chemical strategies that are framed within it, highlighting the role that Biocatalysis currently plays. For this, the enzyme classification according to their catalytic activity has been detailed, together with the main characteristics of the biocatalyst classes used in this work: laccases, alcohol dehydrogenases and transaminases. Finally, the importance of developing multicatalytic processes is discussed, either by designing multienzymatic transformations or combining metals and enzymes, which allow to improve the traditionally stepwise chemical routes, that involve the isolation of reaction intermediates with the consequent overall yield loss.

In Chapter 1, the oxidation of two lignin model compounds such as veratryl alcohol and adlerol has been studied, in order to obtain the corresponding aldehydes. For this purpose, two commercial laccases and a series of chemical nitrogenated mediators have been used, which have been previously synthesized from compounds also derived from the lignin degradation, mainly vanillin and syringaldehyde. The results from this research have been published in the full article entitled "*Synthesis of nitrogenated lignin-derived compounds and reactivity with laccases. Study of their application in mild chemoenzymatic oxidative processes*" (*RSC Adv.* **2017**, 7, 50459-50471).

In Chapter 2, two sequential processes have been developed to accomplish the deracemization as well as the stereoselective amination of different allylic (hetero)aromatic secondary alcohols. Both processes share the first synthetic step, which consists in the oxidation of these racemic allylic alcohols using the chemoenzymatic system composed by the laccase of *Trametes versicolor* and the chemical radical mediator TEMPO. Subsequently, the α,β -unsaturated ketone intermediates have been transformed into:

- optically active allylic alcohols, through a bioreduction process, by using an alcohol dehydrogenase. Thus, the deracemization of the starting racemic alcohols has been achieved, and this work has been published as a research article entitled "*One-pot two-step chemoenzymatic deracemization of allylic alcohols using laccases and alcohol dehydrogenases*" (*Mol. Catal.* **2020**, 493, 111087), and
- enantioenriched allylic amines, by using transaminases, publishing these results in the research article entitled "*Sequential two-step stereoselective amination of allylic alcohols through the combination of laccases and amine transaminases*" (*ChemBioChem* **2020**, 21, 200-211).

Finally, in Chapter 3, a series of optically active 1-(hetero)arylpropan-2-ols and 1-(hetero)arylpropan-2-amines have been prepared, starting from the corresponding allyl(hetero)arenes, through two multicatalytic sequential processes. Thus, first of all, the photocatalytic Wacker-Tsuji oxidation of different allyl(hetero)arenes has been carried out in an aqueous medium, which allowed the preparation of the corresponding 1-(hetero)arylpropan-2-ones in a highly selective manner. Subsequently, different optically active alcohols and amines have been obtained employing an alcohol dehydrogenase or a transaminase, respectively. Depending on the biocatalyst of choice, both alcohol and amine enantiomers have been prepared, and the results from this research have been recently published in the full article titled "*Markovnikov Wacker-Tsuji Oxidation of Allyl(hetero)arenes and Application in a One-Pot Photo-Metal-Biocatalytic Approach to Enantioenriched Amines and Alcohols*" (*Adv. Synth. Catal.* **2021**, doi: 10.1002/adsc.202100351).

A mi familia

Experience is merely the name men gave to their mistakes

Oscar Wilde

Echando la vista atrás, parece que fue ayer cuando llegué a Asturias con un contrato de investigación y la posibilidad de desarrollar una etapa más de mi carrera investigadora. Durante estos últimos cinco años puedo decir que he aprendido mucho, en todos los ámbitos y, por ello, para comenzar esta Tesis Doctoral, me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido con su apoyo a la consecución de la misma.

En primer lugar, debo agradecer a mis directores de Tesis, Vicente Gotor Fernández e Iván Lavandera, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y prestarme todo el apoyo que me han dado durante estos años. Gracias por las charlas, los cafés, las cañas, los consejos (fueran personales o profesionales) ... Y por supuesto, no me olvidaré de esas reuniones express de tres días por Europa (San Sebastián, Ámsterdam, Aberystwyth y Stathelle), incluyendo todo lo aprendido durante ellas, tanto de forma profesional como personalmente. También quiero agradecer al Profesor Vicente Gotor Santamaría por permitirme participar en el proyecto OXYPOL de financiación europea.

A mis compañeros de laboratorio, tanto antiguos como nuevos. María, gracias por guiarme y enseñarme durante mis primeros meses en el lab. Sergio, Jorge, Carlos, Marina y Virginia, creo que sois con los que más tiempo he compartido, gracias por los buenos momentos, las risas, y, especialmente, las cenas y espichas... Antía, Nicoletta, Lorena, ¡sangre nueva por el lab! Gracias por estar ahí y ánimo con esta etapa, sois gente buena y lo vais a hacer genial.

A mis amigos de Oviedo, con los que he compartido muchas idas y venidas. Charlas, cervezas, fiestas... Últimamente menos, pero no será porque no queramos, ¡sino porque no nos dejan!

Al que considero mi mejor amigo, Julio. Aunque nuestras vidas se hayan separado en mayor o menor medida y pasemos, en ocasiones, meses sin hablar, siempre podemos contar el uno con el otro, y lo sabemos.

Al Gobierno de Asturias, por la financiación que he recibido a través del Programa Severo Ochoa de becas predoctorales.

A mi compañera, que me ha aguantado mucho los últimos meses. Gracias por tu apoyo incondicional con todo, de verdad. Llegaste en un momento complicado, justo antes de una “crisis sanitaria” (qué chapas), pero siempre estuviste ahí para lo que fuera. *El buen perfume viene en frasco pequeño*. Muchas gracias Laurita.

A mi familia, y en especial, a mis padres y mis hermanos. Sé que la investigación es complicada y a veces no doy tantas señales de vida como debería o quisiera, pero gracias por ser pacientes, especialmente estos últimos días de escritura. Os quiero mucho y lo sabéis. Gracias por estar ahí siempre para apoyarme, sea lo que sea.

Gracias abuelas, por vuestro cariño y apoyo, os quiero. Gracias tía Santi, porque sabes que siempre te he considerado otro pilar más en mi vida.

Asturias, mi tierra adoptiva, siempre verde (y orbayando). Extremadura, la natal, ¡qué frío y qué calor!

A todo el mundo, de nuevo, ¡muchas gracias por estar ahí!

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

1-HBT	1-Hidroxibenzotriazol
¹ H-RMN	Resonancia magnética de protón
Å	Ángstrom(s)
μ	Micro
v	Frecuencia
A	Amperio
ABTS	Sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3- <i>etilbenzotiazolidina-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
ac.	Disolución acuosa
Ác.	Ácido
AcO	Acetato
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
Acr	Acridinio
Ad	Adamantilo
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>
ADH-T	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter</i> sp.
ADP	Adenosín-5'-difosfato (<i>Adenosine 5'-diphosphate</i>)
ADPR	Adenosina difosforibosa (<i>Adenosine diphosphate ribose</i>)
<i>AdRedAm</i>	Aminasa reductora de <i>Ajellomyces dermatitidis</i> (<i>Reductive aminase from Ajellomyces dermatitidis</i>)
AHR	Aldehído reductasa
AIBN	Azobisisobutironitrilo (<i>Azobisisobutyronitrile</i>)

AlaDH	Alanina deshidrogenasa
AmDH	Amino deshidrogenasa
Ar	Arilo
ArRmut11	Variante de la transaminasa (<i>R</i>)-selectiva de <i>Arthrobacter</i> sp. con 11 ciclos evolutivos
AscH ₂	Ácido ascórbico
Asp	Aspartato
ATA	Amino transaminasa
<i>At</i> BBE	Enzima de tipo puente de berberina de <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Arabidopsis thaliana berberine bridge enzyme-like</i>)
atm	Atmósfera
ATP	Adenosín-5'-trifosfato (<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>)
AZADO	Radical 2-Azaadamantan- <i>N</i> -oxilo (<i>2-Azaadamantane N-oxyl, free radical</i>)
BINAP	2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftaleno (<i>2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthalene</i>)
BmGDH	Glucosa deshidrogenasa de <i>Bacillus megaterium</i> (<i>Bacillus megaterium glucose dehydrogenase</i>)
Bn	Bencilo
bpy	2,2'-Bipiridina (<i>2,2'-Bipyridine</i>)
Bu	Butilo
<i>c</i>	Conversión
°C	Grado Celsius
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B (<i>Candida antarctica lipase type B</i>)
Cat.	Catalizador
CG	Cromatografía de gases
cm	Centímetro
cod	1,5-Ciclooctadieno

conc.	Concentrado
conv	Conversión
CR	Carbonil reductasa
Cys	Cisteína (<i>Cysteine</i>)
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
dmgH	Dimetilglioxima
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E</i>	Potencial redox
EC	Comisión enzimática (<i>Enzyme Commission</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i> /ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i> sobreexpresada en <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> /ADH-T	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter</i> sp. sobreexpresada en <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> /LBADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i> sobreexpresada en <i>E. coli</i>
<i>ed</i>	Exceso diastereomérico
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
<i>ee_p</i>	Exceso enantiomérico del producto
EnT	Proceso de transferencia de energía, del inglés <i>energy-transfer</i>
EPR	Resonancia paramagnética electrónica (<i>Electron paramagnetic resonance</i>)
eq	Equivalente
e.r.	Relación enantiomérica (<i>enantiomeric ratio</i>)
ERED	Alqueno reductasa (<i>Ene-reductase</i>)
Et	Etilo
ET	Transferencia electrónica (<i>Electronic transfer</i>)
Et ₂ O	Éter dietílico
EtOH	Etanol
FDH	Formiato deshidrogenasa
G	Grupo grande

G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>)
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GC	Carbono vítreo (<i>Glassy-carbon</i>)
<i>g</i> -C ₃ N ₄	Nitruro de carbono grafitico
GDH	Glucosa deshidrogenasa
Glu	Glutamato
GQDs	<i>Quantum dots</i> de grafeno (<i>Graphene quantum dots</i>)
HAA	Ácido 3-hidroxiantranílico (3- <i>Hydroxyanthranilic acid</i>)
HAT	Transferencia de un átomo de hidrógeno (<i>Hydrogen atom transfer</i>)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etanosulfónico (<i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>)
Het	Heterociclo
His	Histidina
HMFO	5-(Hidroximetil)furfural oxidasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High performance liquid chromatography</i>)
h ν	Radiación fotónica
<i>i</i>	<i>iso</i>
I	Intermedio
IFCM	Líquido iónico derivado de carbono fibroso y mesoporoso (<i>Ionic liquid-derived fibrillated mesoporous carbon</i>)
IPA	Isopropilamina
kDa	KiloDalton
KPi	Fosfato de potasio (<i>Potassium phosphate inorganic</i>)
KRED	Cetorreductasa (<i>Ketoreductase</i>)

L-(+)-DET	(+)-L-tartrato dietílico ((+)- <i>Diethyl L-tartrate</i>)
LBADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
LED	Diodo emisor de luz (<i>Light-emitting diode</i>)
LI	Líquidos iónico
LiP	Lignina peroxidasa
LKADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus kefir</i>
LMS	Sistema lacasa-mediador (<i>Laccase-mediator system</i>)
LMt	Lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i>
LTv	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>
Lys	Lisina (<i>Lysine</i>)
m	Mili
M	Molar
MAO-N	Monoamino oxidasa de <i>Aspergillus niger</i>
MAO-N D5	Variante evolucionada de la monoamino oxidasa de <i>Aspergillus niger</i>
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
Mes	Mesitil
MPa	Megapascal
MS	Tamiz molecular (<i>Molecular sieves</i>)
MnP	Manganeso peroxidasa
MW	Microondas (<i>Microwave</i>)
N	Normal
NAD(P) ⁺	Dinucleótido (fosfato) de adenina y nicotinamida oxidado (<i>Nicotinamide (Phosphorylated) Adenine Dinucleotide oxidized form</i>)

NAD(P)H	Dinucleótido (fosfato) de adenina y nicotinamida reducido (<i>Nicotinamide (Phosphorylated) Adenine Dinucleotide reduced form</i>)
NaHDMS	Hexametildisililamida de sodio (<i>Sodium bis(trimethylsilyl)amide</i>)
NAP-Mg-Pd	Paladio estabilizado con nanocristales de óxido de magnesio (<i>Nanocrystalline magnesium oxide-stabilized palladium</i>)
NaTFA	Trifluoroacetato de sodio (<i>Sodium trifluoroacetate</i>)
nm	Nanómetro
NMI	<i>N</i> -metil imidazol
<i>n</i> -OctSH	<i>n</i> -Octanotiol
NP	Nanopartícula
Ns	4-Nosilo
OMe	Metóxido
ox	Forma oxidada
P	Grupo pequeño
P	Producto
PDB	Banco de Datos de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PdCNT	Nanopartículas de paladio soportadas en nanotubos de carbono
PDMS	Polidimetilsiloxano
Ph	Fenilo (<i>Phenyl</i>)
Phe	Fenilalanina (<i>Phenylalanine</i>)
PLP	Piridoxal 5'-fosfato (<i>Pyridoxal 5'-phosphate</i>)
PMP	Piridoxamina 5'-fosfato (<i>Pyridoxamine 5'-phosphate</i>)
<i>p/p</i>	Relación en masa (peso/peso)
PPL	Lipasa de páncreas porcino (<i>Pancreas porcine lipase</i>)
ppy	2-Fenilpiridina (<i>2-Phenylpyridine</i>)

PQQ	Pirroloquinolina quinona
PQQ-DH	Pirroloquinolina quinona deshidrogenasa
Pr	Propilo
PS-Ir D	Catalizador de iridio soportado en poliestireno
PSL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia lipase</i>)
<i>p/v</i>	Relación peso/volumen
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (<i>Polyvinylidene fluoride</i>)
py	Piridina (<i>Pyridine</i>)
RasADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Ralstonia</i> sp.
rdto	Rendimiento
red	Forma reducida
Rib	Ribosa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sustrato
SAS	2-Antraquinonasulfonato de sodio (<i>Sodium anthraquinone-2-sulfonate</i>)
SET	Proceso de transferencia de un electrón (<i>Single-electron transfer</i>)
SIL	Líquido iónico supramolecular (<i>Supramolecular ionic liquid</i>)
sp.	Especie (<i>species</i>)
Sus	Sustrato reducido
Sus•	Radical sustrato oxidado
SyADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Sphingobium yanoikuyae</i>
<i>t</i>	<i>tert</i>
t.a.	Temperatura ambiente
TA	Transaminasa
TBME	<i>tert</i> -butil metil éter
TDAH	Trastorno por déficit de atención con hiperactividad

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>
TeSADH WIC	TeSADH con 3 mutaciones (W110A, I86A y C295A)
TFA	Trifluoroacetato
THF	Tetrahidrofurano
TPPFeCl	Cloruro de 5,10,15,20-tetrafenil-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porfirina (5,10,15,20-Tetraphenyl-21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -porphirine iron(III) chloride)
TRIP	Dihidrógenofosfato de 3,3'-bis(2,4,6-triisopropilfenil)-1,1'-binaftil-2,2'-diilo (3,3'-Bis(2,4,6-triisopropylphenyl)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogenphosphate)
Tris·HCl	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
Tyr	Tirosina (<i>Tyrosine</i>)
U	Unidad de actividad enzimática
V	Voltio
VAO	Oxidasa del alcohol veratrílico (<i>Veratryl alcohol oxidase</i>)
Vf	<i>Vibrio fluvialis</i>
VLA	Ácido violúrico (<i>Violuric acid</i>)
VP	Peroxidasa versátil (<i>Versatile peroxidase</i>)
vs	<i>versus</i>
v/v	Relación en volúmen (<i>Volume/Volume ratio</i>)
W	Vatio

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
0.1. QUÍMICA SOSTENIBLE Y ENZIMAS: LA BIOCATÁLISIS	3
0.2. MODOS DE EMPLEO Y CLASIFICACIÓN DE BIOCATALIZADORES	8
0.2.1. OXIDORREDUCTASAS (ENZIMAS REDOX)	10
0.2.1.1. Lacasas	11
0.2.1.1.1. Las lacasas de <i>Trametes versicolor</i> y de <i>Myceliophthora thermophila</i>	14
0.2.1.1.2. Los sistemas lacasa-mediador (LMS)	17
0.2.1.1.3. Mediadores radicalarios de tipo nitroxilo: TEMPO como oxidante	19
0.2.1.2. Alcohol deshidrogenasas	22
0.2.1.2.1. Tipos de alcohol deshidrogenasas	24
0.2.1.2.2. Sistemas de regeneración del cofactor	27
0.2.2. TRANSAMINASAS	30
0.2.2.1. Cofactor y mecanismo de acción	31
0.2.2.2. Desplazamiento del equilibrio en reacciones catalizadas por transaminasas	34
0.3. REACCIONES MULTICATALÍTICAS	40
0.3.1. REACCIONES EN CASCADA: SECUENCIAL VS CONCURRENTE	41
0.3.1.1. Cascadas multienzimáticas	45
0.3.1.2. Cascadas quimioenzimáticas	47
0.3.1.3. Cascadas fotobiocatalíticas	49
OBJETIVOS GENERALES	53

Índice

CAPÍTULO 1. Síntesis de compuestos nitrogenados derivados de lignina y estudio de su reactividad en procesos quimioenzimáticos mediados por lacasas 57

ANTECEDENTES	59
1.1.1. LIGNINA COMO FUENTE RENOVABLE PROCEDENTE DE LA BIOMASA	61
1.1.2. METODOLOGÍAS QUÍMICAS PARA LA OXIDACIÓN DE DERIVADOS DE LA LIGNINA	63
1.1.3. METODOLOGÍAS ENZIMÁTICAS PARA LA OXIDACIÓN DE DERIVADOS DE LA LIGNINA	66
1.1.3.1. Peroxidasas	67
1.1.3.2. Lacasas	69
OBJETIVOS	73
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
1.3.1. MODIFICACIONES QUÍMICAS DE COMPUESTOS DERIVADOS DE FUENTES NATURALES	79
1.3.2. REACTIVIDAD DE LAS LACASAS CON LOS MEDIADORES SINTETIZADOS	81
1.3.3. APLICACIÓN DE LOS NUEVOS LMS A LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS MODELO DE LA ESTRUCTURA DE LA LIGNINA ..	83
CONCLUSIONES	89
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	93
1.5.1. PROCEDIMIENTO SINTÉTICO PARA LA OBTENCIÓN DE LAS OXIMAS 5a-c (ver Esquema 1.7a)	95
1.5.2. PROCEDIMIENTO SINTÉTICO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE LAS HIDRAZONAS 6a-c, LAS SEMICARBAZONAS 7a-c, LOS TRIAZOLES 8a-c Y LOS TETRAZOLES 9a-c (ver Esquema 1.8)	95

1.5.3. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OXIDACIÓN DE LOS NUEVOS MEDIADORES UTILIZANDO LACASAS (ver Esquema 1.9)	96
1.5.4. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OXIDACION DE COMPUESTOS MODELO DE LA ESTRUCTURA DE LA LIGNINA CATALIZADOS POR LACASAS EN PRESENCIA DE MEDIADORES NATURALES O NITROGENADOS (ver Tabla 1.1, Figura 1.3 y Esquema 1.10)	96
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	97
CAPÍTULO 2. Desarrollo de procesos secuenciales quimioenzimáticos para la desracemización y aminación estereoselectiva de (3E)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles racémicos utilizando lacasas, alcohol deshidrogenasas y transaminasas	113
ANTECEDENTES	115
2.1.1. OXIDACIONES AERÓBICAS DE ALCOHOLES ALÍLICOS CATALIZADAS POR METALES	117
2.1.2. OXIDACIONES AERÓBICAS DE ALCOHOLES ALÍLICOS EN PRESENCIA DE TEMPO	120
2.1.3. RELEVANCIA Y SÍNTESIS DE ALCOHOLES ALÍLICOS ÓPTICAMENTE ACTIVOS	122
2.1.4. RELEVANCIA Y SÍNTESIS DE AMINAS ALÍLICAS ENANTIOENRIQUECIDAS	129
OBJETIVOS	135
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	139
2.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS (3E)-4-ARILBUT-3-EN-2-OLES RACÉMICOS 1a-p	141
2.3.2. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LOS ALCOHOLES RACÉMICOS 1a-p EMPLEANDO LA LACASA DE TRAMETES VERSICOLOR Y EL MEDIADOR QUÍMICO TEMPO	142

Índice

2.3.3. DESRACEMIZACIÓN LINEAL DE LOS (3E)-4-(HET)ARILBUT-3-EN-2-OLES 1a-p	144
2.3.3.1. Biorreducción de las (3E)-4-(het)arilbut-3-en-2-onas 2a-p	145
2.3.3.2. Desracemización de los (3E)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles 1a-p	148
2.3.4. AMINACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE LOS ALCOHOLES 1a-p	150
2.3.4.1. Síntesis de las aminas alílicas racémicas 3a-p	151
2.3.4.2. Biotransaminación de las (3E)-4-(het)arilbut-3-en-2-onas .	152
2.3.4.3. Estudio del proceso secuencial de aminación estereoselectiva	155
CONCLUSIONES	157
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	161
2.4.1. PROCEDIMIENTO GENERAL DE OXIDACIÓN DE LOS ALCOHOLES 1a-p MEDIADA POR EL SISTEMA LTv/TEMPO (ver Tabla 2.1 y Esquema 2.18)	163
2.4.2. PRODECIMIENTO GENERAL DE BIORREDUCCIÓN DE LAS CETONAS 2a-p (ver Esquema 2.19 y Tabla 2.2)	163
2.4.3. PRODECIMIENTO GENERAL DE BIOTRANSAMINACIÓN DE LAS CETONAS 2a-p (ver Esquema 2.23 y Tabla 2.3)	164
2.4.4. PRODECIMIENTO GENERAL PARA LA DESRACEMIZACIÓN DE LOS ALCOHOLES ALÍLICOS RACÉMICOS 1a-p A ESCALA ANALÍTICA (ver Esquema 2.20)	165
2.4.5. PRODECIMIENTO GENERAL PARA LA AMINACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE LOS ALCOHOLES ALÍLICOS RACÉMICOS 1a-p A ESCALA ANALÍTICA (ver Esquema 2.24)	166
ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN	169

CAPÍTULO 3. Estudio de la reacción de oxidación de Wacker-Tsuji fotocatalizada y su aplicación en procesos secuenciales quimioenzimáticos para la obtención de 1-(hetero)arilpropan-2-oles y 1-(hetero)arilpropan-2-aminas enantioenriquecidos	195
ANTECEDENTES	197
3.1.1. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE 1-ARILPROPAN-2-AMINAS	201
3.1.2. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE 1-ARILPROPAN-2-OLES	203
3.1.3. OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI	205
3.1.4. OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI Y ENZIMAS EN PROCESOS EN CASCADA	208
3.1.5. FOTOCATÁLISIS EN PROCESOS CATALIZADOS POR Pd ..	211
OBJETIVOS	215
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	219
3.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI FOTOCATALIZADA	221
3.3.2. ESTUDIO DE LA BIOTRANSAMINACIÓN DE 1-(HETERO)ARILPROPAN-2-ONAS Y APLICACIÓN EN UN PROCESO SECUENCIAL JUNTO CON LA OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI FOTOCATALIZADA DE ALIL(HETERO)ARENOS	227
3.3.3. ESTUDIO DE LA BIORREDUCCIÓN DE 1-ARILPROPAN-2-ONAS Y APLICACIÓN EN UN PROCESO SECUENCIAL JUNTO CON LA OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI FOTOCATALIZADA DE ALIL(HETERO)ARENOS	230
CONCLUSIONES	235
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	239
3.5.1. PROCEDIMIENTO GENERAL DE LA REACCIÓN DE WACKER-TSUJI FOTOCATALIZADA (ver Esquema 3.17)	241

Índice

3.5.2. PRODECIMIENTO GENERAL DE BIOTRANSAMINACIÓN DE LAS CETONAS 2d-h,l,m (ver Tabla 3.1)	241
3.5.3. PRODECIMIENTO GENERAL DE BIORREDUCCIÓN DE LAS CETONAS 2a-m (ver Tabla 3.2)	242
3.5.4. PROCEDIMIENTO SECUENCIAL PARA LA OBTENCIÓN DE LAS 1-(HETERO)ARILPROPAN-2-AMINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS (ver Esquema 3.18)	243
3.5.5. PROCEDIMIENTO SECUENCIAL PARA LA OBTENCIÓN DE LOS 1-(HETERO)ARILPROPAN-2-OLES ÓPTICAMENTE ACTIVOS (ver Esquema 3.20)	244
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	247
CONCLUSIONES GENERALES	263
REFERENCIAS CRUZADAS	267

INTRODUCCIÓN

0.1. QUÍMICA SOSTENIBLE Y ENZIMAS: LA BIOCATALÍISIS

La Química Sostenible, también conocida como Química Verde, del inglés *Green Chemistry*, se enfoca en el diseño de productos y procesos químicos de forma segura.¹ Su nacimiento tuvo lugar en 1990, promovida por la Agencia de Protección del Medioambiente de Estados Unidos, con el fin de impulsar una serie de medidas dirigidas tanto hacia la reducción del impacto medioambiental generado por los procesos químicos industriales, como a un desarrollo de los mismos en condiciones más seguras. Esta primera conceptualización de la Química Verde fue plasmada por Anastas y Warner en 1998,² a través de la redacción de 12 principios que reflejaron el espíritu sostenible de manera llamativa, acuñándolos a tal fin bajo el acrónimo inglés *PRODUCTIVELY*:³

1. *Prevent wastes* (reducción de residuos)
2. *Renewable materials* (uso de materias renovables)
3. *Omit derivatization steps* (evitar etapas de protección y desprotección de grupos funcionales en rutas sintéticas)
4. *Degradable chemical products* (utilización de productos químicos biodegradables)
5. *Use safe synthetic methods* (empleo de métodos sintéticos seguros)
6. *Catalytic reagents* (uso de catalizadores)
7. *Temperature, pressure ambient* (empleo de condiciones de reacción suaves)
8. *In-Process monitoring* (análisis de los procesos en tiempo real)
9. *Very few auxiliary substances* (minimizar el uso de sustancias auxiliares, como disolventes, agentes de separación...)
10. *E-factor, maximize feed in product* [maximizar la producción, factor E = Residuos (kg) / Producto (kg)]
11. *Low toxicity of chemical products* (manejo de productos químicos de baja toxicidad)
12. *Yes, it is safe* (en general, desarrollar una química segura)

¹ (a) R. Mestres, *Educ. Quím.* **2013**, *24*, 103-112; (b) R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801-838.

² (a) P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Nueva York (EE. UU.), **1998**, p. 30; (b) H. C. Erythropel, J. B. Zimmerman, T. M. de Winter, L. Petitjean, F. Melnikov, C. H. Lam, A. W. Lounsbury, K. E. Mellor, N. Z. Janković, Q. Tu, L. N. Pincus, M. M. Falinski, W. Shi, P. Coish, D. L. Plata, P. T. Anastas, *Green Chem.* **2018**, *20*, 1929-1961.

³ S. L. Tang, R. L. Smith, M. Poliakoff, *Green Chem.* **2005**, *7*, 761-762.

Introducción

Si bien estas 12 recomendaciones aportan mucha información sobre las características ideales de un proceso químico, a su vez podemos resumir estos postulados en tres grandes bloques:

1. Prevenir riesgos y tener en cuenta sus causas (principios 5, 7 y 11)
2. Desarrollar metodologías químicas más eficientes (principios 2, 3, 6, 8, 9 y 10)
3. Planificar de manera concienzuda procesos limpios y seguros (principios 1, 2, 4, 7, 11 y 12)

De esta forma, en los últimos años se ha observado un progresivo aumento en la aparición y consolidación tanto de grupos de investigación académicos como de empresas químicas y/o biotecnológicas, que se han enfocado en el diseño de procesos químicos donde no solo es central la obtención de un producto con buen rendimiento, sino que resultan claves tanto las fuentes de partida, como la manera de acceder a ese producto deseado desde un punto de vista energético, productivo y respetuoso con la naturaleza, generando la mínima cantidad posible de desechos. Todo ello ha dado lugar a la aparición de diversas disciplinas que, combinadas de manera lógica y eficiente, permiten pasar desde una posible ruta sintética plasmada en un papel a la ejecución práctica en el laboratorio de un proceso eficiente y, si fuera necesario, a gran escala.

En este contexto, cabe destacarse que las ideas sencillas pueden llegar a ser las más deseadas, como por ejemplo llevar a cabo reacciones sin disolventes (del inglés *solvent-free*),⁴ inmovilizar enzimas dentro de un reactor y trabajar en sistemas en continuo (química de flujo),⁵ o emplear técnicas instrumentales más atractivas medioambientalmente hablando, como la aplicación de microondas en procesos

⁴ (a) K. Tanaka, F. Toda, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1025-1074; (b) W. C. Shearouse, D. C. Waddell, J. Mack, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2009**, *12*, 772-783.

⁵ (a) S. G. Newman, K. F. Jensen, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1456-1472; (b) M. P. Thompson, I. Peñafiel, S. C. Cosgrove, N. J. Turner, *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23*, 9-18; (c) T. Yu, Z. Ding, W. Nie, J. Jiao, H. Zhang, Q. Zhang, C. Xue, X. Duan, Y. M. A. Yamada, P. Li, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 5729-5747.

químicos,⁶ así como otras tecnologías como la sonoquímica,⁷ electroquímica,⁸ o fotoquímica,⁹ entre otras.¹⁰

En la búsqueda de procesos más seguros y eficientes, desde hace décadas se utilizan catalizadores de origen biológico, las enzimas,¹¹ que permiten llevar a cabo diversas reacciones químicas de una forma más segura y eficiente. Este potencial no debe sorprendernos, pues se estima que ya desde la civilización egipcia era conocido el empleo de microorganismos en la fermentación de azúcares para obtener productos alcohólicos.¹² De este modo, esta rama de la Química basada en la utilización de enzimas para realizar diferentes transformaciones (conversión de un sustrato en un producto), se conoce por el nombre de Biocatálisis,¹³ y plantea múltiples posibilidades que encajan dentro de la Química Sostenible.¹⁴ En este contexto, se puede destacar de los biocatalizadores su:

- naturaleza intrínseca, ya que su composición de aminoácidos naturales (configuración L) determina la posibilidad de poder actuar de una manera asimétrica al proporcionar un entorno quiral
- biodegradabilidad y baja toxicidad, debido a su origen natural
- alta capacidad catalítica
- utilización en medios usualmente inocuos (como agua o disoluciones salinas) a temperatura y presión suaves.¹⁵

⁶ (a) Á. Díaz-Ortiz, P. Prieto, A. de la Hoz, *Chem. Rec.* **2019**, *19*, 85-97; (b) P. Priezel, J. A. Lopez-Sanchez, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7*, 3-21.

⁷ M. Lupacchini, A. Mascitti, G. Giachi, L. Tonucci, N. d'Alessandro, J. Martinez, E. Colacino, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 609-653.

⁸ T. H. Meyer, I. Choi, C. Tian, L. Ackermann, *Chem* **2020**, *6*, 2484-2496.

⁹ (a) M. Melchionna, P. Fornasiero, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 5493-5501; (b) T. Rigotti, J. Alemán, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 11169-11190.

¹⁰ T. Schaub, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 1865-1869.

¹¹ Sobre el género ambiguo de la voz *enzima*, se sugiere una interesante carta al director de M. J. Aguilar Ruiz en *Revista Hispanoamericana de Hernia* **2016**, *4*, 77-78. Cabe mencionar que en esta Tesis Doctoral se ha empleado su uso en femenino tratando de homogenizarse a lo largo del manuscrito.

¹² C. M. Heckmann, F. Paradisi, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 6082-6102.

¹³ (a) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480-12496; (b) V. Gotor-Fernández, M. J. Hernáiz Gómez-Dégano, *An. Quím.* **2017**, *113*, 27-35.

¹⁴ (a) T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132; (b) C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605; (c) G. Torrelo, U. Hanefeld, F. Hollmann, *Catal. Lett.* **2015**, *145*, 309-345; (d) R. A. Sheldon, D. Brady, *ChemSusChem* **2019**, *12*, 2859-2881; (e) R. A. Sheldon, D. Brady, M. L. Bode, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 2587-2605.

¹⁵ K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook*, 7ª Ed., Springer, Berlín (Alemania), **2018**.

Introducción

La actividad catalítica y especificidad de las enzimas se debe a la presencia de un conjunto de aminoácidos que, debido a su disposición estructural y espacial, se agrupan dentro de lo que se conoce como centro catalítico, también conocido como centro activo (del inglés, *active site*). Por un lado, esta resulta ser una zona de la proteína donde se lleva a cabo la catálisis, pero hay otros aminoácidos que también son relevantes desde un punto de vista funcional. Así, los aminoácidos que se encuentran entre las cercanías del centro activo y la superficie, determinan desde la aproximación del sustrato(s) al centro activo, hasta la propia interacción con el medio externo, jugando en este caso un papel crucial cuando se desea inmovilizar la enzima con el fin de conferirle de una mayor estabilidad para trabajar en medios no acuosos como disolventes orgánicos o neotéricos.¹⁶

Como cualquier otro tipo de catalizador, las enzimas pueden presentar tres tipos distintos de selectividad:¹⁷

- **Quimioselectividad**, basada en la capacidad de distinguir entre diferentes grupos funcionales que puedan presentar una reactividad similar.
- **Regioselectividad**, posibilidad de diferenciar grupos funcionales iguales en distintas zonas de una molécula.
- **Estereoselectividad**, permite diferenciar entre isómeros ópticos, como enantiómeros o diastereoisómeros.

Si bien las dos primeras ofrecen múltiples ventajas en síntesis orgánica, evitando procesos tediosos de protección y desprotección de grupos funcionales, la acción estereoselectiva de las enzimas, y por tanto la posibilidad de generar productos enantioméricamente puros a partir de moléculas sin quiralidad o mezclas racémicas, ha motivado el creciente interés de la industria farmacéutica por las biotransformaciones.¹⁸ Así, si bien hay compuestos racémicos en los que ambos enantiómeros pueden presentar idéntico o muy similar perfil biológico, en otros

¹⁶ (a) O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 435-456; (b) A. Basso, S. Serban, *Mol. Catal.* **2019**, *474*, 110607; (c) R. C. Rodrigues, J. J. Virgen-Ortíz, J. C. S. dos Santos, Á. Berenguer-Murcia, A. R. Alcantara, O. Barbosa, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 746-770.

¹⁷ (a) G.-W. Zheng, J.-H. Xu, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 784-792; (b) R. Mu, Z. Wang, M. C. Wamsley, C. N. Duke, P. H. Lii, S. E. Epley, L. C. Todd, P. J. Roberts, *Catalysts* **2020**, *10*, 832.

¹⁸ (a) J.-M. Choi, S.-S. Han, H.-S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443-1454; (b) K. Rosenthal, S. Lütz, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2018**, *11*, 58-64; (c) J. P. Adams, M. J. B. Brown, A. Diaz-Rodriguez, R. C. Lloyd, G.-D. Roiban, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2421-2432; (d) J. I. Ramsden, S. C. Cosgrove, N. J. Turner, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 11104-11112; (e) S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 88-119.

casos uno de los isómeros puede ser completamente inactivo, o puede incluso presentar efectos adversos cuando es administrado (Figura 0.1).¹⁹

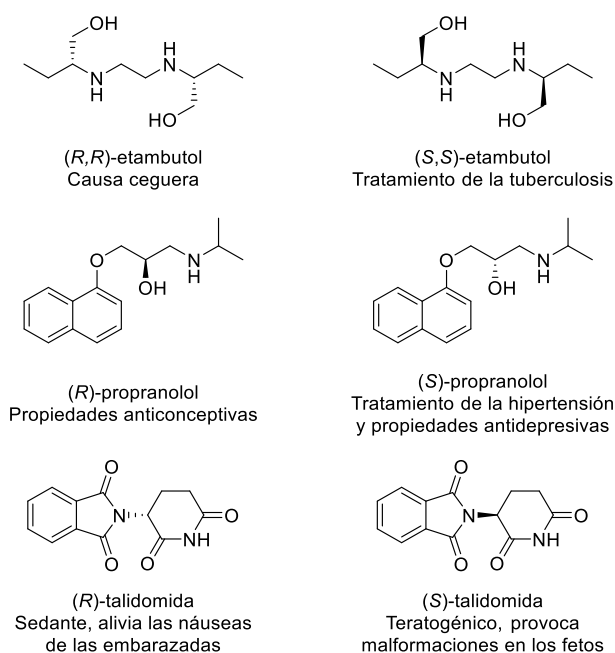


Figura 0.1. Ejemplos de distinción de propiedades entre enantiómeros de un mismo compuesto.

Por todo ello, la necesidad de llevar a cabo transformaciones estereoselectivas en condiciones medioambientalmente favorables, es una demanda social que se ha transferido al sector industrial a través de las distintas agencias de salud nacionales e internacionales. Afortunadamente, diversas biotransformaciones industriales han sido implementadas con éxito en las últimas décadas, lo cual no ha resultado un proceso trivial, sino que ha necesitado de la aplicación de distintas técnicas basadas en la ingeniería de biocatalizadores, condiciones de reacción y diseño de reactores, así como la puesta a punto de métodos rápidos de medida de actividad (y selectividad) enzimática. Sin duda, este es un campo abierto a grandes mejoras

¹⁹ (a) E. Thall, *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, 481-484; (b) A. Mannschreck, R. Kiesswetter, E. von Angerer, *J. Chem. Educ.* **2007**, *84*, 2012-2018; (c) W. H. Brooks, W. C. Guida, K. G. Daniel, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 760-770; (d) M. Abram, M. Jakubiec, K. Kamiński, *ChemMedChem* **2019**, *14*, 1744-1761.

Introducción

especialmente con los avances continuos en numerosas disciplinas como la biología molecular o la modelización computacional.²⁰

0.2. MODOS DE EMPLEO Y CLASIFICACIÓN DE BIOCATALIZADORES

El desarrollo de procesos enzimáticos viene dado por la forma en que se encuentran estos biocatalizadores, ya sea como:

- proteínas (parcialmente) aisladas, con un determinado grado de purificación, y que dan lugar por lo general a procesos altamente selectivos;
- extractos celulares, en los que se ha eliminado en un paso previo de centrifugación las paredes celulares;
- microorganismos, conocidos también como células enteras, en diferentes condiciones (en crecimiento, en reposo o de manera liofilizada), donde el grado de predicción es menor ya que se puede dar lugar a una reacción preferentemente, pero al mismo tiempo pueden ocurrir reacciones secundarias o la misma transformación pero con selectividad distinta a la deseada debido a la acción de otras enzimas endógenas, que pueden desvirtuar el resultado global del proceso.²¹ Esto en parte ha sido superado mediante el uso de microorganismos recombinantes que sobreexpresan en gran cantidad la proteína deseada en el mismo o en otro microorganismo huésped.

Todas estas aproximaciones tienen sus ventajas e inconvenientes en términos de manipulación, estabilidad, economía y equipamiento necesario para llevar a cabo las biotransformaciones, pero parece evidente que, con este punto de partida, y dado el número ingente de enzimas descubiertas hasta la fecha, exista una gran necesidad de realizar una clasificación enzimática en función de la reacción que puedan catalizar. Así, se ha desarrollado un sistema de cuatro dígitos comenzando con el prefijo EC (*Enzyme Commission* de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular),²² de tipo EC a.b.c.d (Tabla 0.1), donde se desglosa:

²⁰ A. Madhavan, K. B. Arun, P. Binod, R. Sirohi, A. Tarafdar, R. Reshmy, M. K. Awasthi, R. Sindhu, *Bioresour. Technol.* **2021**, 325, 124617.

²¹ R. A. Sheldon, D. Brady, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 6088-6104.

²² (a) H. Gröger, Y. Asano, "Introduction-Principles and Historical Landmarks of Enzyme catalysis in Organic Synthesis" en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3^a

- (a) el proceso catalizado por la enzima,
- (b) el sustrato sobre el cual actúa,
- (c) la naturaleza del cosustrato,
- (d) el número individual de la enzima.

Tabla 0.1. Clasificación enzimática en función del tipo de reacción catalizada.

EC	Clase de enzima	Tipo de reacción
1	Oxidoreductasas	Reacciones de oxidación, reducción y oxigenación
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos funcionales: alquilo, amino, cetona, etc.
3	Hidrolasas	Reacciones de formación/hidrólisis de ésteres, péptidos, glicéridos, etc.
4	Liasas	Reacciones de adición/eliminación sobre enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo
5	Isomerasas	Reacciones de isomerización, racemización, epimerización y transposición
6	Ligasas	Reacciones de formación de enlaces covalentes acompañada por la hidrólisis de ATP
7	Translocasas	Movimiento de iones o moléculas a través de las membranas, o su separación dentro de las mismas

Aunque esta clasificación enzimática permite agrupar a las enzimas en función de su reactividad, en los últimos años se han descrito muy diversos procesos no convencionales que han dado lugar a un área emergente conocida como *promiscuidad catalítica*.²³ Este término describe la capacidad que presentan ciertas

Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), 2012, Capítulo 1, pp. 1-42; (b) <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme>.

²³ Revisiones bibliográficas recientes: (a) M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, *15*, 743-759; (b) R. D. Gupta, *Sustain. Chem. Process.* **2016**, *4*, 2; (c) S. D. Copley, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *47*, 167-175; (d) B. P. Dwivedee, S. Soni, M. Sharma, J. Bhaumik, J. K. Laha, U. C. Banerjee, *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 2441-2466; (e) R. B. Leveson-Gower, C. Mayer, G. Roelfes, *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3*, 687-705; (f) P. Singla, R. D. Bhardwaj, *Biocatal. Biotransform.* **2020**, *38*, 81-92.

Introducción

enzimas para llevar a cabo reacciones distintas a las que habitualmente catalizan. Así, por ejemplo, la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B):

- tiene como función natural la hidrólisis de triacilgliceroles, pero además ha resultado ser una enzima eficiente en la hidrólisis de diversos ésteres,²⁴ y en el desarrollo de procesos reversibles de síntesis empleando diferentes nucleófilos (alcoholes, peróxidos, aminas, tioles...), lo que es un ejemplo de la llamada promiscuidad de sustrato;
- además, en 2003 se describió por primera vez que era capaz de catalizar la formación de enlaces C–C,²⁵ reacción típica de la clase de las liasas, lo que indica su promiscuidad catalítica.

Esto no es solo propio de enzimas hidrolíticas, sino que se han descrito ejemplos con otras clases de enzimas como las transaminasas involucradas en procesos de deshalogenaciones selectivas de aminas fluoradas.²⁶

Esta Tesis Doctoral se ha dividido en tres capítulos donde se va a abordar la reactividad de tres tipos de enzimas, como son las lacasas y las alcohol deshidrogenasas, que pertenecen al grupo de las oxidorreductasas (EC 1), así como las transaminasas, englobadas dentro de la clase de las transferasas (EC 2). Es por ello que, en este momento, se comentarán las características generales de estos biocatalizadores para, a continuación, en cada capítulo, profundizar sobre cada una de las clases de biocatalizadores según los proyectos que han sido estudiados.

0.2.1. OXIDORREDUCTASAS (ENZIMAS REDOX)

Las oxidorreductasas catalizan la transferencia de electrones desde un donador (agente reductor y que, por tanto, se oxida) hasta un aceptor (agente oxidante, que se reduce), estando involucradas en procesos de oxidación, reducción y oxigenación de diversos sustratos. En concreto, en esta Tesis Doctoral se han empleado varias lacasas y alcohol deshidrogenasas que, respectivamente, han permitido desarrollar

²⁴ (a) E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal. Biotransform.* **1997**, *16*, 181-204; (b) V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.

²⁵ C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874-875.

²⁶ A. Cuertos, M. García-Ramos, E. Fischereder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3144-3147.

procesos de oxidación de alcoholes y reducción asimétrica de cetonas. Por tanto, a continuación, se describen las principales características de ambos tipos de enzimas redox.

0.2.1.1. Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2: 1. Oxidorreductasas; 1.10. Actúan sobre difenoles y sustancias similares como donadores de electrones; 1.10.3. Emplean oxígeno como aceptor de electrones; 1.10.3.2. Lacasas) son cuproproteínas que llevan a cabo la oxidación de un sustrato adecuado, típicamente aminas o alcoholes aromáticos, utilizando oxígeno molecular y dando lugar a agua como único subproducto.²⁷ Estos biocatalizadores se encuentran presentes en diferentes organismos vivos como bacterias, hongos, líquenes, plantas superiores e insectos,²⁸ presentando a su vez diferentes características y funciones, dependientes del hábitat donde se hayan desarrollado. Así, la temperatura y pH óptimos para el funcionamiento y estabilidad de las lacasas vienen determinados en función del organismo del que proceden. Por ejemplo, aquellas derivadas de plantas suelen funcionar correctamente a valores de pH cercanos a 9, mientras que las de origen fúngico prefieren intervalos de pH más ácidos (3-7).²⁹

Desde el punto de vista industrial,³⁰ estas enzimas han demostrado su versatilidad en variedad de sectores como el:

- textil, dado que son capaces de llevar a cabo la decoloración de tintes, reduciendo los niveles de contaminación en aguas residuales con respecto a otras aproximaciones más tradicionales,³¹

²⁷ (a) S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219-226; (b) M. D. Cannatelli, J. Ragauskas, *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 122-140.

²⁸ (a) K. J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jiang, Y. C. Zhu, R. Xu, J. L. Kerwin, F. Turecek, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 385-392; (b) H. Forootanfar, M. A. Faramarzi, *Biotechnol. Prog.* **2015**, *31*, 1443-1463.

²⁹ V. Madhavi, S. S. Lele, *BioResources* **2009**, *4*, 1694-1717.

³⁰ (a) Z.-B. Guan, Q. Luo, H.-R. Wang, Y. Chen, X.-R. Liao, *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 3569-3592; (b) A. Zerva, S. Simić, E. Topakas, J. Nikodinovic-Runic, *Catalysts* **2019**, *9*, 1023.

³¹ (a) C. Pezzella, L. Guarino, A. Piscitelli, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 923-940; (b) L. Arregui, M. Ayala, X. Gómez-Gil, G. Gutiérrez-Soto, C. E. Hernández-Luna, M. Herrera de los Santos, L. Levin, A. Rojo-Domínguez, D. Romero-Martínez, M. C. N. Saparrat, M. A. Trujillo-Roldán, N. A. Valdez-Cruz, *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 200.

Introducción

- papelerero, en procesos de separación y degradación de derivados de la madera, como la lignina,³²
- farmacéutico, dando lugar a intermedios radicalarios que han permitido la síntesis de diferentes derivados farmacéuticos de interés,³³ además de diversas aplicaciones en síntesis orgánica.³⁴

Como se comentó anteriormente, estas enzimas contienen varios átomos de cobre en su estructura, los cuales se encuentran involucrados en el mecanismo del proceso de oxidación que catalizan. En concreto, sus estructuras presentan 4 átomos de cobre formando un clúster presente en el centro activo de la enzima, los cuales son diferenciables a través de sus señales de resonancia paramagnética electrónica (EPR, del inglés *electron paramagnetic resonance*), dividiéndose en tres tipos (Figura 0.2a): Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3.³⁵

Así, el átomo de cobre de Tipo 1 se encuentra coordinado ecuatorialmente a dos residuos de histidina y uno de cisteína, y de forma axial a un cuarto aminoácido, que varía según el tipo de microorganismo del cual provenga la enzima (metionina en las bacterias y fenilalanina o leucina en el caso de las fúngicas). Análisis de EPR han mostrado señales intensas y una gran absorción a 610 nm (en la forma oxidada),^{35a} debida a la transferencia de carga entre el azufre de la cisteína y el átomo de cobre, lo que genera un cierto color azulado y hace conocer a estas enzimas como “*blue copper oxidases*”.^{27a} De entre los cuatro átomos de cobre presentes en el centro activo, este de Tipo 1 es el que presenta un mayor potencial redox, por lo que es donde se produce la oxidación del sustrato.

³² (a) L. Munk, A. K. Sitarz, D. C. Kalyani, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 13-24; (b) A. K. Sitarz, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *36*, 70-86.

³³ (a) P. K. Chaurasia, S. L. Bharati, C. Sarma, *Mini Rev. Org. Chem.* **2016**, *13*, 430-451; (b) C. Romero-Guido, A. Baez, E. Torres, *Catalysts* **2018**, *8*, 223.

³⁴ (a) K. W. Wellington, “Application of Laccases in Organic Synthesis: A Review” en *Green Chemistry*, Ed. R. Luque, Nova Science Publishers Inc., Nueva York (EE. UU.), **2014**, Capítulo 7, pp. 167-212; (b) I. Bassanini, E. E. Ferrandi, S. Riva, D. Monti, *Catalysts* **2021**, *11*, 26.

³⁵ (a) H. Claus, *Micron* **2004**, *35*, 93-96; (b) P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, G. Sannia, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 369-385; (c) M. Valles, A. F. Kamaruddin, L. S. Wong, C. F. Blanford, *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10*, 5386-5410.

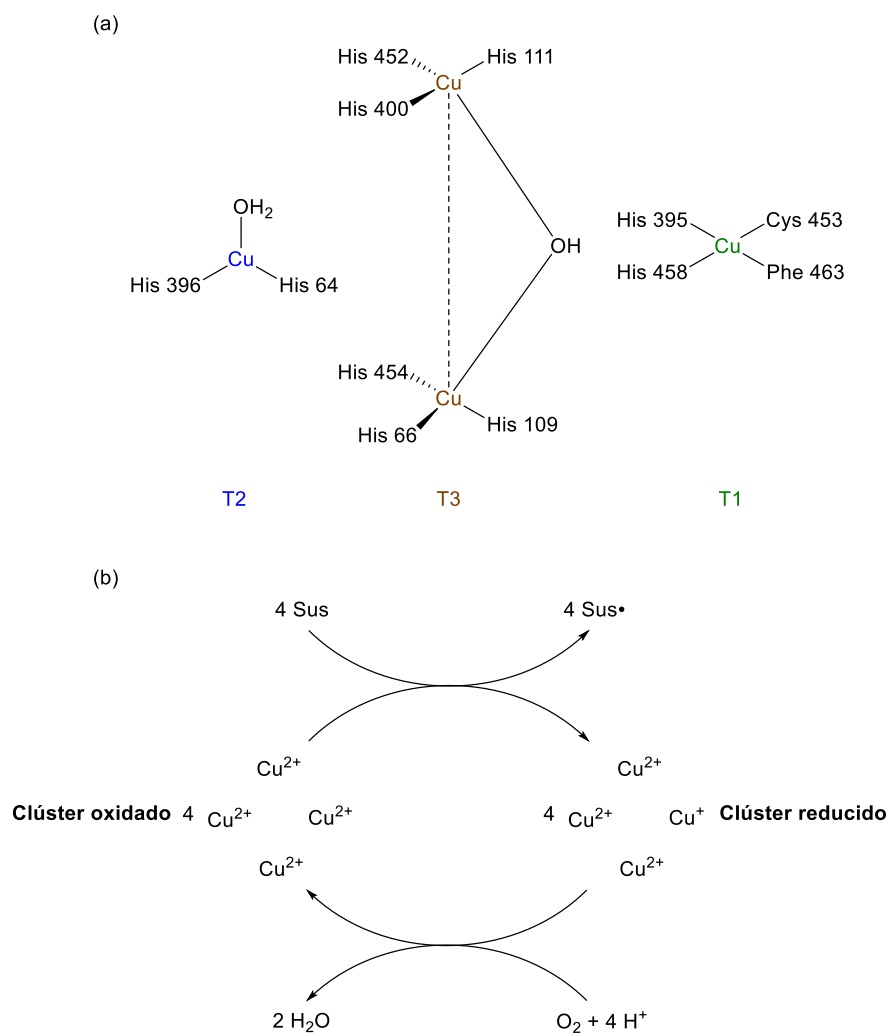


Figura 0.2. (a) Clúster catalítico de la lacasa de *Trametes versicolor* conformado por cuatro átomos de cobre. T1 = átomo de cobre de Tipo 1, T2 = átomo de cobre de Tipo 2 y T3 = átomos de cobre de Tipo 3. (b) Representación esquemática del ciclo oxidativo de una lacasa, donde se generan cuatro radicales del sustrato oxidado y dos moléculas de agua a partir de cada molécula de oxígeno reducida. Sus = sustrato reducido, Sus• = radical del sustrato oxidado.

Por otra parte, a diferencia del átomo de cobre de Tipo 1, el átomo de cobre de Tipo 2 no presenta absorción en el espectro visible, aunque tiene propiedades paramagnéticas según la EPR. Este átomo se encuentra coordinado a dos residuos de histidina y a una molécula de agua. Por último, los átomos de cobre de Tipo 3 no

Introducción

presentan señales en la EPR y absorben a 330 nm (en la forma oxidada),^{35a} encontrándose coordinados a tres residuos de histidina diferentes y entre ellos a través de un grupo hidroxilo que actúa como puente. De manera global, ocurren cuatro oxidaciones monoelectrónicas de cuatro moléculas del sustrato, y puesto que se trata de un proceso unitario, el electrón procedente del átomo de cobre de Tipo 1 se transfiere al clúster trinuclear formado por los átomos de cobres de Tipo 2 y 3, ocurriendo en ese momento la reducción del oxígeno molecular generando agua (Figura 0.2b). Este tipo de procesos monoelectrónicos genera radicales, procedentes del sustrato inicial, que pueden evolucionar dando lugar a diversos procesos de unión (dimerización, oligomerización y/o polimerización), así como degradaciones de compuestos poliméricos y rupturas de anillos aromáticos.^{35a}

0.2.1.1.1. Las lacasas de *Trametes versicolor* y de *Myceliophthora thermophila*

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han utilizado principalmente dos lacasas, ambas procedentes de hongos, la de *Trametes versicolor* (LTV), disponible comercialmente, en nuestro caso a través de la casa comercial Sigma-Aldrich,³⁶ y la de *Myceliophthora thermophila* (LMT) que fue suministrada por la compañía Novozymes.³⁷ De ambas, la LTV es la que ha dado sin duda mejores resultados, como se describirá en los Capítulos 1 y 2 de esta Memoria.

Piontek y Bertrand describieron por primera vez la estructura cristalina de la lacasa de *Trametes versicolor* en 2002, tratándose de una enzima glicosídica conformada por 3 dominios de forma monomérica y una masa molecular entorno a los 70 kDa (Figura 0.3).³⁸

³⁶ <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/38429?lang=es®ion=ES>.

³⁷ <https://www.novozymes.com/en/scientific-publications/characterization-of-novel-enzymes>.

³⁸ (a) K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37663-37669; (b) T. Bertrand, C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougin, *Biochemistry* **2002**, *41*, 7325-7333.

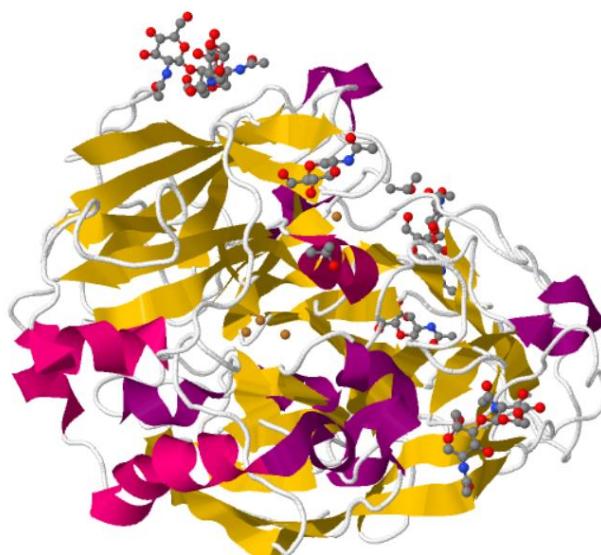


Figura 0.3. Estructura cristalina de la lacasa procedente de *Trametes versicolor*. En ella se observan los átomos de cobre en el centro activo de la proteína (esferas marrones). Tomada del PDB, estructura 1GYC, <https://www.rcsb.org/3d-view/jsmol/1GYC/1>.

El organismo *Trametes versicolor* (que también puede conocerse como *Coriolus versicolor*, *Agaricus versicolor*, *Boletus versicolor*, *Polyporus versicolor*, *Polystictus versicolor* o *Poria versicolor*), es un hongo blanco basidiomiceto que se ha descrito como uno de los que poseen una mayor capacidad para llevar a cabo la degradación de la madera. Además, debido a la capacidad de este hongo para expresar diversas enzimas, se ha estudiado su aplicación en sistemas de purificación, biodegradación y biosorción de contaminantes, incluyéndose entre estos diversos pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, tintes textiles, retardantes de llama bromados y compuestos farmacéuticos.³⁹

Por otro lado, la estructura cristalina de la lacasa del hongo *Myceliophthora thermophila*, fue descrita por primera vez en 2018 por Ernst y colaboradores,⁴⁰ tratándose de una proteína glicosídica termoestable, dividida en tres dominios, con una masa molecular aproximadamente de 128 kDa (Figura 0.4). Esto último sugiere

³⁹ A. P. M. Tavares, S. R. Pereira, A. M. R. B. Xavier, *Curr. Biotechnol.* **2017**, *6*, 78-88.

⁴⁰ H. A. Ernst, L. J. Jørgensen, C. Bukh, K. Piontek, D. A. Plattner, L. H. Østergaard, S. Larsen, M. J. Bjerrum, *PLoS One* **2018**, *13*, e0206589.

Introducción

que la enzima se encuentra en un rápido equilibrio de formas monómero-dímero, pero siendo predominante el estado monomérico en disolución.^{40,41}

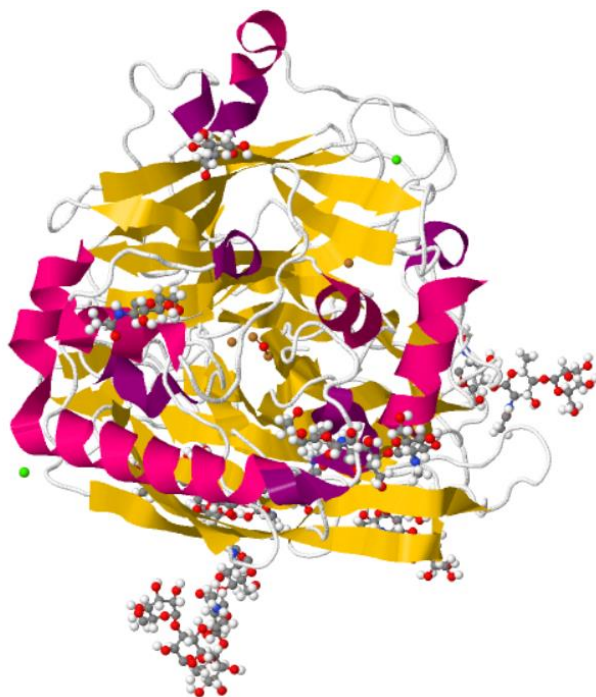


Figura 0.4. Estructura cristalina de la lacasa procedente de *Myceliophthora thermophila*. En ella se observan los átomos de cobre en el centro activo de la proteína (esferas marrones). Tomada del PDB, estructura 6F5K, <https://www.rcsb.org/3d-view/jsmol/6f5k>.

Mientras que la lacasa de *Trametes versicolor* exhibe los mayores valores de actividad a temperaturas suaves, en torno a 30 °C, la lacasa de *Myceliophthora thermophila* presenta una mayor termoestabilidad, lo que permite su utilización a temperaturas más altas. Además, se han llevado a cabo diferentes estudios de tiempos de vida media a elevadas temperaturas, produciéndose la mayor parte de la desnaturalización proteica cuando se alcanzan valores de alrededor de 80 °C.⁴² Por otro lado, ambas lacasas son activas a valores ácidos de pH, si bien la *LMt* alcanza buenas actividades incluso a pHs neutros. Por ello, el rango de utilización de las

⁴¹ R. M. Berka, P. Schneider, E. J. Golightly, S. H. Brown, M. Madden, K. M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf, F. Xu, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3151-3157.

⁴² J. I. López-Cruz, G. Viniegra-González, A. Hernández-Arana, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1093-1098.

lacasas durante el desarrollo de los diferentes experimentos de esta Tesis Doctoral ha estado en el intervalo de pH de 4.5 a 7.0.

Sin duda, ambas lacasas presentan hoy en día un gran interés práctico, siendo el descubrimiento y la generación de nuevas variantes de estos catalizadores redox, un área emergente en el campo de la Biocatálisis.⁴³ La lacasa de *Trametes versicolor* será ampliamente estudiada en los dos primeros capítulos de esta Tesis Doctoral, mientras que la de *Myceliophthora thermophila* se ha empleado exclusivamente en el primero de ellos.

0.2.1.1.2. Los sistemas lacasa-mediador (LMS)

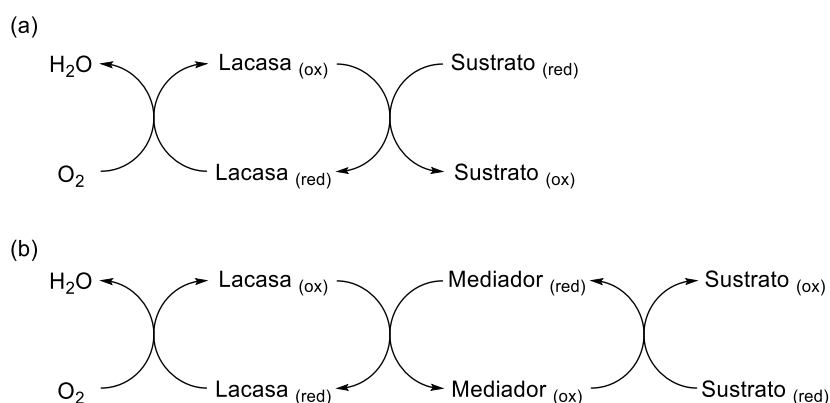
La presencia del átomo de cobre de Tipo 1 en la estructura de estas enzimas permite llevar a cabo procesos de oxidación de diversos sustratos, como por ejemplo fenoles, cuyos potenciales redox se encuentran entre 0.5-1.0 voltios, y que se consideran los sustratos naturales de estas enzimas (Esquema 0.1a). Sin embargo, otros compuestos, como alcoholes o aminas alifáticas, no pueden ser oxidados por acción directa de este tipo de enzimas. Para solventar este inconveniente, en estos casos es necesario utilizar un compuesto intermedio que actúe como sustrato de la lacasa, y que pueda oxidar el derivado de interés, pudiéndose ampliar así el espectro de compuestos que se pueden utilizar con estas enzimas, y por tanto sus posibilidades sintéticas.⁴⁴ Este tipo de moléculas intermedias se denominan mediadores, y el conjunto de la lacasa junto con el mediador se conoce como sistema lacasa-mediador (LMS, del inglés *laccase-mediator system*).⁴⁵ En ellos, la lacasa lleva a cabo la oxidación del mediador, generando una especie oxidada cuyo potencial redox es lo suficientemente elevado como para llevar a cabo la subsecuente oxidación del sustrato deseado (Esquema 0.1b). Tras ello, el mediador vuelve a su forma inicial (reducida), reincorporándose al ciclo catalítico oxidativo de la lacasa.

⁴³ (a) D. M. Mate, M. Alcalde, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 25-40; (b) I. Pardo, S. Camarero, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 897-910.

⁴⁴ (a) S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1187-1209; (b) T. Kudanga, B. Nemađziva, M. Le Roes-Hill, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 13-33.

⁴⁵ (a) O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, S. V. Shleev, Y. I. Yaropolov, *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43*, 523-535; (b) A. I. Cañas, S. Camarero, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 694-705; (c) M. Mogharabi, M. A. Faramarzi, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 897-927.

Introducción



Esquema 0.1. Representación del ciclo catalítico de una lacasa: (a) en ausencia de un mediador; y (b) en presencia de un mediador.

En función de su mecanismo de acción, los mediadores químicos se engloban en tres grupos: mediadores de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, del inglés *hydrogen atom transfer*), de transferencia electrónica (ET, del inglés *electronic transfer*) y aquellos formados por radicales nitroxilo.⁴⁶

Uno de los primeros mediadores utilizados en los LMS, concretamente en 1990, fue el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolidina-6-sulfónico), comúnmente conocido como ABTS (Figura 0.5a), y que pertenece al grupo de mediadores de transferencia electrónica.

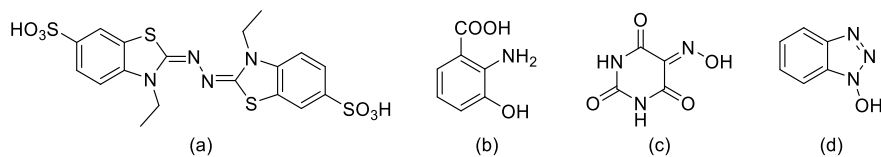


Figura 0.5. Ejemplos de mediadores químicos: (a) Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolidina-6-sulfónico) (ABTS). (b) Ácido 3-hidroxiantranílico (HAA). (c) Ácido violúrico (VLA). (d) 1-Hidroxibenzotriazol (HBT).

Por otra parte, los mediadores de tipo HAT, presentan grupos hidroxilo o amino en sus estructuras (Figura 0.5b), dando lugar a radicales al ser oxidados por las lacasas. En concreto, los mediadores de tipo N-OH dan lugar a radicales nitroxilo

⁴⁶ J.-R. Jeon, Y.-S. Chang, *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 335-341.

en el propio medio de reacción, siendo las especies que dan lugar a la oxidación del sustrato (Figuras 0.5c,d).

Un tercer grupo de mediadores se encuentra conformado por aquellos que contienen radicales nitroxilo alquílicos, los cuales se comentarán a continuación en mayor profundidad, debido a que han sido empleados ampliamente en el segundo capítulo de esta Tesis Doctoral, concretamente el radical TEMPO.

0.2.1.1.3. Mediadores radicalarios de tipo nitroxilo: TEMPO como oxidante

La utilización de mediadores cuyas estructuras se basan en nitroxidos alquílicos suscita gran interés debido a que este tipo de compuestos son capaces de presentarse como radicales nitroxilo muy estables en el medio de reacción.⁴⁷ En concreto, los compuestos pertenecientes a la familia de los derivados del 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-*N*-oxilo, más conocido como TEMPO (Figura 0.6), que fue descrito por primera vez en 1960 por Lebedev y colaboradores.⁴⁸

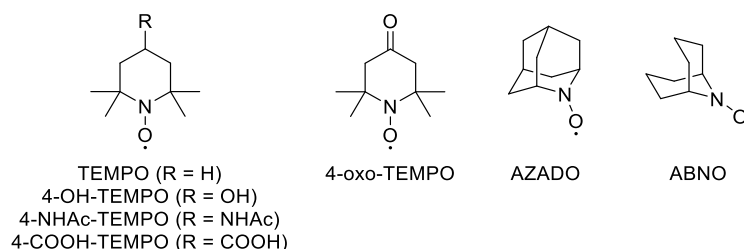


Figura 0.6. Ejemplos de estructuras de nitroxidos de dialquilo cíclicos.

Este tipo de estructuras radicalarias estables presentan un extraordinario comportamiento redox,⁴⁹ lo que hace que hayan sido ampliamente utilizadas en síntesis orgánica para llevar a cabo diferentes tipos de reacciones. Inicialmente estas transformaciones fueron enfocadas a la oxidación anaeróbica de alcoholes,⁵⁰ pero con el paso de los años, sus posibilidades se ampliaron a otro tipo de

⁴⁷ (a) Q. Cao, L. M. Dornan, L. Rogan, N. L. Hughes, M. J. Muldoon, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 4524-4543; (b) S. L. Zultanski, S. S. Stahl, "NO_x Cocatalysts for Aerobic Oxidation Reactions: Application to Alcohol Oxidation" en *Liquid Phase Aerobic Oxidation Catalysis*, Eds. S. S. Stahl, P. L. Alsters, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2016**, Capítulo 15, pp. 239-252.

⁴⁸ (a) O. L. Lebedev, S. N. Kazarnovskii, *Zhur. Obshch. Khim.* **1960**, 30, 1631-1635; (b) N. Merbouh, J. M. Bobbitt, C. Brückner, *Org. Prep. Proced. Int.* **2004**, 36, 1-31.

⁴⁹ J. E. Nutting, M. Rafiee, S. S. Stahl, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 4834-4885.

⁵⁰ J. A. Cella, J. A. Kelley, E. F. Kenehan, *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 1860-1862.

Introducción

transformaciones químicas, incluyendo la oxidación aeróbica de alcoholes y aminas o la creación de enlaces C–O, C–N y C–C,^{49,51} entre otros. Por otra parte, debido a la gran aplicabilidad sintética de este tipo de compuestos, su empleo en reacciones fotocatalíticas oxidativas está cada vez más en auge.⁵²

Como se ha comentado previamente, este tipo de compuestos, y en concreto el TEMPO, han sido utilizados como mediadores en procesos de oxidación involucrando lacasas.^{45,53} En este caso, el mecanismo de reacción establecido en la bibliografía comienza por la oxidación del radical nitroxilo por la lacasa a expensas de la reducción del oxígeno, dando lugar a un catión oxoamonio, que resulta ser el encargado de llevar a cabo la oxidación del sustrato.⁵⁴ En este punto la oxidación del sustrato puede seguir dos vías, en función del pH del medio de reacción (Esquema 0.2):⁵⁵

- Medio ácido, donde el mecanismo propuesto se basa en una transferencia bimolecular de hidruro, de la molécula de alcohol al ion oxoamonio. En este caso suelen estar más favorecidos alcoholes más ricos electrónicamente, si bien es cierto, que la cinética de estos procesos en medio ácido suele ser bastante peor que la de los que transcurren en condiciones básicas. En este caso se han establecido al menos dos mecanismos de reacción: (a) a bajos valores de pH ($\text{pH} \leq 4$) se favorece la oxidación de los alcoholes secundarios, con una cinética lenta; y (b) a valores de pH algo mayores ($7 \geq \text{pH} \geq 5$) se favorece la oxidación de los alcoholes primarios, con una mayor velocidad de reacción.
- Medio básico, donde se forma un aducto de alcóxido intermedio con el ion oxoamonio. En este caso hay un fuerte impedimento estérico, siendo posible

⁵¹ (a) O. G. Mancheño, T. Stopka, *Synthesis* **2013**, 45, 1602-1611; (b) B. L. Ryland, S. S. Stahl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 8824-8838; (c) H. A. Beejapur, Q. Zhang, K. Hu, L. Zhu, J. Wang, Z. Ye, *ACS Catal.* **2019**, 9, 2777-2830; (d) H. Zuang, H. Li, S. Zhang, Y. Yin, F. Han, C. Sun, C. Miao, *Chin. Chem. Lett.* **2020**, 31, 39-48; (e) Z. Ma, K. T. Mahmudov, V. A. Aliyeva, A. V. Gurbanov, A. J. L. Pombeiro, *Coord. Chem. Rev.* **2020**, 423, 213482.

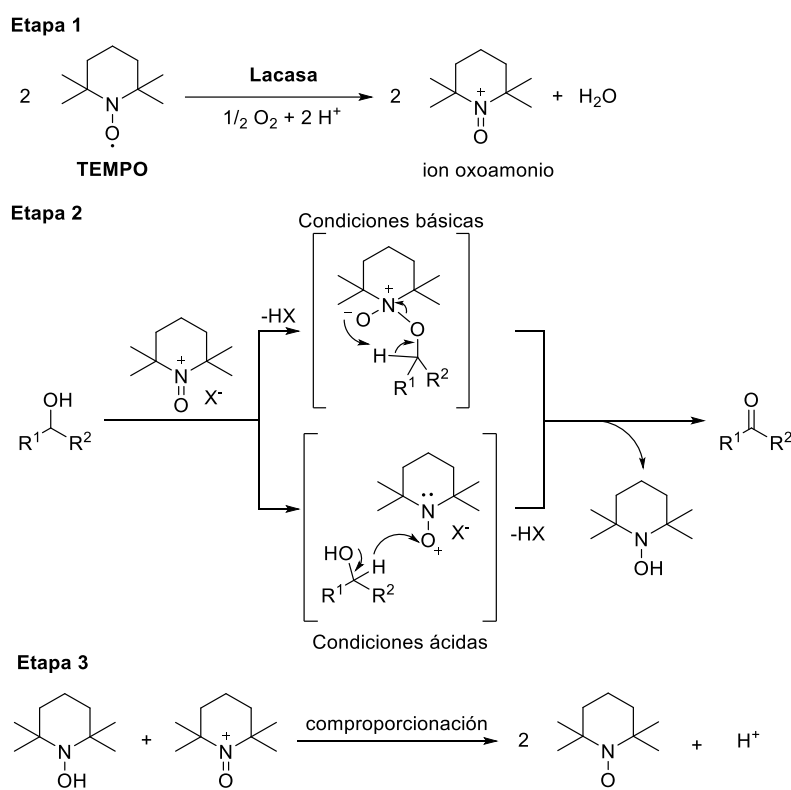
⁵² X. Lang, J. Zhao, *Chem. Asian J.* **2018**, 13, 599-613.

⁵³ M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 16, 231-240.

⁵⁴ (a) I. W. C. E. Arends, Y.-X. Li, R. Ausan, R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **2006**, 6659-6665; (b) S. A. Tromp, I. Matijošytė, R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, G. Mul, M. T. Kreutzer, J. A. Mouljin, S. de Vries, *ChemCatChem* **2010**, 2, 827-833.

⁵⁵ (a) W. F. Bailey, J. M. Bobbitt, K. B. Wiberg, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4504-4509; (b) M. Rafiee, K. C. Miles, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 14751-14757.

incluso llevar a cabo oxidaciones regioselectivas sobre alcoholes primarios en presencia de secundarios.



Esquema 0.2. Mecanismo de oxidación de un alcohol a un grupo carbonilo catalizado por el sistema lacasa/TEMPO en tres etapas.

Como puede observarse y acorde a la bibliografía, en la última etapa del proceso oxidativo se produce una comproporciónación entre el catión oxoammonio y la hidroxilamina (TEMPO reducido) generada en la etapa 2, recuperándose dos moléculas del radical nitroxilo inicial.^{54b} Por último, dado que las lacasas trabajan mejor en entornos ligeramente ácidos o, a lo sumo neutros, el mecanismo de reacción que se propone en este caso será el representado para el medio ácido.

Introducción

0.2.1.2. Alcohol deshidrogenasas

Las alcohol deshidrogenasas (ADHs), también conocidas como carbonil reductasas (CRs) o ceterreductasas (*ketoreductases*, KREDs),⁵⁶ son enzimas pertenecientes a la clase de las oxidorreductasas (EC 1.1.1.1: 1. Oxidorreductasas; 1.1. Actúan sobre grupos CH-OH como donadores de electrones; 1.1.1. Emplean NAD⁺ o NADP⁺ como aceptor de electrones; 1.1.1.1. Alcohol deshidrogenasas). Su reacción principal es la reducción de grupos carbonilo a los correspondientes alcoholes,⁵⁷ si bien dependiendo de las condiciones de reacción pueden catalizar el proceso reversible de oxidación incluso con aplicaciones prácticas industriales.⁵⁸

Para llevar a cabo este tipo de reacciones, las enzimas requieren de un cofactor de nicotinamida como fuente de hidruro, bien sea el dinucleótido de nicotinamida y adenina (*nicotinamide adenine dinucleotide in reduced form*, NADH), o el dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in reduced form*, NADPH) en sus formas reducidas (Figura 0.7).⁵⁹

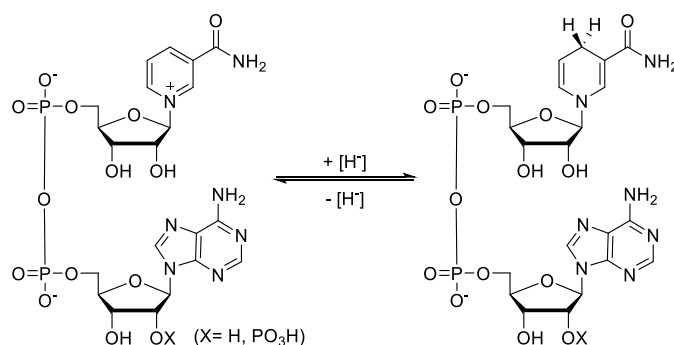


Figura 0.7. Estructuras de los cofactores pirimidínicos NAD (X = H) y NADP (X = PO₃H) requeridos por las ADHs, tanto en su forma oxidada (izquierda) como reducida (derecha).

⁵⁶ (a) H. Gröger, W. Hummel, S. Borchert, M. Krauß, "Reduction of Ketones and Aldehydes to Alcohols" en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3^a Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, Capítulo 26, pp. 1035-1110; (b) C. M. Nealon, M. M. Musa, J. M. Patel, R. S. Phillips, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 2100-2114; (c) R. Kratzer, J. M. Woodley, B. Nidetzky, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1641-1652; (d) J. An, Y. Nie, Y. Xu, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2019**, *39*, 366-379; (e) F. Hollmann, D. J. Opperman, C. E. Paul, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 5644-5665.

⁵⁷ (a) M. Hall, A. S. Bommarius, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110; (b) J. Magano, J. R. Dunetz, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 1156-1184; (c) N. J. Turner, L. Humphreys, *Biocatalysis in Organic Synthesis: The Retrosynthesis Approach*, Royal Society of Chemistry, Cambridge (Reino Unido), **2018**.

⁵⁸ (a) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmey, B. Bühler, *Green Chem.* **2011**, *13*, 226-265; (b) K. Robins, A. Osorio-Lozada, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1524-1530.

⁵⁹ H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773-1789.

En el caso de las reducciones de cetonas proquirales, una de las características más remarcables de las ADHs es su alta estereoselectividad,⁶⁰ que viene determinada por la transferencia, en el centro activo de la enzima, de un hidruro proveniente de la forma reducida del cofactor al grupo carbonilo proquiral de la cetona. De esta manera, según por qué cara transcurra este ataque, se genera el correspondiente alcohol secundario ópticamente activo. Así, de acuerdo con la “regla de Prelog” establecida en 1964 (Figura 0.8),⁶¹ aquellas ADHs que llevan a cabo la transferencia del grupo hidruro por la cara *Re* de la cetona proquiral se denominan de tipo “Prelog”, y dan lugar a alcoholes de configuración *S*, siempre y cuando el sustituyente más voluminoso tenga preferencia a la hora de asignar las prioridades de Cahn-Ingold-Prelog. Por otro lado, aquellas ADHs que dan lugar a los alcoholes de configuración *R*, por transferencia del grupo hidruro por la cara *Si* de la cetona, son denominadas “anti-Prelog”. En la naturaleza, se encuentran más frecuentemente ADHs con selectividad Prelog, si bien se han diseñado en muchos casos ADHs con preferencia anti-Prelog a través de técnicas de biología molecular.

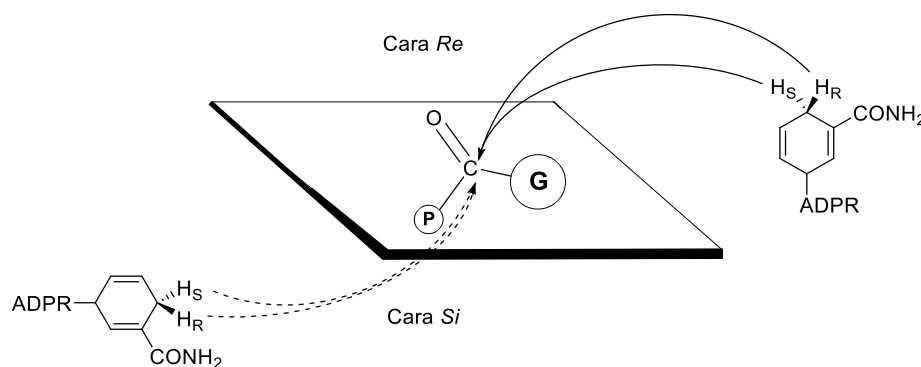


Figura 0.8. Reducción de cetonas proquirales (P= sustituyente pequeño, G= sustituyente grande) catalizada por ADHs. Las líneas continuas indican una transferencia del hidruro por la cara *Re*, mientras que las discontinuas a través de la cara *Si*.

Por otro lado, esta misma estereoselectividad es aplicable al proceso contrario de oxidación. Así, cuando una ADH es completamente selectiva en la oxidación de un alcohol secundario racémico, tiene lugar la oxidación del 50% de la mezcla (la correspondiente al enantiómero más reactivo), en lugar del 100%, que es lo que suele

⁶⁰ (a) G. W. Huisman, J. Liang, A. Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 122-129; (b) M. M. Musa, R. S. Phillips, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1311-1323; (c) D. Romano, R. Villa, F. Molinari, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 739-749.

⁶¹ V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130.

Introducción

ocurrir cuando consideramos alcoholes no racémicos, como pueden ser los primarios.

0.2.1.2.1. Tipos de alcohol deshidrogenasas

Estas enzimas se clasifican de forma general en tres grandes grupos en función de la longitud de su cadena de aminoácidos, como son las ADHs de cadena larga (600-750 aminoácidos), media (alrededor de 350 aminoácidos) y corta (sobre 250 aminoácidos), presentando similares patrones estructurales, pero también características muy diferenciales. De los tres tipos, las enzimas de cadena media y corta son las más comúnmente empleadas en procesos sintéticos, y sus mecanismos han sido ampliamente estudiados.⁶²

Las ADHs de cadena media presentan un ion metálico de Zn^{2+} , coordinado tetraédricamente por dos residuos de cisteína y uno de histidina, junto con una molécula de agua.⁶³ Esta molécula de agua es sustituida por un ion alcóxido, bien durante el proceso de reducción por el átomo de oxígeno del grupo carbonilo (Esquema 0.3),⁶⁴ o bien por el grupo hidroxilo del alcohol en el proceso de oxidación, facilitando la ruptura del enlace O–H del alcohol al ser oxidado. Por otra parte, este ion metálico presenta una fuerte coordinación con el centro activo de la enzima, lo cual se ha demostrado al no producirse la inactivación del biocatalizador cuando se añaden diferentes agentes quelantes para tratar de llevar a cabo la extracción del átomo de Zn^{2+} .⁶⁵ En los Capítulos 2 y 3 de esta Tesis Doctoral se hará uso de las siguientes ADHs de cadena media:

- ADH-A de *Rhodococcus ruber*.⁶⁶

⁶² P. A. Frey, D. Hegeman, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, Nueva York (EE. UU.), **2007**.

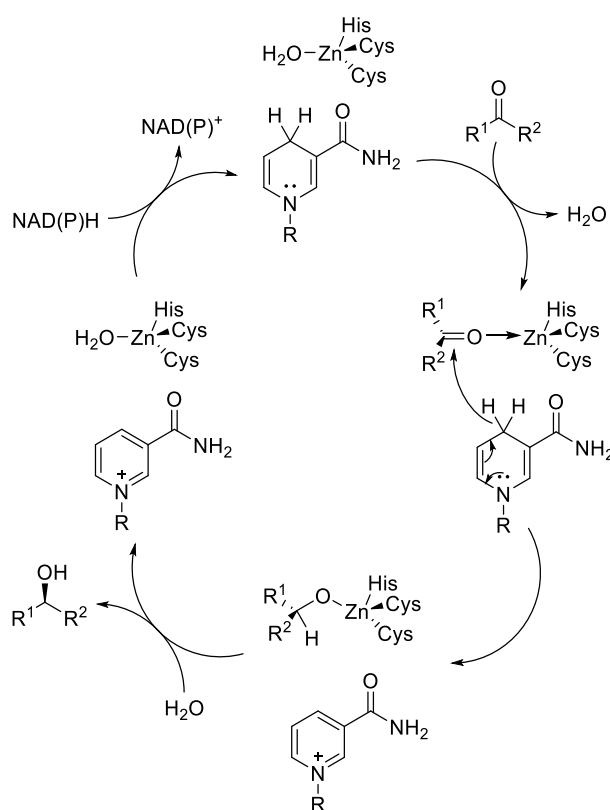
⁶³ (a) P. J. Baker, K. L. Britton, M. Fisher, J. Esclapez, C. Pire, M. J. Bonete, J. Ferrer, D. W. Rice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 779-784; (b) R. Crichton, "Zinc – Lewis Acid and Gene Regulator" en *Biological Inorganic Chemistry: A New Introduction to Molecular Structure and Function*, Elsevier, Ámsterdam (Países Bajos), **2019**, Capítulo 12, pp. 229-246.

⁶⁴ F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green. Chem.* **2011**, *13*, 2285-2314.

⁶⁵ B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 55-62.

⁶⁶ W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014-1017.

- ADH-T de *Thermoanaerobacter* sp.⁶⁷
- TeSADH de *Thermoanaerobacter ethanolicus*.⁶⁸



Esquema 0.3. Mecanismo resumido de la reducción de una cetona proquiral llevada a cabo por una ADH dependiente de Zn²⁺ en ausencia de un sistema de regeneración del cofactor.

Por otro lado, las ADHs de cadena corta no son dependientes del ion Zn²⁺ ni de otros metales, pero suelen tener presentes iones Mg²⁺ que estabilizan su estructura cuaternaria, confiriéndoles de una mayor resistencia a temperaturas altas y a la presencia de disolventes orgánicos. Además, se ha demostrado que, en contraposición a las ADHs de cadena media, la adición de agentes quelantes conduce a la inactivación del biocatalizador, aunque la estructura cuaternaria no se ve

⁶⁷ Z. Findrik, D. Vasić-Rački, S. Lütz, T. Dausmann, C. Wandrey, *Biotechnol. Lett.* **2005**, 27, 1087-1095.

⁶⁸ C. Heiss, M. Laivenieks, J. G. Zeikus, R. S. Phillips, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 7, 1659-1666.

Introducción

afectada en gran medida por ello.⁶⁹ Por otra parte, también a diferencia de las ADHs de cadena media, en lugar de utilizar Zn^{2+} para llevar a cabo la activación del sustrato, es clave la actuación de un residuo de tirosina. Para ello, este aminoácido debe encontrarse, o bien en su forma ionizada para abstraer el protón del alcohol a oxidar, generando el grupo carbonilo correspondiente (Figura 0.9), o bien en su forma neutra para el proceso inverso de reducción, cediendo así el protón al grupo alcóxido generado en la biorreducción y dando lugar al enlace O–H.

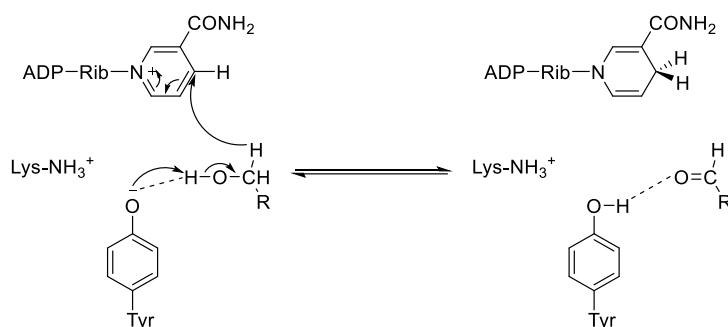


Figura 0.9. Biooxidación de un alcohol primario mediada por una ADH de cadena corta.

En los Capítulos 2 y 3 de esta Tesis Doctoral se hará uso de las siguientes ADHs de cadena corta:

- RasADH de *Ralstonia* sp.⁷⁰
- SyADH de *Sphingobium yanoikuyae*.^{70b,71}
- LBADH de *Lactobacillus brevis*.⁷²
- Enzima comercial evo-1.1.200.⁷³

⁶⁹ N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813.

⁷⁰ (a) I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2008**, *15*, 6003-6005; (b) H. Man, K. Kędziora, J. Kulig, A. Frank, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, D. Rother, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, *Top. Catal.* **2014**, *5*, 356-365.

⁷¹ (a) I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *11*, 2155-2158; (b) I. Lavandera, G. Oberdofer, J. Gross, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *15*, 2539-2543.

⁷² (a) M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306-4308; (b) S. Leuchs, L. Greiner, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, *2*, 267-281.

⁷³ S. Kara, D. Spickermann, A. Weckbecker, C. Leggewie, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 973-976.

0.2.1.2.2. Sistemas de regeneración del cofactor

Como se ha comentado anteriormente, las ADHs requieren de cofactores para su correcta actuación, siendo este tipo de compuestos relativamente inestables y de un alto coste económico.⁷⁴ Su precio y la posible inactivación de las ADHs a altas concentraciones del cofactor, por tanto, limitan su empleo en cantidades estequiométricas, por lo que se han desarrollado diferentes metodologías para llevar a cabo la regeneración *in situ* de estos cofactores pirimidínicos, pudiendo así utilizarse en cantidades catalíticas. Entre las diferentes técnicas empleadas, destacan la utilización de sistemas acoplados conocidos como del sustrato (Esquema 0.4a) o de la enzima acoplada (Esquema 0.4b),⁷⁵ así como otras técnicas electroquímicas, fotoquímicas o de catálisis metálica.^{59,76}

Como se ha comentado con anterioridad, el desarrollo de una reacción que transcurre de manera paralela a la principal es lo que da lugar a los sistemas acoplados de reciclaje del cofactor, y requieren de la utilización de un cosustrato auxiliar. Así, los dos sistemas descritos, se describen en el Esquema 0.4 y son los del:

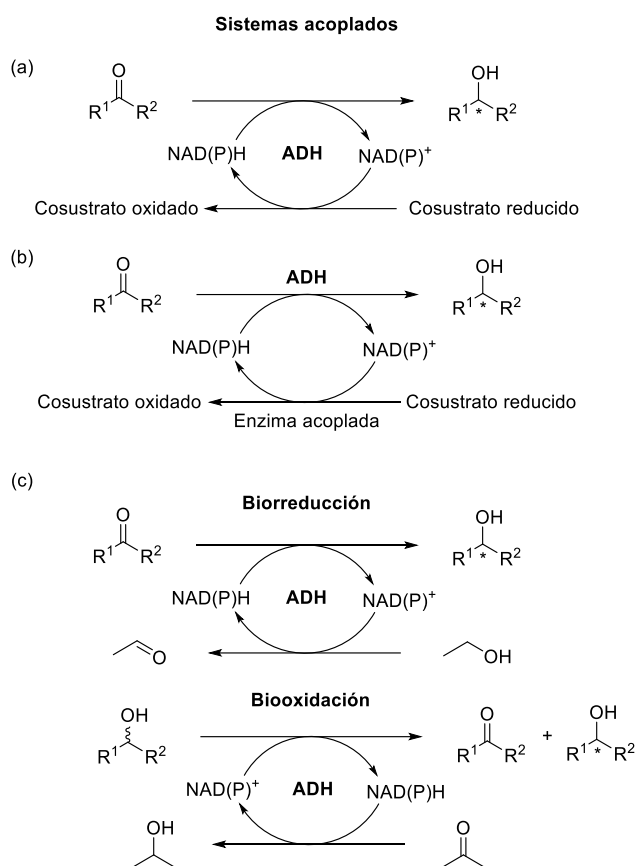
- sustrato acoplado (Esquema 0.4a): donde el cosustrato reacciona a través de un proceso redox contrario al de la reacción principal, siendo ambas reacciones catalizadas por la propia ADH. En el Esquema 0.4c se han representado ejemplos de procesos de reducción (empleando etanol como cosustrato) y oxidación (usando acetona como cosustrato),
- enzima acoplada (Esquema 0.4b): entrando en acción un segundo catalizador enzimático con un cosustrato específico para el reciclaje del cofactor y que transcurre de manera completamente independiente a la reacción principal.

⁷⁴ Coste de cofactores de tipo nicotinamida en Sigma-Aldrich (julio 2021). Precio de NAD⁺ = 165 €/g (N3014, <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/n3014?context=product>). Precio de NADP⁺ = 896 €/g (N5755, <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/n5755?context=product>).

⁷⁵ K. Goldberg, K. Schroer, S. Lutz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237-248.

⁷⁶ (a) S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260-1266; (b) C. Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2525-2541; (c) X. Wang, T. Saba, H. H. P. Yiu, R. F. Howe, J. A. Anderson, J. Shi, *Chem* **2017**, *2*, 621-654; (d) 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*, Eds. I. Lavandera, G. de Gonzalo, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2021**, Capítulo 10, pp. 275-296.

Introducción



Esquema 0.4. Sistemas del (a) sustrato acoplado; y (b) enzima acoplada. (c) Procesos de biorreducción (izquierda) y de biooxidación (derecha) catalizados por una ADH y con el sistema de regeneración del cofactor del sustrato acoplado, empleando respectivamente etanol o acetona en exceso molar como cosustratos.

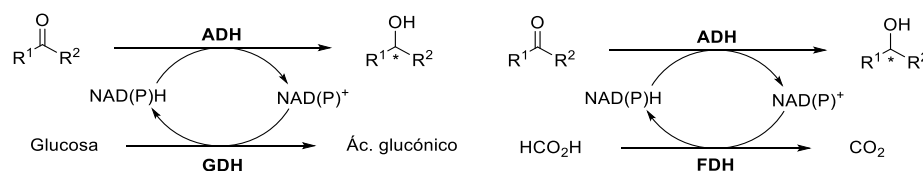
Los requisitos principales de los cosustratos auxiliares empleados y las reacciones involucradas con el fin de reciclar los cofactores enzimáticos, pueden resumirse a continuación:

- sistema sencillo, fácil de manipular, de alta estabilidad operacional, económicamente viable y con una alta disponibilidad de sus componentes. Así, etanol o 2-propanol (o isopropanol, 2-PrOH o ⁱPrOH), resultan cosustratos recurrentes en reacciones de biorreducción cumpliendo con todas estas características,
- los agentes auxiliares, subproductos, y en el caso del sistema acoplado con otra enzima involucrada, no deben interferir en la reacción principal,

- a ser posible, la reacción secundaria debe ser una etapa favorable tanto desde un punto de vista cinético como termodinámico.

Sin duda, para conservar durante más tiempo la actividad de la enzima principal es aconsejable el desarrollo de sistemas de reciclaje del cofactor empleando el sistema de la enzima acoplada. Así, se han descrito en la bibliografía diferentes sistemas para regenerar el NAD(P)H, tal como se muestra en el Esquema 0.5,⁷⁵ la utilización de:

- glucosa, que es oxidada a glucono-1,5-lactona por acción de la glucosa deshidrogenasa (GDH), y que en el propio medio acuoso de la reacción se convierte en ácido glucónico. De manera similar también es conocido el sistema glucosa-6-fosfato / glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH),
- ácido fórmico o sales derivadas, como el formiato amónico, que se convierte en dióxido de carbono en presencia de una formiato deshidrogenasa (FDH).



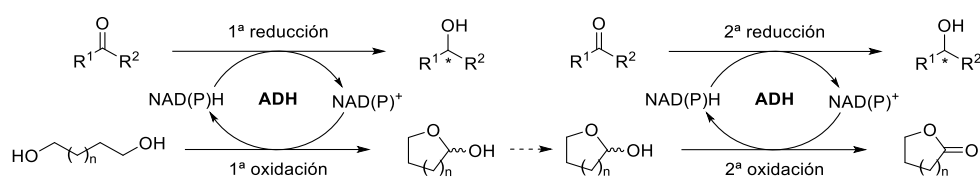
Esquema 0.5. Mecanismo de regeneración de cofactor mediante el sistema de la enzima acoplada: glucosa deshidrogenasa (izquierda) o formiato deshidrogenasa (derecha).

Uno de los mayores inconvenientes de las reacciones del sustrato acoplado, es que a pesar de que se tiende a emplear cosustratos baratos, su empleo en gran exceso molar para ayudar a desplazar el equilibrio de la reacción principal conduce en general a una pobre eficiencia atómica del proceso global. Por ello, en los últimos años se han desarrollado sistemas “inteligentes” que hacen uso de sustancias en cantidades cuasi-estequiométricas con respecto al sustrato (*smart cosubstrates*), dado que son capaces de desplazar eficientemente el equilibrio termodinámico de la reacción principal al formar especies estables incapaces de revertir el equilibrio hacia la situación de partida.⁷⁷ Un ejemplo de la aplicación de este tipo de cosustratos es el uso de un 1, ω -diol que en presencia de la ADH es oxidado al correspondiente ω -hidroxialdehído intermedio que sufre una ciclación intramolecular espontánea para

⁷⁷ S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, M. B. Ansorge-Schumacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1517-1529.

Introducción

formar un hemiacetal (Esquema 0.6). A continuación, una segunda regeneración del cofactor reducido NAD(P)H es posible mediante la oxidación del hemiacetal a la correspondiente lactona, por lo que en teoría 0.5 equivalentes del diol serían capaces de reducir todo el sustrato de partida.⁷⁸



Esquema 0.6. Regeneración del cofactor y desplazamiento del equilibrio en reacciones de reducción catalizadas por ADHs a través de una lactonización del cosustrato.

0.2.2. TRANSAMINASAS

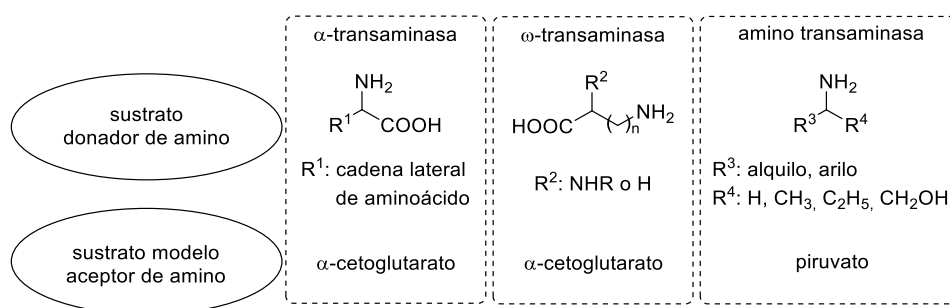
Las transaminasas (TAs), también denominadas aminotransferasas, son enzimas pertenecientes al grupo de las transferasas (EC 2.6.1.X: 2. Transferasas; 2.6. Transfieren grupos nitrogenados; 2.6.1. Transaminasas). Conforman probablemente uno de los grupos de enzimas con mayor utilidad sintética debido a que permiten acceder a aminas quirales, compuestos nitrogenados de gran importancia para industrias como la farmacéutica o agroquímica, a partir de compuestos fácilmente accesibles como son los derivados carbonílicos. En función de la especificidad del sustrato que aceptan, las TAs se dividen en tres grupos diferentes que se han representado en el Esquema 0.7:⁷⁹

1. α -transaminasas (α -TAs): son las más específicas, ya que únicamente aceptan sustratos con un grupo ácido carboxílico en posición contigua al grupo amino,
2. ω -transaminasas (ω -TAs): transfieren grupos amino unidos a carbonos primarios que, al menos, se encuentren separados del ácido carboxílico por otro átomo de carbono,

⁷⁸ (a) S. Kara, D. Spickermann, J. H. Schrittwieser, C. Leggewie, W. J. H. van Berkel, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Green Chem.* **2013**, *15*, 330-335; (b) A. Bornadel, R. Hatti-Kaul, F. Hollmann, S. Kara, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2442-2445.

⁷⁹ M. Höhne, U. T. Bornscheuer "Application of Transaminases" en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3^a Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, Capítulo 19, pp. 779-820.

3. *amino transaminasas (ATAs)*: son las transaminasas más versátiles dado que aceptan una gran variedad de sustratos, sin necesidad de la existencia de un grupo ácido carboxílico en su estructura. De esta forma pueden aceptar aldehídos y cetonas, pudiéndose obtener con estas últimas las correspondientes aminas quirales.



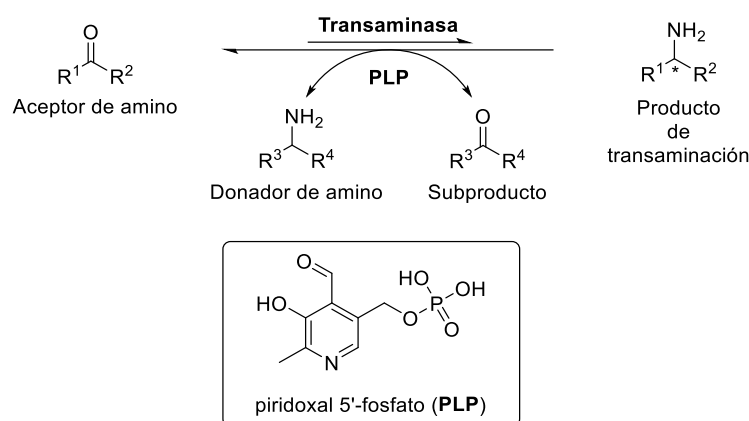
Esquema 0.7. Clasificación de los diferentes tipos de transaminasas en función del sustrato donador del grupo amino y del sustrato modelo aceptado por las mismas.

0.2.2.1. Cofactor y mecanismo de acción

Como se ha comentado anteriormente, estas enzimas llevan a cabo la transferencia de un grupo amino entre un donador y un aceptor de dicho grupo, utilizando para ello piridoxal 5'-fosfato (PLP) como cofactor (Esquema 0.8).⁸⁰

⁸⁰ Revisiones recientes: (a) F. Guo, P. Berglund, *Green Chem.* **2017**, *19*, 333-360; (b) I. Slabu, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 8263-8284; (c) 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; (d) E. E. Ferrandi, D. Monti, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *34*, 13; (e) Y.-L. Du, K. S. Ryan, *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 430-457.

Introducción



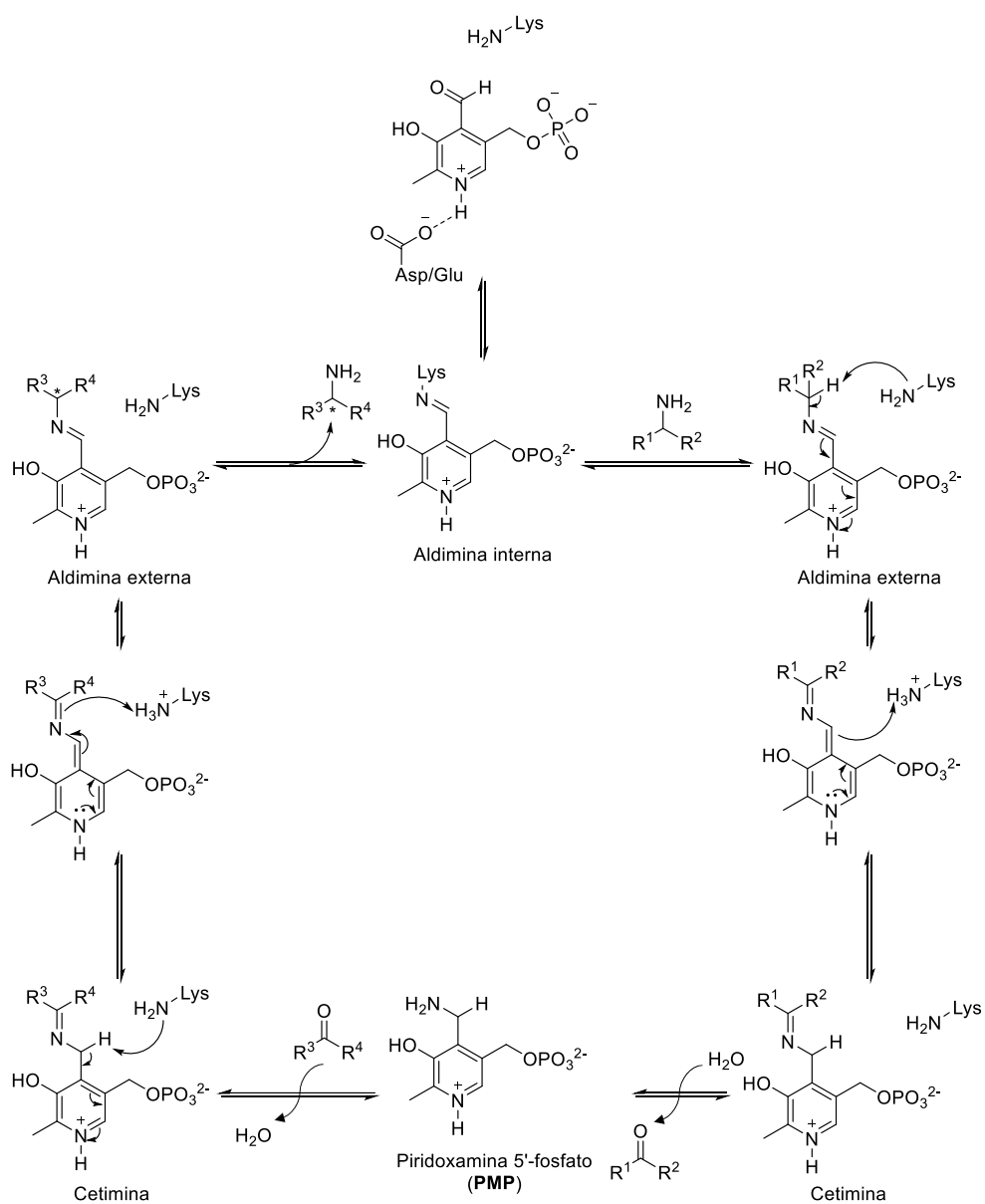
Esquema 0.8. Representación del equilibrio presente en la catálisis desarrollada por transaminasas (arriba) junto con la estructura química del PLP (abajo).

El PLP es el encargado de transferir el grupo amino desde el donador de amino hasta el aceptor de amino, pudiéndose dividir esta transferencia en dos pasos (Esquema 0.9). Aunque el mecanismo de transaminación se ha estudiado en detalle para la aspartato aminotransferasa, este se puede considerar análogo para el resto de las transaminasas.⁸¹ En un principio, el PLP se encuentra unido mediante un enlace imínico reversible con el grupo ϵ -amino de la lisina presente en el centro activo de la enzima, formando una aldimina (interna) activada por un grupo de aspartato o glutamato.⁸² Así, en un primer momento se produce la transferencia del grupo amino del donador al complejo formado por la enzima y el PLP. De esta forma se genera una nueva aldimina (externa) que, por isomerización, mediada por la lisina catalítica, da lugar a una cetimina que se hidroliza posteriormente, formándose la especie aminada del PLP, la piridoxamina 5'-fosfato (PMP), y una cetona como subproducto. Tras esto, en un segundo paso, ocurren los mismos pasos, pero de forma inversa: el PMP reacciona con el sustrato aceptor de amino, generando una cetimina que se isomeriza a la correspondiente aldimina, la cual por reacción con la lisina catalítica da lugar al producto de transaminación creando un centro quiral, y regenerando el PLP, que por tanto solo es necesario en cantidades catalíticas.⁸³

⁸¹ (a) J. M. Goldberg, 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.

⁸² A. C. Elliot, J. F. Kirsch, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 383-415.

⁸³ K. E. Cassimjee, B. Manta, F. A. Himo, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8453-8464.



Esquema 0.9. Mecanismo catalítico de la biotransaminación catalizada por una transaminasa.

Introducción

0.2.2.2. Desplazamiento del equilibrio en reacciones catalizadas por transaminasas

Como se comentó anteriormente, las transaminasas son una de las clases de enzimas con mayor potencial sintético, dada la gran importancia que presentan muchas aminas empleadas como compuestos farmacéuticos y que presentan una alta actividad biológica.^{80c,84} Desde un punto de vista sintético, estas enzimas son capaces de catalizar dos tipos de reacciones (Esquema 0.8):

- biotransaminación de grupos carbonilo por reacción con un donador del grupo amino para dar las correspondientes aminas (quirales) y desprender el correspondiente aceptor de amino,
- transformación de aminas en grupos cetona o aldehído, existiendo la posibilidad de resolver aminas racémicas a través de procesos de resolución cinética.

En el primer caso, partiendo del hecho de llevar a cabo la biotransaminación de una cetona proquiral, es posible obtener un 100% de rendimiento teórico. Esta vía aparentemente es la más atractiva, dado que la economía atómica del proceso sería muy alta, sin embargo, el equilibrio de esta biotransaminación se encuentra por regla general muy desfavorecido termodinámicamente,^{80a,85} siendo necesario usar altas concentraciones del donador de amino (análogo al sistema del sustrato acoplado descrito para las ADHs), o bien otro tipo de sistemas enzimáticos acoplados para favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de la amina deseada (análogo al sistema de la enzima acoplada descrito para las ADHs).

En el caso de partir de la amina, y como se ha comentado anteriormente, es especialmente interesante el hecho de poder partir de sustratos racémicos para crear asimetría, mediante el desarrollo de procesos de resolución cinética clásica. De esta forma, si solo uno de los dos enantiómeros de la mezcla racémica reacciona, se podría obtener un 50% de rendimiento máximo teórico de uno de los dos

⁸⁴ M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824.

⁸⁵ Revisiones bibliográficas recientes: (a) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324-332; (b) J. Rudat, B. R. Brucher, C. Syldatk, *AMB Express* **2012**, *2*, 11; (c) M. Fuchs, J. E. Farnberger, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6965-6982; (d) B. Manta, K. E. Cassimjee, F. Himo, *ACS Omega* **2017**, *2*, 890-898; (e) M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommaris, H. Yun, *Catalysts* **2018**, *8*, 254.

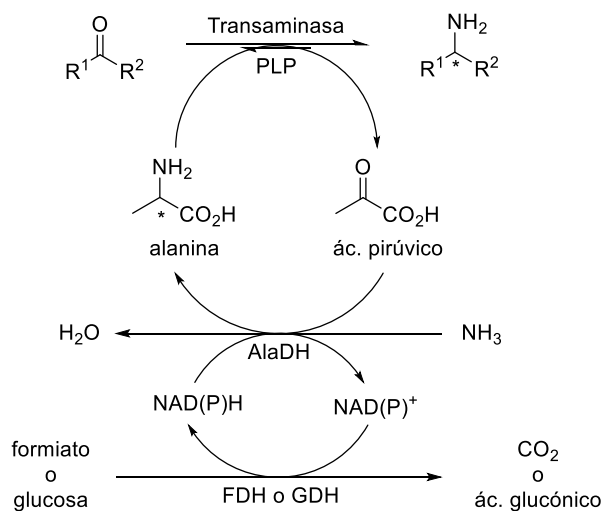
enantiómeros de la amina, que es el que queda inalterado, mientras que el otro se transforma en el correspondiente compuesto carbonílico.

El sustrato natural para las amino transaminasas es la D- o L-alanina (en función de si la transaminasa empleada es (*R*)- o (*S*)-selectiva),⁸⁶ dando ácido pirúvico como subproducto en las reacciones de biotransaminación. Desafortunadamente, la acumulación de concentraciones altas de este compuesto conduce a la progresiva inhibición de las transaminasas,^{80c} por lo que resulta completamente necesario eliminar el ácido pirúvico del medio a través de diferentes vías, algunas de las cuales se destacan en el Esquema 0.10:

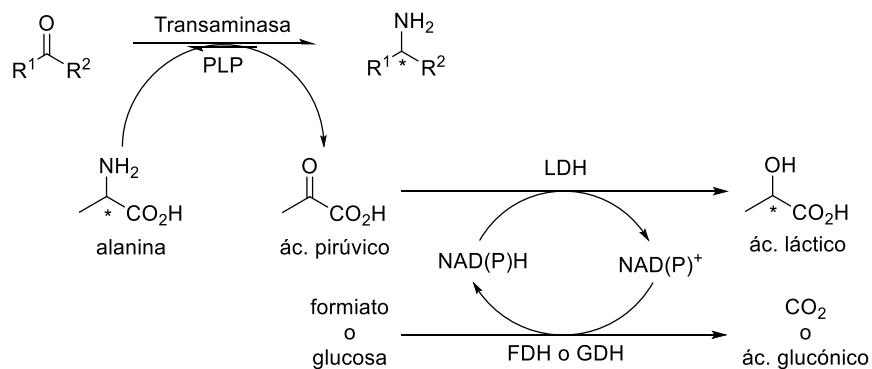
⁸⁶ A este respecto hay que señalar que la mayoría de las TAs de origen natural son (*S*)-selectivas, si bien a través de técnicas de biología molecular y métodos computacionales se han diseñado/discubierto enzimas con selectividad opuesta. Ver, por ejemplo: M. Höhne, S. Schätzle, H. Jochens, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 807-813.

Introducción

(a) Sistema de la AlaDH



(b) Sistema de la LDH



Esquema 0.10. Biotransaminación con alanina como donador de amino y un sistema enzimático acoplado de regeneración de la misma usando: (a) AlaDH o (b) LDH.

- (a) la utilización de alanina deshidrogenasa (AlaDH),⁸⁷ que permite el reciclaje de la alanina que se emplea como donador de amino, pudiendo adicionarse así de forma catalítica. En este caso, se requiere otra enzima adicional para el reciclaje del cofactor pirimidínico reducido (necesario para la AlaDH), como puede ser una glucosa deshidrogenasa o una formiato deshidrogenasa,
- (b) la transformación del ácido pirúvico en ácido láctico utilizando una lactato deshidrogenasa (LDH), que también requiere el reciclaje del NAD(P)H como en el caso anterior.⁸⁸

Como se comentó anteriormente, el proceso de biotransaminación se encuentra desfavorecido termodinámicamente, necesiéndose utilizar un gran exceso molar del donador de amino para favorecer el desplazamiento del equilibrio. Además, los sistemas descritos en el Esquema 0.10 presentan una gran complejidad al implicar varias enzimas y cosustratos auxiliares. Para resolver este conflicto, y de manera análoga a lo que sucedía con el ⁱPrOH en las reacciones catalizadas por ADHs, la utilización de la 2-propilamina (o isopropilamina, 2-PrNH₂ o ⁱPrNH₂) es altamente recomendada por su alta disponibilidad y bajo coste económico.⁸⁹ Además, el subproducto obtenido del proceso de biotransaminación es la acetona, que presenta un bajo punto de ebullición y puede ser fácilmente eliminable del medio de reacción.⁹⁰

Debido al pequeño tamaño que presenta la isopropilamina, que afecta a la coordinación de esta en el centro activo de la enzima, no hay muchas transaminasas naturales que la acepten como donador de amino bajo condiciones estándar de reacción, obteniéndose normalmente unos resultados pobres en comparación con la utilización de otros donadores. Además, en muchos casos hay que utilizar grandes cantidades de ⁱPrNH₂ para conseguir desplazar el equilibrio hacia la formación de la

⁸⁷ D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337-9480.

⁸⁸ Ejemplos seleccionados: (a) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761-2766; (b) D. Koszelewski, M. Göritzer, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 73-77; (c) M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, J. Sattler, W. Banko, A. K. Holzer, M. Pickl, W. Kroutil, K. Faber, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7691-7694; (d) D. Pressnitz, C. S. Fuchs, J. H. Sattler, T. Knaus, P. Macheroux, F. G. Mutti, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 555-559.

⁸⁹ (a) G. Matcham, M. Bhatia, W. Lang, C. Lewis, R. Nelson, A. Wang, W. Wu, *Chimia* **1999**, *53*, 584-589; (b) P. Tufvesson, C. Bach, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 309-319; (c) P. Tufvesson, M. Nordblad, U. Krühne, M. Schürmann, A. Vogel, R. Wohlgenuth, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 652-660.

⁹⁰ P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrikos-Ergas, I. V. Pavlidis, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1634-1642.

Introducción

amina y obtener así buenas conversiones, lo que va en detrimento de la sostenibilidad del proceso y la estabilidad del biocatalizador empleado. Sin embargo, este tipo de problemas y otros que pueden surgir por la utilización de donadores de amino no naturales se han ido solventado en los últimos años, gracias a diversos avances en el campo de la biología molecular.^{86,90,91}

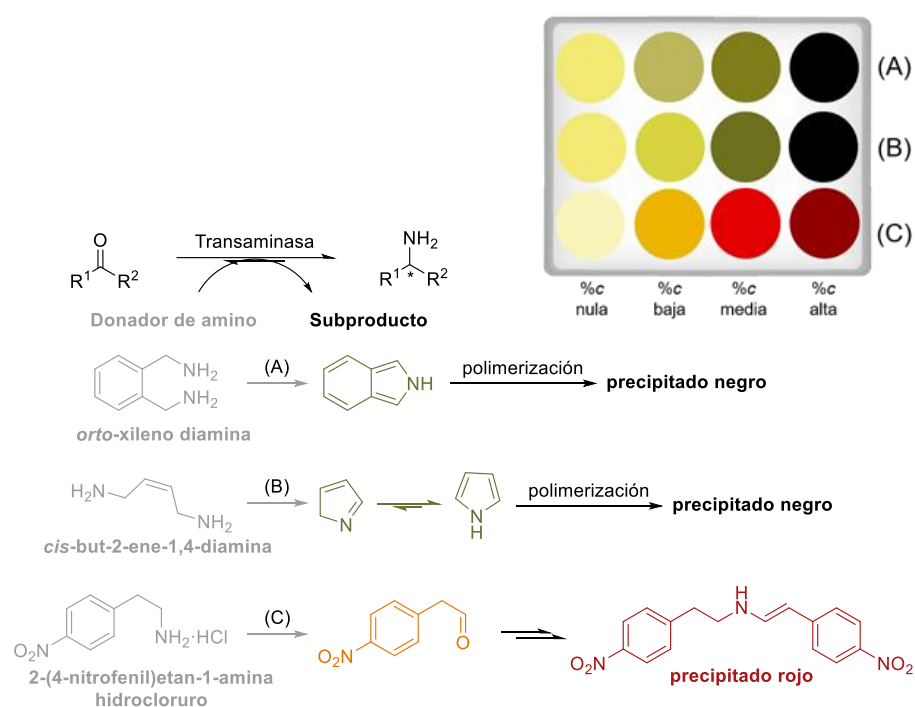
De la misma manera que se ha visto en las biorreducciones, durante los últimos años se ha desarrollado con éxito el uso de *smart cosubstrates* como donadores del grupo amino para llevar a cabo biotransaminaciones,⁹² mejorando así la sostenibilidad del proceso. En este contexto, el empleo de diaminas ha demostrado ser altamente aconsejable, puesto que la formación de los aminoaldehídos intermedios facilita la formación cuasi-irreversible de especies cíclicas que favorecen el desplazamiento del equilibrio.⁹³ Por ejemplo, O'Reilly y colaboradores describieron la utilización de la *orto*-xileno diamina para llevar a cabo biotransaminaciones, formándose un indol con tendencia a su inmediata polimerización, precipitando en el propio medio de reacción (Esquema 0.11a).^{93a} En este campo, nuestro grupo de investigación ha descrito la síntesis y utilización de la *cis*-but-2-ene-1,4-diamina, dado que el pirrol resultante como subproducto tiende a polimerizar, lo cual se observa por la aparición de un precipitado oscuro (Esquema 0.11b).^{93b} Además de estos donadores de amino, Hailes y colaboradores también han demostrado la utilidad de la sal de cloruro de 2-(4-nitrofenil)etan-1-amonio como dador, al generarse el correspondiente aldehído que finalmente reacciona con el propio donador de amino aún presente en el medio, formando una imina que al tautomerizar genera un precipitado de color rojizo.⁹⁴

⁹¹ C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbek, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309.

⁹² (a) T. Li, A. B. Kootstra, I. G. Fotheringham, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 533-538; (b) B. Wang, H. Land, P. Berlung, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 161-163.

⁹³ (a) A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717; (b) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1618-1624; (c) I. Slabu, J. L. Galman, N. J. Weise, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1038-1042; (d) A. Gomm, W. Lewis, A. P. Green, E. O'Reilly, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 12692-12695; (e) S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 2553-2559; (f) S. Grigoriou, P. Kugler, E. Kulcinskaja, F. Walter, J. King, P. Hill, V. F. Wendisch, E. O'Reilly, *Green Chem.* **2020**, *22*, 4128-4132.

⁹⁴ (a) D. Baud, N. Ladkau, T. S. Moody, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 17225-17228; (b) L. Leipold, D. Dobrijevic, J. W. E. Jeffries, M. Bawn, T. S. Moody, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Green Chem.* **2019**, *21*, 75-86.



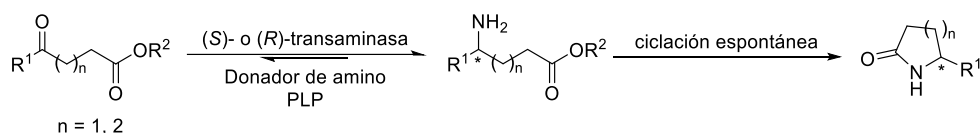
Esquema 0.11. Desplazamiento del equilibrio al utilizar diaminas (1.1-3.0 equivalentes) como donadores de amino. Representación gráfica simplificada del análisis cualitativo de reacciones empleando placas de 96 pocillos (*96-well microtiter plates*), donde (A), (B) y (C) representan las condiciones de la biotransaminación, mientras que la coloración indica un grado de conversión aproximada.

La aparición de nuevos donadores de amino ha ido acompañada en los últimos años de la implementación de métodos colorimétricos de detección de actividad enzimática, pues como se ha comentado, la formación de especies coloreadas en el medio de reacción proporciona una manera sencilla de llevar a cabo el seguimiento de las reacciones, ya sea a simple vista o por mediciones con un espectrofotómetro de visible-ultravioleta.^{94,95} En este contexto sin duda el empleo de placas de múltiples pocillos supone un sustancial ahorro tanto de tiempo como de recursos económicos y energéticos.

⁹⁵ (a) M. Planchestainer, E. Hegarty, C. M. Heckmann, L. J. Gourlay, F. Paradisi, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 5952-5958; (b) R. Cairns, A. Gomm, C. Peel, M. Sharkey, E. O'Reilly, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 4738-4743.

Introducción

Otra forma elegante de llevar a cabo un desplazamiento del equilibrio termodinámico consiste en la utilización del producto generado en la reacción de biotransaminación, como sustrato para una segunda reacción química espontánea. Un ejemplo sería el trabajo descrito recientemente por nuestro grupo de investigación para la formación de lactamas a partir de los correspondientes γ - o δ -cetoésteres.⁹⁶ Así, en un primer paso, la biotransaminación del sustrato de partida dio lugar a un intermedio de tipo γ - o δ -aminoéster, que rápidamente cicló en el medio de reacción para dar lugar a la lactama correspondiente (Esquema 0.12).



Esquema 0.12. Desplazamiento del equilibrio de biotransaminación gracias a la ciclación espontánea de la amina quiral resultante.

0.3. REACCIONES MULTICATALÍTICAS

La naturaleza se sirve de los diferentes biocatalizadores existentes para llevar a cabo la preparación de compuestos orgánicos de gran complejidad estructural. Este tipo de sistemas requiere usualmente de la presencia de varias enzimas cuyo papel se encuentra bien definido, adaptándose cada una a un paso concreto del proceso, sin involucrarse en ninguna otra reacción en la ruta sintética. Un ejemplo clásico es el ciclo de Krebs, ruta metabólica asociada a la respiración celular, que llega a involucrar la acción orquestada de 8 enzimas diferentes.⁹⁷ A semejanza de lo que ocurre en la naturaleza, el desarrollo de procesos multicatalíticos en el laboratorio suscita hoy en día un gran interés, debido a la oportunidad de obtener productos de alto valor añadido en pocos pasos operacionales y generando una mínima cantidad de residuos.⁹⁸ De esta forma, el diseño de este tipo de procesos ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años. A continuación, se va a exponer una

⁹⁶ Á. Mourelle-Insua, L. A. Zampieri, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, 360, 686-695.

⁹⁷ I. Jochmanova, K. Pacak, *Clin. Cancer Res.* **2016**, 22, 5001-5011.

⁹⁸ (a) J. Zhou, *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 422-434; (b) A. Galván, F. J. Fañanás, F. Rodríguez, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, 1306-1313.

clasificación de los mismos en base a la manera en la que transcurren y al origen de los catalizadores empleados.

0.3.1. REACCIONES EN CASCADA: SECUENCIAL VS CONCURRENTE

Desde un punto de vista químico, la posibilidad de llevar a cabo rutas sintéticas en el menor número de pasos posibles, sin necesidad de realizar tediosas y costosas etapas de purificación de intermedios, se traduce normalmente en un aumento del rendimiento global de la reacción, así como en la disminución de residuos, energía y tiempo invertido. Todas ellas son propiedades deseables y necesarias para un proceso sostenible como se ha comentado anteriormente en esta Memoria.

Es por ello que actualmente se observa una tendencia a reducir secuencias largas de síntesis, que son desarrolladas y optimizadas paso a paso (*stepwise*), por procesos que ocurren de manera continuada en uno o varios recipientes de reacción, sin necesidad de llevar a cabo el aislamiento de los diferentes intermedios obtenidos. El primer tipo de metodología se conoce con el anglicismo *one-pot*, de forma que los intermedios que se van generando en los diferentes pasos de reacción van transformándose en nuevos intermedios hasta llegar a la formación del producto final deseado, utilizando el mismo recipiente de reacción.⁹⁹ Sin embargo, el desarrollo de procesos *one-pot* no es trivial y suele requerir de un gran esfuerzo experimental, basado en el estudio de las reacciones individuales por separado, con el fin de:

- monitorizar a tiempo real la evolución de la reacción
- estudiar la formación de (sub)productos
- analizar las posibles incompatibilidades entre los catalizadores, las especies químicas involucradas o las condiciones de reacción de los diferentes pasos.

De esta forma, las transformaciones que involucran más de un paso de reacción y se realizan sin aislamiento de los intermedios se conocen como reacciones en cascada, y en función de su diseño pueden clasificarse en dos grandes grupos de procesos,¹⁰⁰ como se describe en la Figura 0.10:

⁹⁹ (a) W. Kroutil, M. Rueping, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2086-2087; (b) Y. Hayashi, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 866-880.

¹⁰⁰ (a) T. Hudlicky, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3-30; (b) L. F. Tietze, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 115-136; (c) S. F. Mayer, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 332-339; (d) F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor, "Biocatalytic Concurrent Processes" en *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*,

Introducción

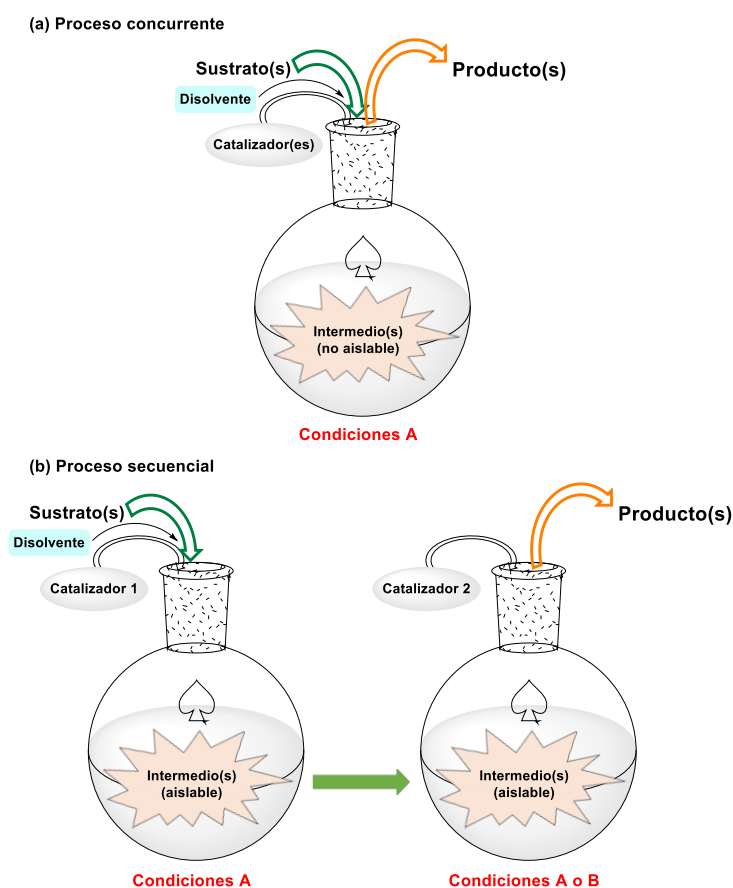


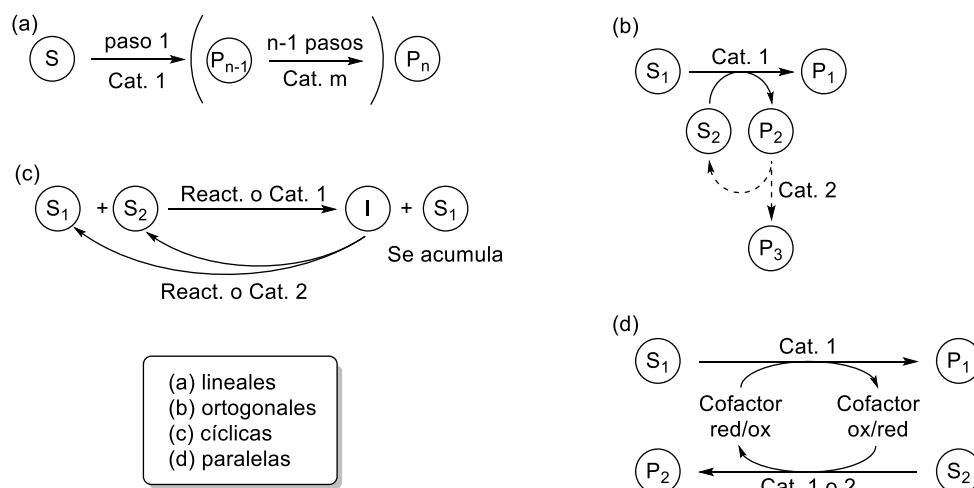
Figura 0.10. Representación esquemática de procesos en cascada desarrollados ya sea en modo concurrente (a) o secuencial (b).

- concurrentes (Figura 0.10a): en los que el o los catalizadores de las diferentes reacciones se encuentran en el mismo recipiente desde el comienzo, y además se mantienen invariables las condiciones de reacción (temperatura, presión, agitación, disolvente...). Son, por tanto, aproximaciones muy útiles para aquellos procesos que involucran intermedios que presentan una alta inestabilidad, lo que desaconseja su aislamiento o manipulación
- secuenciales (Figura 0.10b): se caracterizan porque uno o más de los procesos químicos que ocurren no son compatibles entre sí. De esta forma, una vez que finaliza un determinado paso de la síntesis, se varía de alguna

Ed. A. Seidel, John Wiley & Sons, Hoboken (EE. UU.), 2011, pp. 1-20; (e) E. García-Junceda, I. Lavandera, D. Rother, J. H. Schrittwieser, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2015, 114, 1-6.

manera las condiciones de reacción, como por ejemplo adicionando nuevos reactivos o catalizadores, modificando la temperatura, el pH, las concentraciones de los reactivos, el disolvente de la reacción u otras variables.

A su vez, las reacciones en cascada se pueden dividir en distintas posibilidades dependiendo del proceso sintético, como se desglosa en el Esquema 0.13:^{100e,101}



Esquema 0.13. Representación esquemática de reacciones en cascada: (a) lineales; (b) ortogonales; (c) cíclicas; y (d) paralelas.

- lineales (Esquema 0.13a) donde el producto de una reacción es el sustrato de partida de la siguiente. La inmensa mayoría de ejemplos se encuadran dentro de este tipo de cascadas.
- ortogonales (Esquema 0.13b): utilizadas por ejemplo para lograr desplazar el equilibrio de una reacción pues la formación de ciertos productos puede provocar fenómenos de inhibición enzimática y deben ser eliminados o transformados.¹⁰² Un ejemplo típico es la regeneración de cofactores necesarios para el correcto funcionamiento de un determinado biocatalizador (Esquema 0.4).

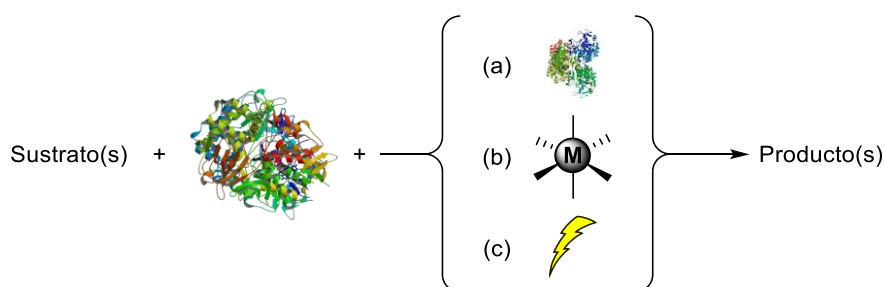
¹⁰¹ J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270-348.

¹⁰² (a) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129-143; (b) N. Richter, J. E. Farnberger, D. Pressnitz, H. Lechner, F. Zepeck, W. Kroutil, *Green Chem.* **2015**, *17*, 2952-2958.

Introducción

- cíclicas (Esquema 0.13c): empleadas especialmente en procesos de desracemización y estereoinversión de alcoholes o aminas.¹⁰³
- paralelas (Esquema 0.13d): en las cuales ocurren dos procesos de utilidad sintética de manera paralela y que se encuentran conectados por la acción de, por ejemplo, un cofactor.^{77,104}

En esta Tesis Doctoral se prestará especial atención a las reacciones en cascada lineales, de las cuales existen múltiples combinaciones posibles según los tipos de catalizadores involucrados. Este campo está muy abierto al acoplamiento de muy diversos tipos de reacciones ya sean mediadas por enzimas, compuestos metálicos, organocatalizadores o fotosensibilizadores,^{102a} y a pesar de ser un campo emergente de gran interés, presenta la dificultad de encontrar condiciones óptimas para combinar estos procesos de manera eficiente. Puesto que en esta Tesis Doctoral se han desarrollado diversas metodologías secuenciales multicatalíticas acoplando una determinada enzima con otro catalizador de tipo enzimático, metálico o fotocatalítico (Esquema 0.14), a continuación, se destaca una serie de aproximaciones representativas aplicadas fundamentalmente a la síntesis de alcoholes o aminas enantioenriquecidas.



Esquema 0.14. Representación simplificada de las metodologías multicatalíticas presentadas: (a) multienzimáticas; (b) quimioenzimáticas; o (c) fotobiocatalíticas.

¹⁰³ (a) C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789-1805; (b) M. Rachwalski, N. Vermue, F. P. J. T. Rutjes, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 9268-9282; (c) A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Green Chem.* **2015**, *2*, 192-211; (d) M. M. Musa, F. Hollmann, F. G. Mutti, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 5487-5503; (e) C. Aranda, G. Oksdath-Mansilla, F. R. Bisogno, G. de Gonzalo, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 1233-1257.

¹⁰⁴ (a) F. R. Bisogno, I. Lavandera, W. Kroutil, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1730-1732; (b) A. Ríos-Martínez, F. R. Bisogno, C. Rodríguez, G. de Gonzalo, I. Lavandera, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1431-1437; (c) S. Mordhorst, J. N. Andexer, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1316-1333.

0.3.1.1. Cascadas multienzimáticas

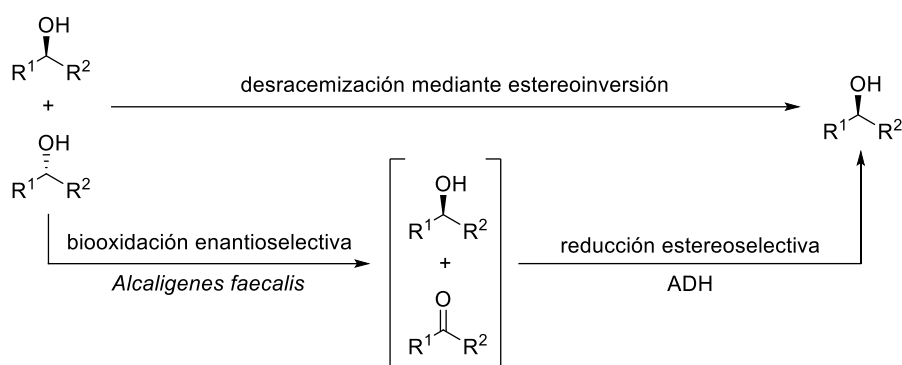
El desarrollo de procesos que involucran más de una enzima en una cascada depende en gran medida de las características de los biocatalizadores implicados, como puede ser su estabilidad en el medio de reacción (orgánico o acuoso, teniendo en cuenta el pH del medio en este último caso), o a la temperatura utilizada, la dependencia de cofactores y los sistemas de regeneración necesarios... En definitiva, este tipo de sistemas pueden no transcurrir de un modo trivial como podría plantearse inicialmente, por lo que la optimización de las reacciones individuales suele ser necesaria para luego estudiar la combinación de los procesos estudiados, idealmente de una manera concurrente.¹⁰⁵

Uno de los procesos que mayor interés presenta es la reacción de desracemización,¹⁰⁶ debido a la alta economía atómica que presenta, dado que tanto el sustrato de partida como el producto es el mismo. En cuanto a las desracemizaciones de alcoholes secundarios,^{106a,d} además de los procesos en cascada cíclicos,¹⁰³ se pueden llevar a cabo mediante secuencias lineales tal como se representa en el Esquema 0.15 combinando dos catalizadores selectivos (oxidación enantioselectiva seguida de una reducción estereoselectiva).^{106a}

¹⁰⁵ (a) P. A. Santacoloma, G. Sin, K. V. Gernaey, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 203-212; (b) N. Ladkau, A. Schmid, B. Bühler, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *30*, 178-189; (c) J. M. Sperl, V. Sieber, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 2385-2396; (d) Z. Wang, B. S. Sekar, Z. Li, *Bioresour. Technol.* **2021**, *323*, 124551; (e) 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*, Eds. I. Lavandera, G. de Gonzalo, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2021**, Capítulo 13, pp. 361-402.

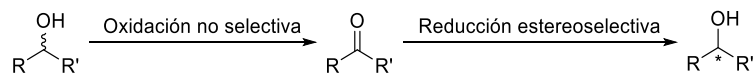
¹⁰⁶ (a) C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 741-745; (b) Y. Okamoto, V. Köhler, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5781-5784; (c) S. Yoon, M. D. Patil, S. Sarak, H. Jeon, G.-H. Kim, T. P. Khobragade, S. Sung, H. Yun, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 1898-1902; (d) F. D. Nasário, P. J. S. Moran, J. A. R. Rodrigues, *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 772-779; (e) J.-D. Zhang, Y.-W. Chang, R. Dong, X.-X. Yang, L.-L. Gao, J. Li, S.-P. Huang, X.-M. Guo, C.-F. Zhang, H.-H. Chang, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 124-128.

Introducción



Esquema 0.15. Desracemización de alcoholes secundarios mediante un paso de biooxidación de uno de los enantiómeros de la mezcla racémica y posterior reducción selectiva de la cetona intermedia formada.

Alternativamente, dichas desracemizaciones pueden llevarse a cabo mediante la combinación de un proceso no selectivo y otro selectivo. En estos casos, ambos enantiómeros de la mezcla racémica de, por ejemplo, un alcohol, se oxidan a un intermedio de tipo cetona mediante una transformación no selectiva, y posteriormente, esta es reducida estereoselectivamente (Esquema 0.16). Un ejemplo de esta metodología es la combinación del sistema catalítico lacasa-TEMPO con una ADH.¹⁰⁷ Aunque, la gran ventaja de este proceso es que solo es necesario una reacción selectiva para llegar a los compuestos en forma ópticamente activa, presenta el gran inconveniente de que el producto final enantioenriquecido sería oxidado de nuevo a la correspondiente cetona, por lo que este tipo de desracemizaciones suelen llevarse a cabo a través de procesos secuenciales.



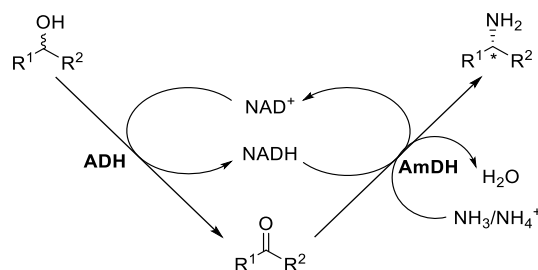
Esquema 0.16. Modelo de desracemización lineal de alcoholes racémicos combinando un paso no selectivo junto con otro estereoselectivo.

Por otra parte, otro tipo de reacciones multienzimáticas de gran interés desde el punto de vista sintético son las aminaciones estereoselectivas de alcoholes.¹⁰⁸ Dentro de ellas, un ejemplo muy interesante es la cascada lineal desarrollada por Turner y

¹⁰⁷ K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2448-2453.

¹⁰⁸ (a) F. G. Mutti, T. Knaus, N. S. Scrutton, M. Breuer, N. J. Turner, *Science* **2015**, *349*, 1525-1529; (b) T. Knaus, L. Cariati, M. F. Masman, F. G. Mutti, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8313-8325.

colaboradores para lograr la síntesis de aminas enantiopuras a partir de alcoholes racémicos.^{108a} Este proceso global de aminación asimétrica implica la oxidación de los alcoholes de partida a las cetonas empleando dos ADHs de selectividad opuesta, y una posterior aminación reductiva empleando una amino deshidrogenasa (AmDH) y una fuente de amoníaco (Esquema 0.17). Este sistema es muy interesante desde el punto de vista redox, ya que el cofactor utilizado en ambas biotransformaciones se recicla en el propio medio de reacción.



Esquema 0.17. Representación de un sistema multienzimático para la aminación estereoselectiva de alcoholes racémicos combinando dos oxidorreductasas.

0.3.1.2. Cascadas quimioenzimáticas

Las cascadas quimioenzimáticas,¹⁰⁹ ya nos estemos refiriendo a procesos concurrentes o secuenciales, son aquellas que involucran una o más transformaciones químicas junto a una o más transformaciones enzimáticas.¹¹⁰ Este tipo de sistemas puede verse limitado debido a las diferentes características de cada uno de los catalizadores empleados, de forma que en muchas ocasiones las transformaciones no pueden desarrollarse de modo concurrente sino

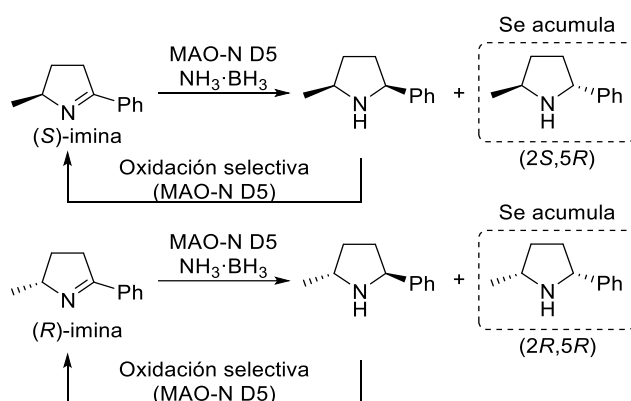
¹⁰⁹ En los artículos de investigación del campo de la química, está comúnmente aceptado que este término (del inglés, *chemoenzymatic*), englobe este tipo de procesos. Esto no quiere decir, por supuesto, que no se considere a los propios procesos enzimáticos como transformaciones químicas.

¹¹⁰ (a) C. A. Denard, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2856-2864; (b) B. Bechi, S. Herter, S. McKenna, C. Riley, S. Leimkühler, N. J. Turner, A. J. Carnell, *Green Chem.* **2014**, *16*, 4524-4529; (c) H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171-179; (d) M. Filice, J. M. Palomo *ACS Catal.* **2014**, *4*, 1588-1598; (e) V. Köhler, N. J. Turner, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 450-464; (f) F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12-22; (g) T. J. Doyon, A. R. H. Narayan, *Synlett* **2020**, *31*, 230-236; (h) Y. Liu, P. Liu, S. Gao, Z. Wang, P. Luan, J. González-Sabín, Y. Jiang, *Chem. Eng. J.* **2021**, *420*, 127659; (i) H. Gröger, "Chemoenzymatic Sequential Protocols" en *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, Eds. I. Lavandera, G. de Gonzalo, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2021**, Capítulo 14, pp. 403-426.

Introducción

secuencialmente. A continuación, se comentan dos ejemplos recientes sobre la utilización de procesos en cascada que involucran el uso de enzimas con un agente reductor como el complejo amoniaco-borano ($\text{NH}_3\cdot\text{BH}_3$) o un catalizador metálico como el tricloruro de oro (AuCl_3).

Como se ha comentado en la *Sección 0.3.1.1*, los procesos de desracemización presentan un gran interés desde el punto de vista químico. En este contexto, Turner y colaboradores han descrito la síntesis asimétrica de pirrolidinas quirales a través de un proceso en cascada cíclico de desracemización que implica el uso de una variante evolucionada de la monoamino oxidasa de *Aspergillus niger* (MAO-N) y el agente reductor $\text{NH}_3\cdot\text{BH}_3$ (Esquema 0.18).¹¹¹ Así, partiendo de pirrolinas ópticamente activas (obtenidas ya a través de un proceso de biotransaminación), se ha llevado a cabo su reducción no selectiva y concurrentemente la oxidación selectiva de uno solo de los diastereoisómeros, enriqueciéndose por tanto el enantiómero que queda sin reaccionar, el (2*S*,5*R*) partiendo de la (*S*)-imina o el (2*R*,5*R*) partiendo de la (*R*)-imina.



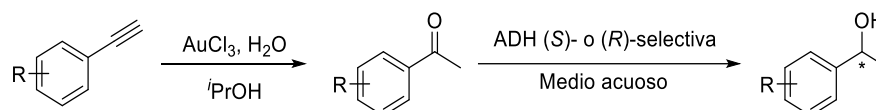
Esquema 0.18. Obtención de pirrolidinas quirales mediante un proceso cíclico de desracemización combinando un reductor no selectivo y una biooxidación selectiva.

Por otra parte, el desarrollo de procesos secuenciales donde se combina la catálisis metálica con la enzimática se ejemplifica a continuación.¹¹² En este caso, Mihovilovic y colaboradores han descrito una cascada lineal acoplando la

¹¹¹ 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.

¹¹² P. Schaaf, V. Gojic, T. Bayer, F. Rudroff, M. Schnürch, M. D. Mihovilovic, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 920-924.

hidratación de fenilacetilenos, empleando tricloruro de oro (AuCl_3) como catalizador e isopropanol como disolvente, a un proceso de biorreducción enzimático de las acetofenonas formadas como intermedios de reacción (Esquema 0.19). La aproximación global resulta ser secuencial, pues la reducción enzimática empleando ADHs necesita de un medio mayormente acuoso para su correcto funcionamiento, además de temperaturas más bajas que las del proceso catalizado por el metal.



Esquema 0.19. Proceso secuencial que involucra la hidratación de alquinos y una posterior reducción estereoselectiva empleando un catalizador metálico y uno enzimático, respectivamente.

0.3.1.3. Cascadas fotobiocatalíticas

Por otra parte, un campo que en los últimos años está ganando muchos adeptos es el de la fotocatalisis,^{9,113} que estudia el desarrollo de transformaciones químicas mediante la utilización de radiación lumínica. Dadas las condiciones suaves de reacción que se utilizan en esta tecnología, la combinación de esta técnica con la Biocatalisis ofrece un nuevo campo a explotar que, posiblemente, dará lugar a nuevos proyectos en próximos años y que, actualmente, ya está ofreciendo resultados notables.¹¹⁴

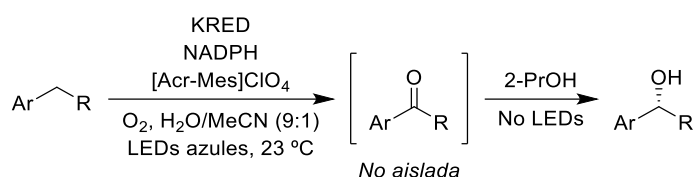
En este sentido, hay que remarcar que muchos de los procesos fotobiocatalíticos que se han llevado a cabo hasta la fecha transcurren de un modo secuencial. Por ejemplo, Scheidt y colaboradores han logrado desarrollar la oxigenación fotocatalítica del enlace C–H bencílico de una gran variedad de compuestos, generando las cetonas intermedias, que posteriormente se pueden reducir con una

¹¹³ (a) A. B. Beeler, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 9629-9630; (b) K. L. Skubi, T. R. Blum, T. P. Yoon, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 10035-10074; (c) B. König, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 1979-1981; (d) Q.-Q. Zhou, Y.-Q. Zou, L.-Q. Lu, W.-J. Xiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 1586-1604.

¹¹⁴ (a) S. H. Lee, D. S. Choi, S. K. Kuk, C. B. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7958-7985; (b) L. Schmermund, V. Jurkaš, F. F. Özgen, G. D. Barone, H. C. Büchenschütz, C. K. Winkler, S. Schmidt, R. Kourist, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 4115-4144; (c) F. F. Özgen, M. E. Runda, S. Schmidt, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 790-806.

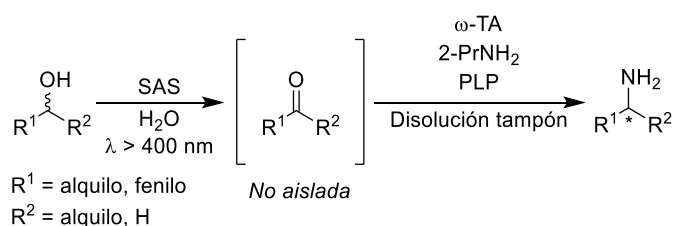
Introducción

ADH para dar lugar a los alcoholes quirales (Esquema 0.20),¹¹⁵ siendo posible además la síntesis de otras clases de compuestos como diarilmetanoles, γ - y δ -lactonas, α -hidroxiésteres y 1,2-aminoalcoholes.



Esquema 0.20. Cascada secuencial lineal aplicada a la hidroxilación selectiva fotobiocatalizada de alquilarenos.

Además de la preparación de alcoholes quirales a través de métodos fotobiocatalíticos secuenciales, también es posible sintetizar aminas de un modo selectivo. En concreto, Hollmann y colaboradores han llevado a cabo la oxidación de diferentes alcoholes primarios o secundarios (alifáticos y aromáticos), mediante la utilización de un fotosensibilizador soluble en agua como es el 2-antraquinonasulfonato de sodio (SAS, *sodium anthraquinone-2-sulfonate*).¹¹⁶ Una vez optimizado el proceso de oxidación, se ha desarrollado con éxito la biotransaminación de las cetonas intermedias para dar lugar a las aminas deseadas (Esquema 0.21).



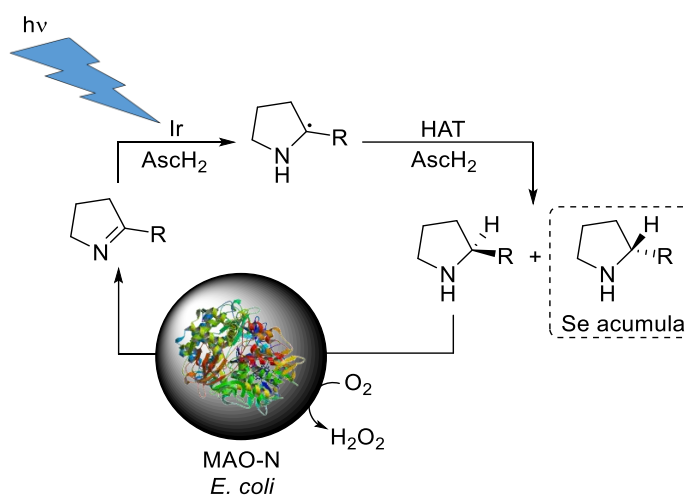
Esquema 0.21. Cascada secuencial lineal para la foto-biotransaminación de alcoholes racémicos.

Si bien la mayoría de los procesos descritos con estos sistemas son secuenciales, siempre que sea posible es preferible llevar a cabo los procesos de manera concurrente, si bien requiere de una mayor optimización y experimentación para permitir la compatibilidad de ambos pasos. En este sentido, Wenger y colaboradores

¹¹⁵ R. C. Betori, C. M. May, K. A. Scheidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 16490-16494.

¹¹⁶ J. Gacs, W. Zhang, T. Knaus, F. G. Mutti, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Catalysts* **2019**, 9, 305.

han desarrollado una cascada cíclica para la obtención de aminas quirales a partir de iminas en disolución acuosa.¹¹⁷ El proceso consiste en la formación inicial de un radical α -aminoalquilo por acción de un catalizador de iridio en condiciones fotocatalíticas sobre la imina de partida, que es acoplado a un proceso de transferencia de hidrógeno (HAT) utilizando ácido ascórbico (AscH₂), y seguidamente se lleva cabo la oxidación de un único enantiómero de la amina racémica resultante empleando una variante de la MAO-N, recuperando parte de la imina de partida y dejando sin reaccionar uno de los dos enantiómeros de la amina quiral deseada que se va acumulando a lo largo del proceso (Esquema 0.22). El catalizador metálico se añade de manera catalítica ya que es reciclado por el propio AscH₂.



Esquema 0.22. Cascada cíclica fotoredox-enzimática para la conversión de pirrolinas en pirrolidinas enantioméricamente puras.

¹¹⁷ X. Guo, Y. Okamoto, M. R. Schreier, T. R. Ward, O. S. Wenger, *Chem. Sci.* **2018**, 9, 5052-5056.

OBJETIVOS GENERALES

Objetivos generales

En la Introducción de esta Tesis Doctoral, se ha puesto de manifiesto la utilidad de distintas clases de enzimas para mediar o catalizar procesos químicos con alta selectividad y en condiciones suaves de reacción. Con el fin de acceder a diversas familias de compuestos orgánicos de gran interés como aldehídos, alcoholes o aminas, el objetivo general de esta Tesis Doctoral consiste en el desarrollo de procesos de oxidación sostenibles empleando (bio)catalizadores. Su posible combinación con otras reacciones catalizadas por enzimas, dando lugar a sistemas multietapa que ocurran en un mismo recipiente, será otro de los fines perseguidos en este trabajo. Así, esta Tesis Doctoral se ha dividido en tres capítulos bien diferenciados.

El desarrollo de procesos de oxidación selectivos y en condiciones suaves de reacción representa uno de los mayores retos en síntesis orgánica. Así, dentro de las distintas familias de biocatalizadores existentes, las lacasas son capaces de llevar a cabo la oxidación de diversos compuestos orgánicos mediante la utilización de oxígeno molecular, generando únicamente agua como subproducto. Considerando la importancia que presenta la utilización de productos derivados de la biomasa, en el Capítulo 1 nos hemos planteado estudiar la oxidación de dos compuestos modelo provenientes de la estructura de la lignina, como son el alcohol veratrílico y el adlerol. Debido a que las lacasas empleadas no tienen el suficiente potencial redox para catalizar este tipo de transformaciones de manera directa, se diseñarán procesos quimioenzimáticos catalizados por un sistema lacasa-mediador químico (LMS). Para este fin, se sintetizarán una serie de derivados nitrogenados a partir del siringaldehído y la vainillina, que serán estudiados posteriormente como mediadores químicos combinados con lacasas en los procesos oxidativos comentados anteriormente, buscando alcanzar buenas conversiones hacia los correspondientes compuestos carbonílicos.

En los últimos años se ha establecido el desarrollo de procesos multicatalíticos en un mismo recipiente como una alternativa a los procesos sintéticos que involucran varios pasos de reacción con el consiguiente aislamiento y purificación de los intermedios de reacción. Por este motivo, en los Capítulos 2 y 3 se desarrollarán diferentes procesos secuenciales para la obtención de alcoholes y aminas quirales, combinando un sistema oxidativo quimioenzimático o uno fotometálico con uno reductivo promovido por un biocatalizador. Así, en el Capítulo 2 se estudiará y optimizará la oxidación de distintos alcoholes alílicos mediada por la lacasa de

Objetivos generales

Trametes versicolor y el agente radicalario TEMPO, para acoplar una segunda transformación enzimática como pueda ser:

- una biorreducción, catalizada por una alcohol deshidrogenasa, que permitiría la desracemización de dichos alcoholes secundarios, o
- una biotransaminación catalizada por una transaminasa, que conduciría a las correspondientes aminas alílicas ópticamente activas, globalmente siendo una aminación estereoselectiva de los alcoholes racémicos de partida.

Uno de los objetivos más importantes consistirá en el acoplamiento de ambos procesos químicos sin necesidad de aislar las cetonas α,β -insaturadas intermedias, además de obtener los alcoholes y aminas quirales deseadas con buenos rendimientos aislados.

Finalmente, debido al reciente y creciente interés en el desarrollo de procesos fotoquímicos como métodos selectivos y medioambientalmente benignos, en el Capítulo 3 nos hemos planteado como objetivo el desarrollo de dos aproximaciones secuenciales novedosas dirigidas a la síntesis estereoselectiva de 1-(hetero)arilpropan-2-oles y 1-(hetero)arilpropan-2-aminas, estas últimas también conocidas como anfetaminas, compuestos bien conocidos por su empleo como fármacos estimulantes del sistema nervioso. Para ello, se ha planteado el estudio por separado y la posterior combinación de dos pasos de reacción en un mismo recipiente, como son:

- la oxidación de Wacker-Tsuji de una serie de alil(hetero)arenos en medio acuoso empleando una sal de paladio(II) bajo condiciones lumínicas, y
- un posterior proceso estereoselectivo biocatalizado bien por una alcohol deshidrogenasa para la obtención de los alcoholes enantioenriquecidos, o bien por una transaminasa para obtener las aminas análogas ópticamente activas.

CAPÍTULO 1

Síntesis de compuestos nitrogenados derivados de lignina y estudio de su reactividad en procesos quimioenzimáticos mediados por lacasas

ANTECEDENTES

1.1.1. LIGNINA COMO FUENTE RENOVABLE PROCEDENTE DE LA BIOMASA

El desarrollo humano, en diferentes ámbitos, lleva ataviado la gran dependencia del consumo de combustibles fósiles. Diariamente, los derivados del petróleo se utilizan para casi cualquier actividad, presentándose como sostén imprescindible para el desarrollo de tareas tan cotidianas como vestirnos, trabajar, desplazarnos, o asearnos. La gran dependencia de estas fuentes no renovables ha despertado en décadas recientes una concienciación social sobre el uso de recursos naturales renovables, más si cabe ante la posibilidad de un mundo sin petróleo en un futuro no tan lejano, debido a la creciente demanda de una población que, al menos hasta la fecha, aumenta anualmente.¹¹⁸ Ante este hecho, la utilización de diferentes energías renovables se ha consolidado en los últimos años como una práctica altamente sostenible, disminuyendo gradualmente la dependencia de los derivados del petróleo, aunque por supuesto sin hacerla desaparecer por completo.

En este contexto, hay que prestar especial atención a la biomasa como posible fuente útil tanto de energía como de materias primas para el ser humano. En términos generales, podemos referirnos a la biomasa como el conjunto de materia orgánica existente en la biosfera, tanto de origen animal como vegetal, además de los productos que pueden ser obtenidos a través de ella mediante diferentes transformaciones.^{118b} Entre estas fuentes de biomasa se encuentran los compuestos lignocelulósicos, que son polímeros orgánicos altamente presentes en las estructuras vegetales, de entramado irregular y conformado por celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1.1),¹¹⁹ y que se encuentran disponibles en grandes cantidades.¹²⁰ Por ello, durante los últimos años, diferentes investigaciones han apuntado a la lignina como una fuente de energía renovable,¹²¹ así como a una potencial fuente de diferentes compuestos orgánicos de alto valor añadido, dado que su estructura

¹¹⁸ (a) D. K. Ray, N. D. Mueller, P. C. West, J. A. Foley, *PLoS One* **2013**, *8*, e66428; (b) M.-A. Perea-Moreno, E. Samerón-Manzano, A.-J. Perea-Moreno, *Sustainability* **2019**, *11*, 863.

¹¹⁹ (a) J. Zakzeski, P. C. A. Bruijninx, A. L. Jongerius, B. M. Weckhuysen, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3552-3599; (b) M. L. Testa, M. L. Tummino, *Catalysts* **2021**, *11*, 125.

¹²⁰ (a) R. L. Howard, E. Abotsi, E. L. Jansen van Rensburg, S. Howard, *Afr. J. Biotechnol.* **2003**, *2*, 602-619; (b) P. C. A. Bruijninx, R. Rinaldi, B. M. Weckhuysen, *Green Chem.* **2015**, *17*, 4860-4861; (c) M. Alcalde, *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 155-162; (d) J. C. Stevens, J. Shi, *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 107418.

¹²¹ C. Li, X. Zhao, A. Wang, G. W. Huber, T. Zhang, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11559-11624.

Capítulo 1. Antecedentes

polimérica se encuentra constituida por una variedad de moléculas aromáticas de gran interés.¹²²

De esta forma, la hidrólisis de la estructura de la lignina ha suscitado un creciente interés, presentándose esta como una alternativa a los derivados del petróleo para diversas aplicaciones, donde destaca su papel como fuente de materia prima de diferentes compuestos que pueden ser utilizados para la preparación de adhesivos, resinas, bioplásticos, materiales poliméricos...¹²³

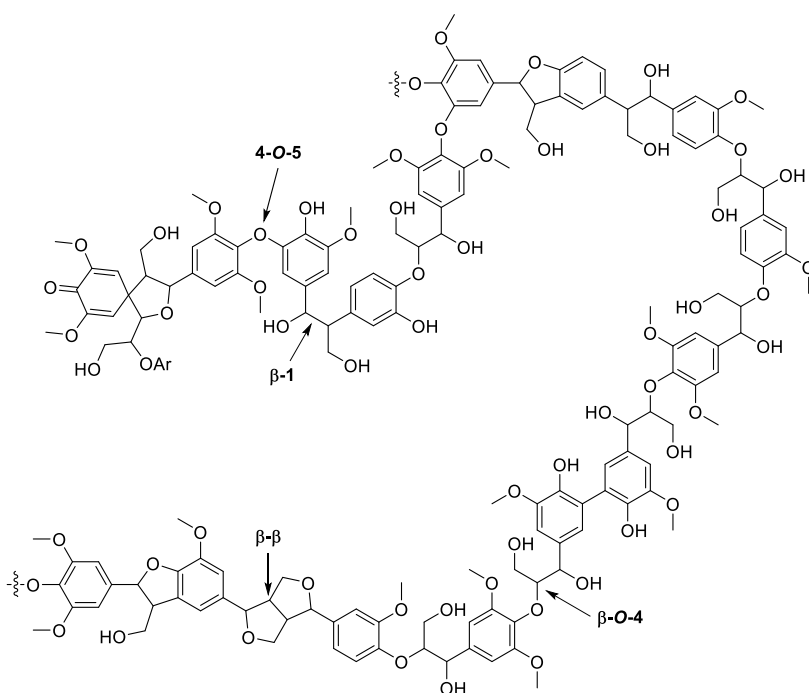


Figura 1.1. Ejemplo estructural de una lignina derivada de maderas duras.

¹²² (a) T. D. H. Bugg, R. Rahmanpour, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *29*, 10-17; (b) M. D. Kärkäs, B. S. Matsuura, T. M. Monos, G. Magallanes, C. R. J. Stephenson, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 1853-1914; (c) L. Yang, K. Seshan, Y. Li, *Catal. Today* **2017**, *298*, 276-297; (d) M. Y. Balakshin, E. A. Capanema, I. Sulaeva, P. Schlee, Z. Huang, M. Feng, M. Borghei, O. J. Rojas, A. Potthast, T. Rosenau, *ChemSusChem* **2021**, *14*, 1016-1036.

¹²³ (a) S. Sen, S. Patil, D. S. Argyropoulos, *Green Chem.* **2015**, *17*, 4862-4887; (b) B. M. Upton, A. M. Kasko, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2275-2306; (c) O. Y. Abdelaziz, D. P. Brink, J. Prothmann, K. Ravi, M. Sun, J. García-Hidalgo, M. Sandahl, C. P. Hultberg, C. Turner, G. Lidén, M. F. Gorwa-Grauslund, *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 1318-1346; (d) D. Kai, M. J. Tan, P. L. Chee, Y. K. Chua, Y. L. Yap, X. J. Loh, *Green Chem.* **2016**, *18*, 1175-1200; (e) V. K. Ponnusamy, D. D. Nguyen, J. Dharmaraja, S. Shobana, J. R. Banu, R. G. Saratale, S. W. Chang, G. Kumar, *Bioresour. Technol.* **2019**, *271*, 462-472; (f) C. Chio, M. Sain, W. Qin, *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *107*, 232-249.

Debido a lo anteriormente comentado, a lo largo de los años se han ido desarrollando diferentes métodos hidrolíticos u oxidativos de la lignina, tanto químicos como biocatalíticos.¹²⁴ Esta última vía ha recibido una gran atención en los últimos años, debido a la posibilidad de poder llevar a cabo la hidrólisis de la lignina bajo condiciones suaves. En concreto, la reactividad de los enlaces tipo β -O-4-aril éter o tipo β -1, que se encuentran muy presentes en la estructura de la lignina (Figura 1.1), ha sido ampliamente estudiada siguiendo diferentes metodologías con el fin de lograr su ruptura u oxidación total o parcial.

1.1.2. METODOLOGÍAS QUÍMICAS PARA LA OXIDACIÓN DE DERIVADOS DE LA LIGNINA

Existen una gran cantidad de procesos químicos que promueven tanto la hidrólisis como la oxidación total o parcial de la estructura de la lignina, así como de derivados de ella.¹²⁴ Dada la dificultad que puede presentar el desarrollo de métodos analíticos para estudiar transformaciones químicas realizadas sobre la estructura de la lignina, diversos estudios se han enfocado en el desarrollo de metodologías oxidativas aplicadas a derivados de la lignina. En concreto, algunos de estos procesos han sido aplicados a dos de los compuestos modelo más representativos de la estructura de la lignina, como son el alcohol veratrílico¹²⁵ y el adlerol.^{125a,e,126}

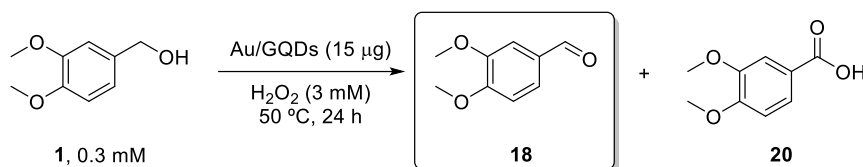
¹²⁴ Bibliografía reciente: (a) H. Lange, S. Decina, C. Crestini, *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 1151-1173; (b) J. Dai, A. F. Patti, K. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 4945-4951; (c) G. de Gonzalo, D. I. Colpa, M. H. M. Habib, M. W. Fraaije, *J. Biotechnol.* **2016**, *236*, 110-119; (d) F. Asina, I. Brzonova, K. Voeller, E. Kozliak, A. Kubátová, B. Yao, Y. Ji, *Bioresour. Technol.* **2016**, *220*, 414-424; (e) D. Salvachúa, R. Katahira, N. S. Cleveland, P. Khanna, M. G. Resch, B. A. Black, S. O. Purvine, E. M. Zink, A. Prieto, M. J. Martínez, A. T. Martínez, B. A. Simmons, J. M. Gladden, G. T. Beckham, *Green Chem.* **2016**, *18*, 6046-6062; (f) G. Janusz, A. Pawlik, J. Sulej, U. Świdarska-Burek, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Paszczyński, *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 941-962; (g) S. Gillet, M. Aguedo, L. Petitjean, A. R. C. Morais, A. M. da Costa Lopes, R. M. Łukasik, P. T. Anastas, *Green Chem.* **2017**, *19*, 4200-4233; (h) T. D. H. Bugg, J. J. Williamson, G. M. M. Rashid, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 26-33.

¹²⁵ (a) R. Bourbonnais, M. G. Paice, *FEBS Lett.* **1990**, *267*, 99-102; (b) K. Kervinen, P. Lahtinen, T. Repo, M. Svanh, M. Leskelä, *Catal. Today* **2002**, *75*, 183-188; (c) M. Díaz-González, T. Vidal, T. Tzanov, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1693-1700; (d) T. M. Larson, A. M. Anderson, J. O. Rich, *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 225-231; (e) P. Nousiainen, J. Kontro, H. Manner, A. Hatakka, J. Sipilä, *Fungal Genet. Biol.* **2014**, *72*, 137-149.

¹²⁶ (a) K. Li, F. Xu, K.-E. L. Eriksson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2654-2660; (b) N. Busse, D. Wagner, M. Kraume, P. Czermak, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *9*, 365-394.

Capítulo 1. Antecedentes

Por ejemplo, Wu y colaboradores han desarrollado la oxidación del alcohol veratrílico (**1**) en condiciones suaves de reacción utilizando *composites* de nanopartículas de oro y *quantum dots* de grafeno (Au/GQDs), en presencia de peróxido de hidrógeno como agente oxidante, logrando conversiones cuantitativas (Esquema 1.1).¹²⁷ En función del pH, fue posible observar la formación del ácido veratrílico (**20**) en mayor o menor cantidad a partir del aldehído **18**.¹²⁸ De manera similar, pero utilizando complejos biomiméticos de manganeso, González-Riopedre y colaboradores han logrado oxidar el alcohol veratrílico al correspondiente aldehído utilizando tres equivalentes de peróxido de hidrógeno con respecto al sustrato, y en condiciones muy suaves de reacción, obteniendo conversiones de hasta el 30%.¹²⁹



Esquema 1.1. Oxidación del alcohol veratrílico (**1**) con peróxido de hidrógeno utilizando nanopartículas de oro y *quantum dots* de grafeno.

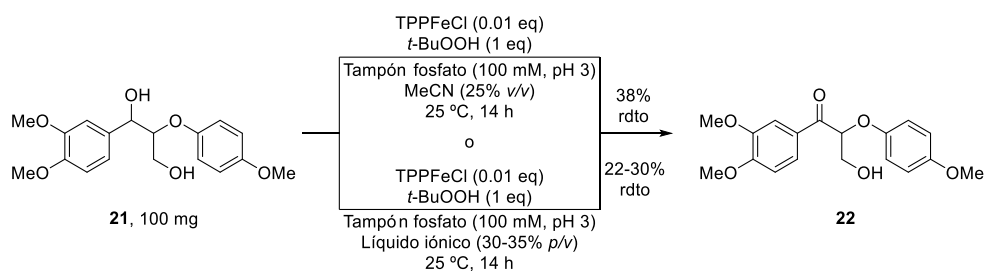
Además del empleo de disolventes acuosos u orgánicos como medios de reacción, la utilización de otros disolventes menos convencionales ha demostrado ser eficaz para llevar a cabo la oxidación de este tipo de moléculas. De esta forma, Yao y colaboradores han descrito la oxidación de diferentes compuestos modelo de la estructura de la lignina (por ejemplo, el derivado **21**) en presencia de un catalizador organometálico de hierro e hidroperóxido de *tert*-butilo (*t*-BuOOH). La utilización de líquidos iónicos (LIs) en el medio de reacción afectó negativamente al proceso de oxidación, en comparación con la utilización de un disolvente convencional. Sin embargo, los LIs estudiados condujeron a un aumento de la selectividad del proceso, priorizándose la oxidación de enlaces C–OH bencílicos frente a otro tipo de enlaces (Esquema 1.2).¹³⁰

¹²⁷ X. Wu, S. Guo, J. Zhang, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 6318-6321.

¹²⁸ Para evitar confusiones, se ha adoptado la misma numeración que presentan los compuestos en el artículo publicado relacionado con la investigación descrita en este capítulo. Los derivados no incluidos en el estudio se han numerado consecutivamente a partir del número **20**.

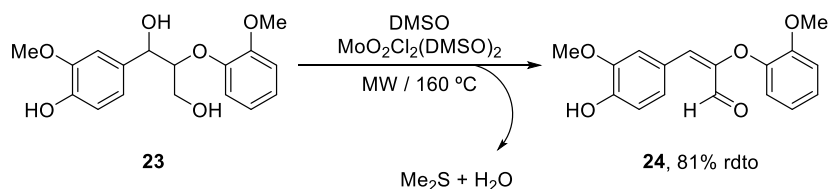
¹²⁹ G. González-Riopedre, M. I. Fernández-García, E. Gómez-Fórneas, M. Maneiro, *Catalysts* **2013**, 3, 232-246.

¹³⁰ S. G. Yao, M. S. Meier, R. B. Pace III, M. Crocker, *RSC Adv.* **2016**, 6, 104742-104753.



Esquema 1.2. Ejemplo del proceso desarrollado por Yao y colaboradores para la oxidación de compuestos modelo de la lignina empleando LIs como cosolventes.

Por otro lado, también se pueden utilizar otro tipo de técnicas más novedosas y sostenibles, como la aplicación de radiación por microondas. Así, Gao y colaboradores han estudiado la reactividad bajo estas condiciones de una amplia variedad de compuestos como el 1,3-diol **23**, obteniéndose los correspondientes productos de oxidación o incluso en algunos casos la hidrólisis de determinados enlaces, mediante la utilización de un compuesto organometálico de molibdeno y DMSO como disolvente y agente oxidante (Esquema 1.3).¹³¹



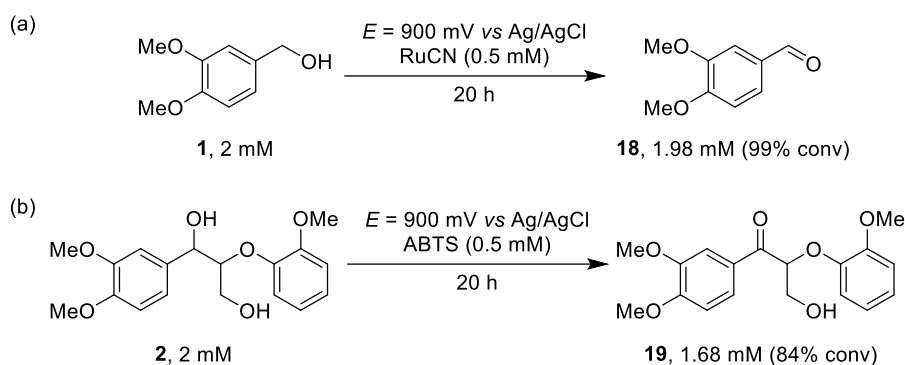
Esquema 1.3. Oxidación del compuesto modelo **23** aplicando microondas.

Aunque estas técnicas demostraron ser efectivas para llevar a cabo la oxidación de esta familia de compuestos, se ha explorado el empleo de otras estrategias oxidativas como la electroquímica. Así, Rochefort y colaboradores han empleado el hexacianorutenato(II) (RuCN) como catalizador metálico y una corriente eléctrica para llevar a cabo su regeneración, alcanzando conversiones cuantitativas en la oxidación del alcohol veratrílico (Esquema 1.4a).¹³² De manera similar, pero evitando la utilización de metales, el ABTS ha sido empleado como oxidante para lograr la oxidación selectiva de un dímero representativo de la lignina, el adlerol (**2**), logrando conversiones de hasta el 84% (Esquema 1.4b).¹³²

¹³¹ R. Gao, Y. Li, H. Kim, J. K. Mobley, J. Ralph, *ChemSusChem* **2018**, *11*, 2045-2050.

¹³² D. Rochefort, R. Bourbonnais, D. Leech, M. G. Paice, *Chem. Commun.* **2002**, 1182-1183.

Capítulo 1. Antecedentes



Esquema 1.4. Oxidaciones del alcohol veratrílico (**1**, a) y el adlerol (**2**, b) mediante métodos electroquímicos.

Aunque estas metodologías transcurren en muchos casos en condiciones suaves de reacción, la utilización de compuestos organometálicos contaminantes o agentes oxidantes peligrosos, supone un problema desde el punto de vista medioambiental por la generación de residuos tóxicos. Por ello, en los últimos años, la investigación de diferentes procesos biocatalíticos para lograr la oxidación sostenible de este tipo de compuestos ha despertado gran interés, especialmente si pueden desarrollarse empleando el oxígeno molecular del aire como agente oxidante, es decir, en condiciones aeróbicas.

1.1.3. METODOLOGÍAS ENZIMÁTICAS PARA LA OXIDACIÓN DE DERIVADOS DE LA LIGNINA

Existen una gran variedad de biocatalizadores provenientes de bacterias u hongos capaces de transformar la lignina o distintos compuestos modelo de la misma mediante diferentes tipos de procesos químicos como hidrolíticos, oxidativos...^{124,133} Entre las enzimas capaces de modificar la lignina, podemos

¹³³ (a) Z. Ahmad, M. A. Bajwa, F. Hussain, M. A. Randhawa, *BioResources* **2016**, *11*, 10511-10527; (b) C. Zhao, S. Xie, Y. Pu, R. Zhang, F. Huang, A. J. Ragauskas, J. S. Yuan, *Green Chem.* **2016**, *18*, 1306-1312; (c) P. Picart, L. Wiermans, M. Pérez-Sánchez, P. M. Grande, A. Schallmey, P. Domínguez de María, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 651-655; (d) B. Yao, P. Kolla, R. Koodali, Y. Ding, S. Balaranjan, S. Shrestha, A. Smirnova, *New J. Chem.* **2017**, *41*, 958-964; (e) S. Xie, Q. Sun, Y. Pu, F. Lin, S. Sun, X. Wang, A. J. Ragauskas, J. S. Yuan, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 2215-2223; (f) M. Bilal, H. M. N. Iqbal, *Catal. Lett.* **2020**, *150*, 524-543; (g) J. C. Chan, M. Paice, X. Zhang, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 401-425.

destacar a las peroxigenasas,¹³⁴ las β -eterasas (gracias a su capacidad de hidrólisis de enlaces tipo éter),¹³⁵ y posiblemente, las que han sido más estudiadas, las peroxidases¹³⁶ y las lacasas.³²

1.1.3.1. Peroxidases

Dentro del grupo de las peroxidases, caben destacarse tres tipos como son la lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), la manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) y la peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1.16). Todas ellas han demostrado su eficiencia en la hidrólisis de la lignina, siendo una de las más interesantes la LiP, procedente del hongo *Phanerochaete chrysosporium*.¹³⁷ Así, Tien y Kirk describieron su purificación, caracterización y aplicación en la oxidación de diferentes compuestos modelo de la estructura de la lignina.¹³⁸ El ciclo catalítico de esta enzima sigue el clásico de una peroxidasa,^{136a} basado en la presencia de un grupo hemo conteniendo hierro(III) en su estructura, el cual permite la oxidación de diferentes sustratos tras haber sido oxidado previamente por peróxido de hidrógeno (Esquema 1.5).¹³⁹

¹³⁴ (a) M. Kinne, M. Poraj-Kobielska, R. Ullrich, P. Nousiainen, J. Sipilä, K. Scheibner, K. E. Hammel, M. Hofrichter, *Holzforschung* **2011**, *65*, 673-679; (b) E. Garcia-Ruiz, D. M. Mate, D. Gonzalez-Perez, P. Molina-Espeja, S. Camarero, A. T. Martínez, A. O. Ballesteros, M. Alcalde, "Directed Evolution of Ligninolytic Oxidoreductases: from Functional Expression to Stabilization and Beyond" en *Cascade Biocatalysis: Integrating Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Eds. S. Riva, W.-D. Fessner, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2014**, Capítulo 1, pp. 1-22; (c) M. Hofrichter, H. Kellner, M. J. Pecyna, R. Ullrich, "Fungal Unspecific Peroxygenases: Heme-Thiolate Proteins That Combine Peroxidase and Cytochrome P450 Properties" en *Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450*, Eds. E. G. Hrycay, S. M. Bandiera, Springer International Publishing, Cham (Suiza), **2015**, Capítulo 13, pp. 341-368.

¹³⁵ (a) P. Picart, P. Domínguez de María, A. Schallmey, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 916; (b) C. A. Lewis Jr., R. Wolfenden, *Biochemistry* **2019**, *58*, 5381-5385.

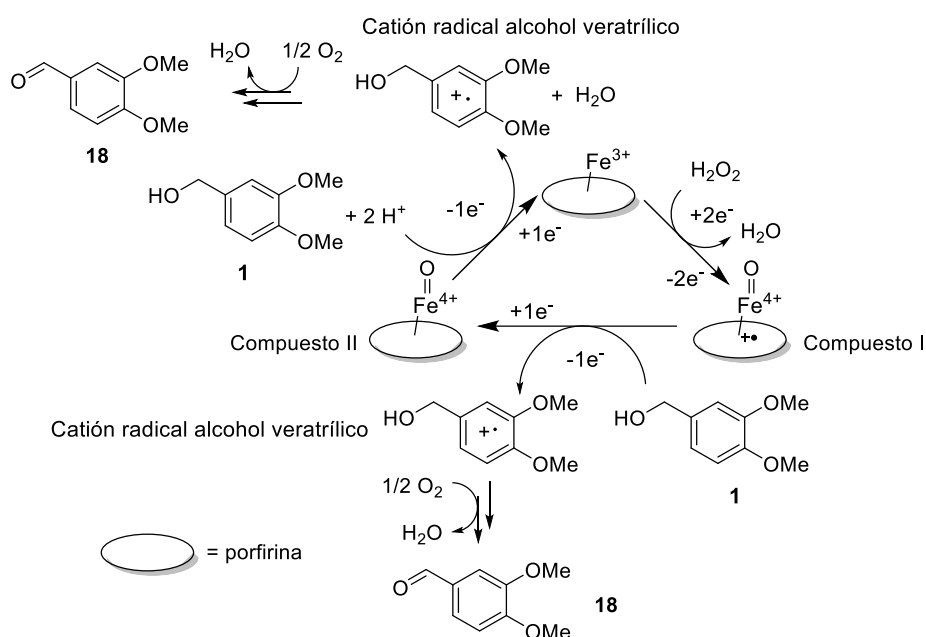
¹³⁶ (a) H. B. Dunford, *Heme peroxidases*, Wiley-VCH, Nueva York (EE. UU.), **1999**; (b) A. O. Falade, U. U. Nwodo, B. C. Iweriebor, E. Green, L. V. Mabinya, A. I. Okoh, *MicrobiologyOpen* **2017**, *6*, e00394; (c) L. Flohé, *Antioxidants* **2020**, *9*, 1254.

¹³⁷ (a) K. Valli, H. Wariishi, M. H. Gold, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8535-8539; (b) S. Linko, R. Haapala, *Biotechnol. Tech.* **1993**, *7*, 75-80.

¹³⁸ M. Tien, T. K. Kirk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 2280-2284.

¹³⁹ (a) K. Lee, S.-H. Moon, *J. Biotechnol.* **2003**, *102*, 261-268; (b) J. O. Romero, E. Fernández-Fueyo, F. Avila-Salas, R. Recabarren, J. Alzate-Morales, A. T. Martínez, *Comp. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 1066-1074.

Capítulo 1. Antecedentes



Esquema 1.5. Mecanismo oxidativo de la peroxidasa LiP con el alcohol veratrílico.

La MnP procede también del hongo *Phanerochaete chrysosporium*,¹⁴⁰ conteniendo iones manganeso(II) que intervienen de manera clave en el ciclo catalítico,¹⁴¹ que a su vez, como la LiP, emplea peróxido de hidrógeno para llevar a cabo la regeneración del centro metálico. Además, existen otros organismos capaces de producir diferentes MnPs, como el hongo *Phlebia* sp. *Nfb19*, que ha sido también aplicado con éxito en la oxidación de diferentes compuestos modelo de la estructura de la lignina.¹⁴²

Finalmente, la VP también ha sido utilizada en diferentes estudios de oxidación. Por ejemplo, Busse y colaboradores estudiaron la procedente de *Bjerkandera adusta*, para llevar a cabo la oxidación del adlerol.^{126b}

¹⁴⁰ (a) J. K. Glenn, M. H. Gold, *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *242*, 329-341; (b) A. Paszczyński, V.-B. Huynh, R. Crawford, *FEMS Microbiol. Lett.* **1985**, *29*, 37-41.

¹⁴¹ H. Wariishi, K. Valli, M. H. Gold, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 23688-23695.

¹⁴² P. Nousiainen, J. Kontro, P. Maijala, E. Uzan, A. Hatakka, A. Lomascolo, J. Sipilä, "Lignin Model Compound Studies to Elucidate the Effect of "Natural" Mediators on Oxidoreductase-Catalyzed Degradation of Lignocellulosic Materials" en *Functional Materials from Renewable Sources*, Eds. F. Liebner, T. Rosenau, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington (EE. UU.), 2012, Capítulo 12, pp. 229-242.

1.1.3.2. Lacasas

Las lacasas, previamente descritas en la *Sección 0.2.1.1* de la Introducción, tienen un potencial añadido como biocatalizadores debido a que su capacidad oxidativa reside en la utilización del oxígeno molecular presente en el aire, sin la necesidad de peróxidos adicionales (potencialmente peligrosos y que pueden inhibir la enzima) para regenerar su centro catalítico. Como se comentó anteriormente, estas enzimas son capaces de llevar a cabo procesos oxidativos en derivados de tipo fenólicos. Sin embargo, su potencial redox puede no ser suficiente para llevar a cabo la oxidación de otro tipo de compuestos químicos, por lo que requiere de la utilización de mediadores químicos para ampliar sus posibilidades sintéticas,^{27b,107,143} conformando los LMS, también previamente descritos en la Introducción de esta Tesis Doctoral.

Debido a la gran ventaja medioambiental que supone utilizar únicamente oxígeno como agente oxidante, las lacasas han sido objeto de investigaciones muy variadas en cuanto a la oxidación de compuestos modelo de la estructura de la lignina.¹⁴⁴ En concreto, Muheim y colaboradores estudiaron la capacidad oxidativa de la lacasa procedente de *Polyporus versicolor* (también conocida como *Trametes versicolor*) para transformar el alcohol veratrílico en su correspondiente aldehído utilizando dos mediadores, el ABTS y el siringaldehído. Mientras que la conversión utilizando ABTS fue completa tras 120 horas de reacción, el mediador natural apenas logró oxidar el alcohol (1%).¹⁴⁵

Li y colaboradores estudiaron la capacidad oxidativa frente al adlerol de lacasas procedentes de diferentes hongos (*Trametes villosa*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Botrytis cinerea* y *Myceliophthora thermophila*) en presencia de otros dos mediadores, el 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT) y el ácido violúrico.^{126a} Así, se alcanzaron conversiones superiores incluso al 70% hacia la correspondiente cetona

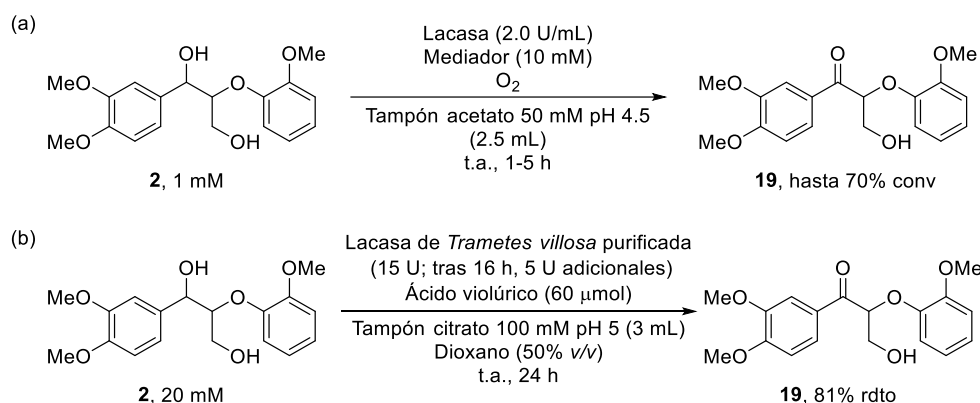
¹⁴³ Ejemplos recientes: (a) A. Díaz-Rodríguez, L. Martínez-Montero, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 2321-2329; (b) J. González-Sabín, N. Ríos-Lombardía, I. García, N. M. Vior, A. F. Braña, C. Méndez, J. A. Salas, F. Morís, *Green Chem.* **2016**, *18*, 989-994.

¹⁴⁴ (a) R. Bourbonnais, D. Leech, M. G. Paice, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1379*, 381-390; (b) M. Lahtinen, K. Kruus, H. Boer, M. Kemell, M. Andberg, L. Viikari, J. Sipilä, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57*, 204-210; (c) M. Kolb, V. Sieber, M. Amann, M. Faulstich, D. Schieder, *Bioresour. Technol.* **2012**, *104*, 298-304; (d) B. Ramalingam, B. Sana, J. Seayad, F. J. Ghadessy, M. B. Sullivan, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 11951-11958; (e) R. Hilgers, J.-P. Vincken, H. Gruppen, M. A. Kabel, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 2037-2046.

¹⁴⁵ A. Muheim, A. Fiechter, P. J. Harvey, H. E. Schoemaker, *Holzforschung* **1992**, *46*, 121-126.

Capítulo 1. Antecedentes

(Esquema 1.6a), eso sí, a una concentración de sustrato muy baja, que dependió de la lacasa y el mediador utilizados en el proceso. Barreca y colaboradores ampliaron el estudio de oxidación de **2**, empleando la lacasa procedente de *Trametes villosa* y ácido violúrico como mediador, con un rendimiento que llegó hasta el 81% a 20 mM de concentración del sustrato (Esquema 1.6b).¹⁴⁶



Esquema 1.6. Oxidación del adlerol utilizando lacasas y 1-HBT o ácido violúrico como mediadores.

Además de poder utilizar mediadores sintéticos, aquellos procedentes de fuentes naturales también pueden ser utilizados en procesos catalizados por lacasas, destacando entre ellos la vainillina, siringaldehído y derivados de estos, que han sido ampliamente estudiados en la bibliografía.^{45b,133d,147} Por otra parte, dada la naturaleza fenólica de este tipo de compuestos, las lacasas son capaces de catalizar la oxidación de una amplia cantidad de derivados procedentes de la estructura de la lignina que presenten dicha funcionalidad en su estructura.¹⁴⁸ Aprovechando este hecho, Camarero y colaboradores llevaron a cabo la decoloración de diferentes colorantes orgánicos utilizando una amplia variedad de mediadores derivados de fuentes

¹⁴⁶ A. M. Barreca, M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, S. Ljunggren, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *26*, 105-110.

¹⁴⁷ (a) P. Nousiainen, P. Maijala, A. Hatakka, A. T. Martínez, J. Sipilä, *Holzforchung* **2009**, *63*, 699-704; (b) T. Rosado, P. Bernardo, K. Koci, A. V. Coelho, M. P. Robalo, L. O. Martins, *Bioresour. Technol.* **2012**, *124*, 371-378; (c) P. Könst, S. Kara, S. Kochius, D. Holtmann, I. W. C. E. Arends, R. Ludwig, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3027-3032; (d) A. Rico, J. Rencoret, J. C. del Río, A. T. Martínez, A. Gutiérrez, *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 6; (e) A. Kirsch, K. Ostendorf, A. Kharazipour, M. Euring, *BioResources* **2016**, *11*, 7091-7101.

¹⁴⁸ S. Slagman, J. Escorihuela, H. Zuilhof, M. C. R. Franssen, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 99367-99375.

naturales.¹⁴⁹ De manera similar, también se ha estudiado la degradación del colorante “Reactive Black 5” en presencia de las lacasas de *Pycnoporus cinnabarinus* y de *Trametes villosa*,¹⁵⁰ utilizando diferentes mediadores de tipo fenólico (Figura 1.2), lográndose diferentes grados de decoloración en función del mediador empleado.

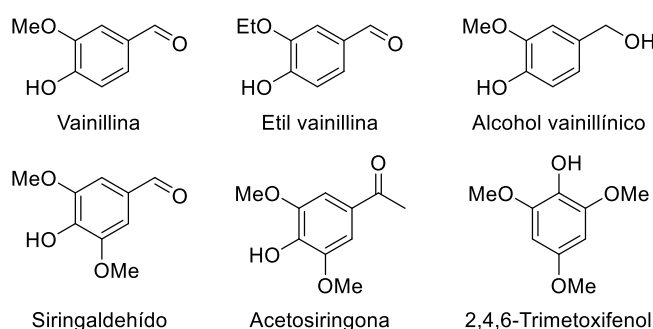


Figura 1.2. Ejemplos de mediadores naturales empleados en la decoloración del “Reactive Black 5” catalizada por lacasas.

Sin embargo, a pesar de que estas enzimas son capaces de llevar a cabo la oxidación e hidrólisis de estructuras derivadas de la lignina, estas reacciones presentan el inconveniente de que también puedan ocurrir procesos de repolimerización, tomando como sustratos los propios productos de hidrólisis obtenidos.¹⁵¹ A pesar de ello, Marzullo y colaboradores estudiaron la biodegradación de lignina evitando su posterior repolimerización.¹⁵² Para ello, aislaron una lacasa y una oxidasa del alcohol veratrílico (VAO) procedentes de *Pleurotus ostreatus*, y estudiaron la inhibición de diferentes procesos de polimerización, como el que puede ocurrir en la reacción de oxidación del guaiacol catalizada por la lacasa. Así, la VAO era capaz de reducir *in situ* los productos de dicha reacción altamente reactivos, inhibiendo la formación del poliguaiacol, a costa de oxidar el alcohol veratrílico (añadido como reactivo al medio de reacción) a veratraldehído. Además de este proceso, los autores describieron la posibilidad de llevar a cabo la polimerización o despolimerización de lignosulfonatos de alto peso molecular.

¹⁴⁹ S. Camarero, D. Ibarra, M. J. Martínez, Á. T. Martínez, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1775-1784.

¹⁵⁰ J. R. Aspland, “Colorants: Dyes” en *Color for Science, Art and Technology*, Ed. K. Nassau, Elsevier, Ámsterdam (Países Bajos), **1998**, Capítulo 11, pp. 313-344.

¹⁵¹ A. Leonowicz, G. Szklarz, M. Wojtaś-Wasilewska, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 393-396.

¹⁵² L. Marzullo, R. Cannio, P. Giardina, M. T. Santini, G. Sannia, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3823-3827.

OBJETIVOS

Numerosas metodologías oxidativas tanto químicas como enzimáticas han sido estudiadas a lo largo de los años. El auge de la Química Verde, que implica la necesidad de desarrollar metodologías químicas respetuosas con el medio ambiente, ha incrementado el interés por las transformaciones de tipo enzimático y que hagan uso de oxígeno molecular como oxidante. Por tanto, en este capítulo nos centraremos en la oxidación de dos compuestos modelo de la estructura de la lignina, como son el veratril alcohol y el adlerol, explorando la posibilidad de emplear diferentes mediadores de tipo fenólico provenientes de fuentes naturales, así como estudiar la reactividad de estos compuestos con las lacasas, ya que podrían dar lugar a la formación de, por ejemplo, dímeros o polímeros.

Así, partiendo inicialmente de compuestos orgánicos naturales como la vainillina o el siringaldehído, se sintetizarán mediante estrategias sintéticas convencionales otros derivados con diversas modificaciones estructurales, centrándonos especialmente en la preparación de análogos nitrogenados.

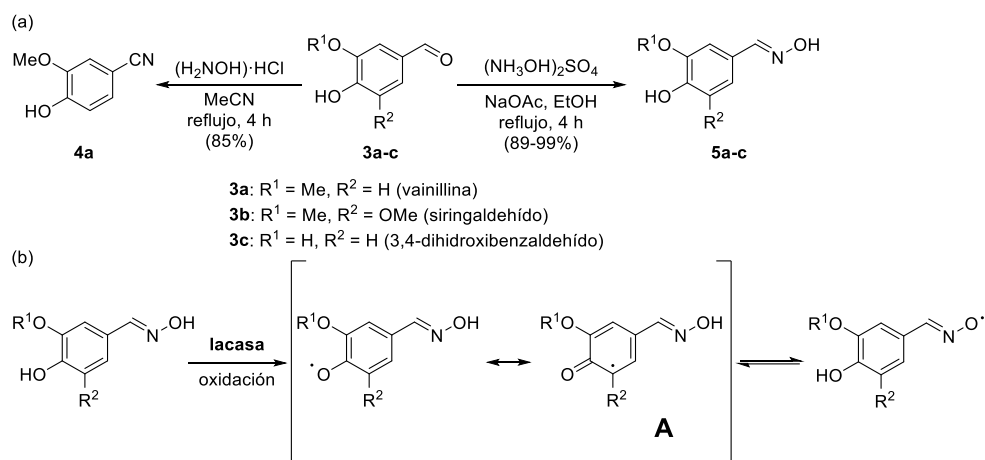
En cuanto a las lacasas, se estudiará la reactividad de dos enzimas provenientes de hongos, ambas comercialmente accesibles, como son las lacasas de *Trametes versicolor* y la de *Myceliophthora thermophila*, a las cuales ya nos hemos referido en la Sección 0.2.1.1.1 de la Introducción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se discute la preparación de diversos mediadores químicos a partir de fuentes naturales y su empleo en procesos químicos oxidativos que involucran el empleo de las lacasas de *Trametes versicolor* y la de *Myceliophthora thermophila*, a través de los llamados sistemas lacasa-mediador.

1.3.1. MODIFICACIONES QUÍMICAS DE COMPUESTOS DERIVADOS DE FUENTES NATURALES

Se eligieron la vainillina (**3a**) y el siringaldehído (**3b**) como estructuras iniciales para la síntesis de nuevos mediadores químicos (Esquema 1.7a) debido a su disponibilidad comercial, bajo coste, alta presencia de estas subestructuras en polímeros de diferentes tipos de lignina, y a su vez ser mediadores naturales comúnmente empleados en sistemas combinados con lacasas.¹⁴⁸



Esquema 1.7. (a) Síntesis del nitrilo **4a** y de las oximas **5a-c**. (b) Deslocalización electrónica en un derivado de oxima, al reaccionar con una lacasa.

Basándonos en las estructuras de algunos mediadores comerciales con grupos nitrogenados cruciales en la catálisis (por ej., radicales N-oxilo), se decidió llevar a cabo transformaciones sencillas del grupo aldehído en **3a** y **3b**, dando lugar a derivados nitrogenados con potencial interés. Además de considerar **3a** y **3b**, se llevó a cabo la desmetilación de la vainillina,¹⁵³ dando lugar al 3,4-dihidroxibenzaldehído

¹⁵³ J. Ravindran, G. V. Subbaraju, M. V. Ramani, B. Sung, B. B. Aggarwal, *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 79, 1658-1666.

Capítulo 1. Resultados y discusión

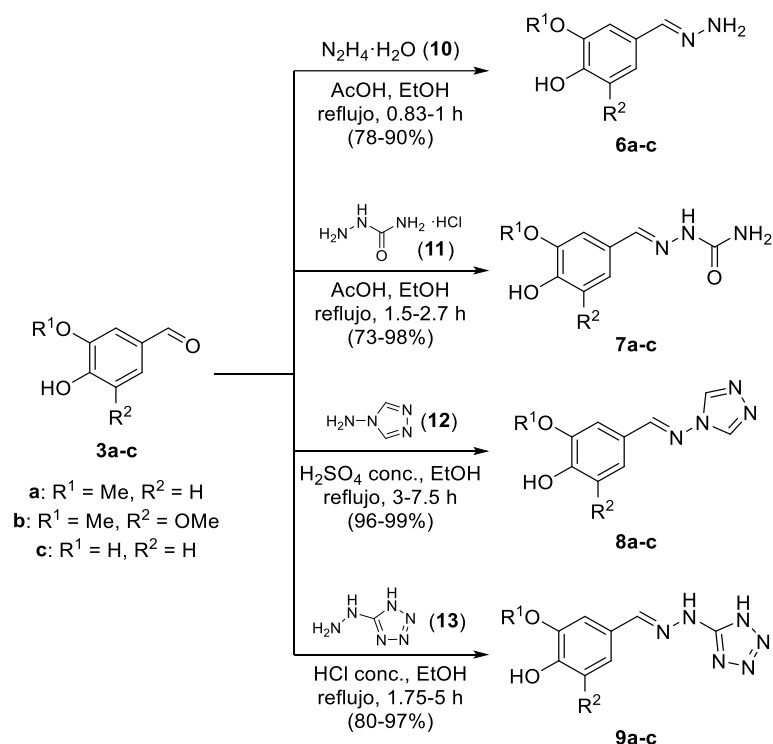
(**3c**), que a su vez fue empleado para la síntesis de otros derivados nitrogenados. Los cambios estructurales se planearon por dos motivos principalmente:

- aumentar la estabilización de los radicales intermedios que se generasen en las reacciones biocatalíticas, y
- tratar de incrementar el número de puntos reactivos en su interacción con las lacasas seleccionadas.

En el Esquema 1.7a, se muestran las condiciones de síntesis del derivado nitrilo **4a** por reacción de la vainillina (**3a**) con hidroxilamina a reflujo de acetonitrilo, así como las de las correspondientes oximas **5a-c** formadas a partir de los aldehídos **3a-c** mediante tratamiento con sulfato de hidroxilamonio en presencia de acetato de sodio.¹⁵⁴ En el caso de las oximas, como se puede observar en el Esquema 1.7b, estas presentan un mayor número de posiciones reactivas a la par que estabilizan posibles intermedios radicalarios generados durante el proceso enzimático. Además, se puede observar que uno de estos intermedios radicalarios, en concreto el representado más a la derecha del Esquema 1.7b, tiene una estructura similar a la del oxidante radicalario TEMPO, de tipo N-oxilo, previamente comentado en la *Sección 0.2.1.1.3* de la Introducción, el cual se conoce que actúa como mediador en diferentes procesos donde están involucradas las lacasas.

Otro tipo de compuestos fácilmente sintetizables a partir de los aldehídos **3a-c** son los de tipo imina (Esquema 1.8), de los cuales se obtuvieron derivados con una variedad de grupos funcionales como hidrazonas (**6a-c**), semicarbazonas (**7a-c**), derivados de triazol (**8a-c**) y derivados de tetrazol (**9a-c**). Así, variando el compuesto nitrogenado (**10-13**) y el catalizador ácido (AcOH, H₂SO₄ o HCl) empleado, se lograron obtener los correspondientes derivados nitrogenados **6-9a-c** con rendimientos entre altos y excelentes (73-99%) tras reacciones a reflujo de etanol y simple evaporación del disolvente o filtración del producto precipitado.

¹⁵⁴ H. E. Master, S. I. Khan, K. A. Poojari, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4891-4899.



Esquema 1.8. Síntesis química de una serie de compuestos nitrogenados **6-9a-c** empleados en este capítulo como posibles mediadores.

1.3.2. REACTIVIDAD DE LAS LACASAS CON LOS MEDIADORES SINTETIZADOS

Para lograr desarrollar un sistema lacasa-mediador de forma eficiente hay que, en primer lugar, comprobar que los nuevos mediadores obtenidos son aceptados por la lacasa estudiada, generándose otros compuestos durante este proceso. Para este estudio, se emplearon la lacasa procedente de *Trametes versicolor* (LTv)¹⁵⁵ y la de *Myceliophthora thermophila* (Novozym 51003),⁴¹ ambas disponibles comercialmente.^{36,37}

En primer lugar, se ensayó su reactividad, considerando los derivados de la vainillina, es decir los de tipo **a**. Así, se comprobó que los compuestos sintetizados

¹⁵⁵ (a) P. Cassland, L. J. Jönsson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52, 393-400; (b) M.-J. Han, H.-T. Choi, H.-G. Song, *J. Microbiol.* **2006**, 43, 555-560.

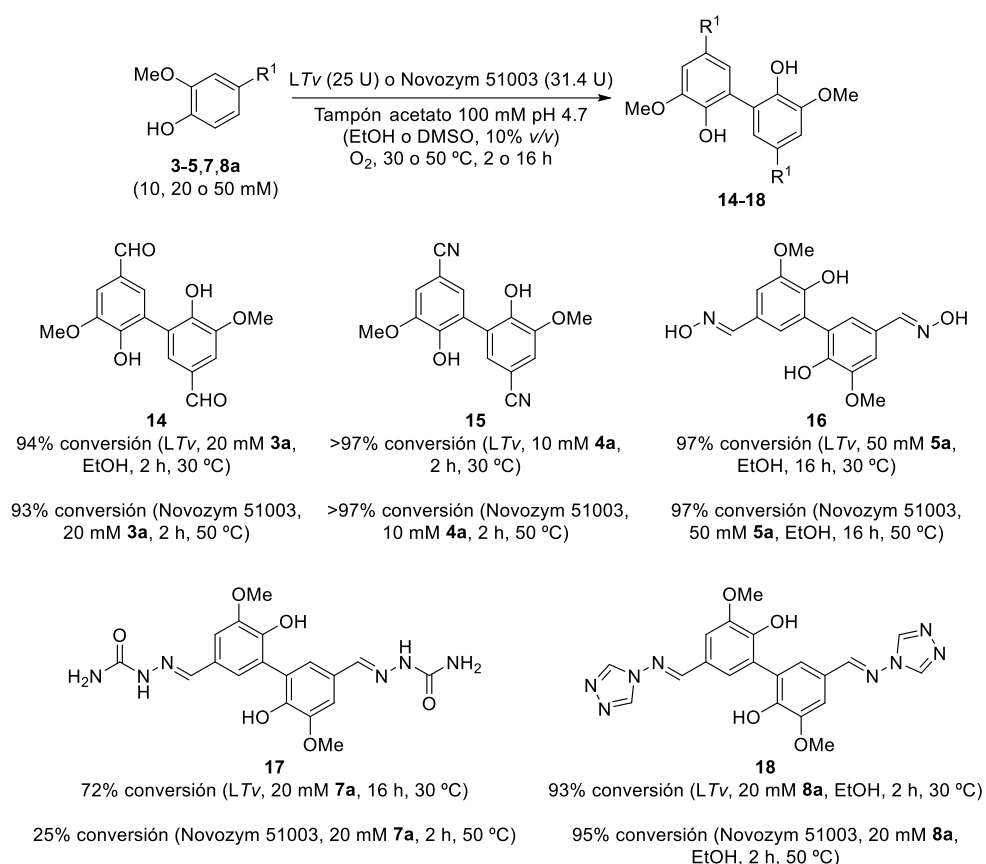
Capítulo 1. Resultados y discusión

4-9a, así como la propia vainillina, podían actuar como potenciales mediadores, dado que presentaron reactividad con ambas lacasas, dando lugar a diferentes productos. Las pruebas de reactividad con los mediadores se llevaron a cabo en un tampón acetato (100 mM) de pH 4.7, variando las concentraciones de sustrato entre 10 y 50 mM. Además, con el fin de mejorar la solubilidad de algunos de estos compuestos, se utilizó en algunos casos un cosolvente orgánico miscible con el medio acuoso (EtOH o DMSO, en una proporción 10% v/v). Asimismo, se comprobó que en ausencia de lacasa no se generaba ningún tipo de producto, lo cual sugirió que de haber reacción en los procesos donde se adicionó la enzima, la catálisis era debida a esta. En las reacciones en presencia de una u otra lacasa, se observaron fundamentalmente tres tipos de procesos:

- Dimerización C–C de especies radicalarias de tipo **A** (Esquema 1.7b), generando los correspondientes productos diméricos (Esquema 1.9). Esto sucedió principalmente para los derivados **3-5,7,8a**.
- Hidrólisis del mediador, para dar lugar a la vainillina, que a su vez dio lugar al primer proceso de dimerización, al menos parcialmente (en especial para el compuesto **6a**).
- Polimerización u oligomerización de los mediadores, procesos que no se estudiaron en profundidad, dado que ocurrían de manera minoritaria y existían limitaciones a la hora de analizar estas mezclas de productos (en especial para el compuesto **9a**, y en menor medida para el compuesto **7a**).

Basándonos en investigaciones previas del grupo,^{107,156} estas reacciones fueron inicialmente estudiadas durante 16 h. Se emplearon 30 o 50 °C para la *LTv* y Novozym 51003, respectivamente, modificando según los casos las condiciones de reacción para alcanzar conversiones significativas hacia los productos diméricos **14-18** (Esquema 1.9), aumentando la concentración del sustrato todo lo que fue posible (hasta 50 mM). A pesar de los esfuerzos realizados, en algunos casos no se pudo determinar la estructura de los productos generados en estas reacciones, debido a la presencia de diversos productos diméricos u oligoméricos en el análisis por RMN.

¹⁵⁶ L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Green Chem.* **2017**, *19*, 474-480.



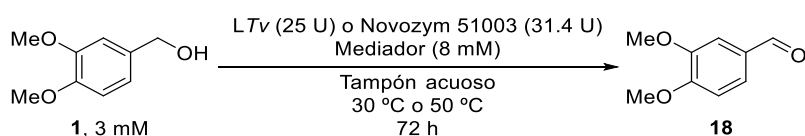
Esquema 1.9. Reactividad de las lacasas empleadas con los nuevos mediadores derivados de vainillina.

1.3.3. APLICACIÓN DE LOS NUEVOS LMS A LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS MODELO DE LA ESTRUCTURA DE LA LIGNINA

Una vez comprobada la compatibilidad de los derivados de vainillina (**a**) con ambas lacasas, tanto esta familia de compuestos como los derivados de siringaldehído (**b**) y 3,4-dihidroxibenzaldehído (**c**) fueron estudiados como potenciales mediadores en la oxidación de dos compuestos modelo de la estructura de la lignina, como son el alcohol veratrílico (**1**) y el adlerol (**2**), estructuras monomérica y dimérica respectivamente (Tabla 1.1).^{125,126}

Capítulo 1. Resultados y discusión

Tabla 1.1. Oxidación de **1** empleando lacasas y diversos mediadores nitrogenados a distintos pHs (solo se muestran las mayores conversiones alcanzadas con cada mediador).



Entrada ^a	Mediador	Lacasa	pH	c (%) ^b
1	3a	Novozym 51003	6	6
2	3b	Novozym 51003	6	7
3	4a	Novozym 51003	6	6
4	5a	LTv	6	37
5	5b	Novozym 51003	7	35
6	5c	LTv	5	70
7	6a	Novozym 51003	6	54
8	6b	Novozym 51003	6	3
9	6c	Novozym 51003	5	10
10	7a	Novozym 51003	6	16
11	7b	LTv	4.7	23
12	7b	Novozym 51003	7	23
13	7c	LTv	4.7	8
14	8a	Novozym 51003	6	9
15	8b	Novozym 51003	6	16
16	8c	LTv	4.7	4
17	9a	LTv	6	39
18	9b	LTv	5	36
19	9c	LTv	5	11

^a Condiciones de reacción: mediador natural o nitrogenado (16 μmol), disolución tampón (2 mL), alcohol veratrílico (0.9 μL, 6 μmol), lacasa de *Trametes versicolor* (25 U, 30 °C) o Novozym 51003 (31.4 U, 50 °C), 72 h. Disoluciones tampón utilizadas: acetato 100 mM pH 4.7, citrato 50 mM pH 5, pH 5.5 o pH 6 y fosfato 100 mM pH 7.

^b Valores de conversión medidos por cromatografía de gases.

En primer lugar, se estudió el proceso de oxidación de **1** a veratraldehído (**18**), partiendo de una concentración inicial de sustrato de 3 mM, estimada como concentración óptima para este tipo de procesos.^{125a} Dado que estos ensayos se llevaron a cabo con dos lacasas distintas y debido a la diferente naturaleza de los

potenciales mediadores (vainillina, **3a**; siringaldehído, **3b**; nitrilo, **4a**; oximas, **5a-c**; hidrazonas, **6a-c**; semicarbazonas, **7a-c**; triazoles, **8a-c**; y tetrazoles **9a-c**), se realizó un extenso estudio de las condiciones de reacción, estudiando la influencia del tipo de medio, pH, temperatura, o la concentración inicial del mediador, entre otros parámetros que pudieran afectar a la reactividad de las lacasas, obteniendo valores de conversión muy variables de hasta el 70% (Tabla 1.1, entrada 6).

Trabajando en un intervalo de pH entre 4.7 y 7,^{41,155} la *LTv* condujo a los mejores resultados en condiciones ácidas, mientras que la Novozym 51003 alcanzó los valores más altos de conversión a pH neutro o ligeramente básico. Tras varios ensayos iniciales con diferentes mediadores, se comprobó que la utilización de un cosolvente orgánico (EtOH o DMSO, al 10% *v/v*) influía negativamente en el proceso de oxidación, al contrario de lo que ocurría en algunos procesos de dimerización previamente comentados. Por otra parte, el tiempo inicial de reacción de 24 h se aumentó progresivamente hasta las 72 h, debido a que las lacasas eran aún activas. Sin embargo, un incremento del tiempo de reacción más allá de las 72 h (por ejemplo, 96 h) condujo a una disminución de la proporción de veratraldehído en los procesos enzimáticos, lo cual puede deberse a la formación del correspondiente ácido carboxílico, el ácido veratrílico, que fue identificado en algunas de estas reacciones.

Además, con el fin de hacer una comparativa de los nuevos mediadores con los de origen natural, se realizaron las mismas pruebas de oxidación, pero utilizando como mediadores tanto **3a** como **3b** (entradas 1 y 2). De esta forma, se encontró una diferencia de conversión apreciable entre dichos mediadores naturales y algunos de los modificados químicamente, viéndose que muchos de los nuevos mediadores nitrogenados proporcionaban valores de conversión más altos que los naturales, poniendo por tanto en valor las transformaciones químicas previamente realizadas sobre los mediadores **3a-c**.

En las condiciones óptimas de reacción, además de los mediadores naturales **3a** y **3b**, tanto el derivado de nitrilo **4a** como los derivados de triazol **8a-c** exhibieron valores de conversión muy bajos (<16%). Por otro lado, los derivados de oxima **5a-c** exhibieron unos resultados de en torno al 30-40% de conversión, a excepción de la oxima **5c**, con la que se obtuvo el mejor valor del estudio (70% conversión). Los tetrazoles **9a,b** dieron lugar a valores similares a las oximas **5a,b** (20-40%), mostrando el tetrazol **9c** los peores resultados dentro de este grupo. Por otra parte,

Capítulo 1. Resultados y discusión

los derivados de hidrazona **6a-c** y semicarbazona **7a-c** dieron lugar a resultados muy dispares, en función del pH de reacción utilizado con ambas lacasas. Además, comparando las estructuras de partida de los nuevos mediadores, no se observó una clara relación entre los valores de conversión obtenidos y los motivos estructurales de los productos de partida. Es decir, la presencia de un grupo metoxi adicional en el anillo aromático (en los derivados **b**), o la ausencia de ellos (en los compuestos **c**), no influyó en gran medida en los resultados obtenidos, si estos son comparados con los obtenidos tras utilizar los derivados de vainillina (**a**), que presentan un único grupo metoxi en el anillo fenólico.

Finalmente, y dados los buenos resultados obtenidos con algunos de estos nuevos mediadores, se estudiaron las reacciones a mayor concentración de sustrato (3-20 mM, Figura 1.3).

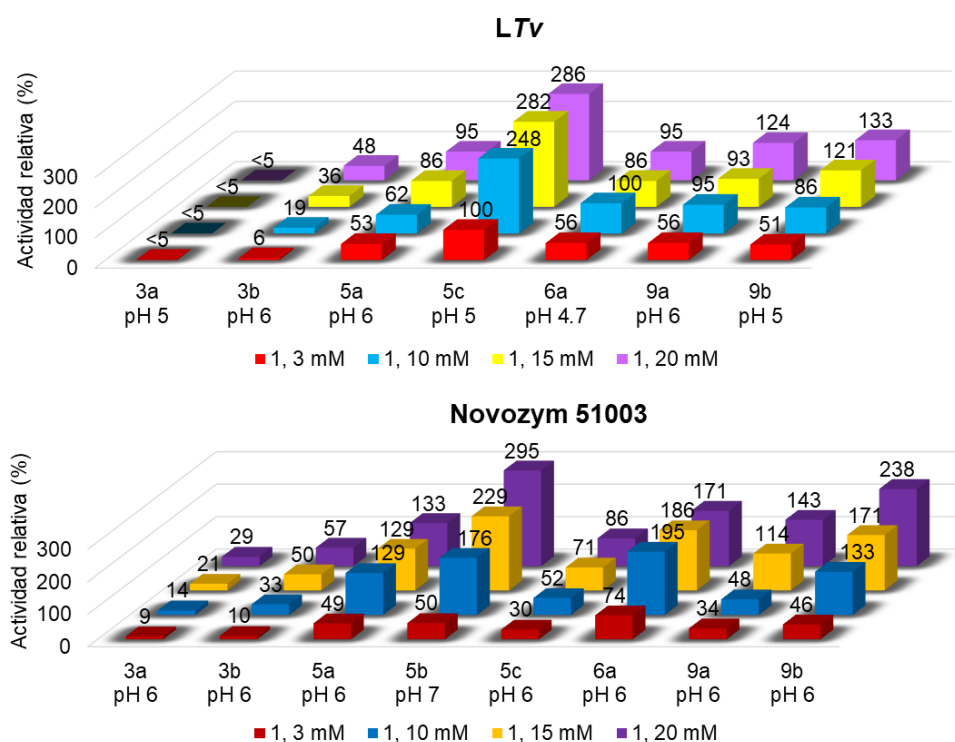
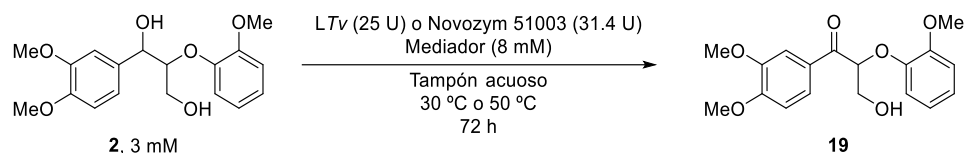


Figura 1.3. Actividades relativas de las lacasas de *Trametes versicolor* y Novozym 51003 en la oxidación de **1** a distintas concentraciones (3-20 mM) del mismo.

A pesar de que se observó un descenso de la conversión al aumentar la concentración del sustrato **1**, en general se obtuvo una mayor productividad del proceso empleando la misma cantidad de la enzima,¹⁵⁷ destacando especialmente la reactividad de los derivados de oxima **5b** (con la lacasa Novozym 51003) y **5c** (con la LTv), derivados del siringaldehído y del 3,4-dihidroxibenzaldehído respectivamente.

Por último, y una vez estudiado el proceso de oxidación del compuesto modelo monomérico, se aplicó esta misma metodología a la oxidación del compuesto modelo dimérico (**2**) en la posición bencílica para obtener la correspondiente cetona **19** (Esquema 1.10). Desafortunadamente, no se observó reactividad alguna con mediadores como la vainillina o el siringaldehído, mientras que con los sintéticos en todos los casos los valores de conversión fueron menores que para el caso del aldehído **18**. Cabe destacar únicamente el valor del 22% de conversión obtenido con la lacasa Novozym 51003 y el mediador de tipo oxima **5b**, que es significativamente más alto que los descritos en la literatura empleando mediadores similares con estructuras semejantes a la vainillina o el siringaldehído.^{125,126}



Esquema 1.10. Oxidación del adlerol (**2**) empleando lacasas y los mediadores nitrogenados sintetizados.

Para terminar, hay que resaltar que en ningún momento se observó ningún tipo de acoplamiento entre los mediadores empleados en estos ensayos y los sustratos de partida, siendo las reacciones bastante limpias al no detectarse la formación de una cantidad significativa de subproductos.

¹⁵⁷ El aumento de productividad del proceso fue medido como actividad relativa, tomando como el 100% aquella correspondiente al proceso catalizado por la lacasa de *Trametes versicolor* y mediado por la oxima **5c** (entrada 6, Tabla 1.1).

CONCLUSIONES

Capítulo 1. Conclusiones

Durante el presente capítulo se ha llevado a cabo la síntesis de diferentes compuestos nitrogenados derivados de mediadores naturales cuyo origen se encuentra en la estructura de la lignina (vainillina, **3a** y siringaldehído, **3b**), así como de un tercer compuesto proveniente de uno de ellos (3,4-dihidroxibenzaldehído, **3c**). En total, se ha realizado la síntesis con rendimientos altos de varios derivados incluyendo diversos grupos funcionales, como nitrilo (**4a**, 85%), oxima (**5a-c**, 89-99%), hidrazona (**6a-c**, 78-90%), semicarbazona (**7a-c**, 73-98%), triazol (**8a-c**, 96-99%) y tetrazol (**9a-c**, 80-97%), mediante procedimientos químicos sencillos.

Tras ello, y con el fin de determinar la posible utilización como mediadores en las reacciones de oxidación catalizadas por lacasas, se ha realizado un estudio de la reactividad de los derivados de **3a** con dos lacasas comerciales: la lacasa procedente de *Trametes versicolor* (LTV) y la lacasa procedente de *Myceliophthora thermophila* (LMT o Novozym 51003). De esta forma, se han conseguido aislar y caracterizar cinco compuestos diméricos procedentes de la oxidación de **3a** y de los derivados de vainillina **4a**, **5a**, **7a** y **8a**, obteniéndose los dímeros **14** (93-94% conversión), **15** (>99% conversión), **16** (97% conversión), **17** (25-72% conversión) y **18** (93-95% conversión).

Con el fin de demostrar la aplicabilidad de los nuevos mediadores y utilizando ambas lacasas, se ha estudiado la oxidación de dos compuestos modelo de la estructura de la lignina:

- El alcohol veratrílico, para dar lugar al veratraldehído, obteniéndose la máxima conversión con la oxima **5c** y la LTV (70%).
- El adlerol, para dar lugar a la adlerona, con una conversión máxima al utilizarse la oxima **5b** y la Novozym 51003 (22%).

Además, el proceso de oxidación del alcohol veratrílico se estudió a concentraciones de sustrato más altas, observándose mayores productividades del proceso hacia la formación del veratraldehído a 20 mM de **1**.

Este estudio es un ejemplo más de las posibilidades que existen dentro del campo de la modificación de la lignina utilizando LMS, en este caso aprovechando el potencial de mediadores sintéticos obtenidos de fuentes naturales obtenidos a través de procesos sintéticos sencillos.

**PROCEDIMIENTOS
EXPERIMENTALES**

1.5.1. PROCEDIMIENTO SINTÉTICO PARA LA OBTENCIÓN DE LAS OXIMAS 5a-c (ver Esquema 1.7a)

Para la obtención de las oximas **5a-c**, se añadieron sucesivamente sulfato de hidroxilamina (650 mg, 3.95 mmol) y acetato de sodio (447 mg, 3.29 mmol) a una disolución de **3a-c** (3.29 mmol) en etanol (3.3 mL), y la mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 4 h. Tras ello, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió CH₂Cl₂ (10 mL) y se filtró y lavó con CH₂Cl₂ (2 x 2 mL). En el caso de la oxima **5a**, el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniéndose la oxima pura de manera cuantitativa. En el caso de la oxima **5b**, se purificó mediante cromatografía en columna (30% AcOEt/Hexano), obteniéndose con un rendimiento aislado del 91%. En el caso de la oxima **5c**, se evaporó el disolvente orgánico y el crudo se redisolvió en H₂O, tras lo que la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío, obteniéndose la oxima **5c** con un rendimiento del 89%.

1.5.2. PROCEDIMIENTO SINTÉTICO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE LAS HIDRAZONAS 6a-c, LAS SEMICARBAZONAS 7a-c, LOS TRIAZOLES 8a-c Y LOS TETRAZOLES 9a-c (ver Esquema 1.8)

A una disolución de **3a-c** (0.657-6.57 mmol) en etanol (2-10 mL) se añadió el compuesto nitrogenado correspondiente (**10-13**) en una cantidad equimolar, y los correspondientes catalizadores ácidos (AcOH, HCl conc. o H₂SO₄ conc., 5-10 gotas). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante el tiempo necesario (0.8-7.5 h) en función del producto. Tras ello, en el caso de las hidrazonas **6a-c** y las semicarbazonas **7a-c**, se enfrió el medio de reacción y se evaporó el disolvente orgánico, obteniéndose los productos en unos rangos de 78-90% y 73-98%, respectivamente, de rendimiento aislado. En el caso de los triazoles **8a-c** y los tetrazoles **9a-c**, el precipitado presente en el medio de reacción se filtró en caliente y el sólido obtenido se secó en la placa filtrante, obteniéndose finalmente los productos en unos rangos de 96-99% y 80-97%, respectivamente, de rendimiento aislado.

Capítulo 1. Procedimientos experimentales

1.5.3. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OXIDACIÓN DE LOS NUEVOS MEDIADORES UTILIZANDO LACASAS (ver Esquema 1.9)

En un tubo de ensayo se solubilizó el correspondiente mediador (10-50 mM) en un determinado cosolvente orgánico (EtOH o DMSO, 300 μ L). Tras ello, se añadió al medio la correspondiente disolución tampón previamente saturada con O₂ (2.7 mL), seguida de la adición de la lacasa comercial de *Trametes versicolor* (25 U) o la de *Myceliophthora thermophila* (Novozym 51003, 31.4 U). Tras ello, se acopló un globo de O₂ al tubo de ensayo y la mezcla se agitó a 30 °C o 50 °C durante un tiempo variable, en función de la lacasa y del mediador empleado (2-16 h). Tras ello, el medio de reacción se extrajo con AcOEt (3 x 2 mL) y las fases orgánicas se combinaron y secaron con Na₂SO₄. Finalmente, se filtró la fase orgánica y se evaporó el disolvente a presión reducida, analizándose el crudo resultante mediante ¹H-RMN. En los casos en los que se observó un precipitado abundante en el medio de reacción, este fue separado mediante decantación y analizado mediante ¹H-RMN.

1.5.4. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OXIDACION DE COMPUESTOS MODELO DE LA ESTRUCTURA DE LA LIGNINA CATALIZADOS POR LACASAS EN PRESENCIA DE MEDIADORES NATURALES O NITROGENADOS (ver Tabla 1.1, Figura 1.3 y Esquema 1.10)

A un tubo de ensayo se añadió el mediador correspondiente (16 μ mol), la disolución tampón saturada con O₂ (pH 4.7: tampón acetato 100 mM; pH 5-6: tampón citrato 50 mM; pH 7: tampón fosfato 100 mM) y, después, el alcohol veratrílico (**1**, 6 μ mol) o el adlerol (**2**, 6 μ mol). Tras agitar la mezcla de reacción suavemente durante unos segundos hasta observar la disolución de los reactivos, se adicionó la lacasa comercial de *Trametes versicolor* (25 U) o la de *Myceliophthora thermophila* (Novozym 51003, 31.4 U) y, finalmente, se agitó el medio de reacción a 30 °C o 50 °C, respectivamente, durante 72 h. Tras este tiempo de reacción, se acidificó el medio con una disolución de HCl 2 N (4 gotas) y se extrajo con AcOEt (2 x 1 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ y se filtraron. Para el cálculo de las conversiones en ambos procesos se procedió de manera diferente: en el caso del alcohol veratrílico, se tomó una alícuota y se analizó mediante CG, y en el caso del adlerol, se evaporó el disolvente orgánico a presión reducida y se analizó el crudo de reacción mediante ¹H-RMN.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN



Cite this: *RSC Adv.*, 2017, 7, 50459

Synthesis of nitrogenated lignin-derived compounds and reactivity with laccases. Study of their application in mild chemoenzymatic oxidative processes†

Jesús Albarrán-Velo,  María López-Iglesias, Vicente Gotor, Vicente Gotor-Fernández * and Iván Lavandera *

The chemical synthesis of a series of lignin-derived nitrogenated compounds was performed in high yields (73–99%) through simple conventional chemical transformations starting from natural monomers such as vanillin, syringaldehyde or 3,4-dihydroxybenzaldehyde. The study of the vanillin-derived compounds as substrates for commercially available laccases from *Trametes versicolor* and *Myceliophthora thermophila* in oxidative transformations, generally led to the isolation of several dimeric species in high to excellent conversions (>70%), while for hydrazone derivatives a more rapidly oxidative coupling was evidenced by the formation of oligomers and/or polymers. Remarkably, vanillin was obtained due to the hydrolysis of some of the nitrogenated functional groups, such as the hydrazone or the hydrazone tetrazole. The three families of lignin-derived compounds can provide a great source of new laccase-mediator systems (LMS), the possibility of employing them for lignin modification being particularly attractive. Preliminary experiments showed promising levels of activity towards the oxidation of a monomer (veratryl alcohol, up to 70% conversion) and a dimer (adlerol, up to 22% conversion) lignin models, higher than those achieved with the natural vanillin and syringaldehyde (up to 7% conversion with veratryl alcohol and almost negligible conversion with adlerol), these processes being also highly influenced by the pH of the reaction medium.

Received 21st September 2017
Accepted 24th October 2017

DOI: 10.1039/c7ra10497a

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Lignin is a highly abundant and irregular biopolymer which constitutes lignocellulosic biomass together with cellulose and hemicellulose. During the last decades, the scientific community has deeply studied the usability of these polymers as sources of energy and high-added value compounds. On the opposite, the complex structure of lignin has overshadowed its value as a renewable alternative to the fuel industry, since high amounts of energy could be involved to break down its cross-linked structure. Nevertheless, the use of lignin as feedstock has become an important field of research in recent years, finding multiple applications in the production of bio-based polymers such as adhesives, bioplastics or resins due to its polyphenolic composition.¹ The lignin valorization is also moving to cleavage processes focused on degradation into

smaller compounds,² biocatalytic methodologies being currently booming.³

Thus, it has been found that some bacterial and fungal microorganisms containing potent oxidative enzymes, have the capability to degrade the structure of lignin by promoting the cleavage of certain connections as the β -O-4-aryl ether bonds or the oxidation at C_{α} positions,^{3c} these predominant linkages being illustrated in the dimeric species of Fig. 1 (left). Particularly, some peroxidases, peroxygenases and laccases have been applied in enzyme-catalyzed delignification processes.⁴

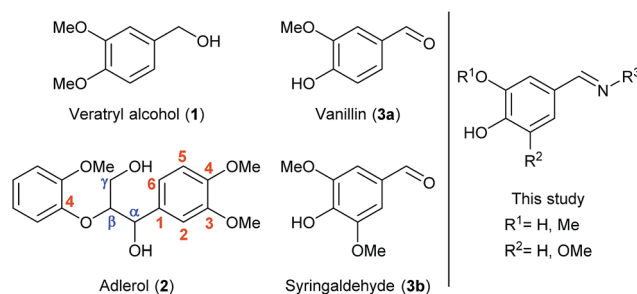


Fig. 1 Lignin-derived model compounds, monomeric and dimeric species.

Organic and Inorganic Chemistry Department, Biotechnology Institute of Asturias (IUBA), University of Oviedo, Avenida Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: vicgotfer@uniovi.es; lavanderaivan@uniovi.es

† Electronic supplementary information (ESI) available: This file includes extensive enzymatic optimization studies, analytical data for the oxidation of adlerol and copy of ¹H, ¹³C and DEPT NMR spectra for novel synthesized compounds. See DOI: 10.1039/c7ra10497a



Furthermore, lignin has attracted an increasing interest not only as source of energy but also because of the valuable low-molecular weight aromatic compounds contained in its structure, which can also serve as building blocks for synthetic processes.⁵ Within this area, many efforts have been intended to investigate the behavior of lignin-related compounds towards cleavage or oxidation processes as representative and handier models in which the most characteristic linkages are present. Among them, some dimeric species such as veratrylglycerol β -guaiaacyl ether (adlerol, **2**, Fig. 1) or similar β -1-type lignin model compounds have found wide application, for instance, for studying the mechanism of lignin C–C linkage cleavage by pyrolytic strategies⁶ or metal catalysis.^{2a} Also Biocatalysis has been applied in lignin valorization by studying the cleavage or oxidation of β -O-4-linkages in dimeric species.⁷

Laccases (EC 1.10.3.2) are multi-copper oxidative enzymes that consume molecular oxygen as electron acceptor during the oxidation of a substrate producing water as the only by-product, which makes them an interesting and suitable tool working under mild reaction conditions.⁸ These enzymes have been employed in lignin degradation,^{4,9} and also in the opposite repolymerization processes or related lignin-surface modifications, in order to functionalize it obtaining valuable biomaterials, for example by single molecule grafting or copolymerization processes.¹⁰ Despite these enzymes present a suitable redox potential to abstract electrons from phenolic compounds, this is not high enough to transform other types of substrates such as aliphatic alcohols, so the use of laccase-mediator systems (LMS) is necessary to allow their oxidation.^{8a,11} Many synthetic compounds are commonly employed in these systems, such as TEMPO, HOBt or ABTS, but also some natural compounds obtained from lignin can be used. Among them, vanillin (**3a**, Fig. 1), syringaldehyde (**3b**, Fig. 1) and their derivatives are some of the most common lignin-derived monomers that have been extensively employed in different ways, for example as natural LMS.^{9a,12} In fact, laccases have proven to accept a large number of lignin-

derived monomers due to the presence of a phenolic function within their structure,¹³ but still the product formation was not studied in many of those cases.

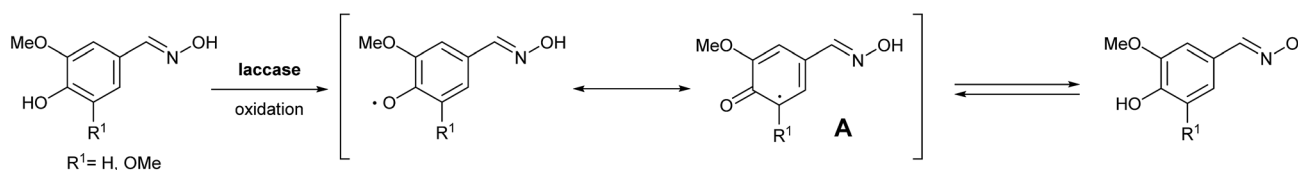
Herein, we aim to combine the use of compounds derived from renewable resources (*e.g.* lignocellulose) and the benefits that biocatalysis offers due to the capability of enzymes to selectively work under environmentally friendly conditions. Thus, we firstly report the chemical modification of vanillin and syringaldehyde towards the synthesis of nitrogenated derivatives whose broad structure is depicted in Fig. 1 (right). Later these compounds will be tested as suitable substrates in laccase-catalyzed processes. Overall, the synthetic strategies will provide novel systems that will be applied in the oxidation of lignin model compounds, which is the underlying purpose of the present research.

Results and discussion

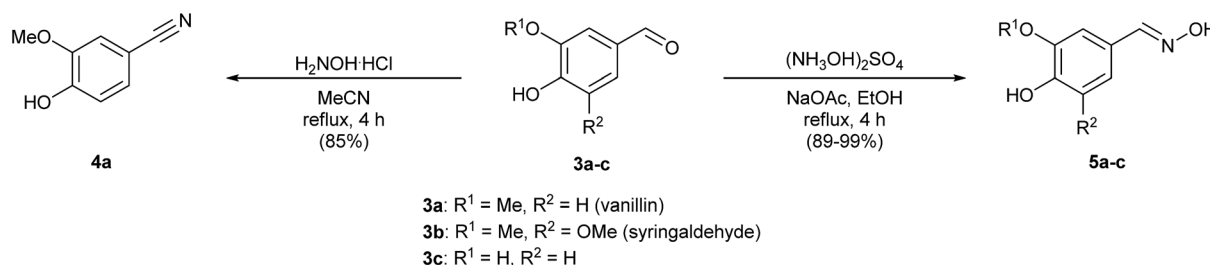
Chemical modification of natural LMS

Vanillin (**3a**) and syringaldehyde (**3b**) were selected as starting materials for further modifications due to the presence of these compounds in high quantities when degrading lignin. As both substrates have a similar structure but a different number of methoxy groups in the aromatic ring, the choice of these two lignin-type monomers will allow us to compare their capacities in LMS. Moreover, anticipating the importance of both the methoxy and the hydroxyl groups in the substrate–laccase interaction, and in order to complete the study, we decided to include also 3,4-dihydroxybenzaldehyde (**3c**), which was synthesized starting from vanillin *via* demethylation in 85% yield as described in the literature (Scheme S1, see the ESI†).¹⁴

In the interest of practical designs for the potential mediators, we focused on simple and easy synthetic procedures. Moreover, the rationale for the synthesis of the proposed compounds is based on the possibility of stabilizing the oxidized radical intermediates by aromatic systems *via* electron



Scheme 1 An oxime derivative presenting an increasing number of reacting points.



Scheme 2 Synthesis of 4-hydroxy-3-methoxybenzonitrile (**4a**) and oximes **5a–c**.



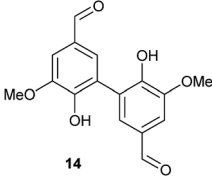
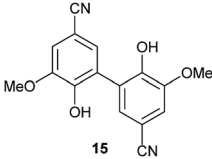
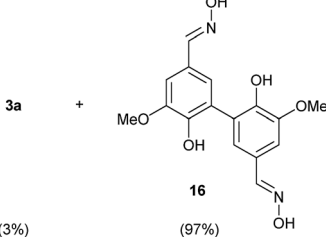
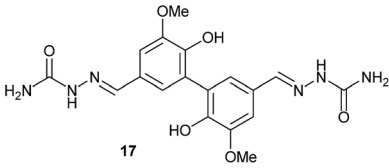
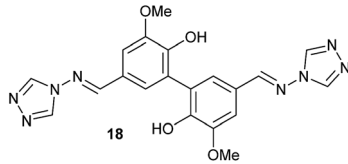
Table 1 Synthesis of new nitrogenated compounds derived from vanillin and syringaldehyde

Entry	Substrate	Reactant	Product	Acid	<i>t</i> (h)	Yield ^a (%)
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 10px;"> a: R¹ = Me, R² = H (vanillin) b: R¹ = Me, R² = OMe (syringaldehyde) c: R¹ = H, R² = H </div> <div style="text-align: center; margin-bottom: 10px;"> </div>						
1	3a	N ₂ H ₄ · H ₂ O (10)		AcOH	0.83	90 (6a)
2	3b	N ₂ H ₄ · H ₂ O (10)		AcOH	0.83	80 (6b)
3	3c	N ₂ H ₄ · H ₂ O (10)		AcOH	1	78 (6c)
4	3a	 (11)		AcOH	1.5	98 (7a)
5	3b	 (11)		AcOH	2	89 (7b)
6	3c	 (11)		AcOH	2.7	73 (7c)
7	3a	 (12)		H ₂ SO ₄ conc.	3	99 (8a)
8	3b	 (12)		H ₂ SO ₄ conc.	7.5	99 (8b)
9	3c	 (12)		H ₂ SO ₄ conc.	6.5	96 (8c)
10	3a	 (13)		HCl conc.	4.5	94 (9a)
11	3b	 (13)		HCl conc.	5	97 (9b)
12	3c	 (13)		HCl conc.	1.75	80 (9c)

^a Yield obtained after isolation of the products by solvent evaporation (for 6a–c and 7a–c) or product filtration (for 8a–c and 9a–c).



Table 2 Laccase-catalyzed oxidation of the new synthesized vanillin-derived compounds^a

Entry	Substrate, concentration	Cosolvent	Enzyme	Laccase		Product	<i>c</i> ^b (%)
				acetate buffer 100 mM pH 4.7			
1	3a, 20 mM	EtOH	LTV	2	30		94
2	3a, 20 mM	—	Novozym 51003	2	50		93
3	4a, 10 mM	—	LTV	2	30		>99
4	4a, 10 mM	—	Novozym 51003	2	50		>99
5	5a, 50 mM	EtOH	LTV	16	30		>99
6	5a, 50 mM	EtOH	Novozym 51003	16	50		>99
7	6a, 50 mM	DMSO	LTV	16	30	3a ^c	51
8	6a, 50 mM	DMSO	Novozym 51003	16	50	3a ^c	69
9	7a, 20 mM	—	LTV	16	30		72
10	7a, 20 mM	—	Novozym 51003	2	50	17 + polymerization	25
11	8a, 20 mM	EtOH	LTV	2	30		93
12	8a, 20 mM	EtOH	Novozym 51003	2	50		95
13	9a, 10 mM	EtOH	LTV	2	30	3a ^d	69
14	9a, 10 mM	EtOH	Novozym 51003	2	50	3a ^d	97

^a Reaction conditions: substrate 3–9a, cosolvent (10% v/v), acetate buffer pH 4.7 (total volume: 3 mL) saturated with O₂, laccase from *Trametes versicolor* (LTV, 25 U) or Novozym 51003 (31.4 U). ^b Conversion values were measured by ¹H-NMR analysis of the reaction crudes. ^c Vanillin and a mixture of dimeric species were obtained. ^d Vanillin and a mixture of unidentified products were attained.

delocalization or by increasing the number of additional reactive points as in the case of an oxime derivative (Scheme 1), resembling in this particular case *N*-oxyl oxidants such as TEMPO.

In a first set of experiments, we evaluated the use of hydroxyl ammonium reagents to introduce both oxime and nitrile functions. Thus, oximes 5a–c were prepared in good to excellent yields following a described methodology¹⁵ in the presence of

hydroxylammonium sulfate and sodium acetate in ethanol (Scheme 2). By varying the solvent to acetonitrile and using hydroxylamine hydrochloride, dehydration of the aldoxime intermediate took place yielding the nitrile derivative 4a from 3a after 4 h.

On the other hand, a panel of nitrogenated substituents was introduced through the aldehyde function by tuning the



strength of the acid catalyst and adjusting the reaction time (Table 1).

Firstly, the reaction between hydrazine monohydrate (**10**) and **3a** was performed under acidic conditions, observing full disappearance of the starting material by TLC analysis after 50 min. Hydrazone **6a** was isolated in 90% yield after removing the solvent by distillation (entry 1). The procedure was extended to the dimethoxylated and dihydroxylated substrates **3b** and **3c**, leading to **6b** and **6c** also in good yields (entries 2 and 3). The reaction time was increased in the synthesis of semicarbazones **7a–c** in the presence of semicarbazide hydrochloride (**11**), obtaining the desired products in good to excellent yields after solvent evaporation (entries 4–6).

To prepare the triazole derivatives **8a–c**, longer reaction times and harsher acidic conditions were needed, so concentrated H₂SO₄ was employed as catalyst.¹⁶ The reaction between **3b** and **3c** with 4*H*-1,2,4-triazol-4-amine (**12**) was completed after 7.5 and 6.5 h, respectively (entries 8 and 9), while starting from **3a** only 3 h were necessary (entry 7), recovering **8a–c** with excellent yields. Concentrated HCl was used in the reactions with tetrazole **13**, obtaining **9a–c** in 80–97% yield (entries 10–12). In these cases, the isolation was performed by filtration from the reaction crude, since both families of poly-nitrogenated compounds **8a–c** and **9a–c** were insoluble in the reaction medium. In the latter reactions, it was necessary to synthesize the reagent **13** through a two-step process (see Experimental section), as it was not commercially available.

Laccase-catalyzed oxidation reactions of the synthesized derivatives

To develop an efficient LMS with these compounds, first we investigated if they could react with laccases. For this, we chose commercially available laccases from *Trametes versicolor* (LTV)¹⁷ and *Myceliophthora thermophila* (Novozym 51003),¹⁸ and the enzymatic experiments were conducted with the family of vanillin-modified derivatives, in order to illustrate the oxidative processes that could take place. This study would verify the validity of the new synthesized compounds as potential laccase mediators. Following previous described protocols with these biocatalysts, enzymatic reactions were carried out in acetate buffer at pH 4.7, varying the substrate concentration from 10 to 50 mM. Due to solubility issues, 10% (v/v) of EtOH or DMSO¹⁹ were added as water-miscible organic solvents in some cases. The control reactions in the absence of enzyme led to no conversion in all cases, proving the direct role of the laccase as the only catalyst.

When the laccases and the vanillin derivatives were mixed, three processes were mainly observed. In most cases the C–C dimerization reaction of species-type **A** (Scheme 1) was favored, but also the formation of vanillin (*via* hydrolysis) and the polymerization/oligomerization of these substrates were observed (Table 2). From now on, no distinction between polymerization and oligomerization will be made, since this was not the main goal of this research, so the polymeric structures were not analyzed such depth to make that differentiation. Firstly, the enzymatic experiments were conducted with the

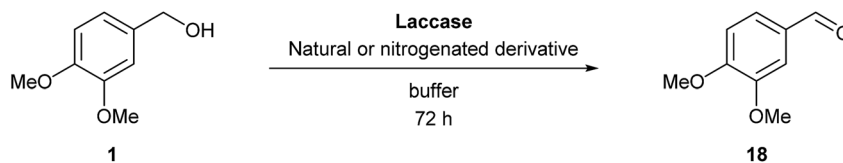
vanillin itself (**3a**), observing it was susceptible to dimerization in a very high extent (entries 1 and 2). Similarly, dimeric species **15–18** were isolated and properly characterized from the reaction crudes when starting from nitrile **4a**, oxime **5a**, semicarbazone **7a**, and triazole **8a** (entries 3–6, 9, 11 and 12). Particularly, **4a** reacted at 10 mM concentration, achieving a quantitative conversion with LTV and Novozym 51003 (entries 3 and 4). Oxime **5a** also led to full conversions at 50 mM (entries 5 and 6), observing with both biocatalysts the formation of a minimum amount of **3a** (3%) which was not detected in the absence of the enzyme. Semicarbazone **7a** was converted at 20 mM concentration in the presence of LTV conducting to dimer **17** (72% conversion, entry 9). However, the product formation differed in the case of Novozym 51003 (entry 10), in which the presence of a polymeric species, even at short reaction time, was detected due to the broad signals observed in the ¹H-NMR experiments. The generation of polymeric products in laccase-catalyzed reactions has already been reported in the literature for this type of lignin monomer.^{13b,20} Finally, dimer **18** was obtained as a precipitate from the reaction crude when starting from triazole **8a** (20 mM, entries 11 and 12) in almost full conversion with both enzymes. These results can be related with the stability of the radical species-type **A** (Scheme 1). If this intermediate is stable enough, the dimerization process will be favored. Nitrogenated electron-withdrawing groups enhanced the stability of this radical as the C–C dimerization reaction was prominent.

The hydrazone bond of **6a** was hydrolyzed during the enzymatic process, so vanillin was detected in significant amounts in the ¹H-NMR of the reaction crude (entries 7 and 8), a 4% of the hydrolysis product **3a** being also formed in the absence of enzyme. Moreover, after aldehyde formation also dimerization took place, so a mixture of starting material, **3a** and several dimeric species were detected in the reaction crude in a proportion varying depending on the biocatalyst used. Despite of the presence of unreacted hydrazone in the crude, it was noticed a fast reaction as the mixture acquired a dark purple color just after the addition of the enzyme. When the *N*-tetrazole substituted hydrazone derivative **9a** (10 mM) was submitted to oxidation, the hydrolysis of the C=N bond was also observed. Thus, a mixture of products was extracted from the reaction crude when LTV or Novozym 51003 were used, in which the starting material, vanillin and other unidentified products were already present at 2 h. Nevertheless, polymerization might also be occurring, as a significant loss of weight in the crude recovered by extraction was observed.

Since laccases are not expected to hydrolyze hydrazones, we evaluated if unspecific catalysis of this protein or other impurities that could be present in the commercial laccase preparation might be responsible of this transformation. So the LTV was denatured by a heat treatment (for details, see the ESI†). The conversion towards **3a** formation was just 4%, demonstrating the role of the biocatalytic system in the hydrolysis of **6a**. While it has been described the hydrolysis of hydrazones under oxidative conditions,²¹ there is only one precedent in the literature showing a similar behavior of LMS, the authors observing bio-deoximation processes in the presence of TEMPO



Table 3 Selected results in the laccase-catalyzed veratryl alcohol oxidation in the presence of different natural or nitrogenated lignin-derived compounds^a



Entry	Compound	Laccase	T (°C)	pH	Conversion ^b (%)
1	3a	LTv	30	5	4
2	3b	LTv	30	6	6
3	3a	Novozym 51003	50	6	6
4	3b	Novozym 51003	50	6	7
5	4a	LTv	30	4.7	3
6	4a	Novozym 51003	50	6	6
7	5a	LTv	30	6	37
8	5b	LTv	30	4.7	11
9	5c	LTv	30	5	70
10	5a	Novozym 51003	50	6	34
11	5b	Novozym 51003	50	7	35
12	5c	Novozym 51003	50	6	21
13	6a	LTv	30	5	39
14	6b	LTv	30	5	<1
15	6c	LTv	30	5.5	8
16	6a	Novozym 51003	50	6	54
17	6b	Novozym 51003	50	6	3
18	6c	Novozym 51003	50	5	10
19	7a	LTv	30	6	14
20	7b	LTv	30	4.7	23
21	7c	LTv	30	4.7	8
22	7a	Novozym 51003	50	6	16
23	7b	Novozym 51003	50	7	23
24	7c	Novozym 51003	50	5	5
25	8a	LTv	30	4.7	8
26	8b	LTv	30	4.7	5
27	8c	LTv	30	4.7	4
28	8a	Novozym 51003	50	6	9
29	8b	Novozym 51003	50	6	16
30	8c	Novozym 51003	50	6	2
31	9a	LTv	30	6	39
32	9b	LTv	30	5	36
33	9c	LTv	30	5	11
34	9a	Novozym 51003	50	6	24
35	9b	Novozym 51003	50	6	32
36	9c	Novozym 51003	50	6	3

^a Reaction conditions: natural or nitrogenated derivative (16 μmol), buffer (2 mL), veratryl alcohol (0.9 μL, 6 μmol), laccase from *Trametes versicolor* (LTv, 25 U, 30 °C) or Novozym 51003 (31.4 U, 50 °C), 72 h. Buffers used: acetate buffer 100 mM pH 4.7; citrate buffer 50 mM pH 5; citrate buffer 50 mM pH 5.5; citrate buffer 50 mM pH 6; phosphate buffer 100 mM pH 7. ^b Conversion values were measured by GC analysis of the reaction crudes.

as mediator.^{11a} In our experiments, we assume that the laccase is able to catalyze the synthesis of unstable radical intermediates which can undergo hydrolysis releasing vanillin.

New LMS applied to the oxidation of lignin-model compounds

After checking that these compounds were suitable substrates for the studied laccases, they were tested as potential mediators to oxidize two different lignin model compounds. The syringyl and 3,4-dihydroxybenzaldehyde families were also included in this study. Thus, veratryl alcohol (**1**) and adlerol (**2**) were

employed as representative monomeric and dimeric structures of lignin units,²² respectively, the alcohol moiety being in both cases at benzylic position (Fig. 1). Control experiments in the absence of laccase and/or nitrogenated compound revealed that both must be present for an efficient catalysis.

Beginning with the veratryl alcohol oxidation, we selected 3 mM as starting substrate concentration according to some reports found in the literature,^{22d} evaluating both commercial laccases. A deep optimization was performed in order to determine the best reaction conditions, including the reaction



medium, temperature, amount of catalyst and concentration of the nitrogenated derivative, and the use of different cosolvents (see Tables S1–S18 in the ESI†). Among them, the pH was identified as key parameter, and depending on the phenolic compound employed, the optimum value varied. Similarly, changes in the amount of the co-oxidant implied important variations in the conversion degree, detecting the higher values at 8 mM concentration. The first experiments were stopped at 48 h but, after observing that the laccase was still active, the reactions were followed until 72 h. The best results were obtained in the acidic pH range of 4.7–7, as described for these laccases,^{17,18} and are summarized in Table 3. LTV works better under acidic conditions while Novozym 51003 accepts higher pHs.

The process was also carried out in the presence of vanillin and syringaldehyde (entries 1–4), to compare the behavior of these natural derivatives with the chemically modified ones, finding an improvement in the conversion values for several of the newly nitrogenated synthesized compounds. Still some of them displayed very low activity even at these long reaction times, as was the case of the nitrile derivative **4a**, which led to less than 10% conversion with both enzymes LTV and Novozym 51003 (entries 5 and 6). On the contrary, oximes **5a–c** exhibited remarkable activities, **5c** providing with LTV the highest value of all derivatives tested with 70% conversion (entry 9). The reaction exceeded 30% conversion when employing vanillin and

syringyl oximes **5a** and **5b**, the process being promoted to 37% conversion at pH 6 with **5a** and LTV, and 34% when Novozym 51003 was employed under the same pH conditions at 50 °C (entries 7 and 10). In an attempt to increase those values, the use of different cosolvents was tested but resulted ineffective (see Table S4 in the ESI†), and longer reaction times led to the disappearance of the product signal in the GC chromatogram. We hypothesized that the product was degraded, partially to form the veratryl acid, which was identified in the reaction analysis.

The presence of an additional methoxy group in oxime **5b** did not affect significantly the performance of Novozym 51003, obtaining a conversion of 35% at pH 7 (entry 11), while the reaction was disfavored with LTV (entry 8), especially at higher pHs (see Table S9 in the ESI†).

When the vanillin hydrazone **6a** was studied, good values of conversion were observed (entries 13 and 16), obtaining 54% in combination with Novozym 51003 at pH 6 (entry 16). On the opposite, **6b** led to low or null conversions with both enzymes (entries 14 and 17). The results were slightly better but still poor with the dihydroxylated derivative **6c** (entries 15 and 18), not improving in the presence of an organic cosolvent (see Table S15 in the ESI†). Conversely to the hydrazones, the semi-carbazone derived from syringaldehyde **7b** (entries 20 and 23) showed higher activities than the corresponding analogue from vanillin **7a** (entries 19 and 22). As for the hydrazone family, the

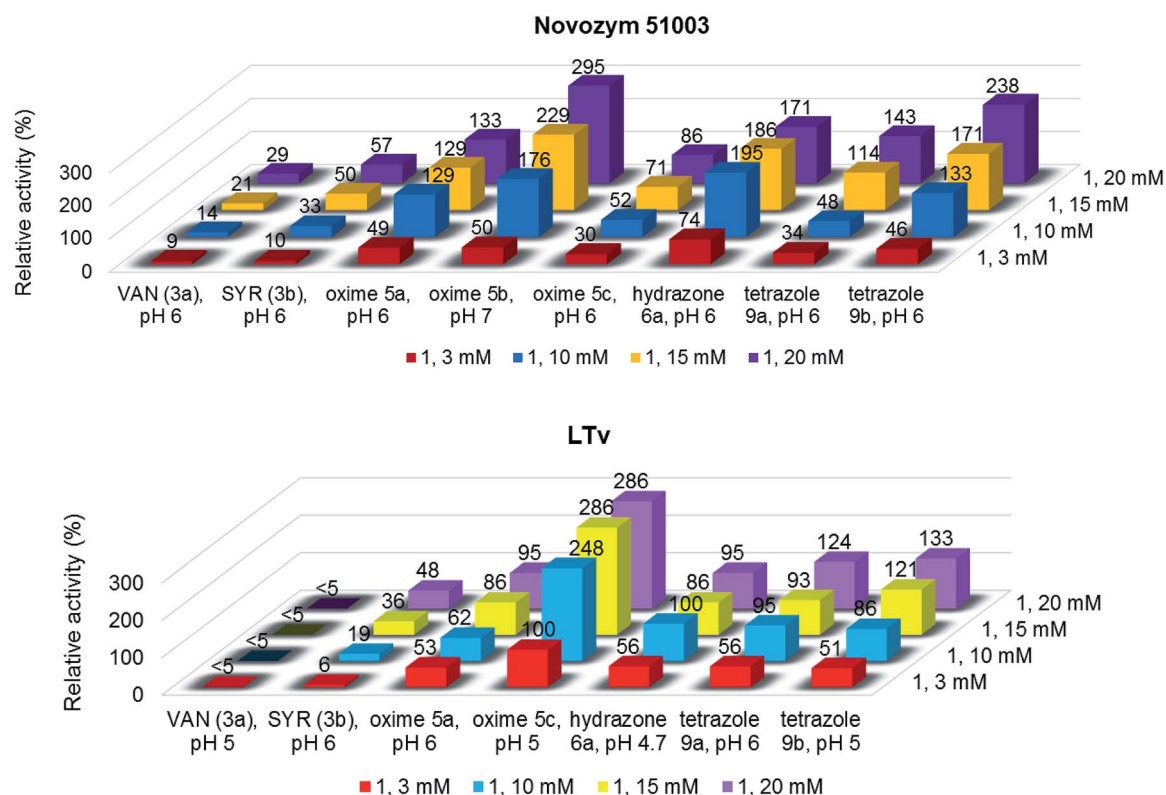


Fig. 2 Relative activity representing micromoles of alcohol **1** converted into aldehyde **18** at different substrate concentrations, using the new synthesized compounds as co-oxidants, and Novozym 51003 (up) or LTV (down) as biocatalyst. 100% relative activity corresponds to 0.42 μmol **18** per μL mg^{-1} of enzyme (entry 9, Table 3). Reactions with relative activities higher than 200% were performed by duplicate, showing similar results.



dihydroxylated semicarbazone **7c** displayed the lowest conversions (entries 21 and 24).

In general, the triazole family was poorly active, affording the dimethoxylated derivative **8b** the highest conversion value in the reaction with Novozym 51003 at pH 6 (entry 29). Interestingly, tetrazole derivatives **9a** and **9b** showed enhanced conversions (entries 31–32 and 34–35). As for the case of semicarbazones **7a–b** and triazoles **8a–b**, Novozym 51003 exhibited higher acceptance to the syringyl-derived substrate than to the corresponding vanillin-derived one (entries 34 and 35), behaving positively the additional methoxy group. On the contrary, when the reaction was carried out in the presence of the dihydroxylated derivative **9c**, the conversions decayed significantly, especially for Novozym 51003 acting as catalyst (entry 36).

As the next step, we decided to increase the veratryl alcohol concentration for those cases where higher conversions were found. This would allow us to study the effect of this parameter in the reaction outcome and also to obtain a higher productivity of the aldehyde **18** in the process. Remarkably, at 10 mM substrate concentration, conversions suffered just a slight decrease in some cases, maintaining the previous values in

other cases, resulting in an enhancement of the relative activity for all derivatives tested (Fig. 2).

Noteworthy, it was possible to rise the substrate concentration until 15 mM and 20 mM, maintaining good levels of catalytic activity and, therefore, improving the productivities. For instance, relative activity values of 186–295% were found with oxime **5b**, hydrazone **6a** and tetrazole **9b** within the Novozym 51003-catalyzed reactions (Fig. 2, top). In general, LTV showed less alcohol concentration tolerance, but even so oxime **5c** displayed an excellent activity in the presence of this enzyme (286%, Fig. 2, bottom).

Finally, the methodology was extended to the oxidation of the benzylic position of the dimeric lignin model compound adlerol **2** using the derivatives that displayed the higher activities with the laccases for the oxidation of **1** (Fig. 3). The reaction conditions were taken in analogy to the previously shown for veratryl alcohol.

Despite the conversions were lower than for the case of **1**, significant improvements were accomplished with some derivatives, obtaining the best results (22% conversion) for the combination of oxime **5b** with Novozym 51003, which is a remarkable value when considering the examples reported in the literature using vanillin or syringyl-type natural mediators in this kind of process.²² In order to verify the improvement over the natural compounds, **3a** and **3b** were tested, observing no formation of hydroxy ketone **19**.

Oxime **5c** showed significant conversions in the LTV-catalyzed process, as well as tetrazoles **9b** and **9c** (Fig. 3b). On the contrary, the use of Novozym 51003 as catalyst resulted in high conversion values with derivatives **6a**, **9a** and **9b** (Fig. 3a). We figure out that the lower conversion values may be caused by a fast reaction of the phenolic compound with the laccase, leading to the formation of inactive species and disabling the oxidative capacity in the adlerol transformation. As a final remark, it must be mentioned that coupling between the synthesized nitrogenated derivatives and the substrates (veratryl alcohol and adlerol) was never observed.

Conclusions

The chemical modification of some lignin-type monomers such as vanillin and syringaldehyde has been carried out through simple methodologies toward the synthesis of several families of nitrogenated compounds. These derivatives were envisaged as suitable candidates for LMS due to the stabilization of the phenoxy radicals formed. Their combination with two commercially available laccases, the one from *Trametes versicolor* and the one from *Myceliophthora thermophila*, allowed their dimerization or oligomerization, showing that they could act as substrates for laccases.

The application of these compounds in oxidative processes of lignin model units in laccase-mediator systems has been investigated employing these commercial laccases, showing much better conversions than the natural compounds vanillin and syringaldehyde. Remarkably, both the substitution pattern of the aromatic ring and the pH have shown a dramatic influence in the reactivity behavior, conducting to higher

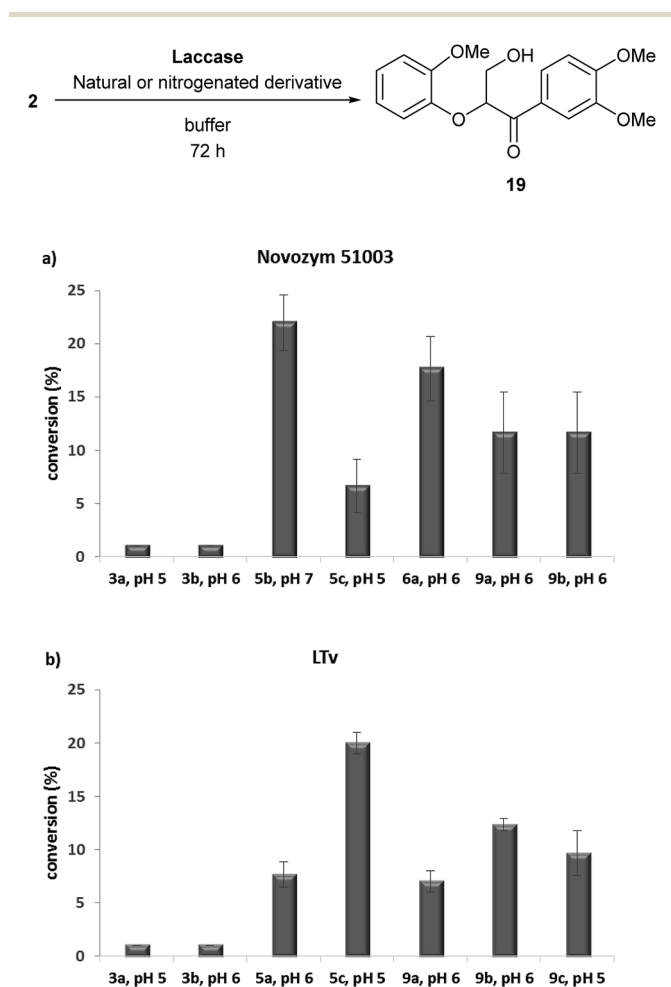


Fig. 3 Oxidation of adlerol (**2**) using natural or nitrogenated lignin-derived compounds with: (a) Novozym 51003; or (b) LTV. All the experiments were performed by triplicate.



conversions according to the presence of additional methoxy and/or hydroxyl groups. On the one hand, veratryl alcohol was transformed into veratraldehyde in high conversions at 3 mM, and the increase in the substrate concentration up to 20 mM led to higher relative activity values (up to 295%). On the other hand, lower conversions were obtained in the oxidation of the lignin model dimer adlerol, but these results are a good starting point for future studies in the enzymatic modification of lignin surfaces.

Experimental section

General methods

Chemical reagents employed in the synthesis of starting and reference materials were purchased from Sigma-Aldrich. Solvents for chemical reactions were used without further treatment.

Laccase from *Trametes versicolor* (2.5 U mg⁻¹) was purchased from Sigma, while the laccase from *Myceliophthora thermophila* (Novozym 51003, 3.14 U μL⁻¹) was acquired from Novozymes. Enzymatic activities were measured using the ABTS assay.²³

Thin-layer chromatography (TLC) was conducted using Merck Silica Gel 60 F254 precoated plates and visualized with UV and potassium permanganate stain. Column chromatographies were performed using silica gel 60 (230–400 mesh). ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and DEPT experiments were registered using different Bruker spectrometers (¹H, 300.13 MHz and ¹³C, 75.5 MHz). The chemical shifts (δ) are given in ppm and the coupling constants (J) in Hertz (Hz). High resolution mass spectra (HRMS) experiments were carried out by ESI⁺ or ESI⁻ using an Impact II ESI-Q-ToF spectrometer.

Synthesis of 4-hydroxy-3-methoxybenzonitrile (4a)²⁴

Hydroxylamine hydrochloride (82 mg, 1.18 mmol) was added to a solution of vanillin (3a, 150 mg, 0.986 mmol) in acetonitrile (1 mL) and the mixture was stirred under reflux for 4 h. After cooling the mixture at room temperature, H₂O was added and the reaction was extracted with Et₂O (3 × 10 mL). The organic layers were combined, washed with an aqueous saturated NaHCO₃ solution (15 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed by distillation under reduced pressure and the reaction crude was purified by column chromatography on silica gel (eluent: 30% EtOAc/hexane) yielding the nitrile derivative 4a in 85% isolated yield. White solid. *R*_f (50% EtOAc/hexane): 0.80. Mp: 86–88 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, MeOD-*d*₄): δ 3.87 (s, 3H), 4.91 (br s, 1H), 6.87 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 7.18 (dd, ³*J*_{HH} = 8.1, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, 1H), 7.21 (d, ³*J*_{HH} = 1.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ 56.6 (CH₃), 103.1 (C), 115.7 (CH), 117.0 (CH), 120.5 (C), 127.7 (CH), 149.3 (C), 152.7 (C). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₈H₈NO₂)⁺ (M + H)⁺ 150.0550, found: 150.0548.

General procedure for the synthesis of oximes 5a–c

Hydroxylamine sulfate (650 mg, 3.95 mmol) and sodium acetate (447 mg, 3.29 mmol) were successively added to a solution of 3a–c (3.29 mmol) in ethanol (3.3 mL). The mixture was stirred

under reflux for 4 h, cooled at room temperature, resuspended in CH₂Cl₂ (10 mL), filtered and washed with CH₂Cl₂ (2 × 2 mL). The solvent of the filtrate was evaporated under reduced pressure obtaining pure oxime 5a. Oxime 5b was submitted to column chromatography (eluent: 30% EtOAc/hexane) for further purification.

For the isolation of oxime 5c, the solvents were evaporated and the residue was redissolved in H₂O. The mixture was extracted with EtOAc (3 × 5 mL), the organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*, affording pure 5c.

4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde oxime (5a).¹⁵ Light brown solid (550 mg, >99% yield). *R*_f (50% EtOAc/hexane): 0.67. Mp: 110–112 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, MeOD-*d*₄): δ 3.83 (s, 3H), 6.79 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 6.95 (dd, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.7 Hz, 1H), 7.23 (d, ⁴*J*_{HH} = 1.7 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ 56.2 (CH₃), 109.6 (CH), 116.0 (CH), 122.4 (CH), 126.0 (C), 149.1 (C), 149.3 (C), 150.6 (CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₈H₁₀NO₃)⁺ (M + H)⁺ 168.0655, found: 168.0656.

4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde oxime (5b). Light brown solid (590 mg, 91% yield). *R*_f (50% EtOAc/hexane): 0.46. Mp: 126–128 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, MeOD-*d*₄): δ 3.82 (s, 6H), 6.87 (s, 2H), 7.99 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ 56.6 (2CH₃), 105.1 (2CH), 124.9 (C), 138.2 (C), 149.2 (2C), 150.7 (CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₉H₁₁NNaO₄)⁺ (M + Na)⁺ 220.0580, found: 220.0582.

3,4-Dihydroxybenzaldehyde oxime (5c). Light brown solid (448 mg, 89% yield). *R*_f (50% EtOAc/hexane): 0.42. Mp: decomposes at 160–162 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.72 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 6.81 (dd, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, ⁴*J*_{HH} = 2.0 Hz, 1H), 7.04 (d, ⁴*J*_{HH} = 2.0 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 9.18 (br s, 2H), 10.79 (br s 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 112.6 (CH), 115.5 (CH), 119.3 (CH), 124.5 (C), 145.5 (C), 146.9 (C), 148.2 (CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₇H₈NO₃)⁺ (M + H)⁺ 154.0499, found: 154.0498.

General procedure for the synthesis of hydrazones 6a–c

Hydrazine monohydrate (10, 207 μL, 6.57 mmol) and glacial acetic acid (10 drops) were successively added to a solution of 3a–c (6.57 mmol) in ethanol (10 mL). The mixture was stirred under reflux for 50 min or 1 h (see Table 1), and the solvent was removed by distillation under reduced pressure isolating 6a–c in 78–90% yield.

4-(Hydrazonomethyl)-2-methoxyphenol (6a). Yellow solid (983 mg, 90% yield). *R*_f (50% EtOAc/hexane): 0.55. Mp: 177–179 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, MeOD-*d*₄): δ 3.93 (s, 3H), 6.88 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 7.24 (dd, ³*J*_{HH} = 8.3, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, 1H), 7.52 (d, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ 56.4 (CH₃), 110.8 (CH), 116.3 (CH), 125.3 (CH), 127.2 (C), 149.5 (C), 151.4 (C), 162.7 (CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₈H₁₁N₂O₂)⁺ (M + H)⁺ 167.0815, found: 167.0810.

4-(Hydrazonomethyl)-2,6-dimethoxyphenol (6b). Light yellow solid (1.03 g, 80% yield). *R*_f (50% EtOAc/hexane): 0.24. Mp: 212–214 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.82 (s, 6H), 7.16 (s, 2H), 8.59 (s, 1H), 9.08 (br s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 56.0 (2CH₃), 105.8 (2CH), 124.3 (C), 139.9 (C), 148.1



(2C), 162.9 (CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₉H₁₃N₂O₃)⁺ (M + H)⁺ 197.0920, found: 197.0915.

4-((Hydrazonomethyl)benzene-1,2-diol (6c). Light orange solid (780 mg, 78% yield). *R_f* (50% EtOAc/hexane): 0.16. Mp: decomposes at 200 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.81 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 7.10 (dd, ³*J*_{HH} = 8.3, ⁴*J*_{HH} = 2.0 Hz, 1H), 7.32 (d, ⁴*J*_{HH} = 2.0, 1H), 8.45 (s, 1H), 9.42 (br s, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): 113.9 (CH), 115.6 (CH), 121.9 (CH), 125.6 (C), 145.7 (C), 148.9 (C), 160.5 (CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₇H₉N₂O₂)⁺ (M + H)⁺ 153.0659, found: 153.0658.

General procedure for the synthesis of semicarbazones 7a–c

Semicarbazide hydrochloride (**11**, 733 mg, 6.57 mmol) and glacial acetic acid (10 drops) were successively added to a solution of **3a–c** (6.57 mmol) in ethanol (10 mL). The mixture was stirred under reflux for 1.5–2.7 h (see Table 1) and the solvent was removed by distillation under reduced pressure, isolating semicarbazones **7a–c** in good to excellent yields (73–98%).

2-(4-Hydroxy-3-methoxybenzylidene)hydrazine-1-carboxamide (7a).²⁵ Yellow solid (1.3 g, 98% yield). *R_f* (5% MeOH/EtOAc): 0.51. Mp: 228–230 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.81 (s, 3H), 6.45 (br s, 2H), 6.75 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 6.96 (dd, ³*J*_{HH} = 8.1, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, 1H), 7.97 (d, ⁴*J*_{HH} = 1.9, 1H), 7.71 (s, 1H), 9.31 (br s, 1H), 10.03 (br s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 55.7 (CH₃), 109.0 (CH), 115.2 (CH), 121.1 (CH), 126.4 (C), 139.9 (CH), 147.9 (C), 148.0 (C), 157.0 (C). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₉H₁₂N₃O₃)⁺ (M + H)⁺ 210.0873, found: 210.0872.

2-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)hydrazine-1-carboxamide (7b). Light orange solid (1.4 g, 89% yield). *R_f* (5% MeOH/EtOAc): 0.42. Mp: 148–150 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.79 (s, 6H), 6.49 (br s, 2H), 6.97 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 8.65 (br s, 1H), 10.09 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 56.1 (2CH₃), 104.2 (2CH), 125.2 (C), 136.9 (C), 139.9 (CH), 148.1 (2C), 157.0 (C). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₁₀H₁₄N₃O₄)⁺ (M + H)⁺ 240.0979, found: 240.0975.

2-(3,4-Dihydroxybenzylidene)hydrazine-1-carboxamide (7c). Orange solid (936 mg, 73% yield). *R_f* (5% MeOH/EtOAc): 0.49. Mp: decomposes at 210 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.30 (br s, 2H), 6.72 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 6.92 (dd, ³*J*_{HH} = 8.1, ⁴*J*_{HH} = 2.0 Hz, 1H), 7.09 (d, ⁴*J*_{HH} = 2.0, 1H), 7.66 (s, 1H), 8.98 (br s, 1H), 9.31 (br s, 1H), 9.98 (s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 113.2 (CH), 115.5 (CH), 119.1 (CH), 126.3 (C), 140.2 (CH), 145.5 (C), 146.9 (C), 156.9 (C). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₈H₁₀N₃O₃)⁺ (M + H)⁺ 196.0717, found: 196.0709.

General procedure for the synthesis of triazoles 8a–c

4-Aminotriazole (**12**, 55 mg, 0.657 mmol) and an aqueous concentrated sulfuric acid solution (5 drops) were successively added to a solution of **3a–c** (0.657 mmol) in ethanol (2 mL). The mixture was stirred under reflux for 3–7.5 h (see Table 1) and the resulting precipitate was filtrated from the reaction media, yielding **8a–c** in 96–99% yield.

4-(((4*H*-1,2,4-Triazol-4-yl)imino)methyl)-2-methoxyphenol (8a).¹⁶ White solid (142 mg, 99% yield). *R_f* (5% MeOH/EtOAc): 0.40. Mp: 198–200 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.84 (s, 3H), 6.97 (d, ³*J*_{HH} = 8.2 Hz, 1H), 7.33 (dd, ³*J*_{HH} = 8.2, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, 1H), 7.44

(d, ⁴*J*_{HH} = 1.9, 1H), 8.03 (br s, 1H), 9.00 (s, 1H), 9.66 (s, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 55.7 (CH₃), 110.2 (CH), 115.9 (CH), 122.4 (C), 125.5 (CH), 139.4 (2CH), 148.3 (C), 152.1 (C), 162.5 (CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₁₀H₁₁N₄O₂)⁺ (M + H)⁺ 219.0877, found: 219.0878.

4-(((4*H*-1,2,4-Triazol-4-yl)imino)methyl)-2,6-dimethoxyphenol (8b). White solid (161 mg, 99% yield). *R_f* (10% MeOH/EtOAc): 0.25. Mp: decomposes at 160 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.84 (s, 6H), 6.44 (br s, 1H), 7.16 (s, 2H), 8.99 (s, 1H), 9.48 (s, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 56.1 (2CH₃), 106.3 (2CH), 121.6 (C), 139.1 (2CH), 140.6 (C), 148.2 (2C), 160.8 (CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₁₁H₁₃N₄O₃)⁺ (M + H)⁺ 249.0982, found: 249.0982.

4-(((4*H*-1,2,4-Triazol-4-yl)imino)methyl)benzene-1,2-diol (8c). White solid (129 mg, 96% yield). *R_f* (5% MeOH/EtOAc): 0.37. Mp: decomposes at 224–226 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.29 (br s, 2H), 6.89 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 7.16 (dd, ³*J*_{HH} = 8.2, ⁴*J*_{HH} = 2.0 Hz, 1H), 7.32 (d, ⁴*J*_{HH} = 2.0, 1H), 8.88 (s, 1H), 9.38 (s, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 114.1 (CH), 116.0 (CH), 122.9 (C), 123.4 (CH), 139.2 (2CH), 146.1 (C), 150.8 (C), 161.0 (CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₉H₉N₄O₂)⁺ (M + H)⁺ 205.0720, found: 205.0721.

General procedure for the synthesis of hydrazono tetrazoles 9a–c

5-Hydrazinyl-1*H*-tetrazole (**13**, 227 mg, 2.27 mmol) and an aqueous concentrated HCl solution (5 drops) were successively added to a solution of **3a–c** (2.27 mmol) in ethanol (4 mL). The mixture was stirred under reflux for 1.75–5 h (see Table 1) and the resulting precipitate was filtrated from the reaction media, yielding the corresponding tetrazoles **9a–c** in 80–97% yield.

4-(((2-(1*H*-Tetrazol-5-yl)hydrazono)methyl)-2-methoxyphenol (9a). White solid (500 mg, 94% yield). *R_f* (10% MeOH/EtOAc): 0.72. Mp: 197–198 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.84 (s, 3H), 6.75 (br s, 2H), overlapped with 6.81 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H) and 7.04 (dd, ³*J*_{HH} = 8.1, ⁴*J*_{HH} = 1.9 Hz, 1H), 7.48 (d, ⁴*J*_{HH} = 1.9, 1H), 7.93 (s, 1H), 11.61 (br s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 55.9 (CH₃), 109.2 (CH), 115.4 (CH), 121.6 (CH), 125.9 (C), 143.8 (CH), 148.2 (C), 148.5 (C), 156.6 (C). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₉H₁₁N₆O₂)⁺ (M + H)⁺ 235.0938, found: 235.0936.

4-(((2-(1*H*-Tetrazol-5-yl)hydrazono)methyl)-2,6-dimethoxyphenol (9b). White solid (582 mg, 97% yield). *R_f* (10% MeOH/EtOAc): 0.66. Mp: decomposes at 197–199 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.82 (s, 6H), 7.07 (s, 2H), 7.93 (s, 1H), 8.09 (br s, 2H), 11.71 (br s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 56.2 (2CH₃), 104.5 (2CH), 124.8 (C), 137.3 (C), 143.7 (CH), 148.2 (2C), 156.5 (C). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₁₀H₁₃N₆O₃)⁺ (M + H)⁺ 265.1044, found: 265.1038.

4-(((2-(1*H*-Tetrazol-5-yl)hydrazono)methyl)benzene-1,2-diol (9c). White solid (400 mg, 80% yield). *R_f* (10% MeOH/EtOAc): 0.70. Mp: decomposes at 250 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.77 (d, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 6.99 (dd, ³*J*_{HH} = 8.1, ⁴*J*_{HH} = 2.0 Hz, 1H), 7.20 (d, ⁴*J*_{HH} = 2.0, 1H), 7.86 (s, 1H), 8.99 (br s, 1H), 9.44 (br s, 1H), 11.45 (s, 1H), 15.23 (br s, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 113.5 (CH), 115.5 (CH), 119.6 (CH), 125.9 (C), 144.1 (CH), 145.6 (C), 147.4 (C), 156.5 (C). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₈H₉N₆O₂)⁺ (M + H)⁺ 221.0781, found: 221.0783.



Synthesis of 5-hydrazinyl-1H-tetrazole 13

5-Aminotetrazole monohydrate (5 g, 48.51 mmol) was dissolved in a 15% aqueous NaOH solution (50 mL). The mixture was heated at 100 °C and KMnO₄ (7 g) was slowly added by portions until the colour of the solution no longer changed. After stirring 30 min, ethanol was added to eliminate the excess of KMnO₄. The warm solution was filtered and concentrated under reduced pressure to 1/3 of the initial volume. Sodium 5,5'-azotetrazolate was crystallized as a yellow solid (6.2 g, 61% yield).

To a suspension of sodium 5,5'-azotetrazolate (6.2 g, 29.51 mmol) in water (62 mL), an aqueous HCl 6 N solution (13 mL) was added. The mixture was warmed until the gas evolution finished, then evaporated to dryness from water three times to ensure the removal of HCl. The residue was dissolved in the minimum volume of hot water and a hot solution of NaOAc (6.2 g, 75.58 mmol) in water (6.2 mL) was added. The apparatus was flushed out with carbon dioxide and the solution was allowed to cool to give 5-hydrazinyl-1H-tetrazole (13) as a white solid (987 mg, 20% yield). Mp: 192–194 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.17 (s, 4H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.4 (C).

General procedure for the laccase-catalyzed oxidation of the new synthesized compounds

In a test tube, the corresponding derivative was dissolved in an organic cosolvent (EtOH or DMSO, 300 μL). Then, the corresponding buffer saturated with O₂ prior to the experiment (2.7 mL) and the commercial laccases from *Trametes versicolor* (25 U) or the laccase from *Myceliophthora thermophila* (Novozym 51003, 31.4 U), were successively added. A balloon that was filled with oxygen was attached to the test tube and the mixture was stirred at 30 °C or 50 °C for the time shown in Table 2. Then, the reaction was finished by extraction with EtOAc (3 × 2 mL), and the organic layers were combined and dried with Na₂SO₄. After solvent evaporation under reduced pressure, the reaction crude was analyzed by ¹H-NMR. In those cases in which an abundant precipitate was detected in the reaction medium, this was separated by decantation and analyzed by ¹H-NMR.

6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-dicarbaldehyde (14).²⁶ Brown solid. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.92 (s, 6H), 7.41 (d, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, 2H), 7.44 (d, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, 2H), 9.80 (s, 2H), 10.11 (br s, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 56.0 (2CH₃), 108.9 (2CH), 124.9 (2C), 127.4 (2C), 128.3 (2CH), 148.4 (2C), 151.3 (2C), 191.1 (2CH). HRMS (ESI⁻, *m/z*): calcd for (C₁₆H₁₃O₆)⁻ (M - H)⁻ 301.0718, found: 301.0706.

6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-dicarbonitrile (15).²⁷ White solid. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.89 (s, 6H), 7.23 (d, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, 2H), 7.41 (d, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, 2H), 9.85 (br s, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 56.4 (2CH₃), 100.3 (2C), 114.1 (2CH), 119.5 (2C), 124.6 (2C), 128.1 (2CH), 147.9 (2C), 148.9 (2C). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₁₆H₁₃N₂O₄)⁺ (M + H)⁺ 297.0870, found: 297.0870.

6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-dicarbaldehyde dioxime (16).²⁸ Light brown solid. ¹H NMR (300.13 MHz, MeOD-*d*₄): δ 3.92 (s, 6H), 6.99 (d, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, 2H), 7.27 (d, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, 2H), 8.01 (s, 2H). ¹³C NMR (75.5 MHz, MeOD-*d*₄):

δ 56.5 (2CH₃), 108.4 (2CH), 124.9 (2CH), 125.4 (2C), 126.3 (2C), 146.7 (2C), 149.5 (2C), 150.6 (2CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₁₆H₁₇N₂O₆)⁺ (M + H)⁺ 333.1081, found: 333.1086.

2,2'-((6,6'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)-bis(methanylylidene))bis(hydrazine-1-carboxamide) (17).²⁹ Dark brown solid. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.89 (s, 6H), 6.47 (br s, 4H), 6.96 (s, 2H), 7.39 (s, 2H), 7.75 (s, 2H), 8.76 (br s, 2H), 10.04 (s, 2H). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₁₈H₂₀N₆NaO₆)⁺ (M + Na)⁺ 439.1337, found: 439.1339.

5,5'-Bis((E)-((4H-1,2,4-triazol-4-yl)imino)methyl)-3,3'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (18). White solid. ¹H NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.88 (s, 6H), 7.33 (d, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, 2H), 7.39 (d, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, 2H), 8.94 (s, 2H), 9.08 (s, 4H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 55.9 (2CH₃), 108.1 (2CH), 115.6 (2C), 121.5 (2C), 125.6 (2C), 126.4 (2CH), 138.9 (4CH), 148.8 (2C), 158.4 (2CH). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calcd for (C₂₀H₁₉N₈O₄)⁺ (M + H)⁺ 435.1524, found: 435.1527.

General procedure for the laccase-catalyzed oxidation of lignin model compounds in the presence of natural or nitrogenated compounds

The corresponding derivative (16 μmol) was placed in a test tube. The buffer (2 mL) saturated with O₂ prior to the experiment (pH 4.7: acetate buffer 100 mM; pH 5–6: citric buffer 50 mM; pH 7: KPi buffer 100 mM) and the veratryl alcohol (1, 6 μmol) or adlerol (2, 6 μmol) were added. After stirring, the commercial laccases from *Trametes versicolor* (25 U) or the laccase from *Myceliophthora thermophila* (Novozym 51003, 31.4 U), were added and the reaction stirred at 30 or 50 °C, respectively, during 72 h. Then, the reaction was acidified with an aqueous HCl 2 N solution (4 drops) and extracted with EtOAc (2 × 1 mL). The organic layers were combined and dried with Na₂SO₄. For the oxidations of veratryl alcohol, an aliquot was taken and analyzed by GC. In the case of the oxidation of adlerol, the solvent of the organic layers was evaporated and the reaction crudes were analyzed by ¹H-NMR. Thus, the conversions were calculated.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Union (Project OXY-POL, PCIN-2014-134 from an ERA-NET ERA-IB 2 Call).

Notes and references

- (a) O. Y. Abdelaziz, D. P. Brink, J. Prothmann, K. Ravi, M. Sun, J. García-Hidalgo, M. Sandahl, C. P. Hultberg, C. Turner, G. Lidén and M. F. Gorwa-Grauslund, *Biotechnol. Adv.*, 2016, **34**, 1318–1346; (b) S. Sen, S. Patil and D. S. Argyropoulos, *Green Chem.*, 2015, **17**, 4862–4887;



- (c) K. Wang, H. Yang, S. Guo, X. Yao and R.-C. Sun, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2014, **131**, 39673.
- 2 (a) X. Huang, O. M. M. Gonzalez, J. Zhu, T. I. Korányi, M. D. Boot and E. J. M. Hensen, *Green Chem.*, 2017, **19**, 175–187; (b) H. Yang, J. Li, J. Xu and L. Mo, *BioResources*, 2017, **12**, 344–361; (c) H. Zhu, J. P. Max, C. L. Marcum, H. Luo, M. M. Abu-Omar and H. I. Kenttämä, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2016, **27**, 1813–1823; (d) M. D. Kärkäs, B. S. Matsuura, T. M. Monos, G. Magallanes and C. R. J. Stephenson, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 1853–1914; (e) S. Huang, N. Mahmood, M. Tymchyshyn, Z. Yuan and C. Xu, *Bioresour. Technol.*, 2014, **171**, 95–102.
- 3 (a) G. de Gonzalo, D. I. Colpa, M. H. M. Habib and M. W. Fraaije, *J. Biotechnol.*, 2016, **236**, 110–119; (b) F. Asina, I. Brzonova, K. Voeller, E. Kozliak, A. Kubátová, B. Yao and Y. Ji, *Bioresour. Technol.*, 2016, **220**, 414–424; (c) L. Zhang, T. You, T. Zhou, L. Zhang and F. Xu, *BioResources*, 2016, **11**, 3972–3986; (d) D. Salvachúa, R. Katahira, E. N. S. Cleveland, P. Khanna, M. G. Resch, B. A. Black, S. O. Purvine, M. Zink, A. Prieto, M. J. Martínez, A. T. Martínez, B. A. Simmons, J. M. Gladden and G. T. Beckham, *Green Chem.*, 2016, **18**, 6046–6062; (e) T. D. H. Bugg, M. Ahmad, E. M. Hardiman and R. Rahmanpour, *Nat. Prod. Rep.*, 2011, **28**, 1883–1896.
- 4 (a) Z. Ahmad, M. Asgher, F. Hussain and M. A. Randhawa, *BioResources*, 2016, **11**, 10511–10527; (b) C. Zhao, S. Xie, Y. Pu, R. Zhang, F. Huang, A. J. Ragauskas and J. S. Yuan, *Green Chem.*, 2016, **18**, 1306–1312; (c) P. Picart, L. Wiermans, M. Pérez-Sánchez, P. M. Grande, A. Schallmey and P. Domínguez de María, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2016, **4**, 651–655.
- 5 (a) Y. Ohta, R. Hasegawa, K. Kurosawa, A. H. Maeda, T. Koizumi, H. Nishimura, H. Okada, C. Qu, K. Saito, T. Watanabe and Y. Hatada, *ChemSusChem*, 2017, **10**, 425–433; (b) L. Yang, K. Seshan and Y. Li, *Catal. Today*, 2017, **298**, 276–297; (c) T. D. Bugg and R. Rahmanpour, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2015, **29**, 10–17.
- 6 (a) X.-Y. Jiang, Q. Lu, X.-N. Ye, B. Hu and C.-Q. Dong, *BioResources*, 2016, **11**, 6232–6243; (b) M. Akazawa, Y. Kato and Y. Kojima, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2016, **122**, 355–364.
- 7 (a) L. T. M. Pham, S. J. Kim and Y. H. Kim, *Biotechnol. Biofuels*, 2016, **9**, 247; (b) E. Rosini, C. Allegretti, R. Melis, L. Cerioli, G. Conti, L. Pollegioni and P. D'Arrigo, *Catal. Sci. Technol.*, 2016, **6**, 2195–2205.
- 8 (a) M. D. Cannatelli and A. J. Ragauskas, *Chem. Rec.*, 2017, **17**, 122–140; (b) T. Kudanga, B. Nemađziva and M. L. Roes-Hill, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, **101**, 13–33; (c) M. Mogharabi and M. A. Faramarzi, *Adv. Synth. Catal.*, 2014, **356**, 897–927; (d) S. Witayakran and A. J. Ragauskas, *Adv. Synth. Catal.*, 2009, **351**, 1187–1209; (e) S. Riva, *Trends Biotechnol.*, 2005, **24**, 219–226.
- 9 (a) B. Yao, P. Kolla, R. Koodali, Y. Ding, S. Balaranjan, S. Shrestha and A. Smirnova, *New J. Chem.*, 2017, **41**, 958–964; (b) S. Xie, Q. Sun, Y. Pu, F. Lin, S. Sun, X. Wang, A. J. Ragauskas and J. S. Yuan, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2017, **5**, 2215–2223; (c) Q. Wang, S. Liu, G. Yang and J. Chen, *Bioresour. Technol.*, 2015, **175**, 638–641.
- 10 (a) L. Munk, A. M. Punt, M. A. Kabel and A. S. Meyer, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 3358–3368; (b) M. D. Cannatelli and A. J. Ragauskas, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, **100**, 8685–8691; (c) D. Huber, A. Pellis, A. Daxbacher, G. S. Nyanhongo and G. M. Guebitz, *Polymers*, 2016, **8**, 280/1–280/10; (d) H. Wu, J. Noro, Q. Wang, X. Fan, C. Silva and A. Cavaco-Paulo, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 90427–90434; (e) I. F. Fiřigău, C. G. Boeriu and F. Peter, *Macromol. Symp.*, 2015, **352**, 78–86.
- 11 (a) J. González-Sabín, N. Ríos-Lombardía, I. García, N. M. Vior, A. F. Braña, C. Méndez, J. A. Salas and F. Moris, *Green Chem.*, 2016, **18**, 989–994; (b) A. Díaz-Rodríguez, L. Martínez-Montero, I. Lavandera, V. Gotor and V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.*, 2014, **356**, 2321–2329; (c) K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández and V. Gotor, *Green Chem.*, 2014, **16**, 2448–2453.
- 12 (a) A. Kirsch, K. Ostendorf, A. Kharazipour and M. Euring, *BioResources*, 2016, **11**, 7091–7101; (b) A. Rico, J. Rencoret, J. C. del Río, A. T. Martínez and A. Gutiérrez, *Biotechnol. Biofuels*, 2014, **7**, 6; (c) P. Könst, S. Kara, S. Kochius, D. Holtmann, I. W. C. E. Arends, R. Ludwig and F. Hollmann, *ChemCatChem*, 2013, **5**, 3027–3032; (d) T. Rosado, P. Bernardo, K. Koci, A. V. Coelho, M. P. Robalo and L. O. Martins, *Bioresour. Technol.*, 2012, **124**, 371–378; (e) A. I. Cañas and S. Camarero, *Biotechnol. Adv.*, 2010, **28**, 694–705.
- 13 (a) T. Saravanakumar, H.-S. Park, A.-Y. Mo, M.-S. Choi, D.-H. Kim and S.-M. Park, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2016, **134**, 196–205; (b) S. Slagman, J. Escorihuela, H. Zuilhof and M. C. R. Franssen, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 99367–99375; (c) R. Reiss, J. Ihssen, M. Richter, E. Eichhorn, B. Schilling and L. Thöny-Meyer, *PLoS One*, 2013, **8**, e65633.
- 14 J. Ravindran, G. V. Subbaraju, M. V. Ramani, B. Sung and B. B. Aggarwal, *Biochem. Pharmacol.*, 2010, **79**, 1658–1666.
- 15 H. E. Master, S. I. Khan and K. A. Poojari, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 4891–4899.
- 16 H. S. Patel and K. B. Patel, *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 2009, **184**, 2443–2452.
- 17 (a) M.-J. Han, H.-T. Choi and H.-G. Song, *J. Microbiol.*, 2006, **43**, 555–560; (b) P. Cassland and L. J. Jönsson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **52**, 393–400.
- 18 R. M. Berka, P. Schneider, E. J. Golightly, S. H. Brown, M. Madden, K. M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf and F. Xu, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 3151–3157.
- 19 Dimethylsulfoxide is known as radical scavenger, but it has been described as a useful organic co-solvent in laccase-catalyzed reactions. See, for instance ref. 11c.
- 20 (a) B. Ramalingam, B. Sana, J. Seayad, F. J. Ghadessy and M. B. Sullivan, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 11951–11958; (b) N. H. Pham, F. Hollmann, D. Kracher, M. Preims, D. Haltrich and R. Ludwig, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2015, **120**, 38–46; (c) K. Rittstiegl, A. Suurnakki, T. Suortti, K. Kruus, G. Guebitz and J. Buchert, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 403–410.
- 21 See, for instance: (a) J. Safaei-Ghomi and A. R. Hajipour, *Org. Prep. Proced. Int.*, 2011, **43**, 372–376; (b) D. Enders,



- L. Wortmann and R. Peters, *Acc. Chem. Res.*, 2000, **33**, 157–169.
- 22 (a) P. Nousiainen, J. Kontro, H. Manner, A. Hatakka and J. Sipilä, *Fungal Genet. Biol.*, 2014, **72**, 137–149; (b) T. M. Larson, A. M. Anderson and J. O. Rich, *Biotechnol. Lett.*, 2013, **35**, 225–231; (c) M. Díaz-González, T. Vidal and T. Tzanov, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **89**, 1693–1700; (d) R. Bourbonnais and M. G. Paice, *FEBS Lett.*, 1990, **267**, 99–102.
- 23 M. L. Niku-Paavola, L. Raaska and M. Itävaara, *Mycol. Res.*, 1990, **94**, 27–31.
- 24 V. R. Kanetkar, D. D. Zope and Y. V. V. Subrahmanyam, *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, 2005, **44**, 1317–1318.
- 25 R. B. de Oliveira, E. M. de Souza-Fagundes, R. P. P. Soares, A. A. Andrade, A. U. Krettli and C. L. Zani, *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, **43**, 1983–1988.
- 26 M. Delomenède, F. Bedos-Belval, H. Duran, C. Vindis, M. Baldas and A. Nègre-Salvayre, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 3171–3181.
- 27 S. Grelier, H. Cramail, A. Llevot, S. Carlotti and E. Grau, Patent WO 2016/050988 A1, 2016.
- 28 D. R. Kelly, S. C. Baker, D. S. King, D. S. de Silva, G. Lord and J. P. Taylor, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 787–796.
- 29 A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, P. M. E. Mancini, M. N. Kneeteman and M. I. Quindt, *Tetrahedron Lett.*, 2015, **56**, 3988–3991.



CAPÍTULO 2

Desarrollo de procesos secuenciales quimioenzimáticos para la desracemización y aminación estereoselectiva de (3E)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles racémicos utilizando lacasas, alcohol deshidrogenasas y transaminasas

ANTECEDENTES

2.1.1. OXIDACIONES AERÓBICAS DE ALCOHOLES ALÍLICOS CATALIZADAS POR METALES

A lo largo de la historia se han descrito diferentes métodos para llevar a cabo la oxidación de distintos tipos de alcoholes. Tradicionalmente, las formas más comunes de realizar este tipo de oxidaciones se basan en la utilización de sales metálicas de distinta naturaleza (cromo, manganeso, etc.) empleando una cantidad estequiométrica o incluso superior. Desafortunadamente, este tipo de sales son en general nocivas para el medio ambiente, dado que muchos de estos metales pueden presentar, entre otros, efectos carcinogénicos.¹⁵⁸ Sin embargo, con el paso de los años se han ido desarrollando alternativas más sostenibles, de forma que la cantidad utilizada de estas sales ha pasado a un nivel subestequiométrico e incluso catalítico. Por otro lado, muchos de estos procesos han sido posibles gracias a la presencia de diferentes aditivos o co-oxidantes en el medio.¹⁵⁹

Por otra parte, desde un punto de vista sintético y medioambiental, en un proceso de oxidación el oxidante ideal es el oxígeno, ya que se trata de un gas barato, inocuo, presente en el aire y que además genera subproductos de reacción como el agua o el peróxido de hidrógeno, ambos muy fácilmente eliminables. Por ello, las metodologías que se presentarán a continuación, a modo de ejemplo, utilizan únicamente oxígeno o aire como aceptor de electrones.

En primer lugar, hay que comentar que las metodologías existentes para llevar a cabo la oxidación de alcoholes alílicos empleando metales de transición ascienden a un número muy elevado, presentándose la utilización de, por ejemplo, Cu,¹⁶⁰ Rh,¹⁶¹

¹⁵⁸ (a) D. Beyersmann, A. Hartwig, *Arch. Toxicol.* **2008**, *82*, 493-512; (b) Q. Y. Chen, T. DesMarais, M. Costa, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *59*, 537-554.

¹⁵⁹ (a) W. Adam, S. Hajra, M. Herderich, C. R. Saha-Möller, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2773-2776; (b) T. N. Plank, J. L. Drake, D. K. Kim, T. W. Funk, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 597-601; (c) K. Ren, B. Hu, M. Zhao, Y. Tu, X. Xie, Z. Zhang, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2170-2177; (d) S. Budweg, K. Junge, M. Beller, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 14143-14146.

¹⁶⁰ S.-S. Shen, V. Kartika, Y. S. Tan, R. D. Webster, K. Narasaka, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 986-990.

¹⁶¹ X. Wang, C. Wang, Y. Liu, J. Xiao, *Green Chem.* **2016**, *18*, 4605-4610.

Capítulo 2. Antecedentes

Ag,¹⁶² Pt,¹⁶³ Ru,¹⁶⁴ Co,^{164b,165} Mn,¹⁶⁵ Pd^{163d,166} o Au.¹⁶⁷ Desafortunadamente, la gran mayoría de estos procesos oxidativos requieren el uso de disolventes orgánicos (en algunos casos con puntos de ebullición elevados como el tolueno), temperaturas altas o la utilización de un flujo constante o presión positiva del gas oxidante (sea aire u oxígeno). Sin embargo, más recientemente se han desarrollado diferentes metodologías en condiciones de reacción suaves que emplean bajas temperaturas, agua o mezclas alcohólicas-acuosas, o incluso transcurren en ausencia de disolvente. En este contexto, el oro es uno de los metales que ha podido ser utilizado en condiciones más suaves con respecto a las que suelen emplear con otros metales de transición.^{167a,f} Así, Mahyari y colaboradores han logrado desarrollar una metodología benigna para llevar a cabo la oxidación de diferentes alcoholes, entre los que se encuentran varios ejemplos de derivados alílicos, empleando nanopartículas de oro inmovilizadas sobre grafeno modificado cuya superficie presenta un líquido iónico supramolecular (Au NPs@SIL-g-Grafeno).^{167f} Usando este catalizador, en una cantidad muy baja, se logró llevar a cabo la oxidación de diversos alcoholes utilizando aire u oxígeno a temperatura ambiente en agua (Esquema 2.1).

¹⁶² P. Nagaraju, M. Balaraju, K. M. Reddy, P. S. S. Prasad, N. Lingaiah, *Catal. Commun.* **2008**, *9*, 1389-1393.

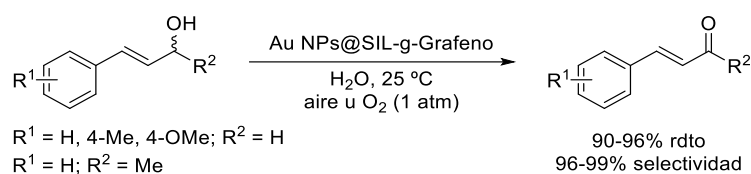
¹⁶³ (a) A. F. Lee, J. J. Gee, H. J. Theyers, *Green Chem.* **2000**, *2*, 279-282; (b) Y. M. A. Yamada, T. Arakawa, H. Hocke, Y. Uozumi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 704-706; (c) Y. Kon, H. Yazawa, Y. Usui, K. Sato, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1642-1648; (d) Y. Uozumi, Y. M. A. Yamada, *Chem. Rec.* **2009**, *9*, 51-65.

¹⁶⁴ (a) K. Kaneda, T. Yamashita, T. Matsushita, K. Ebitani, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1750-1751; (b) K. Ebitani, H.-B. Ji, T. Mizugaki, K. Kaneda, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, *212*, 161-170; (c) B. Karimi, D. Elhamifar, O. Yari, M. Khorasani, H. Vali, J. H. Clark, A. J. Hunt, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 13520-13530.

¹⁶⁵ M. M. Hashemi, Y. Ahmadibeni, *Monatsh. Chem.* **2003**, *134*, 411-418.

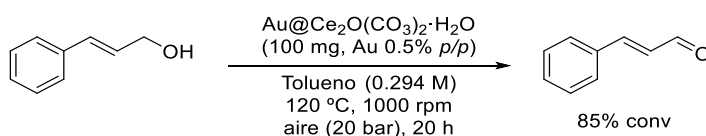
¹⁶⁶ (a) K.-M. Choi, T. Akita, T. Mizugaki, K. Ebitani, K. Kaneda, *New J. Chem.* **2003**, *27*, 324-328; (b) B. Karimi, A. Zamani, S. Abedi, J. H. Clark, *Green Chem.* **2009**, *11*, 109-119; (c) C. M. A. Parlett, D. W. Bruce, N. S. Hondow, M. A. Newton, A. F. Lee, K. Wilson, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 939-950; (d) C. M. A. Parlett, L. J. Durndell, K. Wilson, D. W. Bruce, N. S. Hondow, A. F. Lee, *Catal. Commun.* **2014**, *44*, 40-45; (e) M. Vellakkaran, M. M. S. Andappan, K. Nagaiah, J. B. Nanubolu, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 3575-3583.

¹⁶⁷ (a) A. Abad, C. Almela, A. Corma, H. García, *Chem. Commun.* **2006**, 3178-3180; (b) N. Wang, T. Matsumoto, M. Ueno, H. Miyamura, S. Kobayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4744-4746; (c) C. Lucchesi, T. Inasaki, H. Miyamura, R. Matsubara, S. Kobayashi, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1996-2000; (d) B. Karimi, F. K. Esfahani, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1319-1326; (e) N. Asao, N. Hatakeyama, Menggenbateer, T. Minato, E. Ito, M. Hara, Y. Kim, Y. Yamamoto, M. Chen, W. Zhang, A. Inoue, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4540-4542; (f) M. Mahyari, A. Shaabani, Y. Bide, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 22509-22517; (g) P. D. Giorgi, N. Elizarov, S. Antonioti, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 1830-1836; (h) W. Oberhauser, C. Evangelisti, M. Marelli, V. Del Santo, C. Cepek, M. Bellini, *Catal. Commun.* **2020**, *140*, 105989.



Esquema 2.1. Oxidación aeróbica de alcoholes alílicos en medio acuoso utilizando nanopartículas de oro.

Otro ejemplo exitoso del empleo del oro en procesos de oxidación fue el descrito por Oberhauser y colaboradores, los cuales inmovilizaron nanopartículas de oro sobre oxicarbonato de cerio ($\text{Au@Ce}_2\text{O}(\text{CO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$),^{167h} para posteriormente aplicarlo a la oxidación selectiva del (*E*)-alcohol cinamílico en cinamaldehído. Sin embargo, en este caso fueron necesarias condiciones muy drásticas de temperatura, presión de agente oxidante y empleo de tolueno (Esquema 2.2).

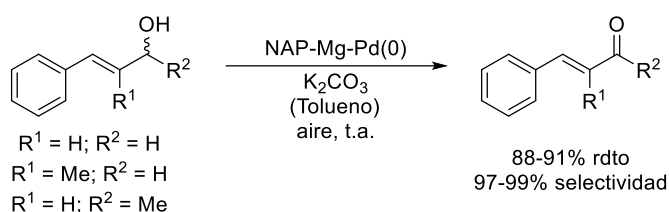


Esquema 2.2. Oxidación del (*E*)-alcohol cinamílico utilizando nanopartículas de oro inmovilizadas.

Otro metal ya comentado anteriormente, y de cuyo empleo se han publicado diferentes estudios en este campo es el paladio, en los cuales además se ha empleado en condiciones suaves de reacción.¹⁶⁸ Por ejemplo, es posible llevar a cabo la oxidación de alcoholes, entre ellos alílicos, mediante la utilización de paladio inmovilizado sobre nanocristales de óxido de magnesio (NAP-Mg-Pd(0)), según han descrito Layek y colaboradores.^{168b} De esta forma se pudo llevar a cabo la oxidación de alcoholes de forma aeróbica y a temperatura ambiente sin emplear disolventes. Sin embargo, los autores también mostraron que, en los casos en los que los alcoholes de partida eran sólidos a temperatura ambiente, se debía utilizar un disolvente, usándose tolueno en estos casos concretos (Esquema 2.3).

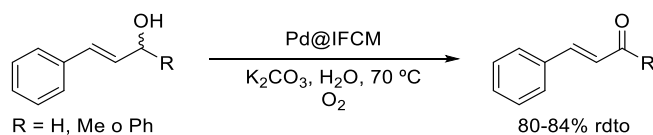
¹⁶⁸ (a) G. An, H. Ahn, K. A. De Castro, H. Rhee, *Synthesis* **2010**, 477-485; (b) K. Layek, H. Maheswaran, R. Arundhathi, M. L. Kantam, S. K. Bhargava, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 606-616; (c) B. Karimi, H. Behzadnia, M. Bostina, H. Vali, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 8634-8640; (d) S. Abedi, A. Morsali, *New. J. Chem.* **2017**, 41, 5846-5852.

Capítulo 2. Antecedentes



Esquema 2.3. Empleo de un catalizador de paladio inmovilizado en la oxidación de alcoholes alílicos en presencia de aire.

A su vez, Karimi y colaboradores lograron llevar a cabo la oxidación de diferentes alcoholes utilizando como catalizador nanopartículas de paladio inmovilizadas sobre una estructura de carbono mesoporoso nanofibrilado (Pd@IFCM), agua como disolvente y temperaturas suaves, además de oxígeno o aire como agentes oxidantes.^{168c} Si bien es cierto que estas condiciones fueron óptimas para la oxidación de alcoholes bencílicos, se tuvieron que emplear temperaturas más altas en el caso de los alcoholes alílicos (Esquema 2.4).



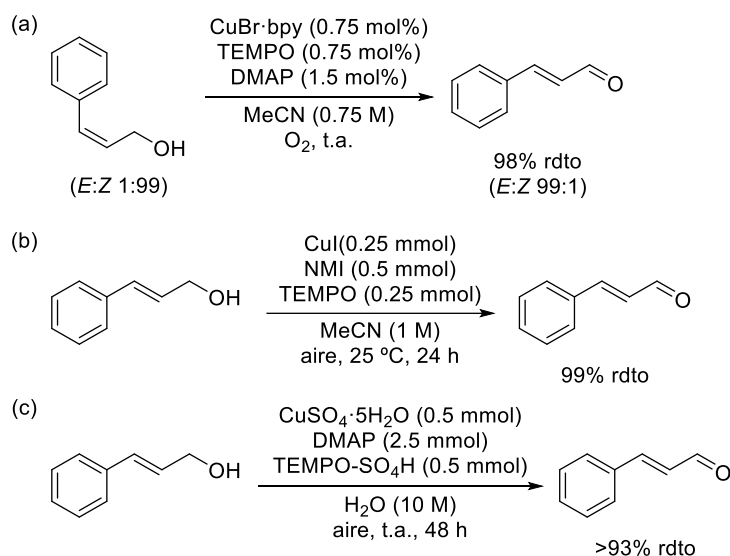
Esquema 2.4. Ejemplo de oxidación de alcoholes alílicos con nanopartículas de paladio inmovilizadas sobre una estructura de carbono mesoporoso nanofibrilado.

2.1.2. OXIDACIONES AERÓBICAS DE ALCOHOLES ALÍLICOS EN PRESENCIA DE TEMPO

Existen multitud de ejemplos donde se emplea el radical TEMPO para llevar a cabo la oxidación de distintos tipos de alcoholes.¹⁶⁹ Muchos de ellos usan este radical en presencia de otros metales, incluidos metales de transición, donde el cobre es uno de los más utilizados. En concreto, Könning y colaboradores describieron la oxidación de diferentes tipos de alcoholes alílicos, entre los que se encontraba el

¹⁶⁹ Ejemplos seleccionados: (a) X. Wang, R. Liu, Y. Jin, X. Liang, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2679-2685; (b) B. Karimi, E. Farhangi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6056-6060; (c) D. Könning, T. Olbrisch, F. D. Sypaseuth, C. C. Tzschucke, M. Christmann, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5014-5016; (d) G. Zhang, S. Li, J. Lei, G. Zhang, X. Xie, C. Ding, R. Liu, *Synlett* **2016**, *27*, 956-960; (e) Z. Liu, Z. Shen, N. Zhang, W. Zhong, X. Liu, *Catal. Lett.* **2018**, *148*, 2709-2718; (f) T. Chen, Z. Wang, J. Xiao, Z. Cao, C. Yi, Z. Xu, *Asian J. Org. Chem.* **2019**, *8*, 1321-1324.

(*Z*)-alcohol cinámico, utilizando el TEMPO en presencia de una sal de cobre, oxígeno y a temperatura ambiente (Esquema 2.5a),^{169c} mientras que en las condiciones de la oxidación de Lindgren¹⁷⁰ (presencia adicional de clorito sódico), fue posible la sobreoxidación de los aldehídos hasta los correspondientes ácidos carboxílicos. También, utilizando otra sal de cobre (CuI) y *N*-metilimidazol (NMI), Zhong y colaboradores consiguieron desarrollar una metodología que emplea TEMPO para llevar a cabo la oxidación de diferentes alcoholes, como el (*E*)-alcohol cinámico, conduciendo al cinamaldehído con un rendimiento del 99% (Esquema 2.5b).^{169e} Finalmente, otro ejemplo donde se combina un derivado de TEMPO (TEMPO-SO₄H) y cobre ha sido desarrollado por Yi y colaboradores, permitiendo la oxidación nuevamente del alcohol cinámico a cinamaldehído con rendimientos superiores al 93% (Esquema 2.5c).^{169f}



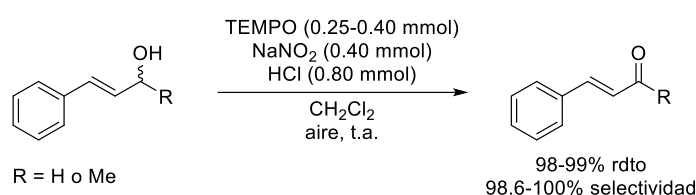
Esquema 2.5. Ejemplos de oxidaciones del alcohol cinámico empleando una sal de cobre y un radical N-oxilo.

Por otra parte, desde un punto de vista medioambiental, es más interesante la posibilidad de llevar a cabo este tipo de oxidaciones en ausencia de metales. De este modo, Wang y colaboradores lograron oxidar una amplia familia de alcoholes bencílicos, heteroaromáticos, alílicos y alifáticos a temperatura ambiente empleando

¹⁷⁰ B. O. Lindgren, T. Nilsson, *Acta Chem. Scand.* **1973**, 27, 888-890.

Capítulo 2. Antecedentes

únicamente el TEMPO en combinación con nitrito de sodio y ácido clorhídrico, sin la utilización de metales adicionales (Esquema 2.6).^{169a}



Esquema 2.6. Oxidación aeróbica de alcoholes alílicos empleando TEMPO y NaNO₂.

También cabe destacarse la posibilidad de utilizar este tipo de radicales N-oxilo anclados a un soporte. Así lo demostraron Karimi y Farhangi, que lograron inmovilizar el 4-oxo-TEMPO sobre nanopartículas magnéticas, quedando finalmente el compuesto radicalario unido a estas.^{169b} Aunque orientaron su investigación principalmente a la oxidación de otro tipo de alcoholes, también estudiaron la posibilidad de oxidar alcoholes alílicos con resultados positivos. Hay que resaltar que, en este caso, las reacciones se llevaron a cabo en agua, a diferencia de otros casos mencionados anteriormente que empleaban disolventes orgánicos como el acetonitrilo o el diclorometano.

2.1.3. RELEVANCIA Y SÍNTESIS DE ALCOHOLES ALÍLICOS ÓPTICAMENTE ACTIVOS

Los alcoholes alílicos quirales son moléculas que presentan una gran versatilidad, dado que en su estructura existen dos fragmentos de alto valor sintético, un grupo alcohol y un doble enlace, ambos fácilmente transformables para dar lugar a moléculas con hasta tres centros quirales contiguos. De esta forma, se han desarrollado multitud de reacciones químicas con el objetivo de modificar el doble enlace de este tipo de alcoholes, aprovechando la existencia del grupo hidroxilo en la molécula, el cual permite dirigir este tipo de transformaciones.¹⁷¹ También en los últimos años se ha estudiado otro tipo de procedimientos con la finalidad de sustituir

¹⁷¹ (a) J. Liu, S. Krajangsri, J. Yang, J. Q. Li, P. G. Andersson, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 438-443; (b) A. Nagata, Y. Akagi, S. S. Masoud, M. Yamanaka, A. Kittaka, M. Uesugi, M. Odagi, K. Nagasawa, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 7630-7641; (c) P. Fan, C. Wang, *Commun. Chem.* **2019**, *2*, 104; (d) C. You, S. Li, X. Li, H. Lv, X. Zhang, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 8529-8533.

este grupo hidroxilo por otro tipo de nucleófilos,¹⁷² lo cual se ha establecido como un enorme avance para sintetizar una amplia variedad de compuestos químicos con alto valor añadido.

En este contexto, Edmondson y colaboradores describieron una ruta sintética para la preparación de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, partiendo de un alcohol alílico quiral (Esquema 2.7a).¹⁷³ Por otra parte, Brenna y colaboradores realizaron la síntesis del (*R*)-(-)-baclofeno, compuesto derivado de un neurotransmisor inhibitorio como es el ácido γ -aminobutírico (GABA) y utilizado como fármaco en el tratamiento de la espasticidad, a través de un reordenamiento de Claisen partiendo de un alcohol alílico quiral (Esquema 2.7b).¹⁷⁴ Este mismo grupo también ha descrito un proceso mediante el cual sintetizaron el *cis*-7-metoxicalameneno (sesquiterpenoide aislado normalmente de fuentes naturales)¹⁷⁵ de forma enantioenriquecida (Esquema 2.7c) partiendo de otro alcohol alílico.¹⁷⁶

¹⁷² S. L. Rossler, D. A. Petrone, E. M. Carreira, *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 2657-2672.

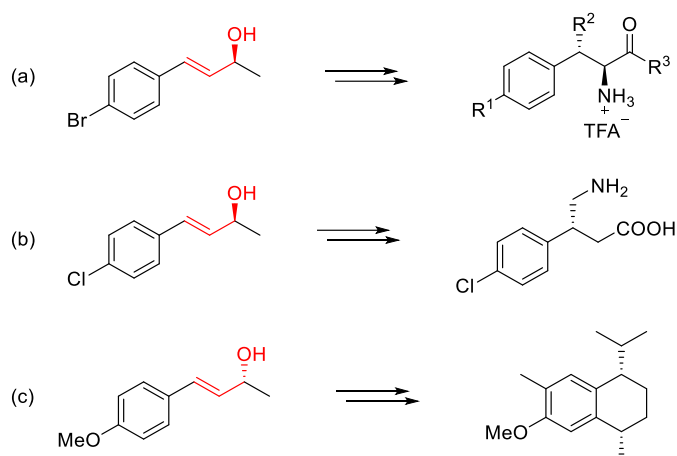
¹⁷³ (a) S. D. Edmondson, A. Mastracchio, J. L. Duffy, G. J. Eiermann, H. He, I. Ita, B. Leiting, J. F. Leone, K. A. Lyons, A. M. Makarewicz, R. A. Patel, A. Petrov, J. K. Wu, N. A. Thornberry, A. E. Weber, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3048-3052; (b) S. D. Edmondson, A. Mastracchio, R. J. Mathvink, J. He, B. Harper, Y.-J. Park, M. Beconi, J. Di Salvo, G. J. Eiermann, H. He, B. Leiting, J. F. Leone, D. A. Levorse, K. Lyons, R. A. Patel, S. B. Patel, A. Petrov, G. Scapin, J. Shang, R. S. Roy, A. Smith, J. K. Wu, S. Xu, B. Zhu, N. A. Thornberry, A. E. Weber, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3614-3627.

¹⁷⁴ E. Brenna, N. Caraccia, C. Fuganti, D. Fuganti, P. Grasselli, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3801-3805.

¹⁷⁵ (a) M. Salmoun, J. C. Braekman, Y. Ranarivelo, R. Rasamoelisendra, D. Ralambomanana, J. Dewelle, F. Darro, R. Kiss, *Nat. Prod. Res.* **2007**, *21*, 111-120; (b) P. A. McDowell, D. A. Foley, P. O'Leary, A. Ford, A. R. Maguire, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 2035-2040.

¹⁷⁶ E. Brenna, C. Dei Negri, C. Fuganti, F. G. Gatti, S. Serra, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 335-340.

Capítulo 2. Antecedentes



Esquema 2.7. Aplicaciones sintéticas de diferentes alcoholes alílicos ópticamente activos.

En este contexto, la preparación de este tipo de alcoholes alílicos de manera estereoselectiva adquiere un gran atractivo.¹⁷⁷ Así, diversas metodologías químicas se han venido desarrollando desde hace años para la preparación de este tipo de compuestos, ya sea mediante la formación (estereoselectiva) de enlaces C–C,¹⁷⁸ C–O¹⁷⁹ o C–H,¹⁸⁰ además de diferentes procesos metal- u organocatalizados para realizar isomerizaciones¹⁸¹ o resoluciones cinéticas de los alcoholes alílicos racémicos de partida.¹⁸²

Existe una gran variedad de procesos que podrían exponerse a modo de ejemplo referidos a la síntesis estereoselectiva de alcoholes alílicos. De entre ellos se ha seleccionado el de Shi y colaboradores que desarrollaron la preparación de diferentes alcoholes alílicos enantioenriquecidos mediante el acoplamiento estereoselectivo

¹⁷⁷ A. Lumbroso, M. L. Cooke, B. Breit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1890-1932.

¹⁷⁸ (a) S. Crotti, G. Belletti, N. Di Iorio, E. Marotta, A. Mazzanti, P. Righi, G. Bencivenni, *RSC Adv.* **2018**, *8*, 33451-33458; (b) W. J. Jang, J. Yun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12116-12120; (c) A. Narczyk, M. Pieczykolan, S. Stecko, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 3921-3946; (d) B. Maliszewski, T. Bauer, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 3689-3693; (e) Y. Cai, J.-W. Zhang, F. Li, J.-M. Liu, S.-L. Shi, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 1-6.

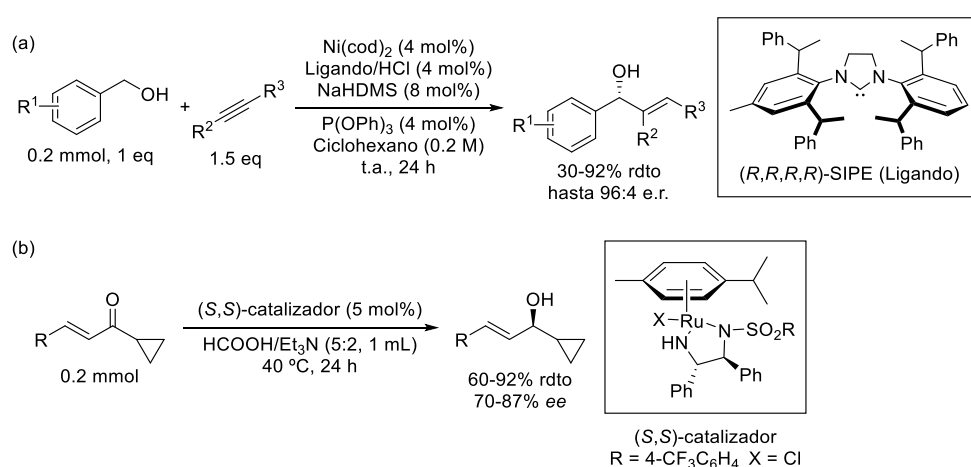
¹⁷⁹ Z. Liu, B. Breit, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 300-303.

¹⁸⁰ (a) F. Chen, Y. Zhang, L. Yu, S. Zhu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2022-2025; (b) S. Liu, P. Cui, J. Wang, H. Zhou, Q. Liu, J. Lv, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 264-267; (c) C. Li, W. Lu, B. Lu, W. Li, X. Xie, Z. Zhang, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 16086-16094; (d) L. Amenós, L. Nóvoa, L. Trulli, A. Arroyo-Bondía, A. Parra, M. Tortosa, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 6583-6587.

¹⁸¹ K.-Y. Ye, T. McCallum, S. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 9548-9554.

¹⁸² (a) R. M. Neyyappadath, R. Chisholm, M. D. Greenhalgh, C. Rodríguez-Esrich, M. A. Pericàs, G. Hähner, A. D. Smith, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 1067-1075; (b) Y. Liu, S. Liu, D. Li, N. Zhang, L. Peng, J. Ao, C. E. Song, Y. Lan, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 1150-1159.

entre alcoholes bencílicos y alquinos (Esquema 2.8a).^{178c} Por otra parte, Lv y colaboradores han descrito la reducción de diferentes cicloalquil vinyl cetonas a los correspondientes alcoholes alílicos ópticamente activos, mediante la utilización de catalizadores de rutenio (Esquema 2.8b).^{180b}



Esquema 2.8. Síntesis estereoselectiva de alcoholes alílicos con complejos metálicos.

Por otra parte, como ya se ha comentado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, la existencia de diferentes clases de biocatalizadores aporta una gran versatilidad sintética para el desarrollo de transformaciones selectivas en condiciones de reacción suaves. Dentro de este campo, la obtención estereoselectiva de alcoholes alílicos ha sido posible mediante la utilización de diferentes enzimas como, por ejemplo, lipasas, mediante procesos de resolución cinética clásica¹⁸³ o dinámica¹⁸⁴ de las correspondientes mezclas racémicas. Otro tipo de enzimas que también se han utilizado en la preparación de este tipo de compuestos quirales son las oxidorreductasas, a través de diferentes procesos de oxidación o reducción

¹⁸³ (a) M. Szigeti, E. R. Tóke, M. C. Turóczy, V. Nagy, G. Szakács, L. Poppe, *Arkivoc* **2008**, iii, 54-65; (b) A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, G. Maciejewska, C. Wawrzeńczyk, *Molecules* **2016**, 21, 1552.

¹⁸⁴ (a) M.-J. Kim, H. K. Lee, J. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, 28, 2096-2098; (b) S. Akai, R. Hanada, N. Fujiwara, Y. Kita, M. Egi, *Org. Lett.* **2010**, 12, 4900-4903; (c) M. Egi, K. Sugiyama, M. Saneto, R. Hanada, K. Kato, S. Akai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 3654-3658; (d) B. Xia, J. Xu, Z. Xiang, Y. Cen, Y. Hu, X. Lin, Q. Wu, *ACS Catal.* **2017**, 7, 4542-4549.

Capítulo 2. Antecedentes

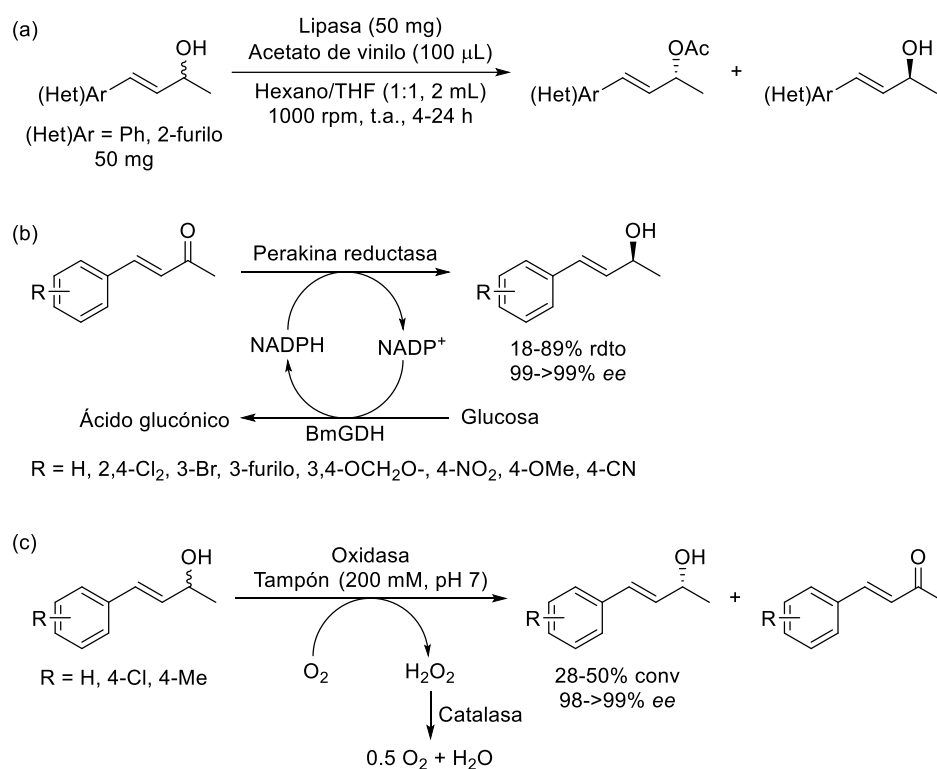
partiendo tanto de los alcoholes alílicos racémicos¹⁸⁵ como de las cetonas α,β -insaturadas.¹⁸⁶

La utilización de lipasas para obtener alcoholes ópticamente activos ha sido ampliamente estudiada durante muchos años, pudiéndose destacar el trabajo de Poppe y colaboradores que describieron la resolución cinética de dos (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles, donde la mayoría de lipasas actuaron con una excelente estereoselectividad en favor de la acetilación de los correspondientes (*R*)-alcoholes (Esquema 2.9a).^{183a} Así, para el (3*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ol destacaron las lipasas de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B, 51% conversión y 95.6% *ee_P* después de 4 h) y de *Pseudomonas cepacia* (PSL, 48% conversión y 98.3% *ee_P* después de 24 h), mientras que para el (3*E*)-4-(2-furil)but-3-en-2-ol, los mejores resultados fueron obtenidos con la lipasa de páncreas porcino (PPL, 50% conversión y 99.2% *ee_P* después de 72 h). Por otra parte, la utilización de procesos de asimetrización como la biorreducción de cetonas para la obtención de alcoholes alílicos ha permitido acceder a mejores rendimientos teóricos que los procesos catalizados por las lipasas. Así, Zhao y colaboradores llevaron a cabo la reducción de varias (3*E*)-4-arilbut-3-en-2-onas de manera selectiva, utilizando para ello la perakina reductasa procedente de *Rauvolfia* (Esquema 2.9b).^{186b} Otro método que se ha utilizado extensamente para la obtención de alcoholes enantiopuros consiste en la utilización de oxidasas para catalizar la oxidación estereoselectiva de uno de los enantiómeros de la mezcla racémica del alcohol, quedando remanente el opuesto en el medio de reacción. Mediante la utilización de dos alcohol oxidasas dependientes de flavina procedentes de diferentes organismos, la oxidasa tipo puente de berberina procedente de *Arabidopsis thaliana* (AtBBE15) y la 5-(hidroximetil)furfural oxidasa (HMFO) de *Methylovorus* sp., tanto en sus forma nativas como variantes con una o varias mutaciones, Kroutil y colaboradores investigaron la oxidación de varios (3*E*)-4-arilbut-3-en-2-oles así como de otros alcoholes alílicos alifáticos.^{185b} Todas las enzimas estudiadas catalizaron la oxidación de los enantiómeros de configuración *S* con una selectividad variable, dando lugar en el medio de reacción a una mezcla de las correspondientes cetonas y los enantiómeros *R* remanentes, incluso en reacciones

¹⁸⁵ (a) T. Sivakumari, R. Preetha, A. Chadha, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 2257-2262; (b) S. Gandomkar, E. Jost, D. Loidolt, A. Swoboda, M. Pickl, W. Elailly, B. Daniel, M. W. Fraaije, P. Macheroux, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 5264-5271.

¹⁸⁶ (a) R. van Deursen, W. Stampfer, K. Edegger, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *31*, 159-163; (b) S. Cai, N. Shao, Y. Chen, A. Li, J. Pan, H. Zhu, H. Zou, S. Zeng, L. Sun, J. Zhao, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 4411-4414.

a escala semipreparativa (12.5 mmol) a una concentración de sustrato de 50 mM (Esquema 2.9c).



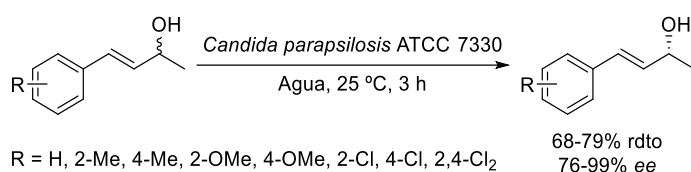
Esquema 2.9. Procesos enzimáticos para la obtención estereoselectiva de alcoholes alílicos empleando: (a) lipasas, (b) reductasas, y (c) oxidasas.

Además, otra de las formas estudiadas para obtener alcoholes alílicos quirales consiste en el diseño de desracemizaciones partiendo de los sustratos racémicos, tal como se ha comentado anteriormente en la *Sección 0.3.1.1* de la Introducción.¹⁸⁷ Este tipo de procesos implica la acción de dos enzimas redox (por ejemplo, una oxidasa y una reductasa), que desarrollan una cascada bienzimática consistente en la oxidación (selectiva) del alcohol racémico de partida y la posterior reducción (selectiva) de la cetona intermedia formada. En estos casos, la alta selectividad demostrada por una sola de las enzimas favorece en gran medida la actuación de la segunda, permitiendo el desarrollo de un proceso de desracemización efectivo. Cabe destacar que este tipo de procesos pueden desarrollarse con enzimas purificadas,

¹⁸⁷ C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Synlett* **2010**, 991-998.

Capítulo 2. Antecedentes

siendo necesario un uso complementario de cofactores pirimidínicos, o bien empleando un único microorganismo que presente ambas actividades. Por ejemplo, Chadha y colaboradores lograron la desracemización de diferentes alcoholes alílicos quirales mediante el empleo de células enteras del microorganismo de *Candida parapsilosis* ATCC7330 (Esquema 2.10), en un proceso que transcurre en agua a 25 °C y en cortos tiempos de reacción.¹⁸⁸



Esquema 2.10. Desracemización de (3E)-4-arylbut-3-en-2-oles utilizando la levadura de *Candida parapsilosis*.

Aunque los alcoholes obtenidos en este tipo de procesos han presentado en muchos casos unos excesos enantioméricos altos, estos procesos de desracemización suele presentar limitaciones en cuanto a su extensión a un amplio número de sustratos, así como los problemas asociados a combinar procesos opuestos de oxidación y reducción, lo que afecta a la conversión y estereoselectividad del proceso global.

La combinación de lacasas^{27,30b,44a} con diferentes cantidades subestequiométricas del mediador oxi-radicalario TEMPO se ha presentado como un método oxidativo quimioenzimático aplicable a la oxidación de diferentes tipos de alcoholes,^{54a,189} como alifáticos,^{143a} bencílicos secundarios,^{107,156,190} alílicos,¹⁹¹ y propargílicos,¹⁹² utilizando medios acuosos y oxígeno como aceptor final de electrones. Además, esta transformación se ha acoplado con distintos procesos enzimáticos para lograr llevar a cabo la aminación de alcoholes racémicos¹⁵⁶ y la isomerización de alcoholes alílicos hacia los correspondientes compuestos

¹⁸⁸ (a) D. Titu, A. Chadha, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1698-1701; (b) T. Saravanan, R. Selvakumar, M. Doble, A. Chadha, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1360-1368.

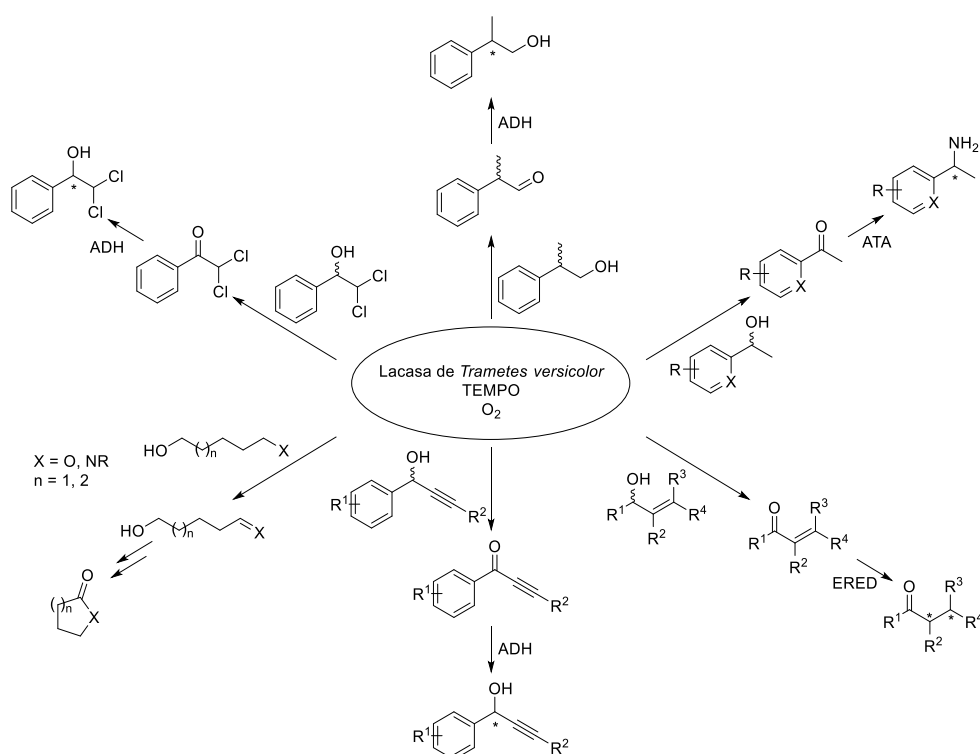
¹⁸⁹ M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, D. Macchitella, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7551-7553.

¹⁹⁰ L. Marx, N. Ríos-Lombardía, P. Süß, M. Höhne, F. Morís, J. González-Sabín, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 510-513.

¹⁹¹ L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 2413-2419.

¹⁹² (a) S. González-Granda, D. Méndez-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 520-527; (b) A. B. V. Silva, E. D. Silva, A. A. dos Santos, J. L. Princival, *Catal. Commun.* **2020**, *137*, 105946.

carbonílicos saturados.¹⁹¹ Asimismo, también se ha estudiado como primer paso en sistemas lineales para la desracemización de profenoles,¹⁹³ alcoholes bencílicos¹⁰⁷ y propargílicos,^{192a} combinándolo en procesos secuenciales con alcohol deshidrogenasas (Esquema 2.11).



Esquema 2.11. Procesos de oxidación quimioenzimática catalizados por el sistema LTv/TEMPO y su utilización en procesos multienzimáticos en cascada.

2.1.4. RELEVANCIA Y SÍNTESIS DE AMINAS ALÍLICAS ENANTIOENRIQUECIDAS

El empleo de amino transaminasas (ATAs) ha suscitado un gran interés en estos últimos años debido a la versatilidad que presentan este tipo de enzimas aplicadas a la síntesis de aminas quirales partiendo de cetonas proquirales. En concreto, la

¹⁹³ A. Díaz-Rodríguez, N. Ríos-Lombardía, J. H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, 5, 1443-1446.

Capítulo 2. Antecedentes

síntesis de aminas alílicas ha sido de gran interés a lo largo de las últimas décadas,¹⁹⁴ debido a la presencia de estas estructuras en numerosos compuestos biológicamente activos y en productos naturales, además de su uso como intermedios para la síntesis de otros compuestos de interés (Figura 2.1).¹⁹⁵

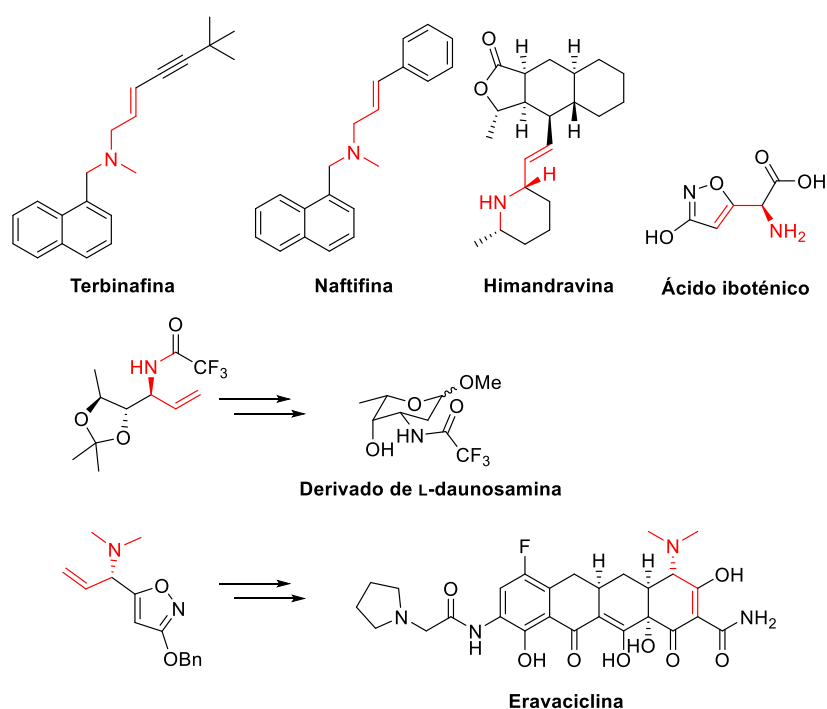


Figura 2.1. Ejemplos de diferentes aminas alílicas (quirales) de interés.

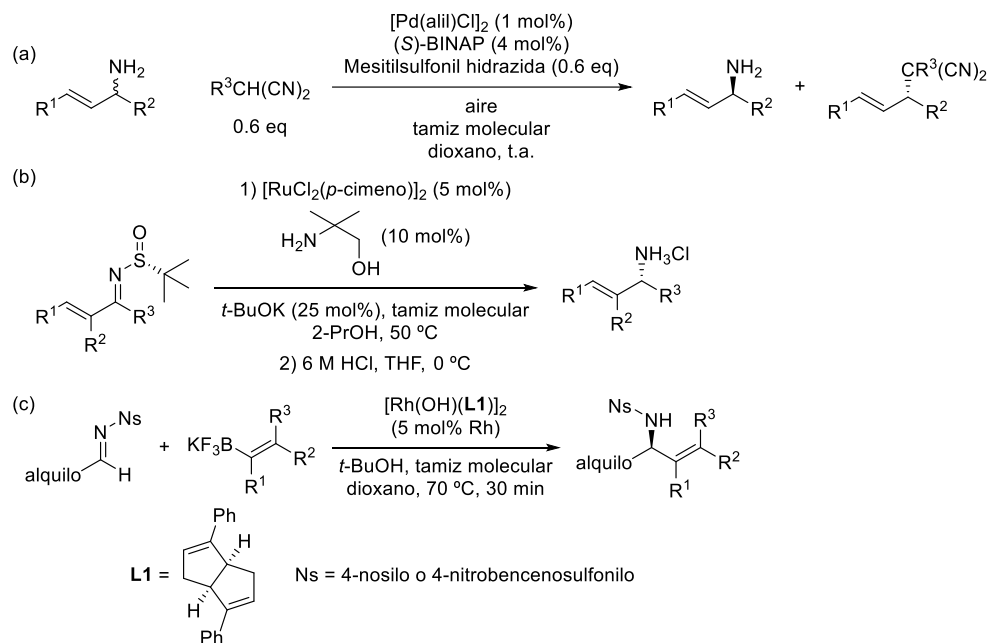
La presencia de un doble enlace C=C en este tipo de aminas les confiere una cierta versatilidad desde el punto de vista sintético, habiéndose demostrado que, a partir de este tipo de derivados, es posible llevar a cabo la síntesis de distintos compuestos nitrogenados de alto valor añadido.¹⁹⁶ En este contexto, la preparación

¹⁹⁴ (a) A. Lauren, P. Mison, A. Nafti, *Synthesis* **1983**, 685-700; (b) B. M. Trost, T. Zhang, J. D. Sieber, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 427-440.

¹⁹⁵ (a) A. Stütz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, *26*, 320-328; (b) U. Madsen, M. A. Dumpis, H. Braüner-Osborne, L. B. Piotrovsky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1563-1568; (c) S. Chackalamannil, R. Davies, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1427-1429; (d) D. A. Oliveira, D. G. Pereira, A. M. A. P. Fernandes, S. L. De Castro, A. R. M. Souza Brito, A. O. De Souza, N. Durán, *Parasitol. Res.* **2005**, *95*, 161-166; (e) G. K. Friestad, T. Jiang, A. K. Mathies, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 777-780; (f) A. Farwick, G. Helmchen, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1108-1111; (g) 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.

¹⁹⁶ (a) B. M. Trost, M. L. Crawley, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2921-2944; (b) S. Nag, S. Batra, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8959-9061; (c) E. M. Skoda, G. C. Davis, P. Wipf, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 26-34.

de aminas alílicas quirales derivadas de la estructura de la (3*E*)-4-amilbut-3-en-2-amina se ha estudiado a través de diferentes vías, como resoluciones cinéticas a través de reacciones de acilación¹⁹⁷ o alquilación (Esquema 2.12a),¹⁹⁸ o procesos de síntesis asimétrica a través de un reordenamiento de tipo Claisen,¹⁹⁹ olefinación de α -amino ésteres,²⁰⁰ hidrogenación de enaminas o reducción de *N*-sulfiniliminas (Esquema 2.12b),²⁰¹ hidroaminación de alenos,²⁰² alquienilación de iminas (Esquema 2.12c),²⁰³ azidación de ésteres alílicos²⁰⁴ y aminación enzimática de enlaces C–H,²⁰⁵ entre otros.



Esquema 2.12. Ejemplos de metodologías sintéticas aplicadas a la obtención de aminas alílicas quirales.^{198,201b,203}

¹⁹⁷ E. G. Klauber, N. Mittal, T. K. Shah, D. Seidel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2464-2467.

¹⁹⁸ Y. Wang, Y.-N. Xu, G.-S. Fang, H.-J. Kang, Y. Gu, S.-K. Tian, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5367-5371.

¹⁹⁹ T. G. Schenck, B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2058-2066.

²⁰⁰ A. R. Katritzky, D. Cheng, J. Li, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3438-3444.

²⁰¹ (a) T.-L. Liu, C.-J. Wang, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8416-8419; (b) E. Selva, Y. Sempere, D. Ruiz-Martínez, Ó. Pablo, D. Guijarro, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 13693-13699.

²⁰² K. Xu, Y.-H. Wang, V. Khakyzadeh, B. Breit, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3313-3316.

²⁰³ X.-W. Qian, Z.-J. Xue, Q. Zhao, Z. Cui, Y.-J. Chen, C.-G. Feng, G.-Q. Lin, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5601-5604.

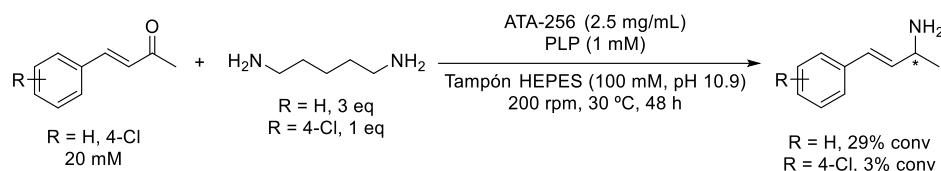
²⁰⁴ S.-I. Murahashi, Y. Taniguchi, Y. Imada, Y. Tanigawa, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3292-3303.

²⁰⁵ Z. Jia, S. Gao, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 10279-10283.

Capítulo 2. Antecedentes

Sin embargo, como se puede observar, la mayor parte de estos procesos requieren de la utilización de metales, disolventes orgánicos, condiciones drásticas y la necesidad de emplear grupos protectores, lo que implica la generación de cantidades importantes de residuos y con ello a procesos escasamente sostenibles. Por este motivo, el estudio de metodologías en condiciones de reacción más suaves, sin atmósfera protectora y donde se emplee agua como disolvente, ofrecen una alternativa interesante y respetuosa con el medio ambiente.

Por otra parte, la Biocatálisis puede aportar grandes mejoras a la preparación de aminas alílicas, especialmente en el desarrollo de procesos asimétricos. Desde el punto de vista biocatalítico, las aminas quirales se pueden obtener mediante la utilización de diferentes clases de enzimas como son las lipasas, amino transaminasas, amino oxidasas, amino deshidrogenasas, imino reductasas o aminosas reductoras, entre otras.²⁰⁶ En el caso de la síntesis estereoselectiva y biocatalítica de aminas alílicas, recientemente O'Reilly y colaboradores han estudiado la biotransaminación de dos (3*E*)-4-arilbut-3-en-2-onas empleando la cadaverina como donador de amino (ver *Sección 0.2.2.2* de la Introducción relacionada con el uso de *smart cosubstrates*), aunque las conversiones encontradas fueron muy bajas (3-29%, Esquema 2.13).²⁰⁷



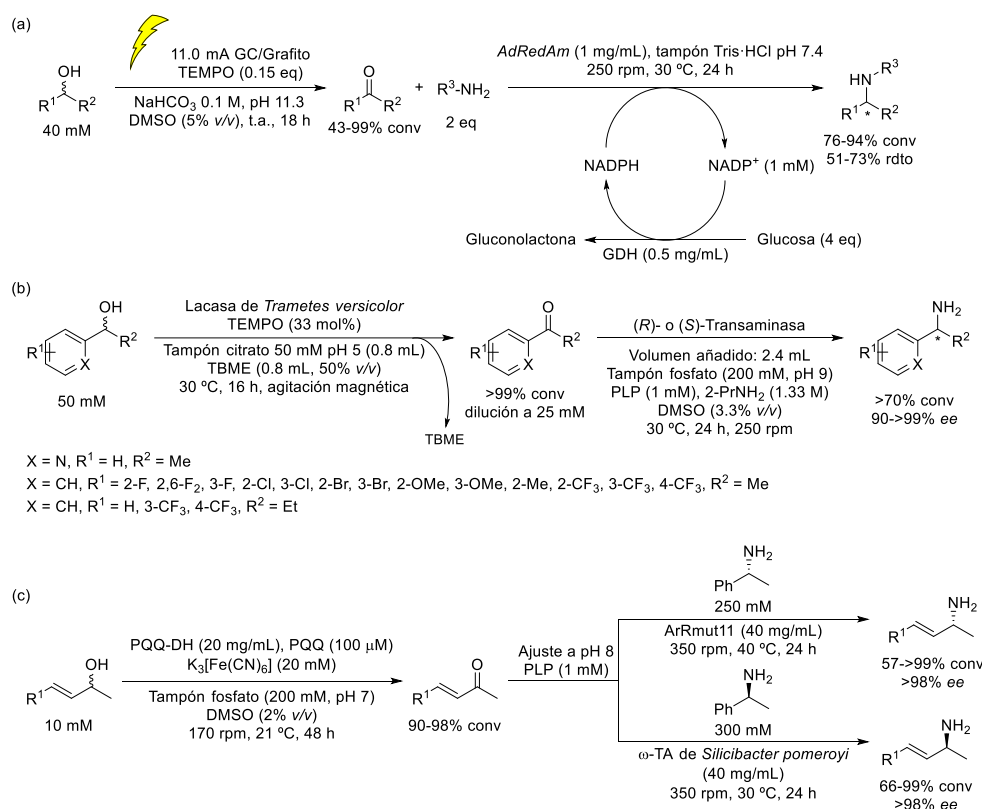
Esquema 2.13. Biotransaminación de la (3*E*)-4-arilbut-3-en-2-ona utilizando cadaverina como *smart cosubstrate*.

Por otra parte, la aminación estereoselectiva de alcoholes racémicos ha sido comúnmente abordada empleando aproximaciones quimio- o multienzimáticas, como por ejemplo el proceso desarrollado por Greaney y colaboradores, que lograron llevar a cabo la oxidación de diferentes alcoholes mediante el uso de TEMPO y un electrodo, para la posterior aminación enzimática de algunos de los compuestos carbonílicos intermedios utilizando una aminosasa reductora de

²⁰⁶ (a) D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, 57, 284-300; (b) G. Grogan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, 43, 15-22.

²⁰⁷ A. Gomm, S. Grigoriou, C. Peel, J. Ryan, N. Mujtaba, T. Clarke, E. Kulcinskaja, E. O'Reilly, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 5282-5284.

Ajellomyces dermatidis (AdRedAm, Esquema 2.14a).²⁰⁸ En este caso, entre los diferentes alcoholes estudiados se encontraron algunos alílicos, como por ejemplo el *trans*-alcohol cinamílico, el carveol, y dos derivados del ciclohex-2-en-1-ol.



Esquema 2.14. Procesos secuenciales de aminación (estereoselectiva) de alcoholes alílicos.

Otras aproximaciones han hecho uso de un sistema exclusivamente químico (NaOCl y AZADO)²⁰⁹ o quimioenzimático (sistema lacasa-mediador) para llevar a cabo el primer paso de oxidación.¹⁵⁶ En este contexto, nuestro grupo de investigación ha descrito un proceso secuencial en el cual se ha llevado a cabo en primer lugar la oxidación quimioenzimática de una serie de alcoholes secundarios racémicos mediada por la lacasa de *Trametes versicolor* en combinación con el TEMPO, para obtener diferentes acetofenonas, cuya biotransaminación catalizada por (*S*)- o (*R*)-ATAs condujo a las aminas ópticamente activas con excelente estereoselectividad

²⁰⁸ I. Peñafiel, R. A. W. Dryfe, N. J. Turner, M. F. Greaney, *ChemCatChem* **2021**, *13*, 864-867.

²⁰⁹ E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, F. Rebollo, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4768-4774.

Capítulo 2. Antecedentes

(Esquema 2.14b).¹⁵⁶ Este proceso se realizó en un recipiente abierto al aire, para tener una fuente permanente de oxígeno, ocurriendo con el tiempo la evaporación del cosolvente orgánico utilizado (TBME), que inicialmente ayudó a solubilizar el sustrato de partida. Debido a las distintas condiciones de reacción entre la lacasa y la ATA, fue necesario realizar un ajuste del pH del medio de reacción y por consiguiente de la concentración de sustrato, creando un entorno óptimo para el segundo paso enzimático.

Los procesos multienzimáticos descritos hasta la fecha para la síntesis asimétrica de aminas a partir de alcoholes, se basan principalmente en la combinación de un proceso de oxidación catalizado por una ADH para convertir dichos alcoholes en sus correspondientes cetonas, seguido de un segundo paso de aminación empleando amino transaminasas²¹⁰ o amino deshidrogenasas.^{108,211} Más recientemente, Kroutil y colaboradores han desarrollado una estrategia secuencial para llevar a cabo la aminación estereoselectiva de cuatro alcoholes alílicos con conversiones variables (57->99%) y excelentes estereoselectividades, mediante la biooxidación de los mismos utilizando la deshidrogenasa dependiente de pirroloquinolina quinona procedente de *Devosia mutans* (PQQ-DH), y ferrocianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$), seguida de un segundo paso de biotransaminación catalizado por diferentes amino transaminasas (Esquema 2.14c).²¹²

²¹⁰ (a) K. Tauber, M. Fuchs, J. H. Sattler, J. Pitzer, D. Pressnitz, D. Koszelewski, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4030-4035; (b) A. Lerchner, S. Achatz, C. Rausch, T. Haas, A. Skerra, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3374-3383.

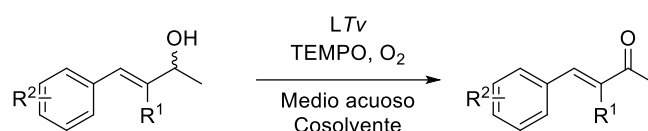
²¹¹ (a) F.-F. Chen, Y.-Y. Liu, G.-W. Zheng, J.-H. Xu, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 3838-3841; (b) M. P. Thompson, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 3833-3836; (c) W. Böhmer, T. Knaus, F. G. Mutti, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 731-735; (d) J. Liu, Z. Li, *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116*, 536-542; (e) J. A. Houwman, T. Knaus, M. Costa, F. G. Mutti, *Green Chem.* **2019**, *21*, 3846-3857.

²¹² S. Gandomkar, R. Rocha, F. A. Sorgenfrei, L. Martínez-Montero, M. Fuchs, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2021**, *13*, 1290-1293.

OBJETIVOS

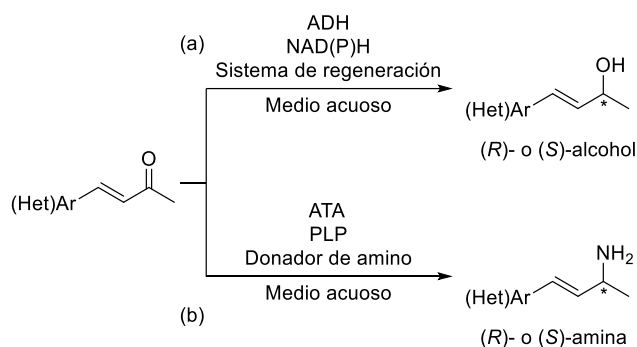
Capítulo 2. Objetivos

Como ya se ha destacado en la Introducción general (*Sección 0.3*), el desarrollo de procesos sintéticos en un solo recipiente (*one-pot*), tanto quimioenzimáticos²¹³ como multienzimáticos,²¹⁴ es sumamente interesante para la obtención de alcoholes y aminas alílicas quirales. El primer paso común a ambas investigaciones consiste en llevar a cabo la oxidación de los (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles racémicos a las correspondientes cetonas proquirales α,β -insaturadas utilizando una metodología previamente descrita en nuestro grupo de investigación,¹⁹¹ como es la utilización del sistema quimioenzimático conformado por la lacasa de *Trametes versicolor* (LTV) y el mediador químico de tipo N-oxilo TEMPO (Esquema 2.15).



Esquema 2.15. Oxidación quimioenzimática de diferentes (3*E*)-4-arilbut-3-en-2-oles.

Posteriormente, se estudiarán de manera independiente los procesos de biorreducción y biotransaminación sobre las cetonas α,β -insaturadas intermedias obtenidas en el paso de oxidación quimioenzimática (Esquema 2.16).²¹⁵



Esquema 2.16. Procesos secuenciales para la obtención de: (a) (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles, y (b) (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-aminas quirales.

²¹³ (a) S. Sgalla, G. Fabrizi, R. Cirilli, A. Macone, A. Bonamore, A. Boffi, S. Cacchi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2791-2796; (b) M. Kraußer, W. Hummel, H. Gröger, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5175-5179.

²¹⁴ (a) Y.-C. Liu, Z.-L. Wu, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1158-1161; (b) Y.-C. Liu, C. Guo, Y. Liu, H.-B. Wang, Z.-L. Wu, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2562-2568.

²¹⁵ Nótese que la numeración de algunos compuestos idénticos ha cambiado en ambas partes de este capítulo para adaptarla a la numeración de los dos artículos de investigación incluidos en este capítulo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se describe el desarrollo de dos procesos bienzimáticos secuenciales que se han recogido de manera independiente en dos artículos de investigación, el primero describe el uso de lacasas y alcohol deshidrogenasas²¹⁶ y en el segundo se emplean amino transaminasas junto con lacasas.²¹⁷ Así, primeramente, se expone la optimización de un proceso quimioenzimático para llevar a cabo la oxidación de (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles racémicos hacia las correspondientes cetonas proquirales α,β -insaturadas utilizando el sistema conformado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el mediador radicalario TEMPO. Tras ello, se estudiarán de manera independiente los procesos de biorreducción y biotransaminación de las (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-onas, utilizando ADHs o ATAs estereoselectivas. Finalmente, se describe el estudio y optimización de los procesos secuenciales involucrando la oxidación quimioenzimática y la segunda biotransformación, para la obtención de (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles y (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-aminas de manera enantioenriquecida.

2.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS (3*E*)-4-ARILBUT-3-EN-2-OLES RACÉMICOS 1*a-p*

Dado que muchos de los sustratos de partida no se encontraban disponibles comercialmente o sus precios eran altos, fue necesario llevar a cabo la síntesis de los mismos, a excepción de la (3*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ona (**2a**), que era comercial y de bajo coste económico. Así, las diferentes cetonas **2b-p** se prepararon mediante una reacción de condensación de Claisen-Schmidt previamente descrita (54-94%, Esquema 2.17a).²¹⁸ Sin embargo, y de modo complementario, se desarrolló la síntesis de estas cetonas **2b-p** mediante un procedimiento descrito por List y colaboradores empleando una sal de morfolinio (Esquema 2.17b), obteniéndose en general mejores rendimientos (59-96%).²¹⁹ Tras ello, los alcoholes alílicos racémicos **1a-p** fueron preparados mediante la aplicación de un procedimiento sencillo de reducción, utilizando borohidruro de sodio (NaBH₄) como agente reductor, en una mezcla de metanol y agua (46-99%, Esquema 2.17c).²¹⁸

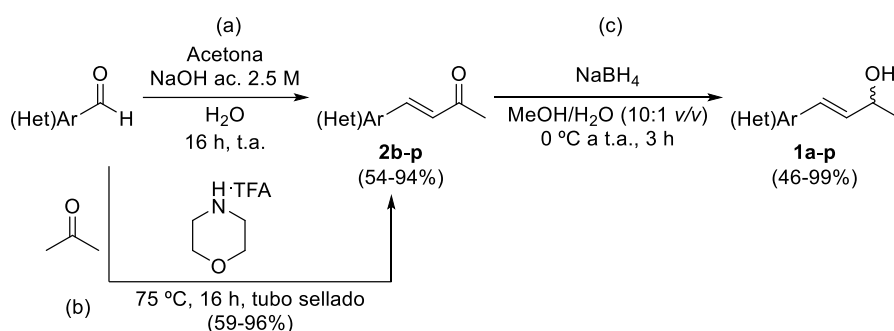
²¹⁶ J. Albarrán-Velo, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Mol. Catal.* **2020**, 493, 111087.

²¹⁷ J. Albarrán-Velo, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *ChemBioChem* **2020**, 21, 200-211.

²¹⁸ W. Gładkowski, A. Skrobiszewski, M. Mazur, M. Siepka, A. Pawlak, B. Obmińska-Mrukowicz, A. Białońska, D. Poradowski, A. Drynda, M. Urbaniak, *Tetrahedron* **2013**, 69, 10414-10423.

²¹⁹ K. Zumbansen, A. Döhring, B. List, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 1135-1138.

Capítulo 2. Resultados y discusión



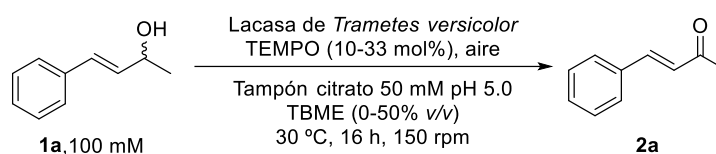
Esquema 2.17. Síntesis de las cetonas **2b-p** y los alcoholes alifáticos racémicos **1a-p**.

2.3.2. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LOS ALCOHOLES RACÉMICOS **1a-p** EMPLEANDO LA LACASA DE *TRAMETES VERSICOLOR* Y EL MEDIADOR QUÍMICO TEMPO

Tras haber sintetizado los sustratos de partida **1a-p**, el siguiente paso fue llevar a cabo el estudio de su oxidación quimioenzimática, eligiéndose para ello el sistema *LTv*/TEMPO, tomando como sustrato modelo el (3*E*)-4-fenilbut-3-en-2-ol (**1a**). En base a resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación,^{107,143a} inicialmente se estudió esta reacción con una cierta cantidad de TBME como cosolvente orgánico (Tabla 2.1). La utilización de este cosolvente en concreto fue debida a que la actividad de la lacasa de *Trametes versicolor* se mantiene en presencia de este, y favorece la solubilidad del sustrato. Además, este tipo de procesos requieren de tiempos de reacción relativamente largos, del orden usualmente de las 16 horas, y puesto que se realizó en un recipiente abierto para que no hubiera una limitación de oxígeno, el cosolvente orgánico acabó evaporándose a lo largo de este tiempo.

Tras probar diferentes concentraciones de sustrato, se observó que el valor óptimo para llevar a cabo esta transformación era de 100 mM. Además, se empleó una cantidad de TEMPO del 33 mol% con respecto al alcohol, y 4.6 unidades de la lacasa de *Trametes versicolor*, en un sistema bifásico consistente en una disolución tampón de citrato de concentración 50 mM y pH 5, y de un 50% v/v de TBME. Tras 16 horas a 30 °C y utilizando agitación magnética, se alcanzó una conversión completa hacia la cetona **2a** (entrada 1, Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Oxidación del alcohol **1a** con el sistema LTv/TEMPO variando las cantidades de mediador y cosolvente orgánico.



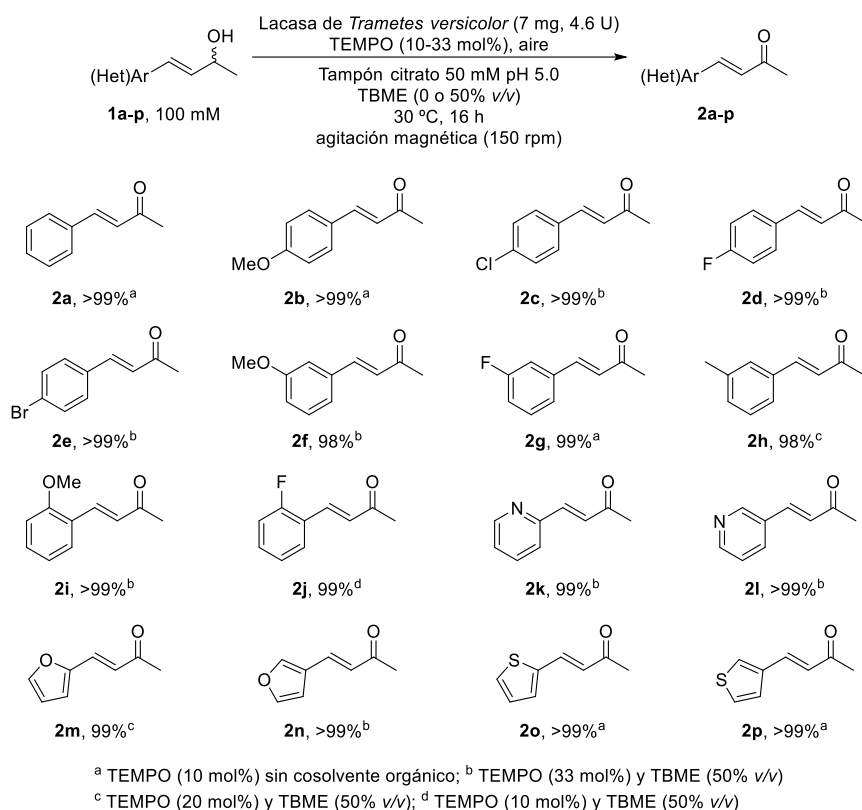
Entrada	TEMPO (mol%)	TBME (% v/v)	2a (%) ^a
1	33	50	>99
2	33	20	>99
3	33	-	>99
4	20	50	>99
5	10	50	>99
6	10	-	>99

^a Valores de conversión medidos por cromatografía de gases.

En este punto, se estudió la influencia en este proceso por parte del cosolvente y el mediador, empleando diversas cantidades de los mismos (0-50% v/v y 10-33 mol%, respectivamente), fijando una velocidad de agitación magnética óptima de en torno a 150 rpm, observándose en todos los casos conversiones cuantitativas. Aunque pueda considerarse una variable de escasa importancia, en esta reacción la agitación jugó un papel fundamental, dado que una alta agitación del medio condujo a que parte del sustrato de partida se proyectara hacia las paredes del recipiente, produciéndose consiguientemente una disminución en los valores de conversión en la oxidación. Sin embargo, alrededor de 150 rpm, el medio de reacción se mantuvo más homogéneo y los valores de conversión observados fueron mayores que los alcanzados a otras velocidades. En cuanto a la reactividad del sistema lacasa-TEMPO cabe destacarse que incluso sin adicionar TBME (entradas 3 y 6) y usando solo un 10 mol% de TEMPO (entradas 5-6), se obtuvo una conversión completa hacia la cetona **2a**.

Disminuir la cantidad de TEMPO o de cosolvente orgánico en la oxidación del resto de los sustratos estudiados condujo en algunos casos a una disminución de los valores de conversión. Por este hecho, se realizó una optimización de las condiciones de reacción para cada uno de los alcoholes **1b-p**, destacando en el Esquema 2.18 las condiciones en las que se obtuvieron conversiones cuantitativas a menor cantidad de TEMPO (10-33 mol%) y TBME (0-50% v/v).

Capítulo 2. Resultados y discusión



Esquema 2.18. Proceso de oxidación quimioenzimático de los alcoholes alílicos **1a-p** empleando el sistema catalítico formado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el mediador radicalario TEMPO.

2.3.3. DESRACEMIZACIÓN LINEAL DE LOS (3E)-4-(HET)ARILBUT-3-EN-2-OLES **1a-p**

Este estudio se realizó en dos pasos: el primero de ellos comprendió el análisis de la reacción de biorreducción de las cetonas **2a-p**, y una vez identificadas las mejores enzimas en términos de actividad y selectividad, se procedió a estudiar en segundo lugar los procesos globales de desracemización. Para ello, se combinaron en un proceso secuencial la oxidación quimioenzimática de los alcoholes **1a-p** con la biorreducción de las correspondientes cetonas intermedias.

2.3.3.1. Biorreducción de las (3E)-4-(het)arilbut-3-en-2-onas 2a-p

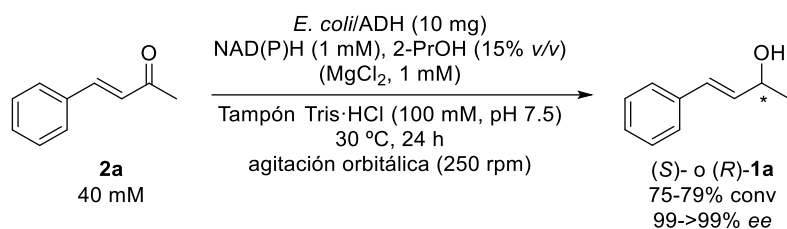
Tras haber optimizado de forma satisfactoria el primer paso del proceso de desracemización, se llevó a cabo el estudio de la biorreducción de las diferentes cetonas α,β -insaturadas proquirales. En primer lugar, se tomó la cetona **2a** como sustrato modelo para realizar un cribado con varios biocatalizadores, utilizando diferentes ADHs sobreexpresadas en *Escherichia coli*, como fueron las provenientes de:

- *Rhodococcus ruber* (ADH-A),⁶⁶ *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TeSADH),⁶⁸ *Thermoanaerobacter species* (ADH-T),⁶⁷ *Ralstonia species* (RasADH)⁷⁰ y *Sphingobium yanoikuyae* (SyADH),^{70b,71} de preferencia Prelog.
- *Lactobacillus brevis* (LBADH),⁷² así como la ADH comercial evo-1.1.200,⁷³ ambas de selectividad anti-Prelog.

Tras varias pruebas preliminares con las diferentes ADHs, se concluyó que las que mejores resultados arrojaban, tanto en términos de conversión como estereoselectividad, eran la ADH-A y la ADH-T para obtener el isómero (*S*)-**1a**, y la LBADH para dar lugar al enantiómero (*R*)-**1a**.

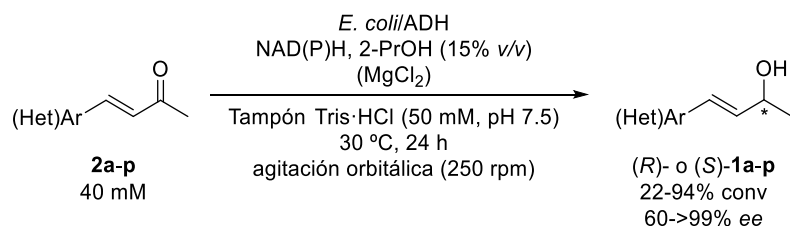
Tras ello, se llevaron a cabo variaciones de las distintas condiciones de reacción, incluyendo la cantidad de isopropanol (2-propanol, 2-PrOH) empleada para el sistema de regeneración del cofactor (5-20% *v/v*), la concentración de sustrato inicial (10-40 mM) y la carga de enzima (10-15 mg de células de *E. coli* liofilizadas). Una vez hecho el estudio, se observó que había que buscar un compromiso entre la conversión y la estereoselectividad del proceso pues al utilizar mayores cantidades de 2-PrOH se mejoraba la conversión, pero disminuía la enantioselectividad. Por este motivo, se decidió utilizar unas condiciones de reacción que dieran lugar a una situación intermedia, estableciéndose como condiciones óptimas las mostradas en el Esquema 2.19.

Capítulo 2. Resultados y discusión



Esquema 2.19. Condiciones óptimas para la biorreducción de **2a**.

Tras establecer las condiciones óptimas para el sustrato modelo **2a**, se extendió el proceso de reducción estereoselectiva catalizado por las ADHs al resto de cetonas α,β -insaturadas previamente sintetizadas (Tabla 2.2), obteniéndose los diferentes alcoholes quirales de configuración *R* o *S*, generalmente con conversiones entre el 60-80% y buenos *ee*.

Tabla 2.2. Biorreducción de las cetonas **2a-p** (40 mM) catalizada por ADHs.


Entrada	Cetona	LBADH (c / ee %) ^{a,b}	ADH-T (c / ee %) ^{a,b}	ADH-A (c / ee %) ^{a,b}
1	C ₆ H ₅ (a)	75 / >99 (R)	77 / >99 (S)	79 / >99 (S)
2	4-OMe-C ₆ H ₄ (b)	51 / 70 (R)	50 / 60 (S)	49 / 60 (S)
3	4-Cl-C ₆ H ₄ (c)	77 / 92 (R)	77 / 94 (S)	77 / 99 (S)
4	4-F-C ₆ H ₄ (d)	70 / 94 (R)	75 / 96 (S)	70 / 96 (S)
5	4-Br-C ₆ H ₄ (e)	78 / 94 (R)	29 / 94 (S)	78 / 94 (S)
6	3-OMe-C ₆ H ₄ (f)	78 / 93 (R)	51 / 93 (S)	75 / 94 (S)
7	3-F-C ₆ H ₄ (g)	79 / 98 (R)	83 / 99 (S)	80 / 99 (S)
8	3-Me-C ₆ H ₄ (h)	72 / 95 (R)	37 / 95 (S)	69 / 96 (S)
9	2-OMe-C ₆ H ₄ (i)	56 / 88 (R)	22 / 90 (S)	60 / 90 (S)
10	2-F-C ₆ H ₄ (j)	80 / 99 (R)	83 / 99 (S)	81 / 99 (S)
11	2-Piridil (k)	94 / 99 (R)	88 / >99 (S)	93 / >99 (S)
12	3-Piridil (l)	89 / 99 (R)	86 / 99 (S)	89 / 99 (S)
13	2-Furil (m)	67 / 86 (R)	69 / 82 (S)	64 / 82 (S)
14	3-Furil (n)	64 / 90 (R)	66 / 90 (S)	61 / 90 (S)
15	2-Tiofenil (o)	66 / 76 (R)	67 / 78 (S)	64 / 78 (S)
16	3-Tiofenil (p)	66 / 88 (R)	66 / 86 (S)	63 / 93 (S)

^a Valores de conversión medidos por cromatografía de gases.

^b Valores de exceso enantiomérico medidos por cromatografía de gases tras derivatización de los crudos de reacción con anhídrido acético. El enantiómero mayoritario aparece entre paréntesis.

Cabe destacarse que en el caso de los sustratos derivados de piridina (entradas 11 y 12), los valores de conversión fueron incluso superiores que en el caso del sustrato modelo, conservando altos valores de estereoselectividad. Sin embargo, hay que recalcar que la biorreducción de las cetonas heteroaromáticas con restos de furano o tiofeno transcurrió con menores conversiones y selectividades (entradas 13-16). Estos cuatro sustratos, los derivados de furano y tiofeno, fueron estudiados por

Capítulo 2. Resultados y discusión

separado en mayor profundidad, variando tanto la concentración del sustrato (25-40 mM) como la cantidad de 2-PrOH (10-15% v/v), sin obtener resultados mucho más satisfactorios, por lo que los procesos secuenciales posteriores se realizaron en las condiciones establecidas como óptimas para todos los demás sustratos.

La configuración absoluta de los alcoholes fue determinada en base a conocimientos previos, como son la estereoselectividad conocida de las alcohol deshidrogenasas empleadas y a las condiciones analíticas de CG o HPLC en fase quiral descritas previamente en la bibliografía consultada.^{213a,220}

2.3.3.2. Desracemización de los (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles **1a-p**

Tras haber estudiado las dos etapas de reacción por separado y obtener resultados satisfactorios, se estudió la posibilidad de llevar a cabo la desracemización de los diferentes (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles racémicos **1a-p** mediante un proceso secuencial, constituido por un primer paso de oxidación quimioenzimática mediado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el TEMPO hacia las cetonas α,β -insaturadas **2a-p**, y un segundo paso de biorreducción estereoselectiva de estas cetonas intermedias empleando una ADH.

En este proceso de desracemización hay que tener en cuenta un factor importante, y es que tanto el sustrato de partida como el producto final son el mismo, por este motivo es muy importante que las conversiones del primer paso de oxidación sean completas, o bien, muy elevadas, pues la oxidación parcial del alcohol racémico conduciría a un descenso apreciable del exceso enantiomérico final.

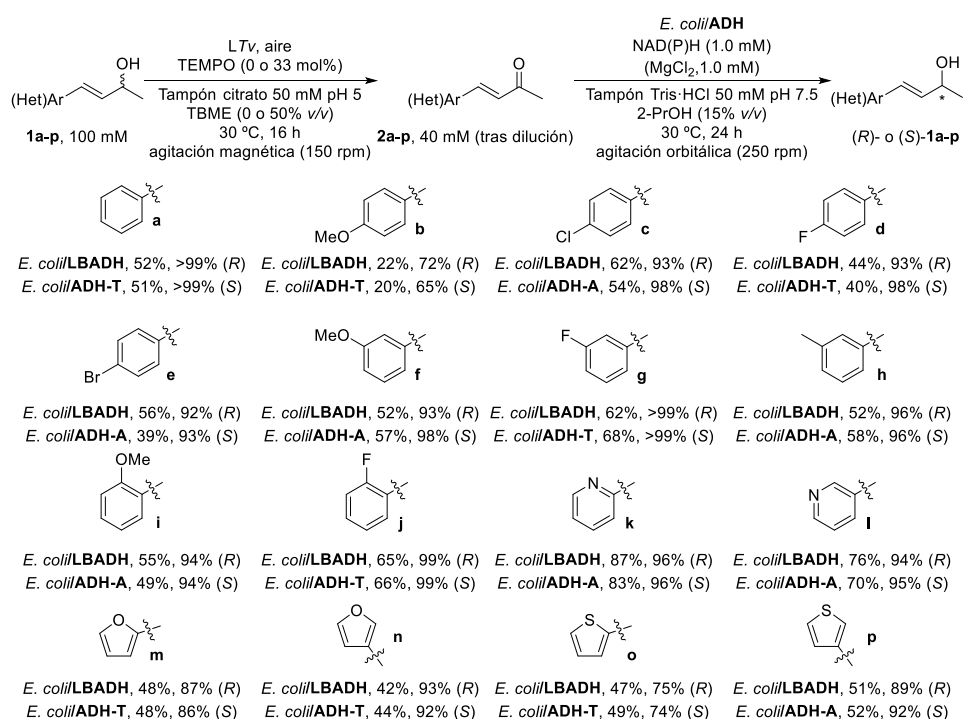
Como se ha mostrado en el Esquema 2.18, el proceso de oxidación quimioenzimático alcanzó valores por encima del 98% de conversión, lo que favoreció en gran medida que se obtuvieran los productos de manera muy estereoselectiva al desarrollar el proceso secuencial de desracemización. Una vez completado el primer paso de oxidación, y tras las modificaciones pertinentes para generar un medio favorable para las ADHs (concentración y pH), se llevó a cabo el siguiente paso de biorreducción. En concreto, estas modificaciones se basaron en:

²²⁰ (a) C. Quirin, U. Kazmaier, *Synthesis* **2009**, 1725-1731; (b) T. Nishihara, A. Shiomi, S. Kadotani, T. Nokami, T. Itoh, *Green Chem.* **2017**, *19*, 5250-5256.

Capítulo 2. Resultados y discusión

- la dilución del medio de reacción con una disolución tampón ligeramente básica, con el objetivo de disminuir la concentración del sustrato (haciéndola favorable para la correspondiente ADH)
- aumentar el pH del medio de reacción a un valor ligeramente por encima de 7 (favorable para la actividad catalítica de las ADHs)
- adición de 2-PrOH como cosustrato para el sistema de regeneración del cofactor requerido en la biorreducción, así como del cofactor necesario.

En el Esquema 2.20 se muestran los valores obtenidos en este proceso secuencial de desracemización lineal, aislándose los alcoholes tras columna cromatográfica (20-87% rdto) con purezas ópticas muy variadas (65->99% *ee*).

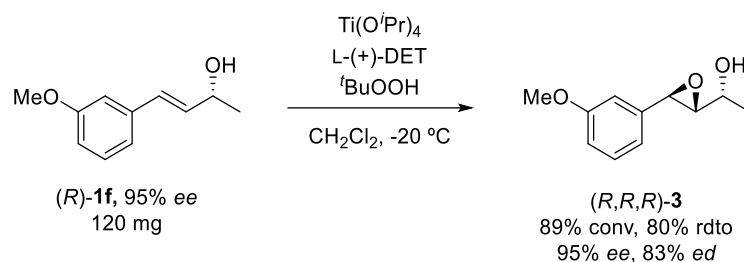


Esquema 2.20. Proceso de desracemización de los alcoholes alílicos **1a-p** incluyendo rendimientos aislados y excesos enantioméricos después de columna cromatográfica.

Los alcoholes alílicos quirales pueden tener actividades biológicas interesantes, pero también pueden utilizarse como sustratos de partida para preparar diferentes productos quirales de interés, dadas las posibilidades que ofrecen el enlace C=C y el grupo alcohol que poseen, pudiendo obtenerse productos de hasta tres centros

Capítulo 2. Resultados y discusión

quirales contiguos. Por ello, y tras una revisión bibliográfica, se decidió realizar el proceso secuencial para obtener el alcohol (*R*)-**1f** a escala preparativa (1 mmol). Una vez purificado, se llevó a cabo un segundo paso sintético de epoxidación en las condiciones de Sharpless para obtener el derivado **3** (Esquema 2.21), que se trata de un precursor adecuado para la preparación de compuestos análogos de productos naturales biológicamente activos, como la briostatina 1, utilizada como fármaco contra la enfermedad de Alzheimer, o la anfotericina B, empleada como compuesto antifúngico.²²¹



Esquema 2.21. Síntesis del epóxido **3** de interés farmacológico a partir del precursor (*R*)-**1f** obtenido a través del proceso secuencial descrito en este capítulo.

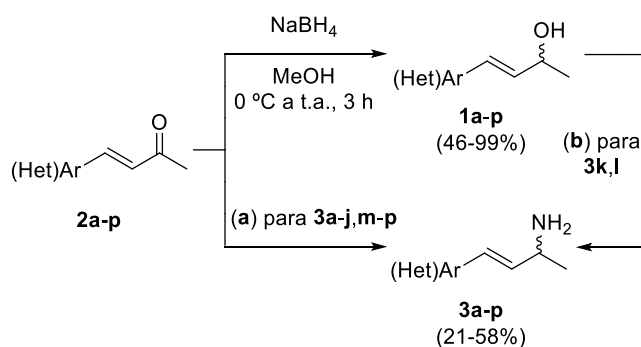
2.3.4. AMINACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE LOS ALCOHOLES *1a-p*

Este estudio se dividió en tres partes, comenzando por la síntesis de las aminas racémicas **3a-p** con el fin de desarrollar métodos analíticos robustos que nos permitieran llevar a cabo un seguimiento de los procesos quimioenzimáticos. A continuación, se estudió la biotransaminación de las cetonas **2a-p**, y tras encontrar las ATAs más activas y selectivas, se pasó a desarrollar los procesos globales de aminación de los alcoholes racémicos **1a-p**, tras combinar este último estudio enzimático con el proceso de oxidación de los alcoholes **1a-p**, ya descrito anteriormente.

²²¹ D. A. Evans, J. A. Gauchet-Prunet, E. M. Carreira, A. B. Charette, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 741-750.

2.3.4.1. Síntesis de las aminas alílicas racémicas 3a-p

Una vez sintetizadas tanto las cetonas proquirales **2a-p** como los alcoholes alílicos racémicos de partida **1a-p** (Sección 2.3.1), fue necesario llevar a cabo la síntesis de las correspondientes aminas alílicas racémicas, las (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-aminas (**3a-p**), a modo de patrón analítico para el posterior análisis de las reacciones enzimáticas a través de la cromatografía de gases o HPLC (Esquema 2.22).



- (a): 1. NaOH, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, EtOH/ H_2O , 16 h, t.a. 2. Zn, EtOH, AcOH, 100 °C, 2 h
 (b): 1. H_2SO_4 conc, MeCN seco, Na_2SO_4 , 0 °C a t.a., 24 h. 2. HCl 6 M, 80 °C, 16 h

Esquema 2.22. Síntesis química de las aminas racémicas **3a-p**.

Para la gran mayoría de las aminas, a excepción de los derivados de piridina **3k** y **3l**, se llevó a cabo la preparación de las mismas mediante un intermedio oxima sintetizado a partir de las correspondientes cetonas α,β -insaturadas y posterior reducción con zinc y ácido acético en etanol (21-54%, Esquema 2.22a).¹⁹⁹ En el caso de los derivados de piridina (**3k** y **3l**), este proceso no fue factible, por lo que se tuvo que desarrollar un procedimiento alternativo para la obtención de dichas aminas, partiendo de los correspondientes alcoholes alílicos.²²² Así, en presencia de acetonitrilo fue posible llevar a cabo un proceso de amidación para obtener las amidas alílicas, que posteriormente se hidrolizaron en medio fuertemente ácido, recuperando las aminas alílicas de interés tras un proceso de extracción ácido-base (47-58%, Esquema 2.22b).

Por otra parte, dado que el desarrollo de la oxidación quimioenzimática mediada por el sistema conformado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el mediador

²²² F. Messina, M. Botta, F. Corelli, M. P. Schneider, F. Fazio, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3767-3769.

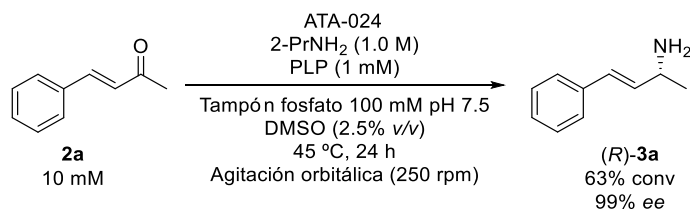
Capítulo 2. Resultados y discusión

radicalario TEMPO para los alcoholes alílicos **1a-p** fue estudiado en la *Sección 2.3.2* de este capítulo, no se llevó a cabo una optimización más profunda de la misma. De esta forma, se procedió a continuación con el estudio de la biotransaminación de las cetonas proquirales α,β -insaturadas **2a-p**, así como el estudio del proceso bienzimático secuencial para obtener las aminas alílicas ópticamente activas.

2.3.4.2. Biotransaminación de las (3E)-4-(het)arilbut-3-en-2-onas

Para la obtención de las distintas aminas alílicas quirales se hizo necesario desarrollar un método enzimático basado en la biotransaminación de las cetonas insaturadas proquirales **2a-p**. Para ello, en primer lugar, se estudió esta reacción con la (3E)-4-fenilbut-3-en-2-ona, como sustrato modelo, utilizando distintas ATAs comerciales y llevando a cabo una optimización de las condiciones de reacción.

En un principio se eligió la transaminasa comercial ATA-024, ya que pruebas anteriores llevadas a cabo en nuestro grupo de investigación establecieron que era una enzima que aceptaba 2-propilamina como donador de amino, lo que simplificaba la ejecución del proceso enzimático. Tras un exhaustivo estudio de las condiciones de reacción en el cual se modificaron diferentes variables influyentes en la actividad enzimática (temperatura, concentración del sustrato y cofactor, cantidad de enzima, tiempo de reacción...), se concluyó que las mejores fueron aquellas que se detallan en el Esquema 2.23. De esta forma, se obtuvo la amina (R)-**3a** con una conversión máxima del 63% y un exceso enantiomérico excelente (99% *ee*).



Esquema 2.23. Condiciones óptimas encontradas para el proceso de biotransaminación de la (3E)-4-fenilbut-3-en-2-ona utilizando la ATA-024.

Capítulo 2. Resultados y discusión

Tras establecer las condiciones óptimas para el proceso de biotransaminación, se extendió la metodología estudiada al resto de cetonas proquirales previamente sintetizadas, llegando a obtenerse ambos enantiómeros de las diferentes aminas alílicas quirales **3a-p** (Tabla 2.3), generalmente con conversiones moderadas (15-89%) y estereoselectividades excelentes (99->99% *ee*). La configuración absoluta de las aminas fue determinada en base a conocimientos previos: la estereoselectividad de las transaminasas empleadas y bibliografía previamente consultada.^{201a}

Capítulo 2. Resultados y discusión

Tabla 2.3. Extensión de la reacción de biotransaminación con los sustratos **2a-p**.

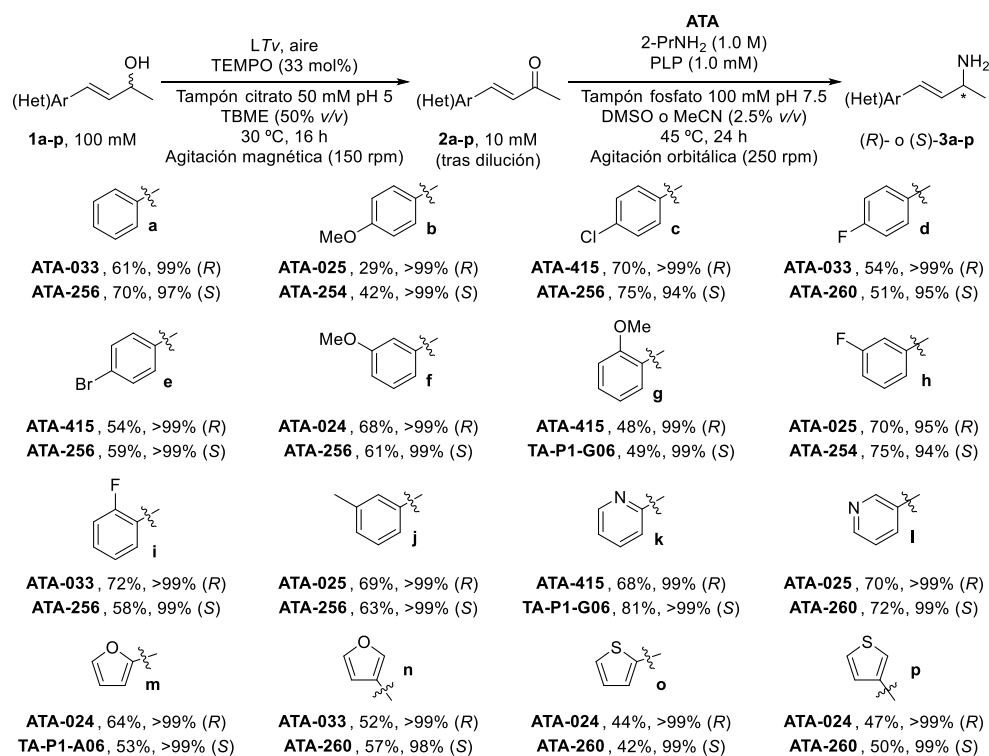
Entrada	Cetona	Transaminasa	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	C ₆ H ₅ (a)	ATA-033	56	99 (<i>R</i>)
2		ATA-256	57	>99 (<i>S</i>)
3	4-OMe-C ₆ H ₄ (b)	ATA-025	42	>99 (<i>R</i>)
4		ATA-254	39	>99 (<i>S</i>)
5	4-Cl-C ₆ H ₄ (c)	ATA-415	45	>99 (<i>R</i>)
6		ATA-256	42	99 (<i>S</i>)
7	4-F-C ₆ H ₄ (d)	ATA-033	50	>99 (<i>R</i>)
8		ATA-254	49	>99 (<i>S</i>)
9	4-Br-C ₆ H ₄ (e)	ATA-033	38	>99 (<i>R</i>)
10		ATA-254	43	>99 (<i>S</i>)
11	3-OMe-C ₆ H ₄ (f)	ATA-024	34	>99 (<i>R</i>)
12		ATA-256	38	99 (<i>S</i>)
13	2-OMe-C ₆ H ₄ (g)	ATA-415	15	99 (<i>R</i>)
14		TA-P1-G06	23	99 (<i>S</i>)
15	3-F-C ₆ H ₄ (h)	ATA-025	56	>99 (<i>R</i>)
16		ATA-254	59	>99 (<i>S</i>)
17	2-F-C ₆ H ₄ (i)	ATA-033	77	>99 (<i>R</i>)
18		ATA-256	76	>99 (<i>S</i>)
19	3-Me-C ₆ H ₄ (j)	ATA-025	32	>99 (<i>R</i>)
20		ATA-256	39	>99 (<i>S</i>)
21	2-Piridil (k)	ATA-415	59	>99 (<i>R</i>)
22		TA-P1-G06	89	>99 (<i>S</i>)
23	3-Piridil (l)	ATA-024	82	>99 (<i>R</i>)
24		ATA-260	76	99 (<i>S</i>)
25	2-Furil (m)	ATA-024	56	>99 (<i>R</i>)
26		TA-P1-A06	57	>99 (<i>S</i>)
27	3-Furil (n)	ATA-033	56	>99 (<i>R</i>)
28		ATA-260	60	98 (<i>S</i>)
29	2-Tiofenil (o)	ATA-024	57	>99 (<i>R</i>)
30		ATA-260	58	99 (<i>S</i>)
31	3-Tiofenil (p)	ATA-024	63	>99 (<i>R</i>)
32		ATA-260	63	99 (<i>S</i>)

^a Valores de conversión medidos por cromatografía de gases.

^b Valores de exceso enantiomérico medidos por cromatografía de gases tras derivatización de los crudos de reacción con anhídrido acético. El enantiómero mayoritario aparece entre paréntesis.

2.3.4.3. Estudio del proceso secuencial de aminación estereoselectiva

Una vez optimizadas las condiciones de reacción para los procesos individuales de oxidación quimioenzimática y de biotransaminación, se estudió la posibilidad de acoplar ambos en un mismo recipiente de manera secuencial, ya que por estudios previos en el grupo de investigación sabíamos de la imposibilidad de realizar ambos pasos de manera concurrente.¹⁵⁶ Así, tras llevar a cabo el primer proceso de oxidación del alcohol, se realizó un ajuste del pH del medio de reacción mediante una dilución del medio con una disolución básica para posibilitar la biotransaminación (Esquema 2.24). De esta forma, se consiguió aumentar el pH hasta un valor cercano a 7.5, a la par que disminuir la concentración de la cetona insaturada hasta aproximadamente 10 mM, ambos valores óptimos para la transaminación.



Esquema 2.24. Aminación estereoselectiva de los alcoholes alílicos **1a-p** incluyendo rendimientos aislados y excesos enantioméricos después de un proceso de extracción ácido-base (excepto derivados **3k** y **3l**, tras columna cromatográfica).

Capítulo 2. Resultados y discusión

Este proceso secuencial quimioenzimático se extendió a los 16 alcoholes alílicos racémicos, aislándose las correspondientes parejas de enantiómeros de las aminas alílicas quirales, con unos valores de rendimiento aislado de entre el 29 y el 81%, y *ee* muy altos, superiores al 93%. Finalmente, se llevó a cabo una serie de procesos secuenciales de aminación a escala semipreparativa (0.16 mmol) para obtener las aminas (*R*)-**3a**, (*S*)-**3b**, (*S*)-**3g** y (*R*)-**3o** de manera enantiopura y con rendimientos aislados moderados (42-61%, 99->99% *ee*).

CONCLUSIONES

Capítulo 2. Conclusiones

Se ha desarrollado una metodología quimioenzimática para llevar a cabo la oxidación de 16 alcoholes alílicos (hetero)aromáticos empleando el sistema formado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el mediador TEMPO, dando lugar a las correspondientes cetonas α,β -insaturadas con conversiones completas en un medio acuoso, condiciones suaves de reacción y usando oxígeno molecular como oxidante.

Se han estudiado y optimizado los procesos tanto de biorreducción como de biotransaminación de las cetonas previamente sintetizadas, con el fin de identificar ADHs y ATAs eficientes para producir (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles y (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-aminas con buenas conversiones y excelentes selectividades, todos ellos compuestos de gran valor sintético.

A continuación, se ha diseñado una estrategia secuencial basada en la oxidación de los (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles racémicos y su posterior reacción con las ADHs o ATAs selectivas, para dar lugar a los correspondientes (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-oles (20-87%) y las (3*E*)-4-(het)arilbut-3-en-2-aminas (29-81%) ópticamente activas, tras purificación por cromatografía de columna o extracción ácido-base.

Para hacer viables ambos procesos secuenciales y debido a que el primer paso de oxidación se desarrolló a pH 5, fue necesario un ajuste del mismo una vez formadas las cetonas α,β -insaturadas, ya que las subsecuentes transformaciones enzimáticas requerían un pH ligeramente básico (7.5). Además, se realizaron diferentes escalados a escala semipreparativa (0.16 mmol) de los procesos secuenciales, obteniéndose:

- Los alcoholes (*R*)-**1d** (57%, 94% *ee*), (*S*)-**1f** (68%, 98% *ee*), (*R*)-**1g** (75%, >99% *ee*) y (*R*)-**1j** (78%, 99% *ee*), tras purificación por columna cromatográfica.
- Las aminas (*R*)-**3a** (61%, >99% *ee*), (*S*)-**3b** (49%, >99% *ee*), (*S*)-**3g** (42%, 99% *ee*) y (*R*)-**3o** (47%, >99% *ee*), tras aislamiento por extracción ácido-base.

Análogamente, se aumentaron los escalados a 0.8-1 mmol de sustrato, para obtener los alcoholes (*S*)-**1a** (74%, >99% *ee*) y (*R*)-**1f** (76%, 95% *ee*), tras purificación por columna cromatográfica. Este último se utilizó posteriormente para llevar a cabo la síntesis, tras una epoxidación de Sharpless, del epóxido **3** con un rendimiento aislado del 80%, 95% *ee* y 83% *ed*, precursor de compuestos análogos de otros de interés farmacológico.

**PROCEDIMIENTOS
EXPERIMENTALES**

2.4.1. PROCEDIMIENTO GENERAL DE OXIDACIÓN DE LOS ALCOHOLES 1a-p MEDIADA POR EL SISTEMA LTV/TEMPO (ver Tabla 2.1 y Esquema 2.18)

En un tubo de ensayo abierto al aire, se añadió TEMPO (10-33 mol%) a una disolución del correspondiente alcohol racémico **1a-p** (0.08 mmol, 100 mM) en una disolución de tampón citrato saturada de oxígeno (800 μ L, pH 5, 50 mM) o en una mezcla bifásica de una disolución de tampón citrato saturada de oxígeno (pH 5, 50 mM) y TBME (10-50% v/v para un volumen total de 800 μ L). El medio de reacción se agitó magnéticamente durante unos segundos para disolver los reactivos, y tras ello se añadió la lacasa de *Trametes versicolor* (7 mg, 4.6 U), y se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 16 h a 30 °C. Tras ello, el producto se extrajo con AcOEt (2 x 2 mL), las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El grado de conversión de la reacción se determinó por CG tomando una alícuota de la fase orgánica resultante (>98% de conversión de las cetonas **2a-p**).

2.4.2. PRODECIMIENTO GENERAL DE BIORREDUCCIÓN DE LAS CETONAS 2a-p (ver Esquema 2.19 y Tabla 2.2)

En un vial Eppendorf de 1.5 mL de volumen se disolvió la correspondiente cetona **2a-p** (0.024 mmol, 40 mM) en 2-PrOH (15% v/v, 90 μ L). Después, se añadió una disolución tampón Tris·HCl 50 mM de pH 7.5 (390 μ L para *E. coli*/LBADH; 450 μ L para *E. coli*/ADH-T o *E. coli*/ADH-A), MgCl₂ disuelto en la disolución tampón (60 μ L, 10 mM, para *E. coli*/LBADH) y NADPH (60 μ L, 10 mM, para *E. coli*/LBADH o *E. coli*/ADH-T) o NADH disueltos en la disolución tampón (60 μ L, 10 mM, para *E. coli*/ADH-A). Finalmente, se añadió el preparado liofilizado de células conteniendo las correspondientes alcohol deshidrogenasas sobreexpresadas (10 mg). La reacción se agitó a 30 °C y 250 rpm durante 24 h, tras lo cual se paró y se extrajo con AcOEt (0.5 mL) y la fase orgánica se separó por centrifugación (2 min, 13000 rpm). Este protocolo de extracción y centrifugación se repitió otra vez, y finalmente las fases orgánicas se combinaron y la disolución resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Tras tomar una alícuota de esta fase orgánica, los valores de conversión a los correspondientes alcoholes enantioenriquecidos **1a-p** fueron medidos utilizando CG. Los excesos enantioméricos de los productos fueron

Capítulo 2. Procedimientos experimentales

medidos utilizando CG tras derivatización de los alcoholes obtenidos a sus correspondientes acetatos.

De esta forma, se tomó una alícuota de los alcoholes obtenidos en el paso de biorreducción (~1 mg) y se disolvió en AcOEt (0.5 mL) en un vial Eppendorf de 1.5 mL de volumen, añadiéndose posteriormente DMAP (10 mg) y anhídrido acético (5 gotas). La mezcla se agitó a 30 °C y 900 rpm durante 2 h, tras lo cual se añadió una disolución acuosa de NaOH 10 M (200 µL). La fase orgánica se separó por centrifugación (2 min, 13000 rpm), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se transfirió a un vial de CG para su posterior análisis enantiomérico.

2.4.3. PRODECIMIENTO GENERAL DE BIOTRANSAMINACIÓN DE LAS CETONAS 2a-p (ver Esquema 2.23 y Tabla 2.3)

En un vial Eppendorf de 1.5 mL de volumen se disolvió la correspondiente cetona **2a-p** (5 µmol, 10 mM) en DMSO (2.5% v/v, 12 µL). Después, se añadió una disolución tampón fosfato 100 mM pH 7.5 (485 µL) conteniendo PLP (1 mM) e isopropilamina (1.0 M) y, finalmente, la correspondiente ATA comercialmente disponible (2 mg). La reacción se agitó a 45 °C y 250 rpm durante 24 h, tras lo cual se paró mediante la adición de una disolución acuosa de NaOH 10 M (200 µL) y se extrajo con AcOEt (500 µL), separándose la fase orgánica mediante centrifugación (2 min, 13000 rpm). Este protocolo de extracción y centrifugación se repitió otra vez y, finalmente, las fases orgánicas fueron combinadas y la disolución resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Tras tomar una alícuota de esta fase orgánica, los valores de conversión a las correspondientes aminas enantioenriquecidas **3a-p** fueron medidos utilizando CG. Los excesos enantioméricos de los productos fueron medidos utilizando CG tras derivatización de las aminas obtenidas a sus correspondientes acetamidas.

De esta forma, se tomó una alícuota de las aminas obtenidas en el paso de biotransaminación (~1 mg) y se disolvió en AcOEt (1 mL) en un vial Eppendorf de 1.5 mL de volumen, añadiéndose posteriormente carbonato de potasio (10 mg) y anhídrido acético (5 gotas). La mezcla se agitó a 30 °C y 900 rpm durante 2 h, tras lo cual se añadió una disolución acuosa de NaOH 10 M (200 µL). La fase orgánica

se separó por centrifugación (2 min, 13000 rpm), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se transfirió a un vial de CG para su posterior análisis enantiomérico.

2.4.4. PRODECIMIENTO GENERAL PARA LA DESRACEMIZACIÓN DE LOS ALCOHOLES ALÍLICOS RACÉMICOS 1a-p A ESCALA ANALÍTICA (ver Esquema 2.20)

En un tubo sellado abierto al aire se añade TEMPO (4.1 mg, 33 mol%) a una disolución del correspondiente alcohol racémico **1a-p** (0.08 mmol, 100 mM) en una mezcla bifásica de una disolución de tampón citrato saturada de oxígeno (pH 5, 50 mM) y TBME (50% v/v para un volumen total de 800 µL). El medio de reacción se agitó magnéticamente durante unos segundos para disolver los reactivos, y tras ello se añadió la lacasa de *Trametes versicolor* (7 mg, 4.6 U), y se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 16 h a 30 °C, observándose la evaporación del TBME durante este tiempo. De este modo, se incrementó la concentración de la cetona en el medio de reacción, desde la inicial de 100 mM a 200 mM.

Al crudo de reacción conteniendo la correspondiente cetona **2a-p** se le aplicaron diferentes protocolos en función del tipo de alcohol deshidrogenasa utilizada. En el caso de la *E. coli*/LBADH, se adicionó 2-PrOH (0.3 mL), una disolución tampón Tris·HCl 50 mM pH 8 (0.9 mL), MgCl₂ (0.2 mL, 10 mM) y NADPH (0.2 mL, 10 mM) disueltos en la disolución tampón, consiguiéndose concentraciones aproximadas de 40 mM del sustrato, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de NADPH y 15% v/v de 2-PrOH.

En el caso de la *E. coli*/ADH-T, se adicionó 2-PrOH (0.3 mL), la disolución tampón Tris·HCl 50 mM pH 8 (1.1 mL) y NADPH disuelto en la disolución tampón (0.2 mL, 10 mM), consiguiéndose concentraciones aproximadas de 40 mM del sustrato, 1 mM de NADPH y 15% v/v de 2-PrOH.

En el caso de la *E. coli*/ADH-A, se adicionó 2-PrOH (0.3 mL), la disolución tampón Tris·HCl 50 mM pH 8 (1.1 mL) y NADH disuelto en la disolución tampón (0.2 mL, 10 mM), consiguiéndose concentraciones aproximadas de 40 mM del sustrato, 1 mM de NADH y 15% v/v de 2-PrOH. Así, en los tres casos, al adicionar esta disolución tampón de pH 8 se consiguió un aumento del valor inicial en torno a

Capítulo 2. Procedimientos experimentales

5 a aproximadamente 7.5, valor óptimo para el paso de las biorreducciones, por lo que no se necesitó llevar a cabo un ajuste adicional del mismo.

Finalmente, se añadieron las correspondientes células liofilizadas de *E. coli* sobreexpresando la alcohol deshidrogenasa correspondiente (33.3 mg). El tubo sellado se cerró y la reacción se agitó a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. Tras este tiempo, la reacción se paró mediante la adición de agua destilada (1.5 mL) o una disolución acuosa concentrada de NaOH (10 M, 1.5 mL, para los alcoholes **1k-l**). La mezcla se extrajo con AcOEt (5 mL) y la fase orgánica se separó mediante centrifugación (3 min, 4900 rpm). Este protocolo de extracción y centrifugación se repitió dos veces más y, finalmente, las fases orgánicas se combinaron y la disolución resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Los valores de conversión y exceso enantiomérico se determinaron de la misma forma tal como se ha descrito en la *Sección 2.4.2*. Los productos se purificaron mediante columna cromatográfica empleando los siguientes eluyentes: 50% Et₂O/Hexano (**1a-j**, 20-68% rendimiento aislado, 65-99% *ee*), 83% AcOEt/Hexano (**1k-l**, 70-87% rendimiento aislado, 94-96% *ee*) o 25% AcOEt/Hexano (**1m-p**, 42-52% rendimiento aislado, 74-93% *ee*).

2.4.5. PRODECIMIENTO GENERAL PARA LA AMINACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE LOS ALCOHOLES ALÍLICOS RACÉMICOS 1a-p A ESCALA ANALÍTICA (ver Esquema 2.24)

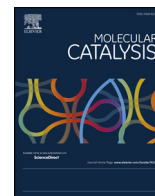
En un tubo de ensayo abierto al aire se añade TEMPO (4.1 mg, 33 mol%) a una disolución del correspondiente alcohol racémico **1a-p** (0.08 mmol, 100 mM) en una mezcla bifásica de una disolución de tampón citrato saturada de oxígeno (pH 5, 50 mM) y TBME (50% *v/v* para un volumen total de 800 µL). El medio de reacción se agitó magnéticamente durante unos segundos para disolver los reactivos, y tras ello se añadió la lacasa de *Trametes versicolor* (7 mg, 4.6 U), y se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 16 h a 30 °C, observándose la evaporación del TBME durante este tiempo. De este modo, se incrementó la concentración de la cetona en el medio de reacción, desde la inicial de 100 mM a 200 mM.

El crudo de reacción conteniendo la correspondiente cetona **2a-p** se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 mL de volumen, y tras ello se añadieron DMSO (0.2 mL) y una disolución tampón fosfato 100 mM pH 7.6 (7.4 mL) conteniendo isopropilamina (1.08 M) y PLP (2 mg), consiguiéndose concentraciones

Capítulo 2. Procedimientos experimentales

aproximadas de 10 mM del sustrato, 1 M de isopropilamina, 1 mM de PLP y 2.5% v/v de DMSO. De la misma manera, al adicionar esta disolución tampón se consiguió un aumento del valor inicial de pH 5 a aproximadamente 7.5, óptimo para el paso de biotransaminación, por lo que no se necesitó llevar a cabo un ajuste adicional del mismo. Finalmente, se añadió la correspondiente ATA (24 mg). El tubo de centrifuga se cerró y la mezcla de reacción se agitó a 45 °C y 250 rpm durante 24 h. Tras este tiempo, la reacción se paró mediante la adición de una disolución acuosa de NaOH (10 M, 3 mL). La reacción se extrajo con AcOEt (5 mL) y la fase orgánica se separó mediante centrifugación (3 min, 4900 rpm). Este protocolo de extracción y centrifugación se repitió dos veces más y, finalmente, las fases orgánicas se combinaron y la disolución resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Los valores de conversión y exceso enantiomérico se determinaron de la misma forma tal como se ha descrito en la *Sección 2.4.3*. Las aminas **3a-j,m-p** se purificaron mediante un protocolo de extracción ácido-base, aislándose con 29-75% de rendimiento y 94->99% *ee*. Las aminas **3k-l** se purificaron mediante columna cromatográfica (5% NH₃/MeOH), aislándose con un 68-81% de rendimiento y 99->99% *ee*.

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN



One-pot two-step chemoenzymatic deracemization of allylic alcohols using laccases and alcohol dehydrogenases

Jesús Albarrán-Velo, Vicente Gotor-Fernández*, Iván Lavandera*

Organic and Inorganic Chemistry Department, Universidad de Oviedo, Avenida Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Alcohol dehydrogenases
Bioreduction
Deracemization
Laccases
One-pot synthesis

ABSTRACT

A series of enantioenriched (hetero)aromatic secondary allylic alcohols has been synthesized through deracemization of the corresponding racemic mixtures combining a non-selective chemoenzymatic oxidation (laccase from *Trametes versicolor* and oxy-radical TEMPO) and a stereoselective biocatalyzed reduction (lyophilized cells of *E. coli* overexpressing an alcohol dehydrogenase, ADH). Both steps were performed in aqueous medium under very mild reaction conditions. After optimization, a sequential one-pot two-step protocol was set up, obtaining the corresponding chiral alcohols in moderate to high conversions (48–95%) and enantiomeric excess (65–> 99% *ee*). Depending on the ADH stereopreference, both antipodes from these valuable chiral synthons could be prepared, even at preparative scale (119–178 mg), in a straightforward manner.

1. Introduction

Chiral allylic alcohols are versatile building blocks for organic synthesis as they contain two moieties, an alcohol and a carbon-carbon double bond, which can be subsequently modified in order to give access to molecules with up to three contiguous chiral centers. In this context, many different reactions have been designed where the hydroxyl group directs the transformation of the alkene moiety, such as epoxidation [1], hydrogenation [2], dihydroxylation [3], or hydroformylation [4], among others. Also in the last years, different approaches have been developed to substitute the alcohol group by different nucleophiles [5], affording a broad spectrum of highly valuable derivatives.

As a consequence, several chemical methodologies have been described to synthesize these compounds in a chiral fashion [6]. Recent examples involve the (stereoselective) formation of C-C bonds, such as the alkenylation of aldehydes [7], the coupling of alcohols and alkynes under redox neutral conditions [8], the aldol addition on α,β -unsaturated ketones [9], the alkyl addition on α,β -unsaturated aldehydes [10], and the Stille coupling reaction [11]. Other methods rely on the selective creation of the C-O bond, such as the addition of *N*-hydroxyphthalimide to allenes [12], or the C-H bond, through the metal-catalyzed reduction of enones [13–15] or vinyl epoxides [16]. Other procedures involve the metal- or organocatalyzed isomerization of oxiranes [17] and the kinetic resolution of racemic allylic alcohols [18,19].

Alternatively, biocatalytic tools have become very relevant along the last decades as enzymes can promote extremely selective transformations under very mild reaction conditions. For instance, enantioenriched allylic alcohols have been obtained through lipase-mediated kinetic [20,21] and dynamic kinetic resolutions [22–25] of the corresponding racemates. Also, oxidoreductases have been successfully applied to obtain these chiral compounds through the oxidative kinetic resolution catalyzed by alcohol dehydrogenases (ADHs) [26] or alcohol oxidases [27] starting from the racemic alcohols, or the bioreduction of the corresponding α,β -unsaturated ketones [28,29]. Due to the relevance of multi-step catalyzed syntheses, the design of chemoenzymatic [30,31] or multienzymatic [32,33] protocols where allylic alcohols are obtained or involved as intermediates has also been envisaged.

An elegant manner to get access to enantioenriched *sec*-alcohols is performing deracemization protocols starting from the racemic forms [34–37]. From an atom economic point of view, this transformation is ideal as both substrate and product are the same compound. Although this approach is very simple, final compounds are frequently not obtained in high enantiomeric excess (*ee*) and also by-products can be formed, due to the presence of many different enzymes, since traditionally, whole-cell biocatalysts are employed. For instance, Chadha and co-workers reported the deracemization of racemic allylic alcohols through an oxidation-reduction strategy using a yeast [38,39]. Next, Kroutil and co-workers demonstrated that deracemization of secondary alcohols could be achieved *via* stereoinversion in a cascade fashion

* Corresponding authors.

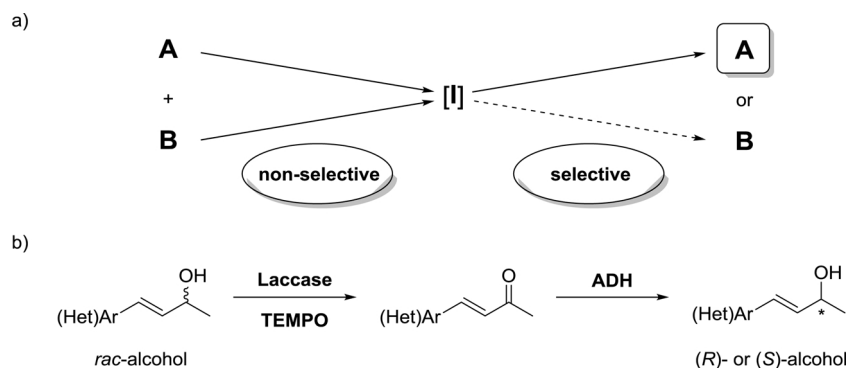
E-mail addresses: vicgotfer@uniovi.es (V. Gotor-Fernández), lavanderaivan@uniovi.es (I. Lavandera).

<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.111087>

Received 8 May 2020; Received in revised form 13 June 2020; Accepted 16 June 2020

Available online 07 July 2020

2468-8231/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Scheme 1. a) General representation of a linear deracemization concept. b) Linear deracemization of *sec*-allylic alcohols combining the laccase/TEMPO system with an ADH. A, B: substrate (and product) enantiomers; I: intermediate.

[40]. For this, two enantiocomplementary ADHs are necessary with different nicotinamide cofactor preference (NADH or NADPH), providing the final alcohols with excellent *ee* values. Whereas this method is very smart, it can suffer from relatively limited substrate scope and undesired crossed regeneration cofactor systems, lowering both conversions and selectivities. A subsequent approach is the use of linear deracemizations [37], where the racemic *sec*-alcohol is transformed into the corresponding ketone intermediate *via* non-selective oxidation, followed by a stereoselective reduction using a chiral (bio)catalyst (Scheme 1 a). This system presents the advantage that just one selective reaction is necessary to get access to the enantioenriched product, broadening the possible scope of the reaction. On the contrary, it is not possible to perform both steps in a cascade manner as the final product would also be oxidized, therefore, one-pot sequential methodologies must be strictly followed.

In the search for novel mild oxidative methods, we and others found out that the combination of a laccase [41–44] with substoichiometric amounts of the oxy-radical TEMPO is very suitable to achieve the oxidation of secondary benzylic [45–49], allylic [50–52] and propargylic alcohols [53,54] in aqueous medium employing oxygen as final electron acceptor. This transformation has been coupled to other (chemo) enzymatic reactions to perform the amination of racemic alcohols [48,49,52] and the isomerization of allylic alcohols into saturated carbonyl compounds [50,51]. It has also been envisaged as the first step in linear deracemizations of profenols [55], benzylic [47], and propargylic [53] alcohols when it was combined sequentially with alcohol dehydrogenases [56]. Herein, the application of the laccase from *Trametes versicolor* (LTV) and TEMPO with stereocomplementary ADHs is disclosed, to accomplish the synthesis of valuable enantioenriched allylic alcohols starting from the racemic compounds in a one-pot sequential mode (Scheme 1 b).

2. Experimental

2.1. Material and methods

Laccase from *Trametes versicolor* (LTV, 0.66 U/mg) was purchased from Sigma-Aldrich. Made in house ADHs overexpressed in *E. coli* and later lyophilized [*Ralstonia* species (RasADH), *Sphingobium yanoikuyae* (SyADH), *Thermoanaerobacter* species (ADH-T), *Lactobacillus brevis* (LBADH), *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TeSADH) and *Rhodococcus ruber* (ADH-A)] were obtained as previously reported in the literature [57–59], while evo-1.1.200 ADH was acquired from Evoxx technologies GmbH. Glucose dehydrogenase (GDH-105) was purchased from Codexis Inc. D-Glucose, NADPH, NADH, ketone **2a** and all other reagents for chemical transformations and product isolation/purification were obtained from commercial sources and used as received. Citrate buffer (pH 5, 50 mM) was saturated with molecular oxygen by bubbling it for 15 min prior to be used in the chemoenzymatic oxidation experiments.

Thin layer chromatographies (TLCs) were conducted with silica gel pre-coated plates and visualized with UV and potassium permanganate stain. Column chromatographies were performed using silica gel (230–400 mesh).

The oxidation step mediated by the laccase/TEMPO catalytic system was optimized in an open-to-air test tube using magnetic stirring, while the bioreduction step was studied in 1.5 mL Eppendorf vial. Sequential reactions were performed in sealed glass tubes of different sizes (18 × 72 × 10), (18 × 109 × 10) or (28 × 137 × 20) mm] depending on the reaction scale.

NMR spectra were recorded on a 300 MHz spectrometer. All chemical shifts (δ) 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. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained in a spectrometer using the ESI-TOF positive mode. Measurement of the optical rotation was carried out at 590 nm in a standard polarimeter.

2.2. Typical procedure for the synthesis of (E)-4-(het)arylbut-3-en-2-ones

Ketones **2b–p** were synthesized following the procedure already described by List and co-workers for ketones **2a**, **2l** and **2o** [60]. To a solution of the corresponding aldehyde (2.5 mmol) in acetone (6.3 mL), morpholinium trifluoroacetate (0.5 mmol) was added, and the reaction was stirred at 75 °C in a sealed tube overnight. After this time the reaction mixture was cooled at room temperature, and a NaHCO₃ saturated aqueous solution (5 mL) and EtOAc (10 mL) were added. After phase separation, the aqueous phase was extracted three times with EtOAc (10 mL), and the combined organic phases dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The reaction crude was purified by column chromatography on silica gel (25% EtOAc/hexane), yielding the corresponding ketone **2b–p** (59–96% yield): **2b** (92%, 406 mg), **2c** (71%, 320 mg), **2d** (61%, 251 mg), **2e** (59%, 333 mg), **2f** (78%, 344 mg), **2g** (63%, 259 mg), **2h** (85%, 340 mg), **2i** (77%, 339 mg), **2j** (68%, 280 mg), **2k** (72%, 266 mg), **2l** (81%, 299 mg), **2m** (75%, 255 mg), **2n** (94%, 320 mg), **2o** (82%, 313 mg) and **2p** (96%, 366 mg). The NMR data of these compounds were in agreement with those reported in the literature [52,60].

2.3. Typical procedure for the synthesis of (E)-4-(het)arylbut-3-en-2-ols

Alcohols **1a–p** were synthesized following the procedure described by our research group [52]. A solution of NaBH₄ (170.2 mg, 4.5 mmol) in water (1 mL) was added dropwise to a stirring solution of the corresponding (3E)-4-(het)arylbut-3-en-2-one **2a–p** (3 mmol) in MeOH

(10 mL) at 0 °C. The reaction mixture was firstly stirred for 1 h in an ice bath and then 2 h at room temperature. Afterwards, hot water (5 mL) was added and the product was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 mL), and the combined organic phases were washed with brine (5 mL). The resulting organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The reaction crude was purified by column chromatography on silica gel (50% Et₂O/hexane, 83% EtOAc/hexane or 25% EtOAc/hexane), yielding the corresponding alcohol **1a-p** (46–99% yield): **1a** (99%, 445 mg), **1b** (88%, 469 mg), **1c** (64%, 351 mg), **1d** (46%, 230 mg), **1e** (57%, 387 mg), **1f** (78%, 417 mg), **1g** (71%, 354 mg), **1h** (85%, 414 mg), **1i** (81%, 435 mg), **1j** (76%, 380 mg), **1k** (87%, 389 mg), **1l** (91%, 409 mg), **1m** (89%, 369 mg), **1n** (87%, 361 mg), **1o** (91%, 423 mg) and **1p** (71%, 328 mg). The NMR data of these compounds were in agreement with those reported in the literature [52].

2.4. Typical procedure for the oxidation of (E)-4-(het)arylbut-3-en-2-ols using the laccase from *Trametes versicolor*-TEMPO catalytic system

In an open-to-air test tube, TEMPO (1.2–4.1 mg, 10–33 mol%) was added to a solution of the racemic alcohol **1a-p** (0.08 mmol, 100 mM) in a (biphasic mixture of) oxygen-saturated citrate buffer (pH 5, 50 mM), studying the possibility of using MTBE (*tert*-butyl methyl ether) as co-solvent (up to 50% v/v, for a total solution volume of 800 µL). The reaction mixture was magnetically stirred for a few minutes to dissolve all the reagents, and then the laccase from *Trametes versicolor* (7 mg, 4.6 U) was added. The mixture was stirred for additional 16 h at 30 °C controlling the agitation speed at 150 rpm. After this time, the product was extracted with EtOAc (2 × 2 mL), the organic phases were combined, dried over Na₂SO₄ and filtered, and an aliquot was taken for the determination of the conversion value by GC (see Tables S1 and S2 in the Supplementary data).

2.5. Typical procedure for the bioreduction of (E)-4-(het)arylbut-3-en-2-ones using overexpressed alcohol dehydrogenases

For *E. coli*/RasADH: In a 1.5 mL Eppendorf vial, ketone **2a** (0.015 mmol, 25 mM) was dissolved in DMSO (10% v/v, 60 µL). Then, Tris-HCl buffer 50 mM pH 7.5 (540 µL) containing glucose (50 mM), GDH (10 U) and NADPH (1 mM) was added. Finally, overexpressed *E. coli*/RasADH lyophilized cells (10 mg) were added. The reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h, and extracted with EtOAc (0.5 mL), separating the organic layer by centrifugation (2 min, 13,000 rpm). This extraction and centrifugation protocol was repeated twice, and the organic layers were combined and dried over Na₂SO₄.

For the other ADHs: In a 1.5 mL Eppendorf vial, ketone **2a** (0.015 mmol, 25 mM) was dissolved in 2-PrOH (10% v/v, 60 µL). Then, Tris-HCl buffer 50 mM pH 7.5 (540 µL) containing MgCl₂ (1 mM, for *E. coli*/LBADH and evo-1.1.200) and NADPH (1 mM for *E. coli*/LBADH, *E. coli*/ADH-T, *E. coli*/SyADH, and *E. coli*/TeSADH) or NADH (1 mM for *E. coli*/ADH-A and evo-1.1.200) was added. Finally, *E. coli* lyophilized cells or evo-1.1.200 (10 mg) were added. The reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h, and extracted with EtOAc (0.5 mL), separating the organic layer by centrifugation (2 min, 13,000 rpm). This extraction and centrifugation protocol was repeated twice, and the organic layers were combined and dried over Na₂SO₄.

General procedure under the optimized conditions: In a 1.5 mL Eppendorf vial, the corresponding ketone **2a-p** (0.024 mmol, 40 mM) was dissolved in 2-PrOH (15% v/v, 90 µL). Then, Tris-HCl buffer 50 mM pH 7.5 (390 µL for *E. coli*/LBADH; 450 µL for *E. coli*/ADH-T or *E. coli*/ADH-A), MgCl₂ (60 µL, 10 mM for *E. coli*/LBADH), and NADPH (60 µL, 10 mM, for *E. coli*/LBADH or *E. coli*/ADH-T) or NADH (60 µL, 10 mM, for *E. coli*/ADH-A) were added. Finally, lyophilized cells containing the overexpressed alcohol dehydrogenase (10 mg) were added. The reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h, and extracted with EtOAc (0.5 mL); the organic layer was separated by centrifugation

(2 min, 13,000 rpm). This extraction and centrifugation protocol was repeated twice, and the organic layers were combined and dried over Na₂SO₄.

Conversion values into the corresponding enantioenriched alcohols **1a-p** were determined by taking an aliquot of the resulting suspensions and injecting them for GC analysis (see the Supplementary data). Derivatization of alcohols **1a-p** as acetates with acetic anhydride was necessary for the measurement of their enantiomeric excess values: An aliquot of the corresponding alcohol **1a-p** obtained in the biotransformation crude and dissolved in EtOAc, was placed in a 1.5 mL Eppendorf vial. Then, DMAP (10 mg) and acetic anhydride (5 drops) were added, and the mixture was shaken at 30 °C and 900 rpm for 2 h. After this time, an aqueous solution of NaOH 10 M (200 µL) was added, and the organic layer was separated by centrifugation (2 min, 13,000 rpm), dried over Na₂SO₄, filtered and transferred to a GC glass vial for analysis.

2.6. Typical procedure for the deracemization of (E)-4-(het)arylbut-3-en-2-ols at analytical scale

In an open-to-air glass tube, TEMPO (4.1 mg, 33 mol%) was added to a solution of the corresponding racemic alcohol **1a-p** (0.08 mmol, 100 mM) in a biphasic mixture of an oxygen-saturated citrate buffer 50 mM pH 5 and MTBE (50% v/v, for a total volume of 800 µL). The reaction mixture was magnetically stirred for a few minutes to dissolve all the reagents, and then the laccase from *Trametes versicolor* (7 mg, 4.6 U) was added. The reaction was stirred for 16 h at 30 °C, observing the complete evaporation of MTBE along this time. This fact led to a volume reduction from the initial 800 µL to 400 µL, and in consequence, the substrate concentration increased from the initial 100 mM to approximately 200 mM.

To the resulting reaction crude containing the ketone intermediate, different protocols have been applied depending on the alcohol dehydrogenase that is used. In the case of LBADH, 2-PrOH (0.3 mL), Tris-HCl buffer 50 mM pH 8 (0.9 mL), MgCl₂ (0.2 mL of a 10 mM solution in Tris-HCl buffer 50 mM pH 8), and NADPH (0.2 mL of a 10 mM solution in Tris-HCl buffer 50 mM pH 8) were added, leading to concentrations of approximately 40 mM for the substrate, 1 mM for MgCl₂, 1 mM for NADPH and 15% v/v for 2-PrOH. At the same time, the addition of this concentrated buffer to the reaction medium, caused an increase in the pH from an initial value of 5 to approximately 7.5, therefore, further pH adjustment was not required for the bioreduction reaction.

For ADH-T, 2-PrOH (0.3 mL), Tris-HCl buffer 50 mM pH 8 (1.1 mL), and NADPH (0.2 mL of a 10 mM solution in Tris-HCl buffer 50 mM pH 8) were added, leading to concentrations of approximately 40 mM for the substrate, 1 mM for NADPH and 15% v/v for 2-PrOH. At the same time, the addition of this concentrated buffer to the reaction medium, caused an increase in the pH from an initial value of 5 to approximately 7.5, therefore, further pH adjustment was not required for the bioreduction reaction.

In the case of ADH-A, 2-PrOH (0.3 mL), Tris-HCl buffer 50 mM pH 8 (1.1 mL), and NADH (0.2 mL of a 10 mM solution in Tris-HCl buffer 50 mM pH 8) were added, leading to concentrations of approximately 40 mM for the substrate, 1 mM for NADH and 15% v/v for 2-PrOH. At the same time, the addition of this concentrated buffer to the reaction medium, caused an increase in the pH from an initial value of 5 to approximately 7.5, therefore, further pH adjustment was not required for the bioreduction reaction.

Finally, the corresponding *E. coli* cells overexpressing the alcohol dehydrogenase (33.3 mg) were added. The sealed tube was closed and the reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h. After this time, the reaction was stopped by addition of distilled water or NaOH 10 M aqueous solution (for alcohols **1k-l**, 1.5 mL). The mixture was extracted with EtOAc (5 mL) and the organic layer was separated by centrifugation (3 min, 4900 rpm). This extraction and centrifugation protocol was performed twice and, finally, the organic layers were combined and

dried over Na₂SO₄. Conversion and *ee* values were measured as previously described. The products were purified through column chromatography using the following eluents: 50% Et₂O/hexane (**1a-j**), 83% EtOAc/hexane (**1k** and **1l**) or 25% EtOAc/hexane (**1m-p**).

2.7. Typical procedure for the deracemization of (E)-4-(het)arylbut-3-en-2-ols at semi-preparative scale

In an open-to-air glass tube, TEMPO (8.2 mg, 33 mol%) was added to a solution of the appropriate racemic alcohol **1d**, **1f**, **1g** or **1j** (0.16 mmol, 100 mM) in a biphasic mixture of an oxygen-saturated citrate buffer (pH 5, 50 mM) and MTBE (50% v/v, for a total volume of 1.6 mL). The reaction mixture was stirred for a few minutes to dissolve all the reagents, and then the laccase from *T. versicolor* (14 mg, 9.2 U) was added. The reaction mixture was stirred for 16 h at 30 °C, with the complete evaporation of MTBE being observed during this time. This led to a volume reduction from the initial 1.6 mL to 800 μL, and as a consequence, the substrate concentration increased from the initial 100 mM to approximately 200 mM.

To the resulting reaction crude containing the ketone intermediate (**2d**, **2f**, **2g** or **2j**), different protocols were applied depending on the alcohol dehydrogenase that was used. In the case of LBADH, 2-PrOH (0.6 mL), Tris-HCl buffer 50 mM pH 8 (1.8 mL), MgCl₂ (0.4 mL of a 10 mM solution in Tris-HCl buffer 50 mM pH 8), and NADPH (0.4 mL of a 10 mM solution in Tris-HCl buffer 50 mM pH 8) were added, leading to concentrations of approximately 40 mM for the substrate, 1 mM for MgCl₂, 1 mM for NADPH and 15% v/v for 2-PrOH. At the same time, the addition of this concentrated buffer to the reaction medium, caused an increase in the pH from an initial value of 5 to approximately 7.5, therefore, further pH adjustment was not required for the bioreduction reaction.

In the case of ADH-A, 2-PrOH (0.6 mL), Tris-HCl buffer 50 mM pH 8 (2.2 mL), and NADH (0.4 mL of a 10 mM solution in Tris-HCl buffer 50 mM pH 8) were added, leading to concentrations of approximately 40 mM for the substrate, 1 mM for NADH and 15% v/v for 2-PrOH. At the same time, the addition of this concentrated buffer to the reaction medium, caused an increase in the pH from an initial value of 5 to approximately 7.5, therefore, further pH adjustment was not required for the bioreduction reaction.

Finally, the corresponding *E. coli* cells overexpressing the alcohol dehydrogenase (66.6 mg) were added. The sealed tube was closed and the reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h. After this time, the reaction was stopped by addition of distilled water (3 mL). The mixture was extracted with EtOAc (10 mL) and the organic layer was separated by centrifugation (3 min, 4900 rpm). This extraction and centrifugation protocol was performed three times and, finally, the organic layers were combined and dried over Na₂SO₄. Conversion values into the corresponding enantioenriched alcohols **1d**, **1f**, **1g** and **1j** were determined by GC analyses. Derivatization of alcohols **1d**, **1f**, **1g** and **1j** as acetates with acetic anhydride was necessary for the measurement of their enantiomeric excess values. The products were purified through column chromatography using 50% Et₂O/hexane as eluent, yielding alcohols (R)-**1d**, (S)-**1f**, (R)-**1g**, and (R)-**1j** in 57-78%.

2.8. Typical procedure for the deracemization of (E)-4-(het)arylbut-3-en-2-ols at preparative scale

2.8.1. (S)-**1a**

In an open-to-air glass tube, TEMPO (41 mg, 33 mol%) was added to a solution of the racemic alcohol **1a** (0.8 mmol, 119 mg, 100 mM) in a biphasic mixture of an oxygen-saturated citrate buffer (pH 5, 50 mM) and MTBE (50% v/v, for a total volume of 8 mL). The reaction mixture was magnetically stirred for a few minutes to dissolve all the reagents, and then the laccase from *T. versicolor* (70 mg, 46 U) was added. The reaction mixture was stirred for 16 h at 30 °C, being observed the complete evaporation of MTBE during this time. This led to a volume

reduction from the initial 8 mL to 4 mL, and as a consequence, the substrate concentration increased from the initial 100 mM to approximately 200 mM.

To the resulting reaction mixture containing the ketone intermediate **2a**, 2-PrOH (3 mL), Tris-HCl buffer 50 mM pH 8 (11 mL), and NADPH (2 mL of a 10 mM solution in Tris-HCl buffer 50 mM pH 8) were added, leading to a concentration of approximately 40 mM for ketone **2a**, 1 mM for MgCl₂, 1 mM for NADPH and 15% v/v for 2-PrOH. At the same time, the addition of this concentrated buffer to the reaction medium, caused an increase in the pH from an initial value of 5 to approximately 7.5, therefore, further pH adjustment was not required for the bioreduction reaction.

Finally, overexpressed *E. coli*/ADH-T cells (333 mg) were added. The glass tube was closed and the reaction shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h. After this time, the reaction was stopped by addition of distilled water (20 mL). The mixture was extracted with EtOAc (50 mL) and the organic layer was separated by centrifugation (3 min, 4900 rpm). This extraction and centrifugation protocol was performed three times and, finally, the organic layers were combined and dried over Na₂SO₄. Analysis through GC showed 76% of conversion and > 99% of enantiomeric excess (as acetate derivative). The product was purified through column chromatography on silica gel (50% Et₂O/hexane), affording the alcohol (S)-**1a** in 74% yield.

2.8.2. (R)-**1f**

In an open-to-air glass tube, TEMPO (52 mg, 33 mol%) was added to a solution of the racemic alcohol **1f** (1 mmol, 178 mg, 100 mM) in a biphasic mixture of an oxygen-saturated citrate buffer (pH 5, 50 mM) and MTBE (50% v/v, for a total volume of 10 mL). The reaction mixture was magnetically stirred for a few minutes to dissolve all the reagents, and then the laccase from *T. versicolor* (88 mg, 58 U) was added. The reaction mixture was stirred for 16 h at 30 °C, being observed the complete evaporation of MTBE during this time. This led to a volume reduction from the initial 10 mL to 5 mL, and as a consequence, the substrate concentration increased from the initial 100 mM to approximately 200 mM.

To the resulting crude reaction mixture containing the ketone intermediate **2f**, 2-PrOH (3.75 mL), Tris-HCl buffer 50 mM pH 8 (21.25 mL), MgCl₂ (5.1 mg, 0.025 mmol), and NADPH (21 mg, 0.025 mmol) were added, leading to concentrations of approximately 40 mM for ketone **2f**, 1 mM for MgCl₂, 1 mM for NADPH and 15% v/v for 2-PrOH. At the same time, the addition of this concentrated buffer to the reaction medium, caused an increase in the pH from an initial value of 5 to approximately 7.5, therefore, further pH adjustment was not required for the bioreduction reaction.

Finally, overexpressed *E. coli*/LBADH cells (415 mg) were added. The glass tube was closed and the reaction shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h. After this time, the reaction was stopped by addition of distilled water (20 mL). The mixture was extracted with EtOAc (50 mL) and the organic layer was separated by centrifugation (3 min, 4900 rpm). This extraction and centrifugation protocol was performed three times and, finally, the organic layers were combined and dried over Na₂SO₄. Analysis through GC showed 78% of conversion and 95% of enantiomeric excess (as acetate derivative). The product was purified through column chromatography on silica gel (50% Et₂O/hexane), affording the alcohol (R)-**1f** in 76% yield.

2.9. Chemical synthesis of (R)-1-[(2R,3R)-3-(3-methoxyphenyl)oxiran-2-yl]ethan-1-ol (**3**)

L-(+)-Diethyl tartrate (DET, 175 μL, 0.848 mmol) was added to a solution of Ti(O^{*i*}Pr)₄ (241 μL, 0.848 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) at -20 °C. The solution was stirred during 30 min at -20 °C and then, a *tert*-butyl hydroperoxide (^{*t*}BuOOH) solution in decane (5.5 M, 250 μL, 1.38 mmol) was added dropwise. After additional 10 min of stirring at -20 °C, a solution of (R)-**1f** (95% *ee*, 120 mg, 0.673 mmol) in dry CH₂Cl₂

(2 mL) was added dropwise and stirred at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 3 h. Afterwards, the resulting mixture was quenched with water (10 mL) and left warming up to room temperature during 30 min. The reaction was filtered through a Celite pad and extracted with CH_2Cl_2 ($3 \times 15\text{ mL}$). The organic phases were combined and washed with brine ($2 \times 10\text{ mL}$), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and the solvent evaporated under reduced pressure. The reaction crude was analyzed by ^1H NMR finding a 89% conversion and 83% diastereomeric excess. Then, the reaction crude was purified by preparative thin layer chromatography (75% Et_2O /hexane), yielding the corresponding epoxide **3** (80% yield, 95% *ee*, 83% *de*).

(R)-1-[(2R,3R)-3-(3-Methoxyphenyl)oxiran-2-yl]ethan-1-ol (**3**) [61]

Yellow wax. R_f (75% Et_2O /hexane): 0.62. IR (NaCl): 3470, 2979, 2965, 2915, 2873, 2847, 1737, 1604, 1586, 1492, 1459, 1441, 1257, 1238, 1154, 1139, 1036, 1025, 853, 801, 782, 732, 695, 591, 504 cm^{-1} . ^1H NMR (300.13 MHz, CDCl_3 , major diastereoisomer): δ 1.31 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.5\text{ Hz}$, 3 H), 2.21 (br s, 1 H), 3.06 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 2.6$, $^4J_{\text{HH}} = 0.8\text{ Hz}$, 1 H), 3.80 (s, 3 H), 3.93 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 2.1\text{ Hz}$, 1 H), 4.10 (qd, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$, $^3J_{\text{HH}} = 2.9\text{ Hz}$, 1 H), 6.79–6.91 (m, 3 H), 7.23–7.28 (m, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3 , major diastereoisomer): δ 160.0 (C), 138.8 (C), 129.7 (CH), 118.2 (CH), 114.1 (CH), 110.9 (CH), 65.7 (CH), 64.9 (CH), 55.4 (CH_3), 54.7 (CH), 18.8 (CH_3) ppm. HRMS (ESI $^+$, m/z): calcd for $(\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_3)^+$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 195.1016, found: 195.1014.

3. Results and discussion

3.1. Chemical synthesis of (*E*)- α,β -unsaturated ketones and racemic (*E*)-allylic alcohols

Prior to the development of the enzymatic study, which includes the laccase-mediated oxidation of the (het)aryl allylic alcohols **1a-p** and the bioreduction of the corresponding ketones **2a-p**, the syntheses of both families of organic compounds were performed following methods already reported in the literature (Scheme 2). Firstly, (*E*)-unsaturated ketones **2a-p** were synthesized in moderate to excellent yield after column chromatography (59–96%) following the procedure already described by List and co-workers for ketones **2a**, **2l** and **2o** [60], consisting in the aldol condensation between acetone and (hetero)aromatic aldehydes catalyzed by the morpholinium trifluoroacetate salt. The resulting ketones were then chemically reduced using sodium borohydride, obtaining the racemic (*E*)-alcohols **1a-p** after 3 h of reaction and column chromatography purification on silica gel (46–99%) [52]. Subsequently, GC analytical methods to separate the ketone and alcohol enantiomers were developed to measure in a later stage the enzymatic reaction conversion and *ee* values (see the Supplementary data for details).

3.2. Laccase-mediated oxidation of (*E*)-4-(het)arylbut-3-en-2-ols **1a-p**

Recently, our research group described the oxidation of this family of allylic alcohols using the catalytic system composed by the laccase from *Trametes versicolor* and the oxy-radical TEMPO [52]. To achieve a complete conversion in the oxidation of (*E*)-4-phenylbut-3-en-2-ol (**1a**, 100 mM), the transformation was performed at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ using 4.6 units of LTv and 33 mol% of TEMPO in a citrate buffer 50 mM pH 5.0 using MTBE (50% *v/v*) as cosolvent to facilitate the solubility of the starting material. However, in this contribution we have further optimized the

reaction conditions considering, if possible, lower amounts of TEMPO (10 or 20 mol%) and MTBE (0 or 20% *v/v*). Gladly, it was discovered that complete conversions into (*E*)-4-phenylbut-3-en-2-one (**2a**) were attained after 16 h, even just employing 10 mol% of TEMPO in the absence of MTBE (see Table S1 in the Supplementary data), appearing critical the use of a slow speed magnetic agitation (150 rpm) since it avoided the split of the reactant and catalysts around the vial walls.

Next, the oxidation of allylic alcohols **1b-p** (100 mM) was undertaken searching for the lowest possible amounts of TEMPO and MTBE (Table S2 in the Supplementary data for a complete optimization of the reaction conditions). Although a clear trend cannot be observed, it was possible to obtain quantitative conversions ($> 97\%$) for all substrates (Table 1), being feasible to diminish the TEMPO loading for aromatic substrates **1h** (entry 8, Table 1) and **1j** (entry 10, Table 1), and for heteroaromatic derivative **1m** (entry 13, Table 1). The results achieved for allylic alcohols **1b**, **1g**, **1o** and **1p** were especially remarkable (entries 2, 7, 15, and 16, Table 1), as the quantity of TEMPO could be lowered to 10 mol% and the organic cosolvent could be avoided.

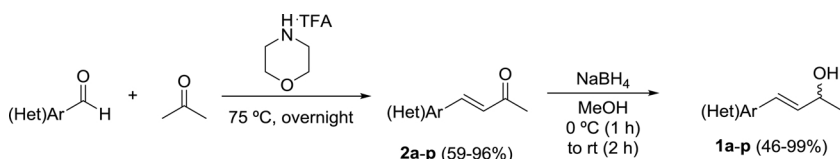
3.3. Bioreduction of (*E*)-4-(het)arylbut-3-en-2-ones

Once optimized the first step of the deracemization protocol, next we focused on the bioreduction of the α,β -unsaturated ketones, starting with (*E*)-4-phenylbut-3-en-2-one (**2a**) as the model substrate. A series of alcohol dehydrogenases overexpressed in *Escherichia coli* were tried such as the one from *Rhodococcus ruber* (ADH-A) [62], *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TeSADH) [63], *Thermoanaerobacter* species (ADH-T) [64], *Ralstonia* species (RasADH) [57,65], and *Sphingobium yanoikuyae* (SyADH) [58,65,66], displaying Prelog selectivity, and the ones from *Lactobacillus brevis* (LBADH) [67,68] and the commercially available evo-1.1.200 ADH [69], acting with opposite selectivity (Tables 2 and S3).

After enzymatic screening for the production of the alcohol (*S*)-**1a**, ADH-A and ADH-T demonstrated complete control of the stereoselection, observing low to moderate conversions and selectivities with TeSADH, RasADH, and SyADH. On the other hand, anti-Prelog evo-1.1.200 displayed moderate selectivity, while LBADH led to the alcohol (*R*)-**1a** in enantiomerically pure form. Then, key parameters for the bioreduction as the amount of 2-propanol (5–30% *v/v*), the substrate concentration (10–40 mM), and the enzyme loading (10–15 mg per 0.015 mmol of ketone) were studied, collecting the most relevant results in Table 2.

The conversion into optically active (*E*)-4-phenylbut-3-en-2-ol increased until 86% when enhancing the hydrogen donor concentration up to 20% *v/v* (entries 15–17), while the selectivity of the enzymes slightly decreased. Therefore, as a compromise, 15% *v/v* of 2-propanol and 40 mM of ketone concentration were selected as the best conditions to achieve the bioreduction, as excellent selectivities and conversions close to 80% were reached (entries 10, 12, and 14).

With the best results in hand, and considering this substrate concentration as optimum to couple it with the chemoenzymatic aerobic oxidation, the reductions of α,β -unsaturated ketones **2b-p** catalyzed by ADH-A, ADH-T and LBADH were carried out in order to produce optically active alcohols **1b-p**. Gratifyingly, (*S*)- and (*R*)-alcohols were obtained with more than 80% *ee* for fourteen out of the sixteen alcohols (Table 3). In comparison with substrate **2a** (entry 1), similar results were found with the three enzymes for the majority of ketones, getting conversions between 60–80% and selectivities $> 90\%$. However, two



Scheme 2. Chemical synthesis of (*E*)- α,β -unsaturated ketones **2a-p** and racemic (*E*)-allylic alcohols **1a-p**.

Table 1

Best conditions for the aerobic oxidation of racemic (het)aryl allylic alcohols **1a-p** using the laccase/TEMPO system in the presence of TEMPO (10-33 mol%) and MTBE (0-50% v/v) after 16 h at 30 °C and 150 rpm.

Entry	Alcohol [(Het)Ar]	TEMPO (mol%)	MTBE (% v/v)	c (%) ^a
1	1a (C ₆ H ₅)	10	0	> 99
2	1b (4-OMe-C ₆ H ₄)	10	0	> 99
3	1c (4-Cl-C ₆ H ₄)	33	50	> 99 ^b
4	1d (4-F-C ₆ H ₄)	33	50	> 99 ^b
5	1e (4-Br-C ₆ H ₄)	33	50	> 99 ^b
6	1f (3-OMe-C ₆ H ₄)	33	50	98 ^b
7	1g (3-F-C ₆ H ₄)	10	0	99
8	1h (3-Me-C ₆ H ₄)	20	50	98
9	1i (2-OMe-C ₆ H ₄)	33	50	> 99 ^b
10	1j (2-F-C ₆ H ₄)	10	50	99
11	1k (2-Pyridyl)	33	50	99 ^b
12	1l (3-Pyridyl)	33	50	> 99 ^b
13	1m (2-Furyl)	20	50	99
14	1n (3-Furyl)	33	50	> 99 ^b
15	1o (2-Thienyl)	10	0	> 99
16	1p (3-Thienyl)	10	0	> 99

^a Conversion values measured by GC analysis.

^b These results were already reported in the literature [52]. Lower conversions were obtained reducing the percentages of TEMPO and/or MTBE (see the Supplementary data).

different facts can be highlighted. First, amongst the two Prelog enzymes (ADH-A and ADH-T), ADH-A seems to be a more robust biocatalyst leading to higher conversion values for selected substrates (4-Br, 3-Me and 2-OMe, entries 5, 8 and 9), which were slowly converted by ADH-T (22–37% conversion). Second, it became clear that apart from possible steric effects, these reductions depended on the electronic character of the (het)aryl substituent. Hence, electron rich groups such as methoxy at positions 2 (entry 9) and 4 (entry 2), or heteroaromatic rings such as furan (entries 13 and 14) and thiophene (entries 15 and 16), limited the extent of the reaction, while electron-withdrawing

moieties such as fluorine (entries 7 and 10) and pyridine (entries 11 and 12), favored the enzymatic transformation.

Due to the fact that the enzymatic bioreduction of ketones derived from furan (**2m** and **2n**) and thiophene (**2o** and **2p**) afforded lower conversions, we decided to study in more detail these biotransformations varying the substrate and hydrogen donor concentrations (Fig. 1). Compared to the initial results shown in Table 3 (entries 13–16) and in Fig. 1 (conditions A), the decrease of 2-propanol concentration up to 10% v/v (conditions B), even at lower substrate concentration (25 mM, conditions C), did not usually lead to better results. However, the use of

Table 2

Bioreduction of ketone **2a** using overexpressed ADHs after 24 h at 30 °C and 250 rpm.

Entry	[Alcohol] (mM)	ADH (mg) ^a	2-PrOH (% v/v)	c (%) ^b	ee (%) ^b
1	25	ADH-A (10)	5	64	99 (S)
2	25	ADH-T (10)	5	65	> 99 (S)
3	25	LBADH (10)	5	54	> 99 (R)
4	25	ADH-A (10)	10	75	> 99 (S)
5	25	ADH-T (10)	10	78	> 99 (S)
6	10	ADH-T (10)	10	85	> 99 (S)
7	25	LBADH (10)	10	74	97 (R)
8	10	LBADH (10)	10	79	> 99 (R)
9	25	LBADH (15)	10	74	> 99 (R)
10	40	ADH-A (10)	15	79	> 99 (S)
11	25	ADH-T (10)	15	83	94 (S)
12	40	ADH-T (10)	15	77	> 99 (S)
13	25	LBADH (10)	15	83	> 99 (R)
14	40	LBADH (10)	15	75	> 99 (R)
15	25	ADH-A (10)	20	85	92 (S)
16	25	ADH-T (10)	20	86	94 (S)
17	25	LBADH (10)	20	86	> 99 (R)

^a The amount of ADH in mgs (per 0.015 mmol of ketone) is indicated in parentheses.

^b Conversion and enantiomeric excess values were measured by GC analysis. Major product enantiomer appears in parentheses.

Table 3
Bioreduction of ketones **2a-p** (40 mM) after 24 h at 30 °C and 250 rpm.

Entry	Ketone	LBADH c (%) ^a	LBADH ee (%) ^b	ADH-T c (%) ^a	ADH-T ee (%) ^b	ADH-A c (%) ^a	ADH-A ee (%) ^b
1	2a (C ₆ H ₅)	75	> 99 (R)	77	> 99 (S)	79	> 99 (S)
2	2b (4-OMe-C ₆ H ₄)	51	70 (R)	50	60 (S)	49	60 (S)
3	2c (4-Cl-C ₆ H ₄)	77	92 (R)	77	94 (S)	77	99 (S)
4	2d (4-F-C ₆ H ₄)	70	94 (R)	75	96 (S)	70	96 (S)
5	2e (4-Br-C ₆ H ₄)	78	94 (R)	29	94 (S)	78	94 (S)
6	2f (3-OMe-C ₆ H ₄)	78	93 (R)	51	93 (S)	75	94 (S)
7	2g (3-F-C ₆ H ₄)	79	98 (R)	83	99 (S)	80	99 (S)
8	2h (3-Me-C ₆ H ₄)	72	95 (R)	37	95 (S)	69	96 (S)
9	2i (2-OMe-C ₆ H ₄)	56	88 (R)	22	90 (S)	60	90 (S)
10	2j (2-F-C ₆ H ₄)	80	99 (R)	83	99 (S)	81	99 (S)
11	2k (2-Pyridyl)	94	99 (R)	88	> 99 (S)	93	> 99 (S)
12	2l (3-Pyridyl)	89	99 (R)	86	99 (S)	89	99 (S)
13	2m (2-Furyl)	67	86 (R)	69	82 (S)	64	82 (S)
14	2n (3-Furyl)	64	90 (R)	66	90 (S)	61	90 (S)
15	2o (2-Thienyl)	66	76 (R)	67	78 (S)	64	78 (S)
16	2p (3-Thienyl)	66	88 (R)	66	86 (S)	63	93 (S)

^a Conversion values measured by GC analysis.

^b Enantiomeric excess values were measured by GC analyses after derivatization of the reaction crudes with acetic anhydride. Major product enantiomer appears in parentheses.

lower amounts of the ketone (conditions D), generally afforded higher conversions, although at the expenses of slightly inferior *ee* values. Similar trends were observed for all ADHs independently of their stereopreference.

3.4. Deracemization of (*E*)-4-(*het*)arylbut-3-en-2-ols **1a-p**

The successful development of aerobic oxidation reactions mediated by the laccase from *Trametes versicolor* in combination with TEMPO for

alcohols **1a-p**, and the discovery of active and selective ADHs that could be applied to the bioreduction of the corresponding α,β -unsaturated ketones **2a-p**, motivated us to initiate the search for the optimal conditions towards the deracemization of racemic allylic alcohols **1a-p**. Taking into account the different reaction conditions required for both steps, including pH (acidic for the laccase/TEMPO system and neutral for the ADH), the agitation mode (magnetic stirring, 150 rpm, for the oxidation in contrast to the orbital shaking, 250 rpm, preferred by the ADHs), and also the substrate concentration (100 mM in the first stage

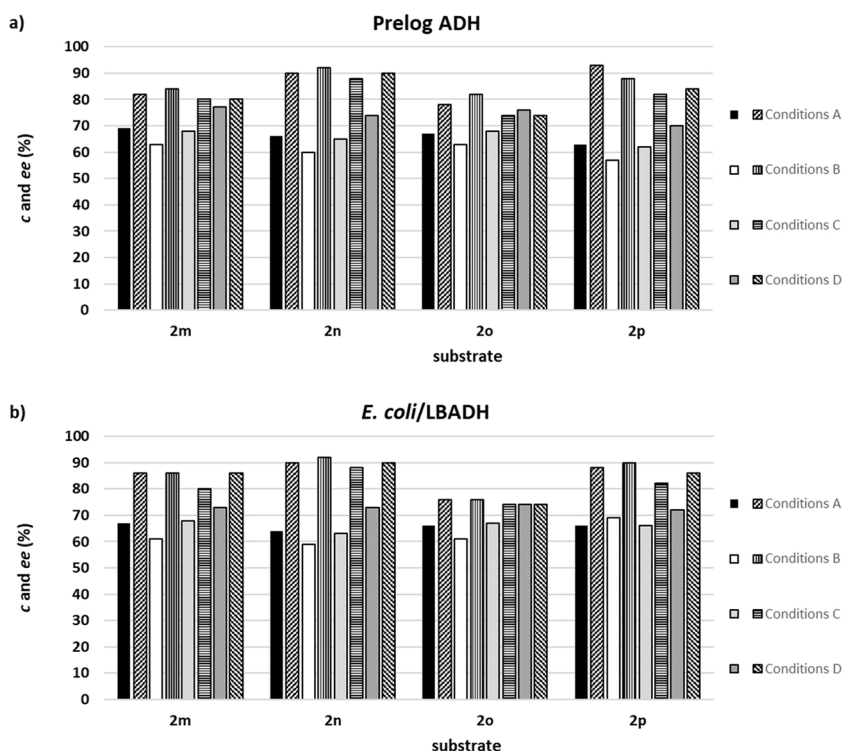


Fig. 1. Effect of the substrate and 2-PrOH concentration in the bioreductions of α,β -unsaturated ketones **2m-p** using: a) *E. coli*/ADH-T (for **2m-o**) and *E. coli*/ADH-A (for **2p**) for the production of (*S*)-alcohols; and b) *E. coli*/LBADH for the production of (*R*)-alcohols. Conditions A: [ketone] = 40 mM and [2-PrOH] = 15% v/v (see Table 3); conditions B: [ketone] = 40 mM and [2-PrOH] = 10% v/v (see Table S4); conditions C: [ketone] = 25 mM and [2-PrOH] = 10% v/v (see Table S4); conditions D: [ketone] = 25 mM and [2-PrOH] = 15% v/v (see Table S4). For each pair, filled bar represents conversion and dashed bar represents *ee* value.

Table 4Deracemization of alcohols **1a-p** combining the laccase/TEMPO system and the corresponding ADH under the optimized conditions.

Entry	Alcohol 1a-p	R	ADH	c (%) ^a	ee (%) ^b
1	1a	H	<i>E. coli</i> /LBADH	74 (52)	> 99 (R)
2 ^c	1a	H	<i>E. coli</i> /LBADH	73 (55)	> 99 (R)
3	1a	H	<i>E. coli</i> /ADH-T	76 (51)	> 99 (S)
4	1b	4-OMe	<i>E. coli</i> /LBADH	49 (22)	72 (R)
5	1b	4-OMe	<i>E. coli</i> /ADH-T	48 (20)	65 (S)
6	1c	4-Cl	<i>E. coli</i> /LBADH	74 (62)	93 (R)
7	1c	4-Cl	<i>E. coli</i> /ADH-A	69 (54)	98 (S)
8	1d	4-F	<i>E. coli</i> /LBADH	60 (44)	93 (R)
9	1d	4-F	<i>E. coli</i> /ADH-T	52 (40)	98 (S)
10	1e	4-Br	<i>E. coli</i> /LBADH	69 (56)	92 (R)
11	1e	4-Br	<i>E. coli</i> /ADH-A	55 (39)	93 (S)
12	1f	3-OMe	<i>E. coli</i> /LBADH	66 (52)	93 (R)
13	1f	3-OMe	<i>E. coli</i> /ADH-A	70 (57)	98 (S)
14	1g	3-F	<i>E. coli</i> /LBADH	84 (62)	> 99 (R)
15	1g	3-F	<i>E. coli</i> /ADH-T	87 (68)	> 99 (S)
16	1h	3-Me	<i>E. coli</i> /LBADH	68 (52)	96 (R)
17	1h	3-Me	<i>E. coli</i> /ADH-A	72 (58)	96 (S)
18	1i	2-OMe	<i>E. coli</i> /LBADH	64 (55)	94 (R)
19	1i	2-OMe	<i>E. coli</i> /ADH-A	60 (49)	94 (S)
20	1j	2-F	<i>E. coli</i> /LBADH	81 (65)	99 (R)
21	1j	2-F	<i>E. coli</i> /ADH-T	82 (66)	99 (S)
22	1k	2-Pyridyl	<i>E. coli</i> /LBADH	95 (87)	96 (R)
23	1k	2-Pyridyl	<i>E. coli</i> /ADH-A	95 (83)	96 (S)
24	1l	3-Pyridyl	<i>E. coli</i> /LBADH	91 (76)	94 (R)
25	1l	3-Pyridyl	<i>E. coli</i> /ADH-A	86 (70)	95 (S)
26	1m	2-Furyl	<i>E. coli</i> /LBADH	65 (48)	87 (R)
27	1m	2-Furyl	<i>E. coli</i> /ADH-T	64 (48)	86 (S)
28	1n	3-Furyl	<i>E. coli</i> /LBADH	59 (42)	93 (R)
29	1n	3-Furyl	<i>E. coli</i> /ADH-T	62 (44)	92 (S)
30	1o	2-Thienyl	<i>E. coli</i> /LBADH	58 (47)	75 (R)
31	1o	2-Thienyl	<i>E. coli</i> /ADH-T	62 (49)	74 (S)
32	1p	3-Thienyl	<i>E. coli</i> /LBADH	65 (51)	89 (R)
33	1p	3-Thienyl	<i>E. coli</i> /ADH-A	69 (52)	92 (S)

^a Conversion values measured by GC analysis. Isolated yields after column chromatography appear in parentheses.

^b Enantiomeric excess values were measured by GC analyses after derivatization of the reaction crudes with acetic anhydride. Major product enantiomer appears in parentheses.

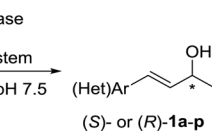
^c No cosolvent was used and TEMPO loading was diminished to 10 mol% in the first step.

and 40 mM in the second one), a one-pot two-step deracemization protocol was followed. Hence, the aerobic oxidation of alcohols **1a-p** was stopped by a proper dilution of the reaction with Tris-HCl buffer 50 mM pH 8, leading to a pH adjustment of 7.5 and a substrate concentration of 40 mM to carry out the bioreduction step (Table 4).

In order to demonstrate a general methodology, the oxidation step was achieved in the presence of TEMPO (33 mol%) and MTBE (50% v/v), conditions that allowed the quantitative oxidation of alcohols **1a-p** (Tables S1 and S2 in the Supplementary data) [70], necessary to avoid ee erosion in the whole process. After 16 h, the organic cosolvent was evaporated, so it did not interfere in the second step. Then, over-expressed LBADH was added to produce the alcohols (R)-**1a-p** (22–87% yield, 72–> 99%), and ADH-T (20–68% yield, 65–> 99%) or ADH-A (39–83% yield, 86–> 99%) to obtain (S)-**1a-p** after column chromatography.

Some of these allylic alcohols have been described as valuable precursors of biologically active compounds. Thus, (S)-**1c** can provide (R)-baclofen [71], which has been employed for the treatment of spasticity, (S)-**1e** is a key building-block of α -amino amide dipeptidyl peptidase IV inhibitors [72,73], used for the treatment of type 2 diabetes, and (R)-**1b** has been utilized as precursor of a derivative of *cis*-calamene terpenoid [74].

To demonstrate the applicability of this method, semi-preparative

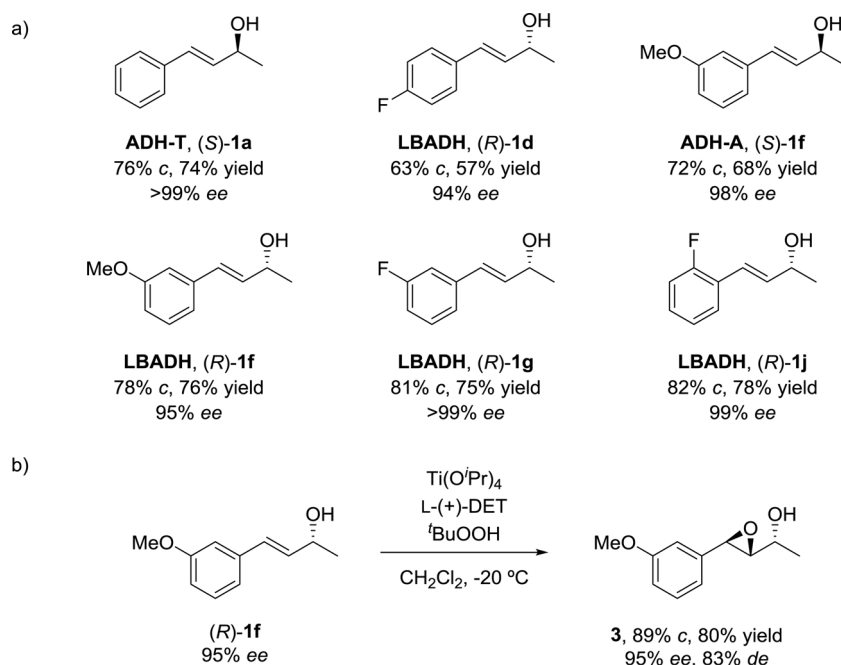


deracemization experiments (Scheme 3a) were performed with selected alcohols **1d,f,g,j** (0.16 mmol) and also at preparative scale with **1a** and **1f** (0.8–1.0 mmol) for the production of derivatives (S)-**1a** and (R)-**1f**, and their optical rotation values were compared to those previously described in the literature (see the Supplementary data), confirming in this manner the proposed absolute configurations, which were in accordance with the stereoselectivity generally displayed by these ADHs [62,64,67,68].

As a further extension of this synthetic approach, (R)-**1f** obtained at preparative scale, was stereoselectively epoxidized employing modified conditions of Sharpless methodology, providing epoxide **3** in high yield (80%, Scheme 3b) and selectivity (95% ee, 83% de). This highly reactive derivative is a synthon for biologically active natural compounds Bryostatatin 1, used as antiviral and anti-Alzheimer agent, and amphotericin B, a potent antifungal agent [61].

4. Conclusions

The search for asymmetric synthetic methods that can provide highly valuable molecules under simple and mild conditions has largely increased in the past years. Deracemization reactions are elegant strategies to produce chiral enantiopure compounds starting from the corresponding racemates. Different biocatalytic approaches have been



Scheme 3. a) Deracemization examples at (semi)preparative scale. b) Epoxidation of enantioenriched alcohol (R)-1f.

designed using whole cell biocatalysts or by combining two ADHs with opposite stereopreference and different cofactor recognition. However, an interesting method is the linear deracemization *via* combination of a non-selective oxidation with a stereoselective reduction step. Herein, we have optimized the oxidation of a series of (het)aryl allylic secondary alcohols with the laccase from *Trametes versicolor* and the radical TEMPO, and the reduction of the corresponding α,β -unsaturated ketone intermediates employing overexpressed alcohol dehydrogenases. It was observed that in the oxidation step it was possible to diminish the quantity of TEMPO and MTBE for some of the substrates by carefully controlling the agitation speed. Applying both steps in a sequential one-pot mode, 16 enantioenriched alcohols (up to > 99% ee) could be obtained with moderate to high isolated yields (up to 87%). Finally, the application of this methodology at preparative scale was also demonstrated, synthesizing a valuable epoxy alcohol that can be utilized as intermediate of biologically active compounds.

CRedit authorship contribution statement

Jesús Albarrán-Velo: Validation, Investigation, Writing - original draft. **Vicente Gotor-Fernández:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision. **Iván Lavandera:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MEC, Project CTQ2016-75752-R) and the Asturian regional government (FC-GRUPIN-IDI/2018/000181) are gratefully acknowledged. J.A.-V. also thanks the Asturian regional government for a predoctoral fellowship inside the Severo Ochoa programme (BP17-32). Prof. Wolfgang Kroutil (University of Graz, Austria) is acknowledged for the donation of overexpressed alcohol dehydrogenases.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.111087>.

References

- [1] A. Nagata, Y. Akagi, S.S. Masoud, M. Yamanaka, A. Kittaka, M. Uesugi, M. Odagi, K. Nagasawa, Stereoselective synthesis of four calcitriol lactone diastereomers at C23 and C25, *J. Org. Chem.* 84 (2019) 7630–7641.
- [2] J. Liu, S. Krajangri, J. Yang, J.Q. Li, P.G. Andersson, Iridium-catalysed asymmetric hydrogenation of allylic alcohols via dynamic kinetic resolution, *Nat. Catal.* 1 (2018) 438–443.
- [3] P. Fan, C. Wang, Molybdenum-catalyzed asymmetric *anti*-dihydroxylation of allylic alcohols, *Commun. Chem.* 2 (2019) 104.
- [4] C. You, S. Li, X. Li, H. Lv, X. Zhang, Enantioselective Rh-catalyzed anti-Markovnikov hydroformylation of 1,1-disubstituted allylic alcohols and amines: an efficient route to chiral lactones and lactams, *ACS Catal.* 9 (2019) 8529–8533.
- [5] S.L. Rossler, D.A. Petrone, E.M. Carreira, Iridium-catalyzed asymmetric synthesis of functionally rich molecules enabled by (phosphoramidite,olefin) ligands, *Acc. Chem. Res.* 52 (2019) 2657–2672 Recent review.
- [6] A. Lumbruso, M.L. Cooke, B. Breit, Catalytic asymmetric synthesis of allylic alcohols and derivatives and their applications in organic synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 1890–1932.
- [7] B. Maliszewski, T. Bauer, Enantioselective alkenylation of aldehydes with protected propargylic alcohols in the presence of a crown ether as an additive, *Adv. Synth. Catal.* 361 (2019) 3689–3693.
- [8] Y. Cai, J.-W. Zhang, F. Li, J.-M. Liu, S.-L. Shi, Nickel/N-heterocyclic carbene complex-catalyzed enantioselective redox-neutral coupling of benzyl alcohols and alkynes to allylic alcohols, *ACS Catal.* 9 (2019) 1–6.
- [9] S. Crotti, G. Belletti, N. Di Iorio, E. Marotta, A. Mazzanti, P. Righi, G. Bencivenni, Asymmetric vinylogous aldol addition of alkylidene oxindoles on trifluoromethyl- α,β -unsaturated ketones, *RSC Adv.* 8 (2018) 33451–33458.
- [10] W.J. Jang, J. Yun, Copper-catalyzed tandem hydrocupration and diastereo- and enantioselective borylalkyl addition to aldehydes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (2018) 12116–12120.
- [11] A. Narczyk, M. Pieczykolan, S. Stecko, The synthesis of non-racemic β -alkyl- β -aryldisubstituted allyl alcohols and their transformation into allylamines and amino acids bearing a quaternary stereocenter, *Org. Biomol. Chem.* 16 (2018) 3921–3946.
- [12] Z. Liu, B. Breit, Rhodium-catalyzed regio- and enantioselective addition of *N*-hydroxyphthalimide to allenes: a strategy to synthesize chiral allylic alcohols, *Org. Lett.* 20 (2018) 300–303.
- [13] F. Chen, Y. Zhang, L. Yu, S. Zhu, Enantioselective NiH/Pmrox-catalyzed 1,2-reduction of α,β -unsaturated ketones, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (2017) 2022–2025.
- [14] S. Liu, P. Cui, J. Wang, H. Zhou, Q. Liu, J. Lv, Asymmetric transfer hydrogenation of cycloalkyl vinyl ketones to allylic alcohols catalyzed by ruthenium amido complexes, *Org. Biomol. Chem.* 17 (2019) 264–267.
- [15] C. Li, W. Lu, B. Lu, W. Li, X. Xie, Z. Zhang, Ru-catalyzed chemo- and enantioselective hydrogenation of 2,4-pentadien-1-ones: synthesis of chiral 2,4-

- pentadien-1-ols, *J. Org. Chem.* 84 (2019) 16086–16094.
- [16] L. Amenós, L. Nóvoa, L. Trullí, A. Arroyo-Bondía, A. Parra, M. Tortosa, Harnessing the elusive 1,4-reduction of vinyl epoxides through copper catalysis, *ACS Catal.* 9 (2019) 6583–6587.
- [17] K.-Y. Ye, T. McCallum, S. Lin, Bimetallic radical redox-relay catalysis for the isomerization of epoxides to allylic alcohols, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (2019) 9548–9554.
- [18] R.M. Neyyappadath, R. Chisholm, M.D. Greenhalgh, C. Rodríguez-Esrich, M.A. Pericàs, G. Hähner, A.D. Smith, Acylative kinetic resolution of alcohols using a recyclable polymer-supported isothiourea catalyst in batch and flow, *ACS Catal.* 8 (2018) 1067–1075.
- [19] Y. Liu, S. Liu, D. Li, N. Zhang, L. Peng, J. Ao, C.E. Song, Y. Lan, H. Yan, Kinetic resolution of allylic alcohol with chiral BINOL-based alkoxides: a combination of experimental and theoretical studies, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (2019) 1150–1159.
- [20] M. Szigeti, E.R. Tőke, M.C. Turóczy, V. Nagy, G. Szakács, L. Poppe, Lipase-catalyzed kinetic resolution of 4-aryl- and 4-heteroarylbut-3-en-2-ols, *Arkivoc iii* (2008) 45–65.
- [21] A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, G. Maciejewska, C. Wawrzęczyk, Chemoenzymatic synthesis of *trans*- β -aryl- δ -hydroxy- γ -lactones and enzymatic kinetic resolution of their racemic mixtures, *Molecules* 21 (2016) 1552.
- [22] M.-J. Kim, H.K. Lee, J. Park, (S)-Selective dynamic kinetic resolution of allylic alcohols by enzyme-metal biocatalysis, *Bull. Korean Chem. Soc.* 28 (2007) 2096–2098.
- [23] S. Akai, R. Hanada, N. Fujiwara, Y. Kita, M. Egi, One-pot synthesis of optically active allyl esters via lipase–vanadium combo catalysis, *Org. Lett.* 12 (2010) 4900–4903.
- [24] M. Egi, K. Sugiyama, M. Saneto, R. Hanada, K. Kato, S. Akai, A mesoporous-silica-immobilized oxovanadium cocatalyst for the lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution of racemic alcohols, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 3654–3658.
- [25] B. Xia, J. Xu, Z. Xiang, Y. Cen, Y. Hu, X. Lin, Q. Wu, Stereoselectivity-tailored, metal-free hydrolytic dynamic kinetic resolution of Morita–Baylis–Hillman acetates using an engineered lipase–organic base cocatalyst, *ACS Catal.* 7 (2017) 4542–4549.
- [26] T. Sivakumari, R. Preetha, A. Chadha, Enantioselective oxidation of secondary alcohols by *Candida parapsilosis* ATCC 7330, *RSC Adv.* 4 (2014) 2257–2262.
- [27] S. Gandomkar, E. Jost, D. Loidolt, A. Swoboda, M. Pickl, W. Elailly, B. Daniel, M.W. Fraaije, P. Macheroux, W. Kroutil, Biocatalytic enantioselective oxidation of *sec*-allylic alcohols with flavin-dependent oxidases, *Adv. Synth. Catal.* 361 (2019) 5264–5271.
- [28] R. van Deursen, W. Stampfer, K. Edegger, K. Faber, W. Kroutil, Chemo- and stereoselective biocatalytic reduction of α,β -unsaturated ketones employing a chemotolerant ADH from *Rhodococcus ruber* DSM 44541, *J. Mol. Catal., B Enzym.* 31 (2004) 159–163.
- [29] S. Cai, N. Shao, Y. Chen, A. Li, J. Pan, H. Zhu, H. Zou, S. Zeng, L. Sun, J. Zhao, Enantioselective reduction of α,β -unsaturated ketones and aryl ketones by perakine reductase, *Org. Lett.* 21 (2019) 4411–4414.
- [30] S. Sgalla, G. Fabrizi, R. Cirilli, A. Macone, A. Bonamore, A. Boffi, S. Cacchi, Chiral (R)- and (S)-allylic alcohols via a one-pot chemoenzymatic synthesis, *Tetrahedron Asymmetry* 18 (2007) 2791–2796.
- [31] M. Kraußner, W. Hummel, H. Gröger, Enantioselective one-pot two-step synthesis of hydrophobic allylic alcohols in aqueous medium through the combination of a Wittig reaction and an enzymatic ketone reduction, *Eur. J. Org. Chem.* (2007) 5175–5179.
- [32] Y.-C. Liu, Z.-L. Wu, Switchable asymmetric bio-epoxidation of α,β -unsaturated ketones, *Chem. Commun.* 52 (2016) 1158–1161.
- [33] Y.-C. Liu, C. Guo, Y. Liu, H.-B. Wang, Z.-L. Wu, Enzymatic cascades for the stereo-complementary epimerisation of *in situ* generated epoxy alcohols, *Org. Biomol. Chem.* 15 (2017) 2562–2568.
- [34] M. Rachwalski, N. Vermue, F.P.J.T. Rutjes, Recent advances in enzymatic and chemical deracemisation of racemic compounds, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 9268–9282.
- [35] A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, Why leave a job half done? Recent progress in enzymatic deracemizations, *Curr. Green Chem.* 2 (2015) 192–211.
- [36] M.M. Musa, F. Hollmann, F.G. Mutti, Synthesis of enantiomerically pure alcohols and amines via biocatalytic deracemisation methods, *Catal. Sci. Technol.* 9 (2019) 5487–5503.
- [37] C. Aranda, G. Oksdath-Mansilla, F.R. Bisogno, G. de Gonzalo, Deracemisation processes employing organocatalysis and enzyme catalysis, *Adv. Synth. Catal.* 362 (2020) 1233–1257.
- [38] D. Titu, A. Chadha, Enantiomerically pure allylic alcohols: preparation by *Candida parapsilosis* ATCC 7330 mediated deracemisation, *Tetrahedron Asymmetry* 19 (2008) 1698–1701.
- [39] T. Saravanan, R. Selvakumar, M. Doble, A. Chadha, Stereochemical preference of *Candida parapsilosis* ATCC 7330 mediated deracemization: *E*- versus *Z*-aryl secondary alcohols, *Tetrahedron Asymmetry* 23 (2012) 1360–1368.
- [40] C.V. Voss, C.C. Gruber, W. Kroutil, Deracemisation of secondary alcohols via biocatalytic stereoinversion, *Synlett* (2010) 991–998.
- [41] S. Riva, Laccases: Blue enzymes for green chemistry, *Trends Biotechnol.* 24 (2006) 219–226.
- [42] S. Witayakran, A.J. Ragauskas, Synthetic applications of laccase in green chemistry, *Adv. Synth. Catal.* 351 (2009) 1187–1209.
- [43] M.D. Cannatelli, A.J. Ragauskas, Two decades of laccases: advancing sustainability in the chemical industry, *Chem. Rec.* 17 (2017) 122–140.
- [44] A. Zerva, S. Simić, E. Topakas, J. Nikodinovic-Runic, Applications of microbial laccases: patent review of the past decade (2009–2019), *Catalysts* 9 (2019) 1023.
- [45] M. Fabbri, C. Galli, P. Gentili, D. Macchitella, An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 7551–7553.
- [46] I.W.C.E. Arends, Y.-X. Li, R. Ausan, R.A. Sheldon, Comparison of TEMPO and its derivatives as mediators in laccase catalysed oxidation of alcohols, *Tetrahedron* 62 (2006) 6659–6665.
- [47] K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, Laccase/TEMPO-mediated system for the thermodynamically disfavored oxidation of 2,2-dihalo-1-phenylethanol derivatives, *Green Chem.* 16 (2014) 2448–2453.
- [48] L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, Stereoselective amination of racemic *sec*-alcohols through sequential application of laccases and transaminases, *Green Chem.* 19 (2017) 474–480.
- [49] L. Marx, N. Ríos-Lombardía, P. Süß, M. Höhne, F. Moris, J. González-Sabín, P. Berglund, Chemoenzymatic synthesis of sertraline, *Eur. J. Org. Chem.* (2020) 510–513.
- [50] E. Brenna, M. Crotti, F.G. Gatti, D. Monti, F. Parmeggiani, A. Pugliese, F. Tentori, Biocatalytic synthesis of chiral cyclic γ -oesters by sequential C–H hydroxylation, alcohol oxidation and alkene reduction, *Green Chem.* 19 (2017) 5122–5130.
- [51] L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, Mild chemoenzymatic oxidation of allylic *sec*-alcohols. Application to biocatalytic stereoselective redox isomerizations, *ACS Catal.* 8 (2018) 2413–2419.
- [52] J. Albarrán-Velo, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, Sequential two-step stereoselective amination of allylic alcohols through the combination of laccases and amine transaminases, *ChemBioChem* 21 (2020) 200–211.
- [53] S. González-Granda, D. Méndez-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, Laccase-mediated oxidations of propargylic alcohols. Application in the deracemization of 1-arylprop-2-yn-1-ols in combination with alcohol dehydrogenases, *ChemCatChem* 12 (2020) 520–527.
- [54] A.B.V. Silva, E.D. Silva, A.A. dos Santos, J.L. Principal, A sustainable access to ynones through laccase/TEMPO-catalyzed metal- and halogen-free aerobic oxidation of propargylic alcohols in aqueous medium, *Catal. Commun.* 137 (2020) 105946.
- [55] A. Díaz-Rodríguez, N. Ríos-Lombardía, J.H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, Deracemization of profenol core by combining laccase/TEMPO-mediated oxidation and alcohol dehydrogenase-catalysed dynamic kinetic resolution, *Catal. Sci. Technol.* 5 (2015) 1443–1446.
- [56] Other recent approximations to achieve similar deracemization protocols involve: a) the use of TEMPO–I₂ as oxidative system: D. Méndez-Sánchez, J. Mangas-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, Chemoenzymatic deracemization of secondary alcohols by using a TEMPO–iodine–alcohol dehydrogenase system, *ChemCatChem* 7 (2015) 4016–4020; b) the utilization of NaOCl–AZADO in the oxidation step: E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Moris, J. González-Sabín, F. Rebollo, A straightforward deracemization of *sec*-alcohols combining organocatalytic oxidation and biocatalytic reduction, *Eur. J. Org. Chem.* (2018) 3031–3035; and c) the use of TEMPO (oxidation stage) with a rhodium catalyst (reduction stage) in a compartmentalized system: P. Qu, M. Kuepfert, S. Jockusch, M. Weck, Compartmentalized nanoreactors for one-pot redox-driven transformations, *ACS Catal.* 9 (2019) 2701–2706.
- [57] I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil, Stereoselective bioreduction of bulky-bulky ketones by a novel ADH from *Ralstonia* sp, *J. Org. Chem.* 15 (2008) 6003–6005.
- [58] I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W.M.F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, One-way biohydrogen transfer for oxidation of *sec*-alcohols, *Org. Lett.* 11 (2008) 2155–2158.
- [59] K. Edegger, C.C. Gruber, T.M. Poessl, S.R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlin, A. Hafner, W. Kroutil, Biocatalytic deuterium- and hydrogen-transfer using over-expressed ADH-*A*: enhanced stereoselectivity and ²H-labeled chiral alcohols, *Chem. Commun.* (2006) 2402–2404.
- [60] K. Zumbansen, A. Döhning, B. List, Morpholinium trifluoroacetate-catalyzed aldol condensation of acetone with both aromatic and aliphatic aldehydes, *Adv. Synth. Catal.* 352 (2010) 1135–1138.
- [61] D.A. Evans, J.A. Gauchet-Prunet, E.M. Carreira, A.B. Charette, Synthesis of 1,3-diol synthons from epoxy aromatic precursors: an approach to the construction of polyacetate-derived natural products, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 741–750.
- [62] W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzl, W. Kroutil, K. Faber, Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 1014–1017.
- [63] C. Heiss, M. Laivenieks, J.G. Zeikus, R.S. Phillips, Mutation of cysteine-295 to alanine in secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* affects the enantioselectivity and substrate specificity of ketone reductions, *Bioorg. Med. Chem.* 7 (2001) 1659–1666.
- [64] Z. Findrik, D. Vasić-Rački, S. Lütz, T. Dausmann, C. Wandrey, Kinetic modeling of acetophenone reduction catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter* sp, *Biotechnol. Lett.* 27 (2005) 1087–1095.
- [65] H. Man, K. Kędziora, J. Kulig, A. Frank, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, D. Rother, S. Hart, J.P. Turkenburg, G. Grogan, Structures of alcohol dehydrogenases from *Ralstonia* and *Sphingobium* spp. reveal the molecular basis for their recognition of 'bulky-bulky' ketones, *Top. Catal.* 5 (2014) 356–365.
- [66] I. Lavandera, G. Oberdofer, J. Gross, S. de Wildeman, W. Kroutil, Stereocomplementary asymmetric reduction of bulky-bulky ketones by biocatalytic hydrogen transfer, *Eur. J. Org. Chem.* 15 (2008) 2539–2543.
- [67] M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, Highly regio- and enantioselective reduction of 3,5-dioxocarboxylates, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 4306–4308.
- [68] S. Leuchs, L. Greiner, Alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*: a versatile robust catalyst for enantioselective transformations, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2 (2011) 267–281.
- [69] S. Kara, D. Spickermann, A. Weckbecker, C. Leggewie, I.W.C.E. Arends,

- F. Hollmann, Bioreductions catalyzed by an alcohol dehydrogenase in non-aqueous media, *ChemCatChem* 6 (2014) 973–976.
- [70] The deracemization process was also done with alcohol **1a** in the absence of MTBE and using 10 mol% of TEMPO. As can be seen in Table 4, entry 2, the protocol worked similarly, demonstrating that the reaction conditions described in Table 1 are also compatible to achieve this transformation.
- [71] E. Brenna, N. Caraccia, C. Fuganti, D. Fuganti, P. Grasselli, Enantioselective synthesis of β -substituted butyric acid derivatives via orthoester Claisen rearrangement of enzymatically resolved allylic alcohols: application to the synthesis of (*R*)-(-)-baclofen, *Tetrahedron Asymmetry* 8 (1997) 3801–3805.
- [72] S.D. Edmondson, A. Mastracchio, J.L. Duffy, G.J. Eiermann, H. He, I. Ita, B. Leiting, J.F. Leone, K.A. Lyons, A.M. Makarewicz, R.A. Patel, A. Petrov, J.K. Wu, N.A. Thornberry, A.E. Weber, Discovery of potent and selective orally bioavailable β -substituted phenylalanine derived dipeptidyl peptidase IV inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 3048–3052.
- [73] S.D. Edmondson, A. Mastracchio, R.J. Mathvink, J. He, B. Harper, Y.-J. Park, M. Beconi, J. Di Salvo, G.J. Eiermann, H. He, B. Leiting, J.F. Leone, D.A. Levorse, K. Lyons, R.A. Patel, S.B. Patel, A. Petrov, G. Scapin, J. Shang, R.S. Roy, A. Smith, J.K. Wu, S. Xu, B. Zhu, N.A. Thornberry, A.E. Weber, (2*S*,3*S*)-3-Amino-4-(3,3-difluoropyrrolidin-1-yl)-*N,N*-dimethyl-4-oxo-2-(4-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyridin-6-yl-phenyl)butanamide: a selective α -amino amide dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3614–3627.
- [74] E. Brenna, C. Dei Negri, C. Fuganti, F.G. Gatti, S. Serra, Enantioselective synthesis of *cis*-7-methoxy-calamenene via Claisen rearrangement of an enzymatically resolved allyl alcohol, *Tetrahedron Asymmetry* 15 (2004) 335–340.

Este capítulo (p. 183-194) se corresponde con el artículo:

Albarrán-Velo, J., Lavandera, I., y Gotor-Fernández, V. (2019). *Sequential Two-Step Stereoselective Amination of Allylic Alcohols through the Combination of Laccases and Amine Transaminases*. ChemBioChem (Vol. 21, Issues 1-2, pp. 200-211). Wiley.

Debido a la política de autoarchivo de la publicación la versión de la editorial está disponible, únicamente para usuarios con suscripción de pago a la revista, en el siguiente enlace:

<https://doi.org/10.1002/cbic.201900473>

Información facilitada por equipo RUO

CAPÍTULO 3

Estudio de la reacción de oxidación de Wacker-Tsuji fotocatalizada y su aplicación en procesos secuenciales quimioenzimáticos para la obtención de 1-(hetero)arilpropan-2-oles y 1-(hetero)arilpropan-2-aminas enantioenriquecidos

ANTECEDENTES

La presencia de centros estereogénicos en los compuestos orgánicos supone un gran atractivo, sobre todo desde un punto de vista farmacológico. De esta forma, en el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral se ha descrito la importancia tanto de alcoholes como de aminas ópticamente activas en posiciones alílicas, al tratarse de moléculas orgánicas que poseen actividad biológica o son intermedios para otros compuestos de interés farmacológico. Siguiendo esta línea, entre los distintos grupos de compuestos nitrogenados cabe destacar la familia de las aminas biógenas (histamina, putrescina, espermina...),²²³ presentes en determinados alimentos y bebidas fermentadas, y cuya concentración provoca efectos muy nocivos en los consumidores. Sin embargo, su existencia en forma libre y en bajas concentraciones en organismos vivos tiene efectos muy beneficiosos debido a sus interacciones no covalentes con biomoléculas, como ácidos nucleicos. Dentro de este grupo, destacan los derivados de la β-feniletilamina (o 2-feniletilamina), los cuales han demostrado una importante capacidad neurotransmisora y neuromoduladora del sistema nervioso central humano.²²⁴ Por este motivo, los derivados de esta amina, tanto naturales como sintéticos, tienen una alta importancia farmacológica (Figura 3.1).

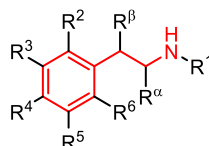


Figura 3.1. Estructura general de la β-feniletilamina con posibles sustituciones.

Por otra parte, su homólogo oxigenado, el alcohol fenético (o 2-feniletanol), se encuentra presente en los extractos de diferentes plantas aromáticas, utilizándose en perfumería debido a su aroma floral,²²⁵ pero también destaca su perfil biológico por su actividad antibiótica y antimicrobiana.²²⁶ A su vez, esta familia de alcoholes

²²³ (a) R. Jastrząb, L. Łomozik, B. Tytkowski, *Phys. Sci. Rev.* **2016**, *1*, 20160003; (b) D. Erdag, O. Merhan, B. Yildiz, *Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines*, doi: 10.5772/intechopen.81569.

²²⁴ M. Irsfeld, M. Spadafore, B. M. Prüß, *Webmedcentral* **2013**, *4*, 4409.

²²⁵ K.-G. Fahlbusch, F.-J. Hammerschmidt, J. Panten, W. Pickenhagen, D. Schatkowski, K. Bauer, D. Gaber, H. Surburg, "Single fragrance and flavor compounds" en *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, Capítulo 2, pp. 77-84.

²²⁶ (a) B. D. Lilley, J. H. Brewer, *J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed.* **1953**, *42*, 6-8; (b) B. T. Lingappa, M. Prasad, Y. Lingappa, D. F. Hunt, K. Biemann, *Science* **1969**, *163*, 192-194; (c) R. M. E. Richards, R. J. McBride, *J. Pharm. Sci.* **1973**, *62*, 585-587.

Capítulo 3. Antecedentes

quirales también son útiles desde el punto de vista químico, al tratarse de intermedios sintéticos de estructuras más complejas y de gran importancia.²²⁷

En cuanto a los derivados nitrogenados, observando la estructura general de las feniletilaminas, los derivados sintéticos con sustitución en la posición R^α se denominan anfetaminas, y han sido estudiadas a lo largo de la historia como potenciales fármacos para el tratamiento de diversos desórdenes del sistema nervioso central u otras patologías (Figura 3.2).²²⁸ De esta forma, se puede establecer que los 1-arylpropan-2-oles y las 1-arylpropan-2-aminas quirales, son compuestos de alto interés y que serán objeto de estudio sintético en este capítulo.

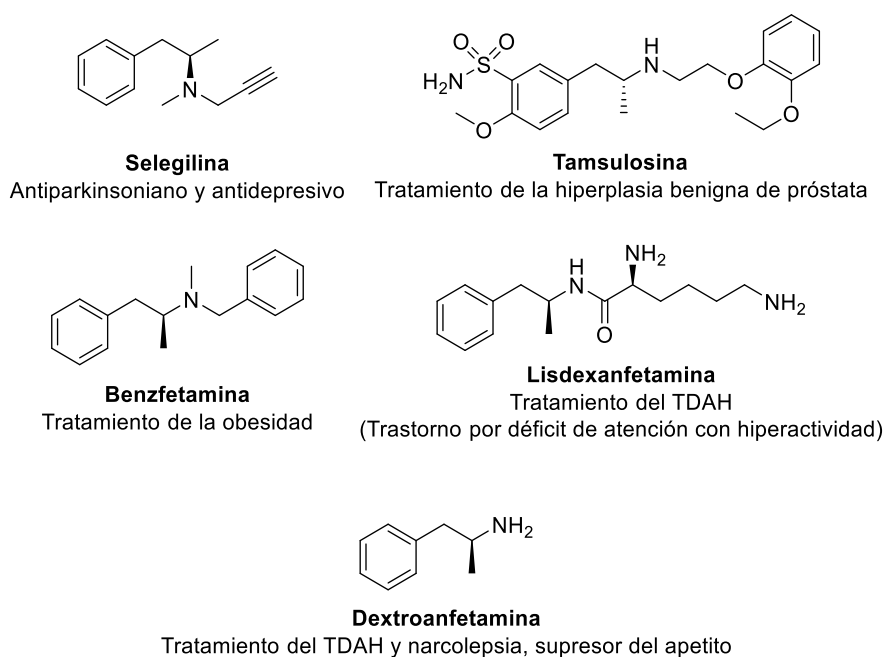


Figura 3.2. Ejemplos de derivados de anfetamina con importantes actividades farmacológicas.

²²⁷ F. Bracher, T. Litz, *Arch. Pharm.* **1994**, 327, 591-593.

²²⁸ D. J. Heal, S. L. Smith, J. Gosden, D. J. Nutt, *J. Psychopharmacol.* **2013**, 27, 479-496.

3.1.1. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE 1-ARILPROPAN-2-AMINAS

Debido al gran interés previamente comentado de estos compuestos, su preparación ha sido ampliamente estudiada a través de diferentes metodologías, donde se incluyen tanto aproximaciones enzimáticas^{93e,229} como químicas.²³⁰ En el caso de las transformaciones biocatalíticas, se han descrito diversas aproximaciones como aminaciones de alcoholes racémicos,^{108a,209,210a,211b,211e} desracemizaciones^{106c} o resoluciones cinéticas dinámicas de las correspondientes aminas racémicas,²³¹ en las cuales se hace empleo de varios catalizadores de manera secuencial o simultánea.

En cuanto a las aminaciones estereoselectivas de alcoholes racémicos, ya fueron previamente comentadas en las *Secciones 0.3* y *2.1.4*, estableciéndose como una metodología muy interesante desde el punto de vista químico. Concretamente, de la mano de Mutti y colaboradores, se describió la aminación estereoselectiva de varios 1-arilpropan-2-oles para dar lugar a las correspondientes aminas combinando ADHs y amino deshidrogenasas (Esquema 3.1a).^{108a} Por otra parte, los procesos de desracemización son interesantes desde el punto de vista de eficiencia atómica, dado que el reactivo de partida y el producto son el mismo. Así, Yun y colaboradores llevaron a cabo la desracemización de diferentes aminas, entre las que se encontraba un derivado de anfetamina, mediante la combinación de amino deshidrogenasas y amino transaminasas, pudiendo obtener ambos enantiómeros en función del conjunto de biocatalizadores empleados (en el Esquema 3.1b se representa el acceso a una (*S*)-amina).^{106c} Por último, Gil y colaboradores describieron la exitosa resolución cinética dinámica de una serie de aminas (entre ellas, dos derivados de anfetamina) mediante la utilización de una lipasa como es la CAL-B, y un agente radicalario que

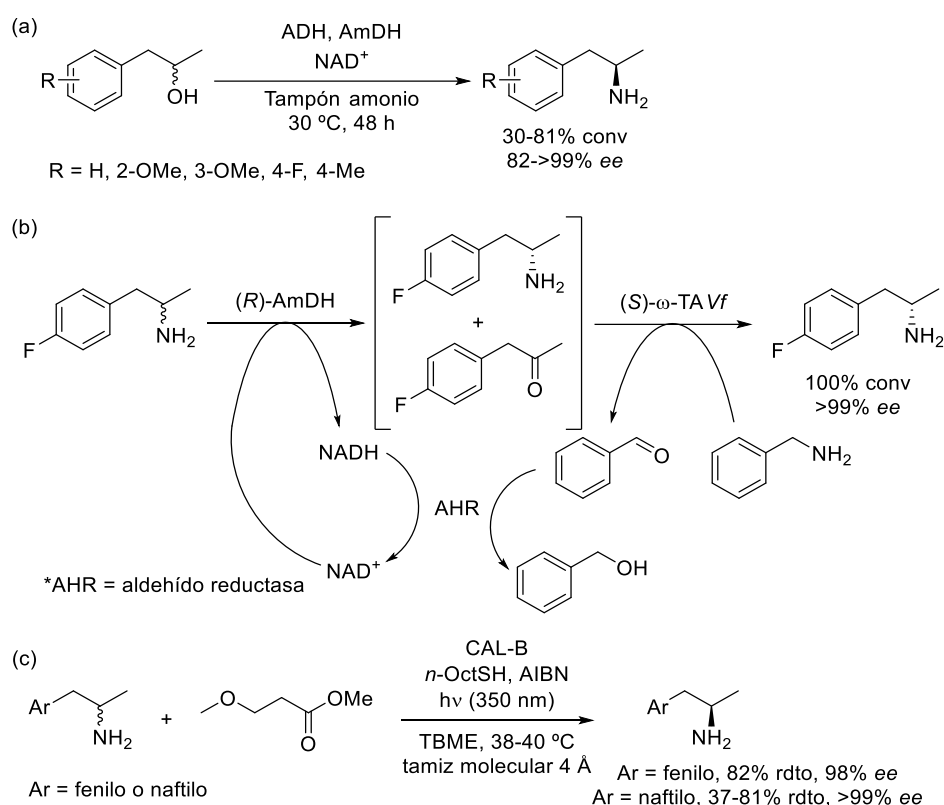
²²⁹ Ejemplos recientes: (a) J. Liu, B. Q. W. Pang, J. P. Adams, R. Snajdrova, Z. Li, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 425-431; (b) A. Pushpanath, E. Sirola, A. Bornadel, D. Woodlock, U. Schell, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 3204-3209; (c) J. Paris, A. Telzerow, N. Ríos-Lombardía, K. Steiner, H. Schwab, F. Morís, H. Gröger, J. González-Sabín, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7*, 5486-5493; (d) R. S. Correia Cordeiro, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, R. Kourist, J. González-Sabín, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 1272-1277; (e) A. Telzerow, J. Paris, M. Håkansson, J. González-Sabín, N. Ríos-Lombardía, M. Schürmann, H. Gröger, F. Morís, R. Kourist, H. Schwab, K. Steiner, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 1140-1148; (f) F.-F. Chen, Y.-H. Zhang, Z.-J. Zhang, L. Liu, J.-P. Wu, J.-H. Xu, G.-W. Zheng, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 14987-14993; (g) J. Mangas-Sánchez, M. Sharma, S. C. Cosgrove, J. I. Ramsden, J. R. Marshall, T. W. Thorpe, R. B. Palmer, G. Grogan, N. J. Turner, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 5052-5057.

²³⁰ Ejemplos recientes: (a) B. Laroche, H. Ishitani, S. Kobayashi, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 4699-4704; (b) T. Yasukawa, R. Masuda, S. Kobayashi, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 1088-1092; (c) L. Cicco, A. Salomone, P. Vitale, N. Ríos-Lombardía, J. González-Sabín, J. García-Álvarez, F. M. Perna, V. Capriati, *ChemSusChem* **2020**, *13*, 3583-3588.

²³¹ F. Poulhès, N. Vanthuyne, M. P. Bertrand, S. Gastaldi, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7281-7286.

Capítulo 3. Antecedentes

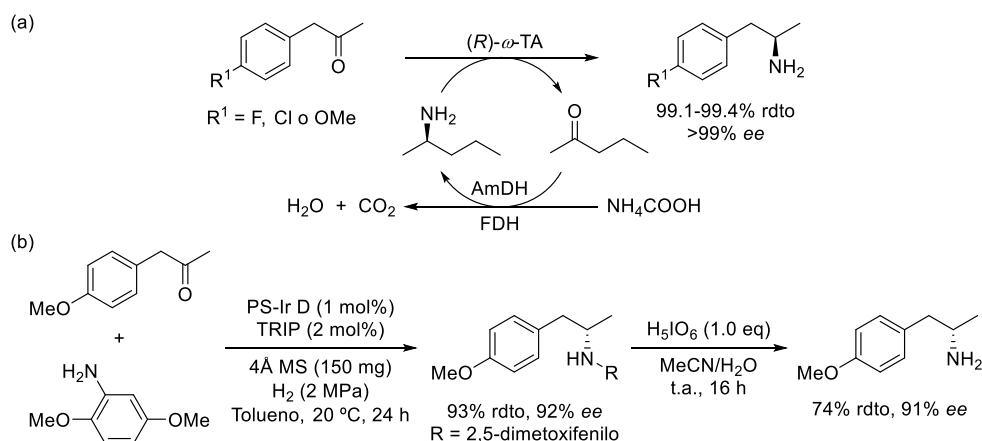
promueve la racemización del enantiómero no reactivo, el octanotiol (*n*-OctSH), en presencia de radiación lumínica (Esquema 3.1c).²³¹



Esquema 3.1. Ejemplos de metodologías multi- o quimioenzimáticas para la obtención 1-arilpropan-2-aminas quirales a partir de sustratos racémicos.

Además del uso de racematos como productos de partida, el empleo de cetonas como materiales de partida resulta altamente interesante debido a la posibilidad de poder realizar procesos de biotransaminación o aminación reductiva asimétrica. Así, Zheng y colaboradores han desarrollado un proceso en cascada constituido por tres enzimas (transaminasa, amino deshidrogenasa y formiato deshidrogenasa) para llevar a cabo la aminación estereoselectiva de diferentes cetonas, generando únicamente agua y dióxido de carbono como subproductos.^{229f} De entre las diferentes cetonas estudiadas, se aplicó a tres 1-arilpropan-2-onas diferentes, dando lugar a las correspondientes (*R*)-1-arilpropan-2-aminas con excelente rendimientos y excesos enantioméricos (Esquema 3.2a). Complementariamente, los métodos no enzimáticos también resultan herramientas eficaces para la síntesis de 1-arilpropan-2-aminas en

forma ópticamente activa a partir de las cetonas. Así, Kobayashi y colaboradores han descrito una metodología en flujo consistente en un proceso de hidrogenación asimétrica.^{230b} Este método se basa en la utilización de un catalizador de iridio aquiral soportado en poliestireno (PS-Ir D) y el empleo de un ácido fosfórico quirales (TRIP), obteniendo así diferentes aminas quirales sustituidas, entre las cuales se estudió la preparación de un derivado de anfetamina y su posterior desprotección (Esquema 3.2b).



Esquema 3.2. Ejemplos de metodologías sintéticas para la obtención 1-arilpropan-2-aminas quirales a partir de las correspondientes 1-arilpropan-2-onas.

3.1.2. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE 1-ARILPROPAN-2-OLES

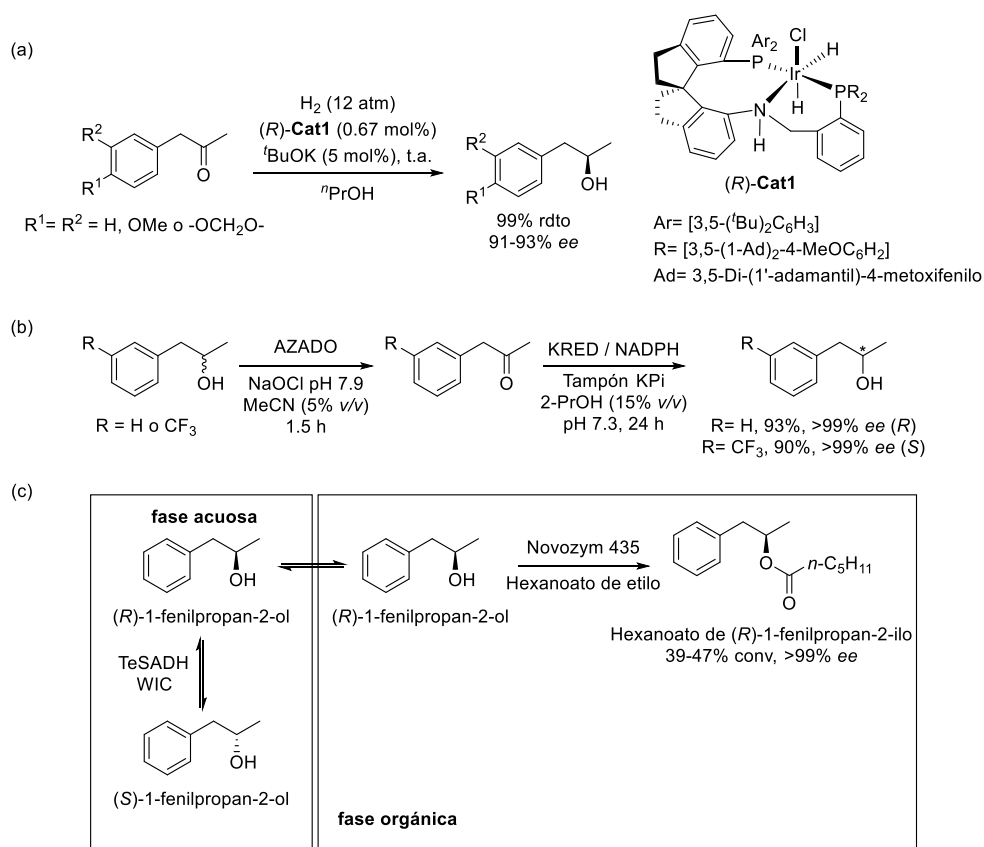
La síntesis de los homólogos oxigenados de las 1-arilpropan-2-aminas, los 1-arilpropan-2-oles, ha sido también descrita mediante métodos químicos²³² o enzimáticos,^{229d,233} así como a través de aproximaciones multicatalíticas que

²³² Ejemplos recientes: (a) B. Gao, X. Feng, W. Meng, H. Du, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 4498-4504; (b) F.-H. Zhang, F.-J. Zhang, M.-L. Li, J.-H. Xie, Q.-L. Zhou, *Nat. Catal.* **2020**, *3*, 621-627.

²³³ Ejemplos recientes: (a) H. C. Lo, J. D. Ryan, J. B. Kerr, D. S. Clark, R. H. Fish, *J. Organomet. Chem.* **2017**, *839*, 38-52; (b) P. Vitale, V. M. Abbinante, F. M. Perna, A. Salomone, C. Cardellicchio, V. Capriati, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 1049-1057; (c) H. N. Hoang, Y. Nagashima, S. Mori, H. Kagechika, T. Matsuda, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 2984-2989; (d) M. M. Musa, O. Bsharat, I. Karume, C. Vieille, M. Takahashi, S. M. Hamdan, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 798-805; (e) R.-J. Li, A. Li, J. Zhao, Q. Chen, N. Li, H.-L. Yu, J.-H. Xu, *Catal. Sci. Technol.* **2018**, *8*, 4638-4644.

Capítulo 3. Antecedentes

incluyen desracemizaciones,²³⁴ resoluciones cinéticas dinámicas²³⁵ o cascadas metalocatalíticas.²³⁶ En este punto nos ha parecido conveniente resaltar dos ejemplos descritos en la bibliografía. El primero, desarrollado por Zhou y colaboradores, describe la hidrogenación estereoselectiva de una gran variedad de cetonas alifáticas y (hetero)aromáticas, encontrándose entre ellas algunos ejemplos de 1-arylpropan-2-onas.^{232b} Para ello, emplearon un catalizador quiral de iridio y altas presiones de hidrógeno (Esquema 3.3a).



Esquema 3.3. Ejemplos de metodologías sintéticas para la obtención de 1-arylpropan-2-oles quirales.

²³⁴ E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, J. González-Sabín, F. Rebolledo, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 3031-3035.

²³⁵ (a) I. Karume, M. M. Musa, O. Bsharat, M. Takahashi, S. M. Hamdan, B. El Ali, *RSC Adv.* **2016**, 6, 96616-96622; (b) J. Poplosńki, T. Reiter, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2018**, 10, 763-768.

²³⁶ S.-B. Ko, B. Baburaj, M.-J. Kim, J. Park, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6860-6864.

Un ejemplo descrito sobre la desracemización de 1-arilpropan-2-oles es el mostrado por Liardo y colaboradores, en el cual se muestra un proceso secuencial quimioenzimático basado en la oxidación química inicial de los alcoholes racémicos utilizando el radical 2-azaadamantano-*N*-oxilo (AZADO, 2-azaadamantane *N*-oxyl) en combinación de hipoclorito de sodio (NaOCl), y posteriormente la biorreducción de las cetonas intermedias para dar lugar a los alcoholes enantioenriquecidos (Esquema 3.3b).²³⁴ Por último, Kroutil y colaboradores estudiaron la resolución cinética dinámica de varios alcoholes utilizando una variante de la alcohol deshidrogenasa procedente de *Thermoanaerobacter ethanolicus* con 3 mutaciones (TeSADH WIC), en combinación con la lipasa CAL-B (Novozym 435),^{235b} gracias a una estrategia de compartimentalización. En este caso, utilizaron bolsas compuestas por fluoruro de polivinilideno (PVDF), para separar el sistema acuoso (en el que transcurría la racemización), de la fase orgánica (en la que ocurría la resolución cinética). Los autores estudiaron la resolución de varios alcoholes, entre los que se encontraba el 1-fenilpropan-2-ol (Esquema 3.3c).

3.1.3. OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI

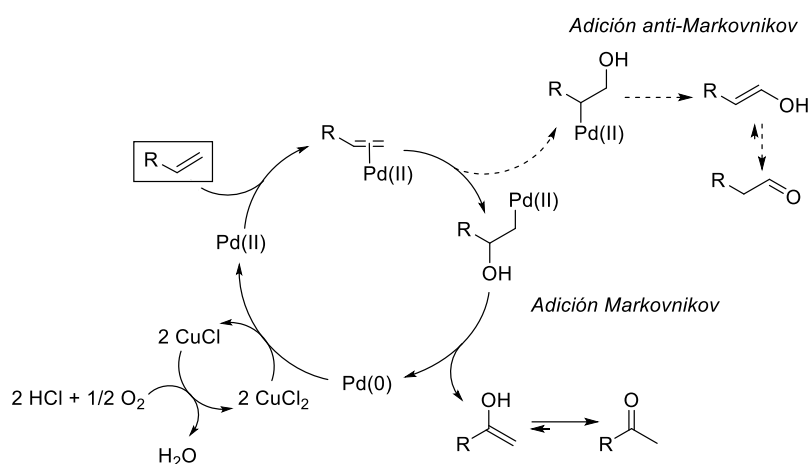
Desde un punto de vista de la química orgánica, una de las transformaciones clásicas para la obtención de cetonas es la reacción oxidativa de Wacker-Tsuji. Así, Smidt y colaboradores de la compañía Wacker Chemie,²³⁷ describieron por primera vez la oxidación de alquenos para dar lugar a compuestos carbonílicos empleando una sal de Pd(II) como catalizador por adición de una molécula de agua. El metal, tras participar en la reacción de oxidación, se reduce a Pd(0), el cual finalmente se recicla a Pd(II) de nuevo en presencia de un oxidante como puede ser una sal de Cu(II) bajo condiciones aeróbicas y medio ácido (Esquema 3.4).²³⁸ De manera general, se produce la adición de la molécula de agua con una regioselectividad de tipo Markovnikov, por lo que la utilización de alquenos terminales da lugar preferentemente a las correspondientes metil cetonas.²³⁹

²³⁷ J. Smidt, W. Hafner, R. Jira, R. Sieber, J. Sendlmeier, A. Saber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *1*, 80-88.

²³⁸ Bibliografía reciente: (a) S. E. Mann, L. Benhamou, T. D. Sheppard, *Synthesis* **2015**, *47*, 3079-3117; (b) T. V. Baiju, E. Gravel, E. Doris, I. N. N. Namboothiri, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3993-4000; (c) R. A. Fernandes, A. K. Jha, P. Kumar, *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10*, 7448-7470.

²³⁹ Para ejemplos de adiciones de tipo anti-Markovnikov en este tipo de procesos, ver: J. J. Dong, W. R. Browne, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 734-744.

Capítulo 3. Antecedentes



Esquema 3.4. Mecanismo general de la reacción de Wacker.

En años recientes, se han desarrollado numerosos intentos para realizar este tipo de procesos oxidativos de un modo más eficiente y sostenible, evitando por ejemplo utilizar sales de cobre(II) para regenerar el catalizador de paladio.²⁴⁰ Desde el punto de vista medioambiental la mejor opción sería la utilización de oxígeno molecular para regenerar la especie de Pd(II), pero en estos casos, normalmente, es necesario utilizar unas condiciones de reacción muy agresivas (grandes presiones de oxígeno y altas temperaturas), disolventes orgánicos o la presencia de compuestos orgánicos adicionales, que actúen como ligandos del Pd(0), evitando así su desactivación por precipitación en forma de paladio elemental.²⁴¹ Sin embargo, se ha descrito que, en ocasiones, antes de ocurrir esta precipitación, los complejos solubles de Pd(0) se encuentran en equilibrio con nanopartículas de paladio (Pd NPs), actuando estas como reserva de especies catalíticamente activas de paladio, como ha podido observarse en algunas reacciones de formación de enlaces C–C.²⁴²

²⁴⁰ Ejemplos seleccionados: (a) M. A. Bigi, M. C. White, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7831-7834; (b) D. A. Chaudhari, R. A. Fernandes, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2113-2121; (c) X. Xia, X. Gao, J. Xu, C. Hu, X. Peng, *Synlett* **2017**, *28*, 607-610; (d) D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2582-2593; (e) S. Saha, S. Yadav, N. U. D. Reshi, I. Dutta, S. Kunnikuruvan, J. K. Bera, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 11385-11393; (f) Q. Huang, Y.-W. Li, X.-S. Ning, G.-Q. Jiang, X.-W. Zhang, J.-P. Qu, Y.-B. Kang, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 965-969.

²⁴¹ (a) K. M. Gligorich, M. S. Sigman, *Chem. Commun.* **2009**, 3854-3867; (b) D. Wang, A. B. Weinstein, P. B. White, S. S. Stahl, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 2636-2679; (c) M. Hu, W. Wu, H. Jiang, *ChemSusChem* **2019**, *12*, 2911-2935.

²⁴² (a) J. A. Widegren, R. G. Finke, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2003**, *198*, 317-341; (b) N. T. S. Phan, M. Van Der Sluys, C. W. Jones, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 609-679; (c) R. H. Crabtree, *Chem. Rev.*

Ejemplos del uso de este tipo de nanopartículas han sido descritos en reacciones catalíticas como acoplamientos cruzados,²⁴³ reducciones e hidrogenaciones²⁴⁴ u oxidaciones de alcoholes.²⁴⁵ En concreto, la posibilidad de que este tipo de NPs de paladio participe en la reacción de oxidación de Wacker ha sido previamente descrita,²⁴⁶ demostrándose finalmente mediante su aplicación directa en este proceso.²⁴⁷ Zhang y colaboradores fueron pioneros en la oxidación de estirenos catalizada por nanopartículas de paladio soportadas sobre ZrO₂ (Pd/ZrO₂) para producir una serie de acetofenonas (Esquema 3.5a).²⁴⁸ Por otra parte, también los grupos de Doris y Namboothiri demostraron la actividad catalítica de Pd NPs soportadas sobre nanotubos de carbono (PdCNT) y en presencia de CuCl en condiciones de reacción muy suaves, logrando la oxidación de estirenos a acetofenonas (Esquema 3.5b).²⁴⁹

2012, *112*, 1536-1554; (d) C. Deraedt, D. Astruc, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 494-503; (e) J. M. Asensio, D. Bouzouita, P. W. N. M. van Leeuwen, B. Chaudret, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 1042-1084.

²⁴³ (a) A. Balanta, C. Godard, C. Claver, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4973-4985; (b) I. Favier, D. Madec, E. Teuma, M. Gomez, *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 3127-3174; (c) A. M. Trzeciak, A. W. Augustyniak, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *384*, 1-20; (d) A. I. Ayad, C. B. Marín, E. Colaco, C. Lefevre, C. Méthivier, A. O. Driss, J. Landoulsi, E. Guénin, *Green Chem.* **2019**, *21*, 6646-6657; (e) G. Ding, L. Hao, H. Xu, L. Wang, J. Chen, T. Li, X. Tu, Q. Zhang, *Commun. Chem.* **2020**, *3*, 43.

²⁴⁴ (a) S. Bulut, Z. Fei, S. Siankevich, J. Zhang, N. Yan, P. J. Dyson, *Catal. Today* **2015**, *247*, 96-103; (b) D. J. Gavia, Y.-S. Shon, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 892-900; (c) S. Luo, Z. Zeng, G. Zeng, Z. Liu, R. Xiao, M. Chen, L. Tang, W. Tang, C. Lai, M. Cheng, B. Shao, Q. Liang, H. Wang, D. Jiang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 32579-32598.

²⁴⁵ M. Nasrollahzadeh, M. Sajjadi, M. Shokouhimehr, R. S. Varma, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *397*, 54-75.

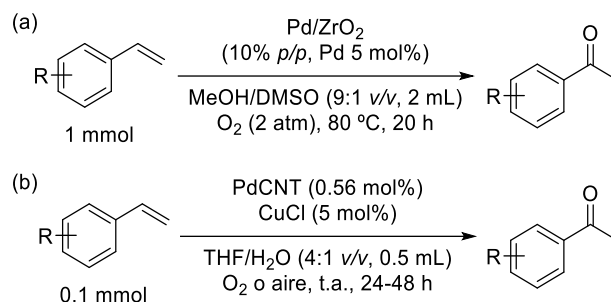
²⁴⁶ M. Hronec, Z. Cvengršová, Š. Holotík, *J. Mol. Catal.* **1994**, *91*, 343-352.

²⁴⁷ J.-L. Wang, L.-N. He, C.-X. Miao, Y.-N. Li, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1317-1320.

²⁴⁸ Z. Zhang, Y. Kumamoto, T. Hashiguchi, T. Mamba, H. Murayama, E. Yamamoto, T. Ishida, T. Honma, M. Tokunaga, *ChemSusChem* **2017**, *10*, 3482-3489.

²⁴⁹ S. Donck, E. Gravel, N. Shah, D. V. Jawale, E. Doris, I. N. N. Namboothiri, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2318-2322.

Capítulo 3. Antecedentes

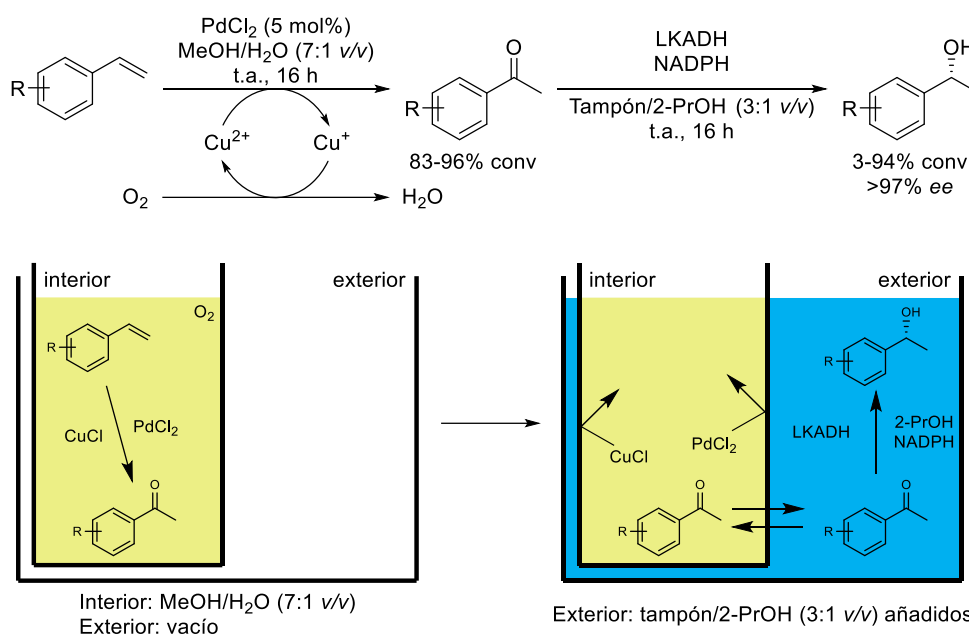


Esquema 3.5. Oxidación de Wacker de estirenos en acetofenonas utilizando nanopartículas de paladio.

3.1.4. OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI Y ENZIMAS EN PROCESOS EN CASCADA

El desarrollo de procesos en cascada combinando la oxidación de Wacker junto con pasos biocatalíticos ha sido previamente descrito por Gröger y colaboradores para la preparación de 1-ariletanoles o 1-ariletilaminas quirales.²⁵⁰ Varias de sus aportaciones han suscitado un gran interés debido al desarrollo de este tipo de transformaciones de forma compartimentalizada en un mismo recipiente. El primer trabajo descrito por este grupo para la transformación de diferentes estirenos en los correspondientes 1-ariletanoles quirales, consistió en la combinación de la reacción de oxidación de Wacker-Tsuji, utilizando cloruro de paladio(II) y benzoquinona para la reoxidación de la especie de paladio, seguida de una biorreducción empleando la ADH de *Lactobacillus kefir* (LKADH).^{250a}

²⁵⁰ (a) I. Schnapperelle, W. Hummel, H. Gröger, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1073-1076; (b) H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4488-4492; (c) F. Uthoff, H. Sato, H. Gröger, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 555-558; (d) F. Uthoff, H. Gröger, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 9517-9521.

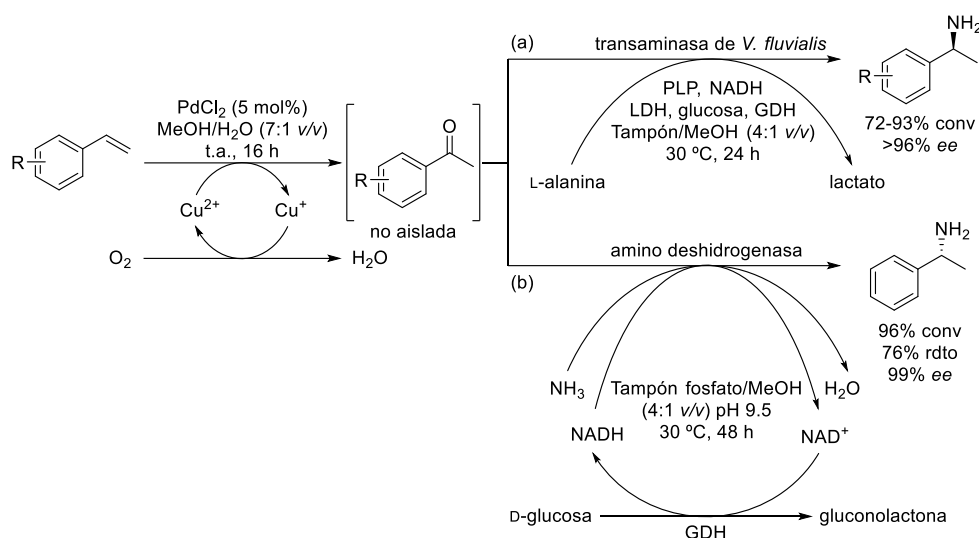


Esquema 3.6. Proceso secuencial de oxidación de Wacker-Tsuji y biorreducción en un recipiente compartimentalizado.

Sin embargo, este proceso utilizaba cantidades estequiométricas de benzoquinona en el primer paso de reacción, por lo que posteriormente se desarrolló un sistema más eficiente a través de una estrategia de compartimentalización para que ambos procesos se pudieran realizar de manera catalítica en el mismo recipiente (Esquema 3.6). Para ello fue clave el empleo de una membrana hidrofóbica de polidimetilsiloxano (PDMS), que evitaba la posible inactivación del sistema enzimático debido a la presencia de la sal de cobre como sistema de reciclaje del paladio.^{250b} En este proceso secuencial la reacción de Wacker tuvo lugar de forma convencional dentro de la membrana. Posteriormente, tras haber finalizado el primer paso sintético, se añadió el medio acuoso junto con la ADH, el 2-propanol y el cofactor enzimático, ocurriendo la biorreducción de la correspondiente acetofenona formada, que difundía desde el interior de la membrana a la fase acuosa.

El mismo grupo desarrolló posteriormente un sistema similar para la obtención de 1-ariletilaminas quirales, gracias a la utilización de la transaminasa procedente de *Vibrio fluvialis* en un segundo paso de biotransaminación (Esquema 3.7a).^{250c}

Capítulo 3. Antecedentes

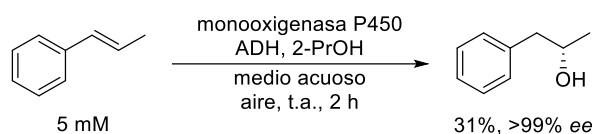


Esquema 3.7. Proceso secuencial en un recipiente compartimentalizado basado en la oxidación de Wacker-Tsuji de derivados de estireno seguido de un paso enzimático: (a) transaminación, o (b) aminación reductiva, para obtener aminas quirales.

Al igual que en el caso de la biorreducción, la presencia de sales de cobre inhibe la reacción enzimática, por lo que se aplicó una estrategia secuencial junto con la membrana de PDMS previamente descrita, lográndose así la hidroaminación formal de los diferentes estirenos estudiados. Complementariamente para la obtención de la (*R*)-1-feniletilamina, estos autores han propuesto el uso de una amina deshidrogenasa (AmDH) en lugar de una transaminasa, empleando una disolución de cloruro de amonio como donador de amino, y evitando así la utilización del sistema de reciclaje del cofactor con L-alanina y LDH (Esquema 3.7b).^{250d}

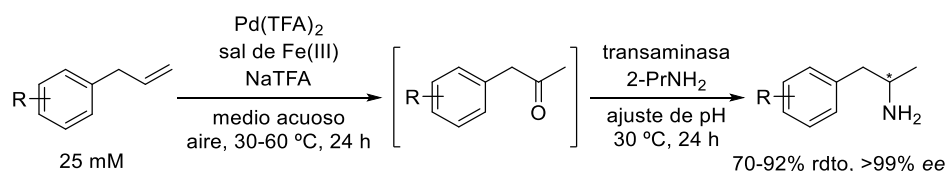
En cuanto a la síntesis de 1-arylpropan-2-oles y 1-arylpropan-2-aminas por combinación de un proceso oxidativo de un alqueno seguido de una transformación asimétrica, tanto Arnold y colaboradores como nuestro propio grupo de investigación han planteado estrategias (quimio)enzimáticas. Así, el grupo de Arnold ha descrito la oxidación anti-Markovnikov de diferentes alquenos utilizando una monooxigenasa P450 modificada, seguida de una biorreducción catalizada por una ADH para generar los correspondientes alcoholes quirales. Este procedimiento

en cascada lo aplicaron al *trans*- β -metilestireno, obteniendo el correspondiente 1-fenilpropan-2-ol enantioenriquecido, pero en baja conversión (Esquema 3.8).²⁵¹



Esquema 3.8. Proceso bienzimático en cascada para la obtención del (*S*)-1-fenilpropan-2-ol.

En cuanto a la síntesis de 1-arilpropan-2-aminas nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente la oxidación de Wacker-Tsuji de una serie de alilarenos seguida de la biotransaminación de las cetonas intermedias (Esquema 3.9).^{240d} En este caso, el primer paso oxidativo fue satisfactorio gracias a la utilización de trifluoroacetato de paladio(II) junto con una sal de hierro(III) (como sistema de reciclaje del paladio) y trifluoroacetato de sodio (como aditivo), en un medio mayoritariamente acuoso a 30-60 °C. Una vez finalizada la reacción, tras llevar a cabo un ajuste del pH del medio de reacción, se pudo acoplar un segundo paso enzimático de transaminación obteniéndose las diferentes 1-arilpropan-2-aminas con unos resultados muy buenos tanto de conversión como de exceso enantiomérico.



Esquema 3.9. Estrategia secuencial para la obtención de 1-arilpropan-2-aminas quirales mediante una reacción de Wacker-Tsuji seguida de una biotransaminación.

3.1.5. FOTOCATÁLISIS EN PROCESOS CATALIZADOS POR Pd

Como se ha descrito en la *Sección 0.3.1.3* de la Introducción, la fotoquímica se ha establecido en los últimos años como una rama de la química en creciente auge. Así, se han desarrollado diferentes procesos orgánicos catalizados por la irradiación con luz a diferentes longitudes de onda. Son lo que se conocen como procesos de

²⁵¹ S. C. Hammer, G. Kubik, E. Watkins, S. Huang, H. Minges, F. H. Arnold, *Science* **2017**, 358, 215-218.

Capítulo 3. Antecedentes

transferencia de un electrón (del inglés *single-electron transfer*, SET) o de transferencia de energía (del inglés *energy-transfer*, EnT), en función del fotocatalizador empleado. Dentro del campo de la catálisis metálica, la cooperación de los catalizadores metálicos y fotoquímicos ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías bajo condiciones suaves de reacción. Por otra parte, la adición de un fotocatalizador no siempre es necesaria, observándose en ocasiones una activación directa de los catalizadores metálicos al aplicar radiación lumínica.²⁵² En este contexto, la activación de complejos de Pd mediante procedimientos fotoquímicos es un proceso bien conocido, sobre todo para la generación de enlaces C–C, a través de procesos radicalarios de tipo SET.²⁵³

Además de los complejos de Pd, también se ha demostrado que la inmovilización de nanopartículas de Pd sobre materiales fotosensibles (como TiO₂ o nitruro de carbono gráfico, *g*-C₃N₄) ha permitido la catálisis de transformaciones químicas, como la descomposición del agua (*water splitting*),²⁵⁴ generación de peróxido de hidrógeno²⁵⁵ o formación radicalaria de enlaces C–C.²⁵⁶

Por otra parte, la síntesis fotocatalítica de diferentes compuestos carbonílicos partiendo de alquenos, incluyendo 1-arilpropan-2-onas, también ha sido previamente descrita. En concreto, Lei y colaboradores describieron la adición de agua a alquenos mediante la combinación del perclorato de 9-mesitil-10-acridinio ([Acr-Mes]ClO₄), actuando como fotocatalizador de tipo SET, junto con un complejo de cobalto (Co(dmgH)₂pyCl), conocido por su capacidad reductora de protones, a través de un mecanismo radicalario (Esquema 3.10a).²⁵⁷

²⁵² (a) J. Twilton, C. C. Le, P. Zhang, M. H. Shaw, R. W. Evans, D. W. C. MacMillan, *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, 0052; (b) R. Kancherla, K. Muralirajan, A. Sagadevan, M. Rueping, *Trends Chem.* **2019**, *1*, 510-523; (c) W.-M. Cheng, R. Shang, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 9170-9196.

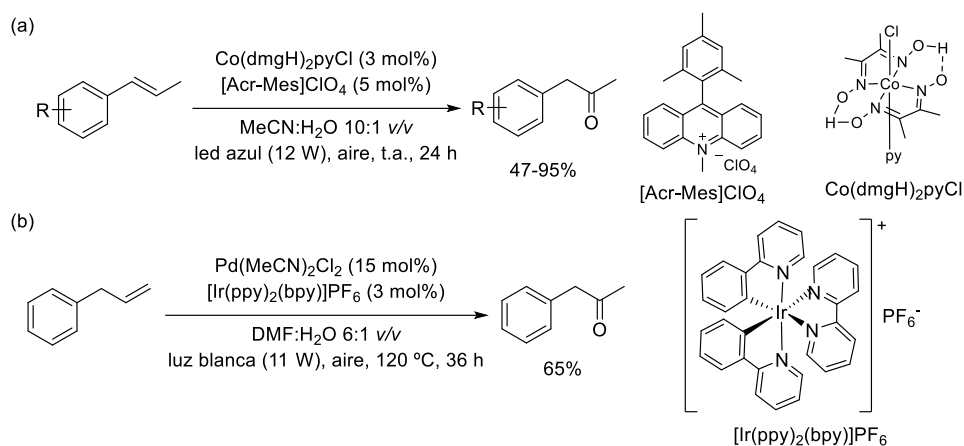
²⁵³ (a) P. Chuentragool, D. Kurandina, V. Gevorgyan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 11586-11598; (b) W.-J. Zhou, G.-M. Cao, Z.-P. Zhang, D.-G. Yu, *Chem. Lett.* **2019**, *48*, 181-191.

²⁵⁴ (a) L. Liu, X. Wu, L. Wang, X. Xu, L. Gan, Z. Si, J. Li, Q. Zhang, Y. Liu, Y. Zhao, R. Ran, X. Wu, D. Weng, F. Kang, *Commun. Chem.* **2019**, *2*, 18; (b) Q. Zhang, J. Guan, *Sol. RRL* **2020**, *4*, 2000283; (c) T. Kawawaki, Y. Mori, K. Wakamatsu, S. Ozaki, M. Kawachi, S. Hossain, Y. Negishi, *J. Mater. Chem. A* **2020**, *8*, 16081-16113; (d) J.-H. Zhang, M.-J. Wei, Y.-L. Lu, Z.-W. Wei, H.-P. Wang, M. Pan, *ACS Appl. Energy Mater.* **2020**, *3*, 12108-12114; (e) M. E. Potter, D. J. Stewart, A. E. Oakley, R. P. Boardman, T. Bradley, P. J. A. Sazio, R. Raja, *ACS Photonics* **2020**, *7*, 714-722.

²⁵⁵ C. Chu, D. Huang, Q. Zhu, E. Stavitski, J. A. Spies, Z. Pan, J. Mao, H. L. Xin, C. A. Schmuttenmaer, S. Hu, J.-H. Kim, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 626-631.

²⁵⁶ A. Tyagi, T. Matsumoto, T. Kato, H. Yoshida, *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 4577-4583.

²⁵⁷ G. Zhang, X. Hu, C.-W. Chiang, H. Yi, P. Pei, A. K. Singh, A. Lei, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12037-12040.



Esquema 3.10. Estrategias foto-metalocatalíticas para la producción de 1-arylpropan-2-onas a partir de alquenos.

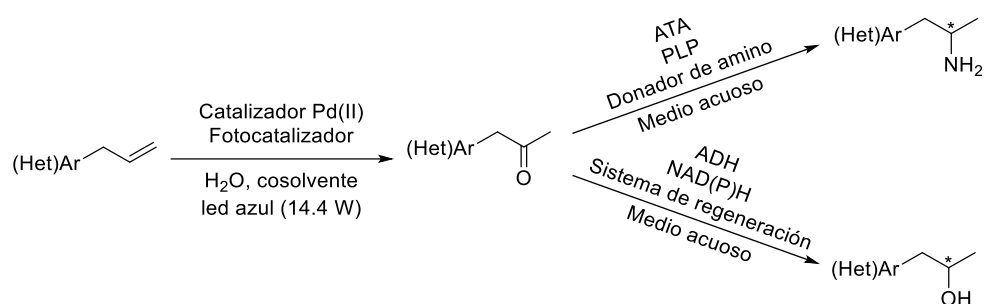
Por otra parte, Fabry y colaboradores desarrollaron la oxidación de diferentes alquenos terminales para dar lugar a las correspondientes metilcetonas, combinando un complejo de Pd(II) junto con un compuesto de iridio ([Ir(ppy)₂(bpy)]PF₆) como fotocatalizador de tipo SET.²⁵⁸ Este último permitió la reoxidación del Pd(0) a Pd(II), cerrando el ciclo catalítico, mediante la transferencia de electrones al oxígeno presente en el medio de reacción (Esquema 3.10b).

²⁵⁸ Y. A. Ho, E. Paffenholz, H. J. Kim, B. Orgis, M. Rueping, D. C. Fabry, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 1889-1892.

OBJETIVOS

Como se comentó previamente en la Introducción, la combinación de estrategias enzimáticas y fotocatalíticas es un campo en auge hoy en día, y permite la preparación de compuestos de interés a través de metodologías sostenibles. Basándonos en los antecedentes del grupo en la síntesis asimétrica de 1-arylpropan-2-aminas combinando la reacción de Wacker-Tsuji con procesos de biotransaminación,^{240d} en este capítulo nos proponemos:

- desarrollar una metodología fotocatalítica para llevar a cabo la oxidación de alil(hetero)arenos bajo condiciones suaves de reacción, que permita acceder a una serie de 1-(hetero)arylpropan-2-onas (Esquema 3.11), así como el estudio del mecanismo del proceso
- diseñar un proceso secuencial con un segundo paso enzimático catalizado por ATAs o ADHs, para sintetizar las correspondientes 1-(hetero)arylpropan-2-aminas y 1-(hetero)arylpropan-2-oles de manera estereoselectiva.



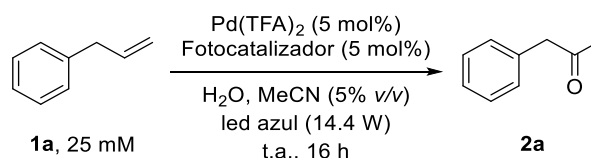
Esquema 3.11. Proceso secuencial foto-metal-biocatalítico para la obtención estereoselectiva de 1-(hetero)arylpropan-2-aminas o 1-(hetero)arylpropan-2-oles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se expone la optimización de un proceso fotoquímico de oxidación de los alil(hetero)arenos **1a-n** para obtener las 1-(hetero)arilpropan-2-onas **2a-n**. Posteriormente, se estudiarán de manera individual los procesos enzimáticos de transaminación y biorreducción de las mismas, utilizando respectivamente amino transaminasas (ATAs) y alcohol deshidrogenasas (ADHs). Finalmente, se describirá la combinación de la reacción fotocatalizada de Wacker-Tsuji con un segundo paso enzimático, con el fin de diseñar procesos secuenciales para la obtención de 1-(hetero)arilpropan-2-aminas y 1-(hetero)arilpropan-2-oles enantioenriquecidos.

3.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI FOTOCATALIZADA

Inicialmente, para llevar a cabo la optimización de la reacción fotocatalítica se emplearon unas condiciones similares a las descritas por nuestro grupo de investigación para el proceso no fotocatalizado.^{240d} Así, tomando como modelo el alilbenceno (**1a**), se seleccionó como catalizador el trifluoroacetato de paladio(II) (Pd(TFA)₂) empleando diversos fotocatalizadores en agua y una baja cantidad de acetonitrilo como cosolvente (Esquema 3.12).

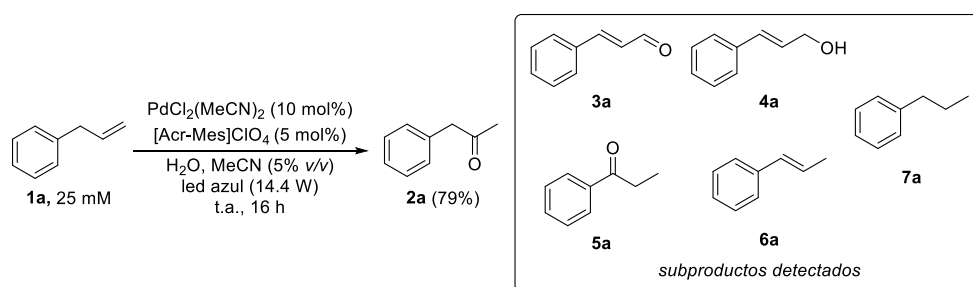


Esquema 3.12. Reacción de oxidación de Wacker-Tsuji fotocatalizada aplicada al alilbenceno (**1a**).

Aunque se comprobó que el proceso conducía a la 1-fenilpropan-2-ona (**2a**, 8-34%), el empleo de otras sales de paladio, y concretamente el dicloruro de bisacetanitrilopaladio(II) [PdCl₂(MeCN)₂] junto con el perclorato de 9-mesitil-10-metilacridinio ([Acr-Mes]ClO₄) como fotocatalizador, permitió obtener conversiones y selectividades más elevadas (90% de conversión con un 79% de **2a**). Tras llevar a cabo un exhaustivo estudio de las condiciones de reacción, donde se varió la cantidad de sal de paladio o fotocatalizador (5-10 mol%), la cantidad de MeCN (0-15% v/v), el tipo de cosolvente (MeCN, DMF, DMSO o THF) y la concentración de sustrato (25-150 mM), se establecieron como condiciones de

Capítulo 3. Resultados y discusión

reacción óptimas las que se describen en el Esquema 3.13, en las cuales se obtuvo un 79% de la cetona **2a**.



Esquema 3.13. Condiciones óptimas para la reacción de Wacker fotocatalizada y subproductos detectados.

Esta transformación fue llevada a cabo mediante un montaje de elaboración propia en viales de cristal de un volumen total de unos 10 mL. El montaje consistió en una gradilla de tubos de ensayo donde se colocaron los viales de reacción, recibiendo estos la radiación lumínica azul por la zona inferior (Figura 3.3). La gradilla estaba sujeta por una pinza de laboratorio, que a su vez se encontraba enganchada a un soporte metálico. Además, el montaje se acompañó con un pequeño ventilador para evitar el calentamiento del medio de reacción, permitiendo que la temperatura del medio de reacción fuera similar a la ambiental.

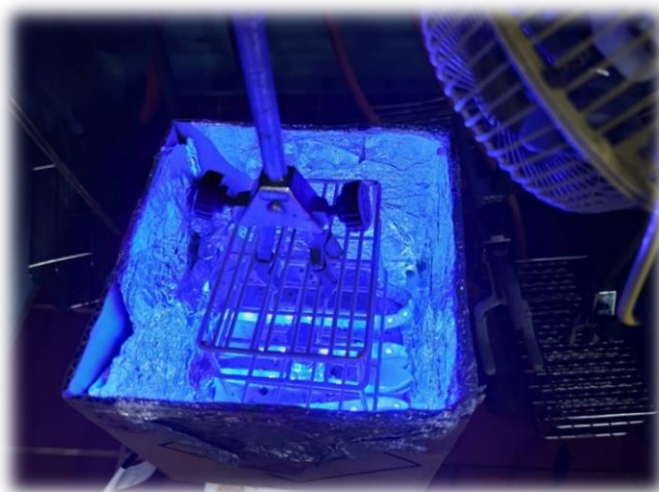
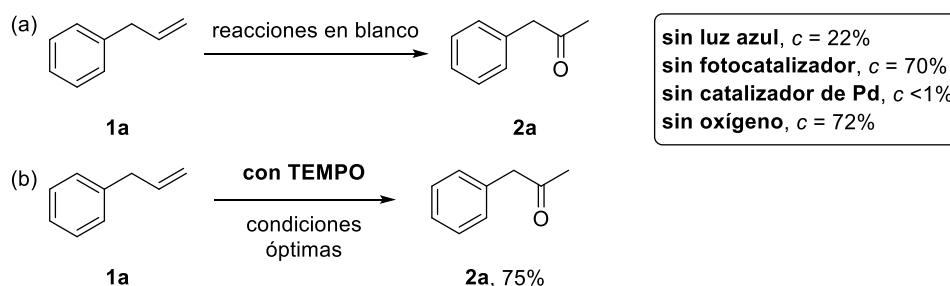


Figura 3.3. Representación gráfica del montaje de la reacción de oxidación de Wacker-Tsuji fotocatalizada.

Previamente a la extensión de esta metodología a otros alil(hetero)arenos (**1b-n**), se realizaron experimentos adicionales para establecer un mecanismo de reacción plausible. Estas pruebas consistieron en llevar a cabo el proceso en las condiciones óptimas de reacción, pero variando algún parámetro e incluyendo pruebas en blanco:

- En ausencia de radiación lumínica, del fotocatalizador, del catalizador de paladio o desgasificando el medio de reacción (Esquema 3.14a).
- En presencia de un agente atrapante radicalario, como es el TEMPO, para comprobar un posible mecanismo de reacción radicalario (Esquema 3.14b).

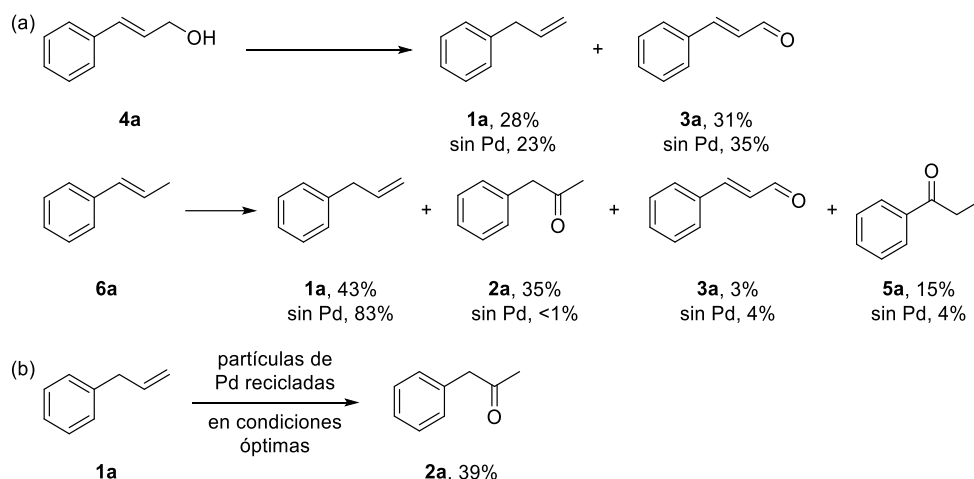


Esquema 3.14. Estudio de la reacción de oxidación de Wacker-Tsuji del alilbenceno en diferentes condiciones.

Como puede observarse, la presencia del catalizador de paladio es fundamental para poder llevar a cabo la reacción de oxidación de Wacker-Tsuji, obteniéndose una conversión nula en su ausencia (<1%). Además, en este proceso también es necesaria la luz azul, sin la cual la reacción procede, pero con una conversión mucho más baja (22%). Sin embargo, aunque inicialmente se esperaba un mecanismo de reacción similar al presentado por Fabry y colaboradores (Esquema 3.10b), en el cual el papel del fotocatalizador era fundamental, se comprobó que en nuestro caso la reacción se desarrollaba con una conversión buena incluso en ausencia del mismo (70%), por lo que pareció no ser una pieza fundamental en la oxidación. Por otra parte, y sorprendentemente, el desarrollo de la reacción de Wacker-Tsuji fotocatalizada en un medio desgasificado, donde el oxígeno se encontraba ausente, y bajo atmósfera de argón, condujo a un resultado de conversión similar de **2a** al obtenido en las condiciones óptimas (72%). Finalmente, con la intención de conocer si el mecanismo de reacción podía seguir una ruta radicalaria, se llevó a cabo la reacción fotocatalizada en las condiciones óptimas, pero en presencia del agente radicalario TEMPO (1 eq), observándose que la reacción procedía igualmente.

Capítulo 3. Resultados y discusión

Con estas pruebas se pudo concluir que la reacción procedía de forma eficiente en ausencia de fotocatalizador e incluso sin oxígeno, por lo que el catalizador metálico se reciclaba en el medio de reacción en estas condiciones. Con el fin de esclarecer en mayor medida estos hechos, así como el posible mecanismo de la reacción, se decidió estudiar la reactividad de dos subproductos presentes en el medio de reacción, como eran el alcohol cinámico (**4a**) y el *trans*- β -metilestireno (**6a**), tanto en presencia como en ausencia del catalizador metálico, pero empleando el fotocatalizador y radiación lumínica azul (Esquema 3.15a). Así, se observó que, a partir de ambos sustratos, y en especial de **6a**, se obtenía el alilbenceno (**1a**) en alta proporción en presencia del ([Acr-Mes]ClO₄).

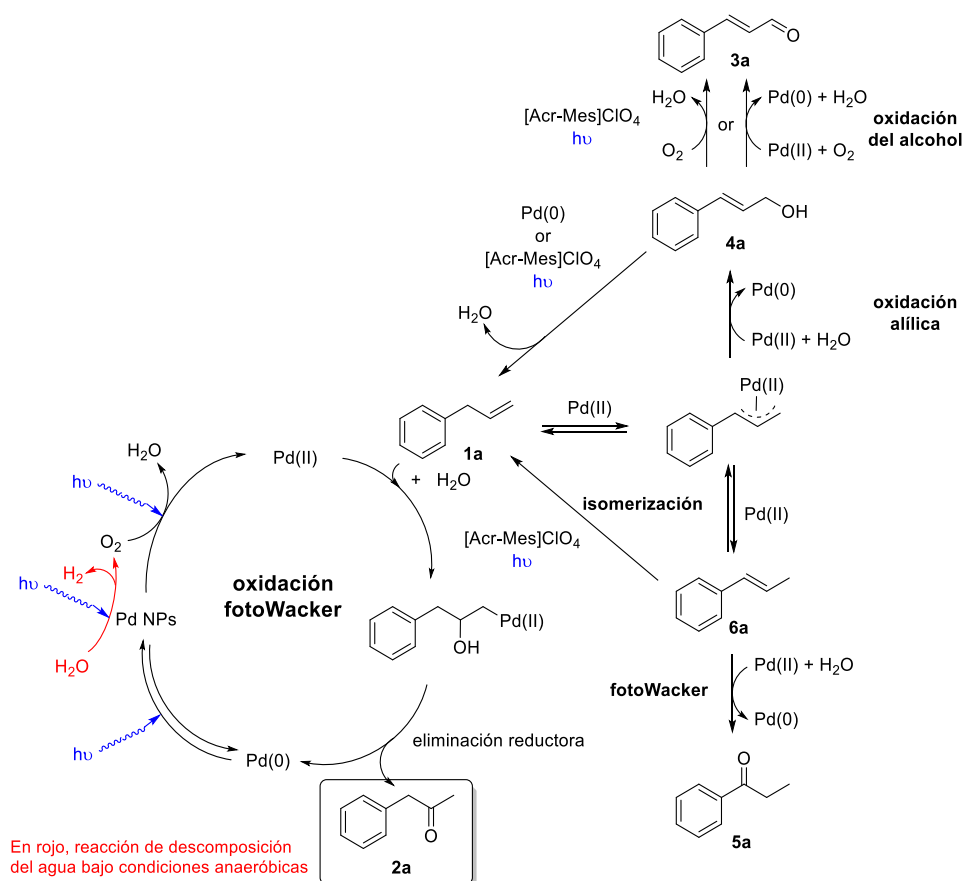


Esquema 3.15. Reacciones adicionales destinadas al estudio del mecanismo de la reacción de Wacker-Tsuji fotocatalizada.

Los resultados observados apoyaron firmemente la posibilidad de que en el medio de reacción se estuvieran produciendo agregados de Pd(0) en forma de nanopartículas. Como se ha podido comprobar en la bibliografía, este tipo de partículas pueden ser activadas con la propia radiación lumínica dando lugar a procesos de descomposición del agua,²⁵⁴ produciéndose de esta forma oxígeno molecular, que podría intervenir en el ciclo catalítico del paladio. De esta forma, se podría explicar el por qué la reacción procede de forma satisfactoria incluso en condiciones inicialmente anaeróbicas. La presencia de agregados de paladio pudo comprobarse en el transcurso de la reacción y, una vez terminada, se filtraron y

reutilizaron dichas partículas de paladio, observándose que seguían siendo catalíticamente activas (Esquema 3.15b).

En base a los resultados obtenidos, se propuso un mecanismo general del proceso, en el cual se detalla la formación de los subproductos observados en la reacción (Esquema 3.16).



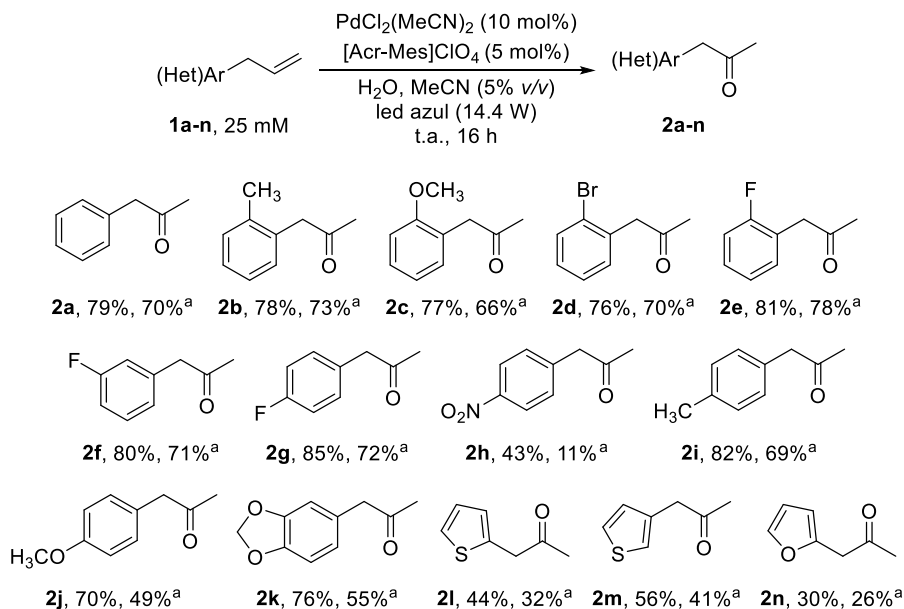
Esquema 3.16. Mecanismo propuesto para la reacción de oxidación de Wacker-Tsuji fotocatalizada.

Como se ha comentado anteriormente, se puede observar que, en presencia de radiación lumínica, estas nanopartículas de paladio darían lugar a la descomposición del agua del medio de reacción, generando oxígeno, que sería el responsable de la regeneración el centro catalítico de paladio cuando esta reacción ocurre bajo condiciones anaeróbicas (es decir, cuando se lleva a cabo la desgasificación del

Capítulo 3. Resultados y discusión

medio de reacción). En las condiciones normales de reacción, la regeneración del centro catalítico de paladio se produciría gracias al oxígeno molecular presente tanto en el aire como en el medio de reacción. Por otro lado, y en base a las observaciones realizadas, se estableció que el papel del fotocatalizador era fundamentalmente el de aumentar la selectividad del proceso, obteniendo de vuelta el sustrato de partida **1a** a partir de alguno de los subproductos formados durante el transcurso de la reacción como **4a** y **6a**.

Tras haber establecido un posible mecanismo de reacción para el proceso oxidativo, se llevó a cabo la extensión de la reacción de Wacker-Tsuji fotocatalizada al resto de alil(hetero)arenos **2b-n** (Esquema 3.17), obteniendo todos ellos como productos mayoritarios (43-85%) con conversiones entre el 45 y 90% tras 16 horas de reacción a temperatura ambiente. Excepto para los casos de los derivados heteroaromáticos **1l-n**, las selectividades hacia la formación de las cetonas fue superior al 88%.



Esquema 3.17. Reacción de Wacker-Tsuji fotocatalizada de los alil(hetero)arenos **1a-n**. Porcentajes referidos a la cantidad específica de la cetona presente en el medio de reacción.

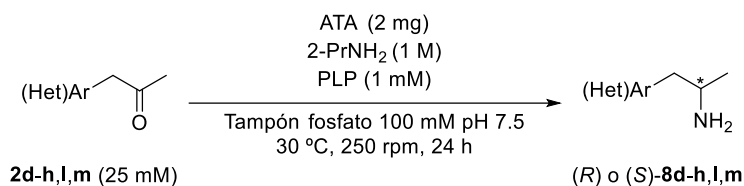
Una vez optimizado este primer paso foto-metalocatalítico, se estudió tanto la biorreducción como la biotransaminación de las 1-(hetero)arilpropan-2-onas, para seleccionar los biocatalizadores adecuados para llevar a cabo posteriormente los procesos secuenciales.

3.3.2. ESTUDIO DE LA BIOTRANSAMINACIÓN DE 1-(HETERO)ARILPROPAN-2-ONAS Y APLICACIÓN EN UN PROCESO SECUENCIAL JUNTO CON LA OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI FOTOCATALIZADA DE ALIL(HETERO)ARENOS

Una vez estudiado el proceso fotocatalizado de oxidación de Wacker-Tsuji, y debido a que previamente nuestro grupo de investigación había estudiado exitosamente el proceso de biotransaminación de diferentes 1-arilpropan-2-onas,^{240d} se decidió estudiar esta aproximación en modo secuencial incorporando nuevas 1-(hetero)arilpropan-2-onas **2d-h,l,m**. De esta forma, en la Tabla 3.1 se recogen las condiciones de reacción óptimas para llevar a cabo el proceso de biotransaminación, así como las diferentes amino transaminasas comerciales que dieron lugar a los mejores resultados con los nuevos sustratos estudiados.

Capítulo 3. Resultados y discusión

Tabla 3.1. Biotransaminación de las cetonas **2d-h,l,m** catalizada por ATAs.



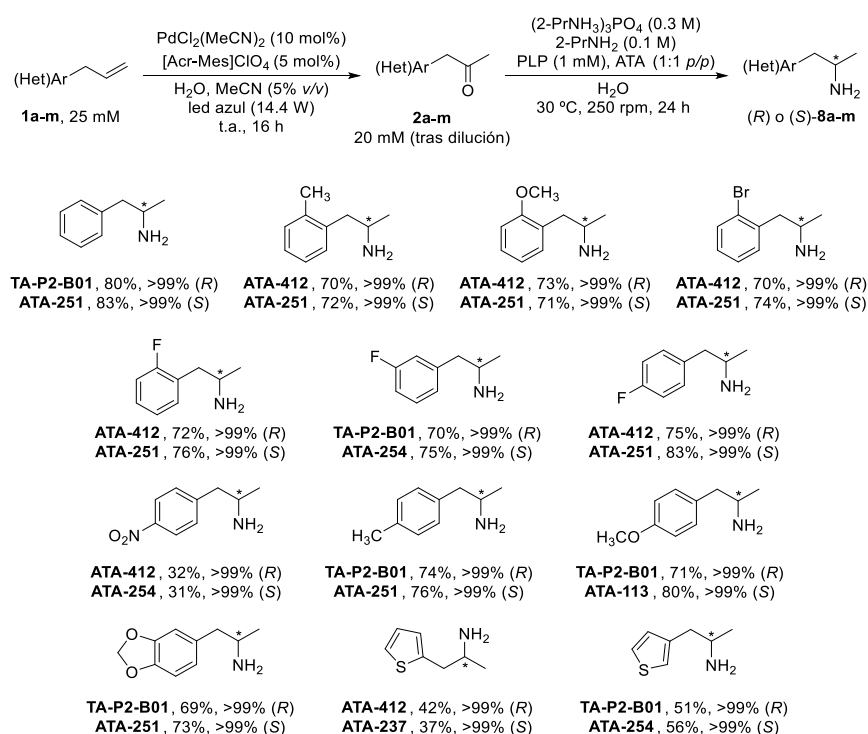
Entrada	Sustrato	ATA	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	2-Br-C ₆ H ₄ (d)	ATA-412	89	>99 (<i>R</i>)
2		ATA-251	94	>99 (<i>S</i>)
3	2-F-C ₆ H ₄ (e)	ATA-412	91	>99 (<i>R</i>)
4		ATA-251	96	>99 (<i>S</i>)
5	3-F-C ₆ H ₄ (f)	TA-P2-B01	96	>99 (<i>R</i>)
6		ATA-254	96	>99 (<i>S</i>)
7	4-F-C ₆ H ₄ (g)	ATA-412	96	>99 (<i>R</i>)
8		ATA-251	98	>99 (<i>S</i>)
9	4-NO ₂ -C ₆ H ₄ (h)	ATA-412	>99	>99 (<i>R</i>)
10		ATA-254	>99	>99 (<i>S</i>)
11	2-Tiofenil (l)	ATA-412	98	>99 (<i>R</i>)
12		ATA-237	96	>99 (<i>S</i>)
13	3-Tiofenil (m)	TA-P2-B01	88	>99 (<i>R</i>)
14		ATA-251	98	>99 (<i>S</i>)

^a Valores de conversión medidos por cromatografía de gases.

^b Valores de exceso enantiomérico medidos por HPLC tras derivatización de los crudos de reacción con anhídrido acético. El enantiómero mayoritario aparece entre paréntesis.

Tras realizar este estudio, el último paso necesario para establecer el proceso secuencial fue conocer las modificaciones necesarias para poder realizar el paso de biotransaminación una vez terminada la etapa de oxidación. El principal inconveniente fue la gran diferencia de pH que existía entre el medio de reacción al finalizar la oxidación de Wacker-Tsuji (pH~3-4) y el óptimo para llevar a cabo el proceso de transaminación enzimática (pH~7.5-8.5). Dada la experiencia previa en este proceso biocatalítico, se estudió la modificación del medio de reacción por medio de la adición conjunta de la sal de fosfato de 2-propilamonio y 2-propilamina,^{240d} con un doble fin: lograr la basicidad necesaria para desarrollar la

reacción enzimática y tener una concentración suficiente e ideal de donador de amino en el medio. Por otra parte, para realizar la biotransaminación se redujo la concentración del sustrato a 20 mM, con el fin de mejorar el funcionamiento de las correspondientes transaminasas (Esquema 3.18).



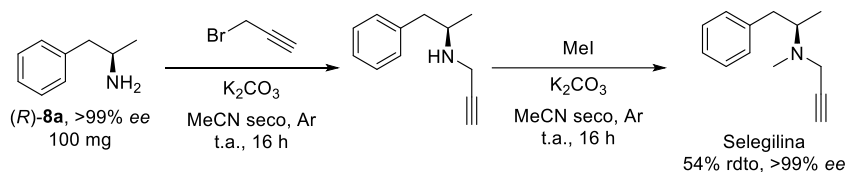
Esquema 3.18. Proceso secuencial foto-metal-biocatalítico para la obtención de 1-(hetero)arilpropan-2-aminas ópticamente activas. Valores de rendimiento aislado y excesos enantioméricos después de columna cromatográfica.

De esta manera se obtuvieron ambos enantiómeros de trece 1-(hetero)arilpropan-2-aminas quirales de forma enantiopura y con unos rendimientos aislados entre moderados y buenos (31-83%). A continuación, se llevó a cabo un escalado del proceso empleando como sustrato de partida **1a** (1 mmol), obteniéndose la (*R*)-1-fenilpropan-2-amina (**8a**) enantiopura (>99% *ee*) y con un rendimiento aislado del 81%. Siguiendo una adaptación del protocolo descrito por MacGregor y colaboradores,²⁵⁹ se desarrolló la síntesis del fármaco antiparkinsoniano y

²⁵⁹ R. R. MacGregor, J. S. Fowler, A. P. Wolf, C. Halldin, B. Langström, *J. Label. Compd. Radiopharm* **1998**, 25, 1-9.

Capítulo 3. Resultados y discusión

antidepresivo selegilina (Esquema 3.19), a partir de (*R*)-**8a** y en 2 pasos de reacción con un rendimiento global del 54% y sin pérdida de la pureza óptica.

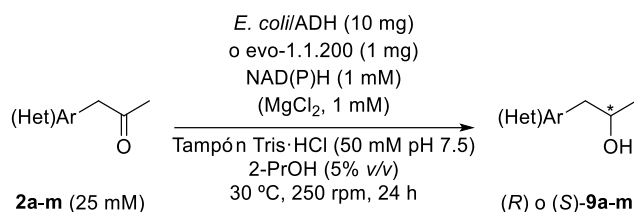


Esquema 3.19. Síntesis de la selegilina utilizando la (*R*)-1-fenilpropan-2-amina obtenida a través del proceso secuencial basado en la oxidación de Wacker-Tsuji fotocatalizada y subsecuente biotransaminación de la cetona intermedia con la TA-P2-B01.

3.3.3. ESTUDIO DE LA BIORREDUCCIÓN DE 1-ARILPROPAN-2-ONAS Y APLICACIÓN EN UN PROCESO SECUENCIAL JUNTO CON LA OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI FOTOCATALIZADA DE ALIL(HETERO)ARENOS

Finalmente, se estudió la síntesis asimétrica de los correspondientes 1-(hetero)arilpropan-2-oles (**9a-m**) siguiendo una aproximación similar a la vista en la Sección 3.3.2, pero sustituyendo el proceso de biotransaminación por una biorreducción de las correspondientes cetonas **2a-m** intermedias. Primeramente, y tras seleccionar la 1-fenilpropan-2-ona (**2a**) como sustrato modelo, se estudió su biorreducción empleando diferentes ADHs que se presentaron anteriormente en el Capítulo 2 (ADH-A, TeSADH, ADH-T, RasADH y SyADH, de preferencia Prelog; y LBADH y evo-1.1.200 de preferencia anti-Prelog). Con vista a la aplicabilidad en un proceso secuencial, y dado que la concentración ideal de sustrato del primer paso del proceso secuencial se estableció como 25 mM, el proceso de biorreducción también se estudió a esa misma concentración.

De entre las ADHs utilizadas, la ADH-A y la ADH-T fueron las que dieron lugar a los mejores valores de conversión y estereoselectividad hacia la formación del (*S*)-1-fenilpropan-2-ol (**9a**), mientras que la enzima comercial evo-1.1.200 dio lugar al enantiómero opuesto, también con un exceso enantiomérico excelente y alto valor de conversión. Tras optimizar el proceso de biorreducción de la cetona modelo, variando las cantidades de 2-PrOH y el biocatalizador empleado, este se extendió al resto de sustratos con gran éxito (90-99% conversión, >99% ee, Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Biorreducción de las cetonas **2a-m** catalizada por ADHs.


Entrada	Sustrato	ADH	c (%) ^a	ee (%)
1	C ₆ H ₅ (a)	evo-1.1.200	95	>99 (R) ^b
2		<i>E. coli</i> /ADH-A	97	>99 (S) ^b
3	2-CH ₃ -C ₆ H ₄ (b)	evo-1.1.200	93	>99 (R) ^b
4		<i>E. coli</i> /ADH-A	95	>99 (S) ^b
5	2-CH ₃ O-C ₆ H ₄ (c)	evo-1.1.200	93	>99 (R) ^c
6		<i>E. coli</i> /ADH-T	90	>99 (S) ^c
7	2-Br-C ₆ H ₄ (d)	evo-1.1.200	97	>99 (R) ^b
8		<i>E. coli</i> /ADH-A	97	>99 (S) ^b
9	2-F-C ₆ H ₄ (e)	evo-1.1.200	98	>99 (R) ^b
10		<i>E. coli</i> /ADH-T	97	>99 (S) ^b
11	3-F-C ₆ H ₄ (f)	evo-1.1.200	98	>99 (R) ^b
12		<i>E. coli</i> /ADH-A	98	>99 (S) ^b
13	4-F-C ₆ H ₄ (g)	evo-1.1.200	97	>99 (R) ^b
14		<i>E. coli</i> /ADH-T	97	>99 (S) ^b
15	4-O ₂ N-C ₆ H ₄ (h)	evo-1.1.200	99	>99 (R) ^b
16		<i>E. coli</i> /ADH-T	98	>99 (S) ^b
17	4-CH ₃ -C ₆ H ₄ (i)	evo-1.1.200	97	>99 (R) ^b
18		<i>E. coli</i> /ADH-T	97	>99 (S) ^b
19	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄ (j)	evo-1.1.200	96	>99 (R) ^b
20		<i>E. coli</i> /ADH-T	96	>99 (S) ^b
21	3,4-OCH ₂ O-C ₆ H ₃ (k)	evo-1.1.200	97	>99 (R) ^b
22		<i>E. coli</i> /ADH-T	97	>99 (S) ^b
23	2-Tiofenil (l)	evo-1.1.200	99	>99 (R) ^b
24		<i>E. coli</i> /ADH-T	99	98 (S) ^b
25	3-Tiofenil (m)	evo-1.1.200	99	>99 (R) ^b
26		<i>E. coli</i> /ADH-T	98	99 (S) ^b

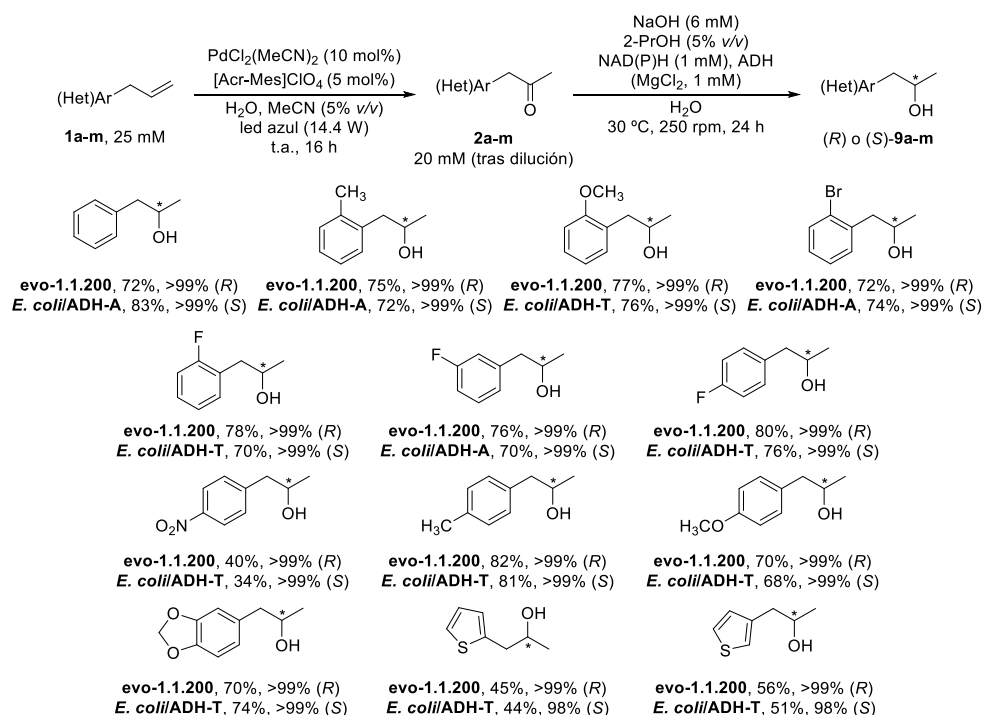
^a Valores de conversión medidos por cromatografía de gases.

^b Valores de exceso enantiomérico medidos por CG como derivados acetilados, tras reacción del crudo con anhídrido acético y DMAP. El enantiómero mayoritario aparece entre paréntesis.

^c Valores de exceso enantiomérico del crudo sin derivatizar medidos por HPLC. El enantiómero mayoritario aparece entre paréntesis.

Capítulo 3. Resultados y discusión

Por otra parte, para desarrollar el proceso secuencial de forma satisfactoria fue necesario estudiar las diferentes modificaciones necesarias para establecer un medio de reacción óptimo para el paso de biorreducción. Como se ha comentado en el caso de la síntesis secuencial de las aminas **8a-m**, el principal inconveniente que se presentó en este caso fue el carácter fuertemente ácido del medio tras la etapa de oxidación. Para lograr alcanzar un pH con un valor ligeramente básico, alrededor de 7.5 (óptimo para las ADHs empleadas), se añadió al medio de reacción un pequeño volumen de una disolución acuosa 0.5 M de NaOH, sin una variación notable de la concentración de cetona. Una vez establecidas las condiciones óptimas para el primer y segundo paso del proceso secuencial, así como las modificaciones necesarias para hacerlos compatibles, se extendió esta metodología a los diferentes alil(hetero)arenos en estudio (Esquema 3.20).



Esquema 3.20. Proceso secuencial foto-metal-biocatalítico para la obtención de 1-(hetero)arilpropan-2-oles ópticamente activos. Valores de rendimiento aislado y excesos enantioméricos después de columna cromatográfica.

Capítulo 3. Resultados y discusión

Como puede observarse, la aplicación del proceso foto-metal-biocatalítico con los diferentes alil(hetero)arenos **1a-m**, permitió acceder a ambos enantiómeros de los 1-(hetero)arilpropan-2-oles con rendimientos entre el 34 y el 83%. Para finalizar este estudio, se llevó a cabo un escalado del proceso secuencial con el alilareno **1a**, a una escala de 1 mmol, obteniéndose el (*S*)-**9a** de forma enantiopura (>99% *ee*) y con un rendimiento aislado del 80% al emplear la ADH-A como biocatalizador.

CONCLUSIONES

Capítulo 3. Conclusiones

A lo largo del presente Capítulo se ha desarrollado una aproximación fotoquímica de la oxidación de Wacker-Tsuji que ha permitido convertir 14 alil(hetero)arenos con diferentes patrones de sustitución en el anillo aromático, obteniendo las correspondientes 1-(hetero)arilpropan-2-onas con conversiones entre el 30 y el 85%, además de muy buena selectividad para los derivados aromáticos (88-96%), aunque algo más baja para los compuestos heteroaromáticos (59-70%). Asimismo, se realizaron diferentes pruebas para proponer un mecanismo plausible de dicho proceso, en el cual la formación de nanopartículas de paladio parece ser la clave para la consecución de la reacción, incluso en condiciones anaerobias y sin fotocatalizador.

Tras el empleo de diversas enzimas y la optimización de los procesos de biotransaminación y biorreducción de las cetonas, estos fueron combinados de manera secuencial con la oxidación fotocatalizada de los alil(hetero)arenos, obteniendo los correspondientes 1-(hetero)arilpropan-2-aminas (31-83%) y 1-(hetero)arilpropan-2-oles (34-83%) de manera enantioenriquecida tras purificación por columna cromatográfica.

Para desarrollar estos procesos secuenciales de manera exitosa, fue clave un correcto ajuste del pH una vez formadas las cetonas intermedias debido a que la reacción de oxidación condujo a valores de pH de en torno a 3-4, mientras que los procesos enzimáticos requerían de pHs neutros o ligeramente básicos. Todo ello permitió la realización de escalados aplicados al alilbenceno (**1a**, 1 mmol) para obtener:

- la (*R*)-1-fenilpropan-2-amina enantiopura, con un 81% de rendimiento aislado empleando la TA-P2-B01, y
- el (*S*)-1-fenilpropan-2-ol enantiopuro, con un rendimiento aislado del 80% usando la ADH-A.

Finalmente, dado que las anfetaminas son compuestos muy interesantes desde el punto de vista farmacológico, se utilizó la (*R*)-1-fenilpropan-2-amina para sintetizar un fármaco utilizado contra la enfermedad de Parkinson, la selegilina, obteniéndose esta de forma enantiopura con un 54% de rendimiento global.

**PROCEDIMIENTOS
EXPERIMENTALES**

3.5.1. PROCEDIMIENTO GENERAL DE LA REACCIÓN DE WACKER-TSUJI FOTOCATALIZADA (ver Esquema 3.17)

En un vial de cristal (3.5 x 2.4 cm) se disolvieron la sal de paladio $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (2.0 mg, 10 mol%) y el fotocatalizador $[\text{Acr-Mes}]\text{ClO}_4$ (1.6 mg, 5 mol%) en acetonitrilo (5% v/v, 150 μL). Tras ello, se añadió el correspondiente alil(hetero)areno **1a-n** (0.075 mmol, 25 mM) a la mezcla, seguido de la adición de H_2O (2.85 mL). La reacción se agitó magnéticamente bajo la irradiación de luz azul proveniente de leds (14.4 W) durante 16 h a temperatura ambiente. Tras este tiempo, la mezcla de reacción se extrajo con AcOEt (1 mL) y la fase orgánica se separó mediante centrifugación (3 min, 4900 rpm). Este protocolo de extracción y centrifugación se repitió otra vez y, finalmente, las fases orgánicas se combinaron y la fase resultante se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró. Tras ello, se transfirió a un vial de CG para analizar el grado de conversión y la selectividad del proceso.

3.5.2. PRODECIMIENTO GENERAL DE BIOTRANSAMINACIÓN DE LAS CETONAS 2d-h,l,m (ver Tabla 3.1)

En un vial Eppendorf de 1.5 mL de volumen se depositó la correspondiente cetona **2d-h,l,m** (12.5 μmol , 25 mM). Después, se añadió una disolución tampón fosfato 100 mM pH 7.5 (500 μL) conteniendo PLP (1 mM) e isopropilamina (1.0 M) y, finalmente, se introdujo la correspondiente ATA comercialmente disponible (2 mg) o las células liofilizadas de *E. coli* sobreexpresando una amino transaminasa (10 mg). La reacción se agitó a 30 °C y 250 rpm durante 24 h, tras las cuales se paró mediante la adición de una disolución acuosa de NaOH 10 M (200 μL) y se extrajo con AcOEt (500 μL), separándose la fase orgánica mediante centrifugación (2 min, 13000 rpm). Este protocolo de extracción y centrifugación se repitió otra vez más, y, finalmente, las fases orgánicas se combinaron y la fase resultante se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró. Tras tomar una alícuota de esta fase orgánica, los valores de conversión hacia las correspondientes aminas enantioenriquecidas **8d-h,l,m** fueron medidos utilizando CG.

Los excesos enantioméricos de los productos fueron medidos utilizando HPLC tras derivatización de las aminas obtenidas a sus correspondientes acetamidas. De esta forma, se tomó una alícuota de las aminas obtenidas en el paso de biotransaminación (~1 mg) y se disolvió en AcOEt (1 mL) en un vial Eppendorf de

Capítulo 3. Procedimientos experimentales

1.5 mL de volumen, añadiéndose posteriormente carbonato de potasio (10 mg) y anhídrido acético (5 gotas). La mezcla se agitó a 30 °C y 900 rpm durante 2 h, tras lo cual se añadió una disolución acuosa de NaOH (10 M, 500 µL). La fase orgánica se separó por centrifugación (2 min, 13000 rpm), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Una vez obtenidas las correspondientes acetamidas, el disolvente orgánico (AcOEt) se evaporó utilizando una corriente continua de gas nitrógeno, y el residuo remanente se redisolvió en el eluyente adecuado, conformado por proporciones variables de *n*-hexano y 2-PrOH. Tras ello, se transfirió a un vial de HPLC para su posterior análisis.

3.5.3. PRODECIMIENTO GENERAL DE BIORREDUCCIÓN DE LAS CETONAS 2a-m (ver Tabla 3.2)

En un vial Eppendorf de 1.5 mL de volumen se disolvió la correspondiente cetona **2a-m** (12.5 µmol, 25 mM) en 2-PrOH (5% v/v, 25 µL). Después, se añadió una disolución tampón Tris·HCl 50 mM de pH 7.5 (475 µL) conteniendo MgCl₂ (1 mM, para la evo-1.1.200) y NADPH (1 mM para *E. coli*/ADH-T) o NADH (1 mM para *E. coli*/ADH-A y evo-1.1.200). Finalmente, se añadieron las células liofilizadas de *E. coli* sobreexpresando la correspondiente alcohol deshidrogenasa (10 mg) o la enzima comercial evo-1.1.200 (1 mg), y el medio de reacción se agitó a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. Tras ello, la reacción se paró y se extrajo con AcOEt (500 µL) y la fase orgánica se separó mediante centrifugación (2 min, 13000 rpm). Este protocolo de extracción y centrifugación se repitió una vez más, y finalmente las fases orgánicas se combinaron y la fase resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Tras tomar una alícuota de esta fase orgánica, los valores de conversión hacia los correspondientes alcoholes enantioenriquecidos **9a-m** y sus excesos enantioméricos (como compuestos acetilados) fueron medidos utilizando CG.

La derivatización de los alcoholes enantioenriquecidos **9a-m** se realizó tomando una alícuota de los alcoholes obtenidos en el paso de biorreducción (~1 mg) y se disolvió en AcOEt (1 mL) en un vial Eppendorf de 1.5 mL de volumen, añadiéndose posteriormente DMAP (10 mg) y anhídrido acético (5 gotas). La mezcla de reacción se agitó a 30 °C y 900 rpm durante 2 h. Tras este tiempo, se añadió una disolución acuosa de NaOH 10 M (500 µL) y la fase orgánica se separó mediante

centrifugación (2 min, 13000 rpm), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Finalmente, se transfirió la disolución obtenida a un vial de CG para su análisis.

3.5.4. PROCEDIMIENTO SECUENCIAL PARA LA OBTENCIÓN DE LAS 1-(HETERO)ARILPROPAN-2-AMINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS (ver Esquema 3.18)

En un vial de cristal (3.5 x 2.4 cm) se disolvieron la sal de paladio PdCl₂(MeCN)₂ (2.0 mg, 10 mol%) y el fotocatalizador [Acr-Mes]ClO₄ (1.6 mg, 5 mol%) en acetonitrilo (5% v/v, 150 µL). Tras ello, el correspondiente alil(hetero)areno **1a-m** (0.075 mmol, 25 mM) se añadió a la mezcla, seguido de la adición de H₂O (2.85 mL). La reacción se agitó magnéticamente bajo la irradiación de luz azul proveniente de leds (14.4 W) durante 16 h a temperatura ambiente.

Al crudo de reacción resultante, conteniendo las cetonas intermedias **2a-m**, se añadió (2-PrNH₂)₃PO₄ (309.8 mg, 0.3 M), 2-PrNH₂ (30.8 µL, 0.1 M) y H₂O (719.2 µL), obteniéndose unas concentraciones aproximadas de 20 mM de las cetonas intermedias y 1 M de 2-PrNH₂. Por otra parte, estas adiciones permitieron elevar el pH del medio de reacción del valor inicial de 3 a aproximadamente 8.5, óptimo para la reacción de biotransaminación. Tras ello, se añadieron al medio de reacción PLP (0.9 mg, 1 mM) y la correspondiente amino transaminasa (1:1 p/p). Finalmente, el vial se recubrió con papel de aluminio y se agitó en un agitador orbitálico a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. Tras este tiempo la reacción se paró mediante la adición de una disolución acuosa de NaOH 10 M (1 mL). El medio de reacción se extrajo con AcOEt (5 mL) y se separó la fase orgánica mediante centrifugación (2 min, 13000 rpm). Este protocolo de extracción y centrifugación se repitió dos veces más, y, finalmente, las fases orgánicas se combinaron y la fase resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Tras tomar una alícuota de esta fase orgánica, los valores de conversión hacia las correspondientes aminas enantioenriquecidas **8a-m** fueron medidos utilizando CG y los excesos enantioméricos determinados utilizando HPLC tras previa derivatización en las correspondientes acetamidas. Los crudos de reacción se purificaron a través de columna cromatográfica (5% NH₃/MeOH) obteniéndose las correspondientes aminas **8a-m** (31-83%) de forma enantiopura (>99 ee).

Capítulo 3. Procedimientos experimentales

3.5.5. PROCEDIMIENTO SECUENCIAL PARA LA OBTENCIÓN DE LOS 1-(HETERO)ARILPROPAN-2-OLES ÓPTICAMENTE ACTIVOS (ver Esquema 3.20)

En un vial de cristal (3.5 x 2.4 cm) se disolvieron la sal de paladio $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (2.0 mg, 10 mol%) y el fotocatalizador $[\text{Acr-Mes}]\text{ClO}_4$ (1.6 mg, 5 mol%) en acetonitrilo (5% v/v, 150 μL). Tras ello, el correspondiente alil(hetero)areno **1a-m** (0.075 mmol, 25 mM) se añadió a la mezcla, seguido de la adición de H_2O (2.85 mL). La reacción se agitó magnéticamente bajo la irradiación de luz azul proveniente de leds (14.4 W) durante 16 h a temperatura ambiente. Al crudo de reacción resultante, conteniendo las cetonas intermedias **2a-m**, se le añadió una disolución acuosa de NaOH (45 μL , 0.5 M), H_2O (517.5 μL) y 2-PrOH (187.5 μL , 5% v/v), permitiendo obtener unas concentraciones aproximadas de 20 mM de las cetonas intermedias y un incremento del pH del medio de reacción del valor inicial de 3 a aproximadamente 7.5, óptimo para la etapa de biorreducción. Tras ello se llevaron a cabo modificaciones en función de la alcohol deshidrogenasa empleada.

En el caso de las reacciones catalizadas por la enzima evo-1.1.200, se añadió NADH (2.7 mg, 1 mM) al medio de reacción, y en lugar de 517.5 μL de H_2O en el segundo paso, se añadieron 375 μL de una disolución acuosa 10 mM de MgCl_2 y 142.5 μL de H_2O , obteniéndose así una concentración final de 1 mM de MgCl_2 . En el caso de las reacciones catalizadas por la *E. coli*/ADH-T, se añadió NADPH (3.1 mg, 1 mM) al medio de reacción. En el caso de las reacciones catalizadas por la *E. coli*/ADH-A, se añadió NADH (2.7 mg, 1 mM) al medio de reacción.

Capítulo 3. Procedimientos experimentales

Finalmente, el correspondiente biocatalizador (3 mg en el caso de la evo-1.1.200 y 30 mg en el caso de las células de *E. coli* sobreexpresando una alcohol deshidrogenasa) se añadió al vial, este se recubrió con papel de aluminio y se agitó en un agitador orbitálico a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. Tras este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (5 mL). separando la fase orgánica mediante centrifugación (2 min, 13000 rpm). Este protocolo de extracción y centrifugación se repitió dos veces más y, finalmente, las fases orgánicas se combinaron y la fase resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Tras tomar una alícuota de esta fase orgánica, los valores de conversión hacia los correspondientes alcoholes enantioenriquecidos **9a-m** fueron medidos utilizando CG y los *ee* determinados utilizando CG quiral tras derivatizar hacia los correspondientes productos acetilados. Los crudos de reacción se purificaron a través de columna cromatográfica (25% AcOEt/Hexano) obteniéndose los correspondientes alcoholes **9a-m** (34-83%) con excelentes excesos enantioméricos (>97% *ee*).

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Markovnikov Wacker-Tsuji Oxidation of Allyl(hetero)arenes and Application in a One-Pot Photo-Metal-Biocatalytic Approach to Enantioenriched Amines and Alcohols

Jesús Albarrán-Velo,^a Vicente Gotor-Fernández,^{a,*} and Iván Lavandera^{a,*}

^a Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo, Avenida Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain
Fax: +34 985103446, +34 985103452 (I. L.)
Tel: +34 985103454 (V. G.-F.)
E-mail: vicgotfer@uniovi.es; lavanderaivan@uniovi.es

Manuscript received: March 20, 2021; Revised manuscript received: June 17, 2021;
Version of record online: ■■, ■■■

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/adsc.202100351>

© 2021 The Authors. Published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: The Wacker-Tsuji aerobic oxidation of various allyl(hetero)arenes under photocatalytic conditions to form the corresponding methyl ketones is presented. By using a palladium complex [PdCl₂(MeCN)₂] and the photosensitizer [Acr-Mes]ClO₄ in aqueous medium and at room temperature, and by simple irradiation with blue led light, the desired carbonyl compounds were synthesized with high conversions (>80%) and excellent selectivities (>90%). The key process was the transient formation of Pd nanoparticles that can activate oxygen, thus recycling the Pd(II) species necessary in the Wacker oxidative reaction. While light irradiation was strictly mandatory, the addition of the photocatalyst improved the reaction selectivity, due to the formation of the starting allyl(hetero)arene from some of the obtained by-products, thus entering back in the Wacker-Tsuji catalytic cycle. Once optimized, the oxidation reaction was combined in a one-pot two-step sequential protocol with an enzymatic transformation. Depending on the biocatalyst employed, i.e. an amine transaminase or an alcohol dehydrogenase, the corresponding (*R*)- and (*S*)-1-arylpropan-2-amines or 1-arylpropan-2-ols, respectively, could be synthesized in most cases with high yields (>70%) and in enantiopure form. Finally, an application of this photo-metal-biocatalytic strategy has been demonstrated in order to get access in a straightforward manner to selegiline, an anti-Parkinson drug.

Keywords: Wacker-Tsuji oxidation; photocatalysis; palladium chemistry; biocatalysis; sequential transformations

Introduction

Wacker-Tsuji oxidation is probably one of the most studied transformations in organic chemistry due to its relevance, since it affords carbonyl compounds from readily available alkenes. This reaction, discovered by Smidt and co-workers at Wacker Chemie company at late 50s,^[1] is based on the use of a palladium(II) salt as catalyst, which is reduced into Pd(0), thus requiring the presence of a copper(II) salt under aerobic and acidic conditions to provide the desired compounds to a large extent.^[2] Under these conditions, the Markovnikov addition of water is usually achieved,^[3] affording the corresponding methyl ketones when terminal alkenes are employed as substrates. However, soon it became clear that the utilization of Cu(II) in a catalytic or stoichiometric amount produced undesired effects such as larger quantities of waste and lower selectivities and atom efficiencies, accompanied by the use of toxic organic co-solvents under harsh reaction conditions. In this field, important efforts have been carried out in order to develop more efficient and safer strategies to replace the copper(II) salt. Hence, it has been described the use of other co-oxidants including peroxides,^[4] organic molecules such as benzoquinone,^[5] *tert*-butyl nitrite,^[6] hypervalent iodine atoms,^[5c,7] or inorganic salts,^[8] among others. Never-

theless, all of them present serious drawbacks since at least stoichiometric amounts of these reagents are required.

The employment of oxygen as final electron acceptor to recycle the catalytically active Pd(II) species releasing hydrogen peroxide or water as co-product is the best choice from an environmental point of view. Unfortunately, this aerobic transformation usually requires harsh conditions (high oxygen pressures and elevated temperatures), polar solvents with high boiling points such as dimethylsulfoxide (DMSO), *N,N*-dimethylformamide (DMF) or *N,N*-dimethylacetamide (DMA), and the addition of ligands, to avoid Pd(0) deactivation due to precipitation as palladium black.^[9] In this context, it is known that soluble Pd(0) complexes are in equilibrium with (soluble) palladium nanoparticles (NPs) before aggregation, acting as reservoir of catalytically active palladium species as demonstrated in cross-coupling reactions.^[10] Stabilized or immobilized Pd NPs are indeed excellent catalysts, which have been applied to different transformations including cross-coupling reactions,^[11] reductions and hydrogenations^[12] or alcohol oxidations.^[13]

The fact that palladium NPs are the catalytically active species in the aerobic Wacker oxidation of olefins has been disclosed decades ago,^[14] and finally demonstrated by applying them in this oxidative reaction.^[15] The pioneering contribution of Ishida, Tokunaga and co-workers demonstrated that the Wacker oxidation of various styrene compounds into the corresponding acetophenones was catalyzed by immobilized Pd NPs on ZrO₂, and also by soluble Pd(0) complexes under both co-catalyst and acid-free conditions at 80 °C and 2 atm of oxygen, implying the formation of catalytically active NPs.^[16] Doris and Namboothiri groups have also shown that supported Pd NPs can catalyze the same reaction in the presence of CuCl under very mild reaction conditions.^[17]

In a continuous search for more sustainable chemical processes, photocatalysis has emerged, especially in the last two decades, as a powerful tool that can be applied to the selective synthesis of valuable organic compounds.^[18] Thus, visible-light is used to initiate different organic transformations under very mild conditions through single-electron transfer (SET) or energy-transfer (EnT) mechanisms, depending on the photocatalyst and reagents employed. Obviously, redox processes can be largely influenced by light irradiation, providing a unique reaction environment, affecting to the redox state of the chemical species involved. In metal-catalyzed methodologies, the addition of a photosensitizer has allowed the design of novel transformations usually under mild conditions due to the cooperative action between the photo- and the metal catalysts, but the direct activation of soluble metal complexes under light irradiation is also possible.^[19] Particularly the photoactivation of Pd complexes is a

well-established method to mediate C–C bond coupling reactions generally via one electron redox chemistry.^[20] Also, immobilized Pd NPs on photosensitive materials such as TiO₂ or graphitic carbon nitride (*g*-C₃N₄), or in combination with an external photocatalyst, have promoted different transformations including water splitting,^[21] hydrogen peroxide production,^[22] or radical C–C bond formation.^[23]

In the last years, the synthesis of carbonyl compounds starting from alkenes has been achieved under photocatalyzed conditions. For instance, Lei and co-workers described the anti-Markovnikov addition of water to alkenes combining 9-mesityl-10-methylacridinium perchlorate ([Ac-Mes]ClO₄) as SET photosensitizer and a cobalt complex at room temperature using blue led light in a mixture of acetonitrile (MeCN):water (10:1 *v/v*), providing the desired carbonyl compounds through a radical mechanism.^[24] Later, Fabry *et al.* developed the Wacker-Tsuji oxidation of various terminal alkenes to produce the corresponding methyl ketones, by mixing a palladium(II) salt and [Ir(ppy)₂(bpy)]PF₆ as SET photocatalyst under white light in a DMF:H₂O (6:1 *v/v*) mixture at 120 °C. In this particular case, the photosensitizer reoxidized the palladium center transferring the electrons to the oxygen and closing the oxidative cycle.^[25] It must be emphasized that the addition of the photocatalyst was strictly necessary.

Due to the mildness of both synthetic strategies, the combination of photo- and biocatalytic methodologies has been successfully implemented, providing efficient and selective pathways to valuable derivatives in a one-pot sequential or cascade fashion.^[26] Examples of photocatalyzed processes involving the action of alcohol dehydrogenases (ADHs)^[27] or amine transaminases (ATAs)^[27,28] towards the synthesis of enantioenriched alcohols and amines, respectively, can be highlighted.^[29]

Enantiopure 1-(hetero)arylpropan-2-ols and 1-(hetero)arylpropan-2-amines (amphetamines) are privileged motifs with a wide spectrum of biological properties, and have also been employed as precursors of pharmaceutical compounds for the treatment of, e. g. obesity (Benzphetamine), Parkinson (Selegiline), the attention deficit hyperactive disorder (Dextroamphetamine and Lisdexamfetamine), and asthma (Formoterol). These high-added value derivatives have been obtained following different synthetic approaches including non-biocatalytic^[30] and enzymatic^[31] syntheses. Also, multienzymatic – deracemization,^[32] amination of racemic alcohols^[33] or dynamic kinetic resolution processes^[34] – and chemoenzymatic – organo-bio^[35] or metal-bio^[36] – cascade transformations have allowed the enantioselective synthesis of these derivatives.

In this field, two remarkable contributions have been disclosed involving a Wacker-type oxidation of alkene substrates in a multi-step sequence to obtain 1-

arylpropan-2-ols or 1-arylpropan-2-amines in aqueous medium under aerobic conditions.^[37] Arnold and co-workers reported the anti-Markovnikov oxidation of a series of alkenes catalyzed by an engineered P450 monooxygenase enzyme followed by an ADH-catalyzed reduction to afford the enantioenriched alcohols (Scheme 1a). Among the different substrates included in this study, *trans*- β -methylstyrene provided 1-phenylpropan-2-ol although at low extent.^[38] Our research group recently developed the stereoselective synthesis of a family of 1-arylpropan-2-amines in good yields starting from allylarenes following a sequential strategy which involved a Wacker-Tsuji oxidation and a biotransamination step (Scheme 1b).^[8d] Interestingly, palladium(II) trifluoroacetate and an iron(III) salt, used as co-oxidant, in the presence of sodium trifluoroacetate efficiently catalyzed the formation of the ketone intermediates at 30–60 °C, which were subsequently aminated by an amine transaminase. With these precedents, here the development of the Wacker-Tsuji oxidation of various allyl(hetero)arenes is described under very simple and mild photocatalytic conditions, in addition to its integration with a stereoselective biocatalyzed process to synthesize in a straightforward manner valuable enantiopure *sec*-alcohols or primary amines (Scheme 1c).

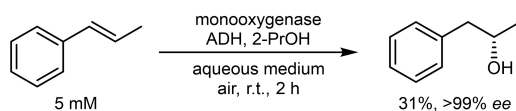
Results and Discussion

As a first step, commercially available allylbenzene (**1a**, 25 mM) was considered as the model substrate to optimize a light-driven Wacker transformation. Hence, various Pd catalysts and photosensitizers were tested (Table 1) to obtain 1-phenylpropan-2-one (**2a**) under blue light irradiation.

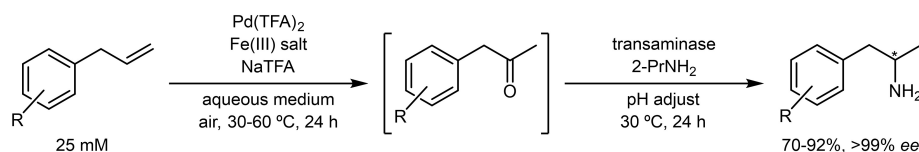
Based on our previous experience developing this reaction,^[8d] we performed the photocatalyst screening under blue led activation using Pd(TFA)₂ as catalyst in a water:MeCN (95:5 v/v) mixture (entries 1–5) at r.t. These conditions were selected as they can be compatible with a second biocatalytic reaction. Among the different pairs screened, Pd(TFA)₂/[Acr-Mes]ClO₄ afforded the highest conversion into the desired product **2a** (34%) after 16 h. [Acr-Mes]ClO₄ is a SET sensitizer belonging to the acridinium family,^[39] and it can promote or mediate Wacker-type transformations activating alkene derivatives^[24,40] or oxygen to form radical anion superoxide.^[39a,41]

Cinnamaldehyde (**3a**), cinnamyl alcohol (**4a**), propiophenone (**5a**), and a non-oxygenated compound such as *trans*- β -methylstyrene (**6a**) were detected as by-products of these transformations, although at very low extent. Next, different Pd(II) and Pd(0) complexes were examined under the same conditions (entries 6–11), finding the best results with PdCl₂(MeCN)₂, which gave **2a** in a very high conversion (75%). It was

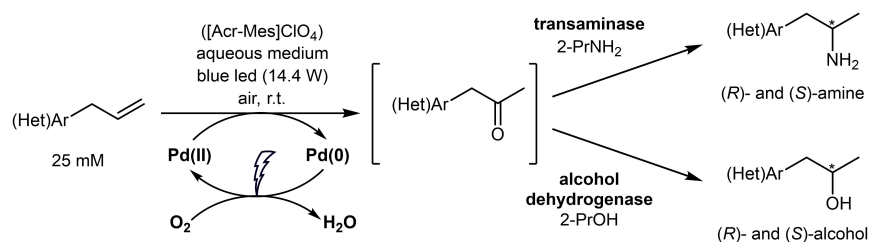
a) **Arnold and co-workers**:^[38] anti-Markovnikov hydration of *trans*- β -methylstyrene combining an engineered monooxygenase and an ADH



b) **Gotor-Fernández and co-workers**:^[8d] one-pot sequential metal-biocatalytic formal Markovnikov hydroamination of allylarenes

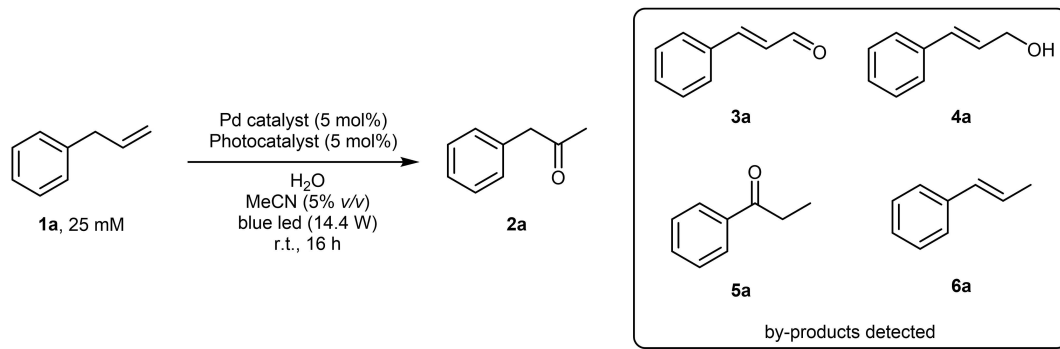


c) **This contribution**: one-pot photo-metal-biocatalytic formal Markovnikov hydration and hydroamination of allyl(hetero)arenes



Scheme 1. Chemo- and multienzymatic approaches to obtain enantioenriched 1-(hetero)arylpropan-2-ols or 1-(hetero)arylpropan-2-amines through multi-step reactions starting from alkene derivatives.

Table 1. Aerobic light-driven Wacker-Tsuji oxidation of allylbenzene (**1 a**).^[a]



Entry	Pd catalyst [5 mol%]	Photocatalyst [5 mol%]	1 a [%] ^[b]	2 a [%] ^[b]	3 a [%] ^[b]	4 a [%] ^[b]	5 a [%] ^[b]	6 a [%] ^[b]
1	Pd(TFA) ₂	Ru(bpy) ₃ Cl ₂	86	7	1	< 1	< 1	6
2	Pd(TFA) ₂	Ir(ppy) ₃	72	19	3	< 1	1	5
3	Pd(TFA) ₂	Eosin Y	66	23	5	< 1	2	4
4	Pd(TFA) ₂	Rose Bengal	86	8	4	< 1	1	1
5	Pd(TFA) ₂	[Acr-Mes]ClO ₄	59	34	7	< 1	< 1	< 1
6	PdCl ₂ (MeCN) ₂	[Acr-Mes]ClO ₄	21	75	2	1	< 1	1
7	Pd(OAc) ₂	[Acr-Mes]ClO ₄	66	27	5	1	< 1	1
8	Pd(OAc) ₂ (PPh ₃) ₂	[Acr-Mes]ClO ₄	60	23	14	3	< 1	< 1
9	Pd(dba) ₂	[Acr-Mes]ClO ₄	67	22	7	2	1	1
10	Pd(PPh ₃) ₄	[Acr-Mes]ClO ₄	68	15	11	2	1	3
11	Pd/C	[Acr-Mes]ClO ₄	69	1	11	17	1	1
12^[c]	PdCl₂(MeCN)₂	[Acr-Mes]ClO₄	10	79	7	1	1	2

^[a] Reaction conditions: Pd catalyst (5 mol%) and photocatalyst (5 mol%) were placed into a glass vial (3.5 × 2.4 cm) and dissolved in MeCN (5% v/v, 150 μL). Next, allylbenzene (**1 a**, 0.075 mmol, 25 mM) and H₂O (2.85 mL) were added to the reaction mixture. The reaction was magnetically stirred under blue led light (14.4 W) for 16 h at room temperature.

^[b] Percentages of compounds were measured by GC analysis (see details in the Supporting Information).

^[c] 10 mol% PdCl₂(MeCN)₂.

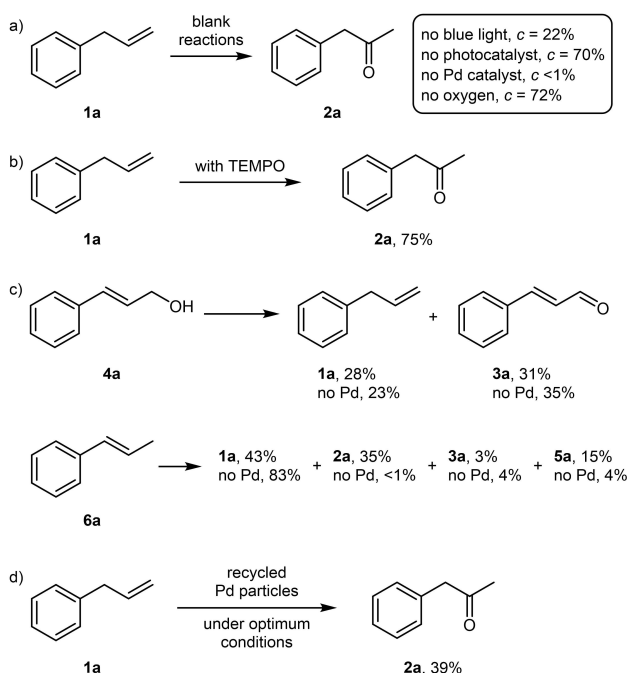
remarkable that also soluble Pd(0) catalysts afforded **2 a** although at lower extension (15–22%), in agreement with previous results.^[16] However, Pd on charcoal did not catalyze the oxidation of **1 a** into **2 a**. It must be noticed that among all Pd sources tested, PdCl₂(MeCN)₂ is the one with the more labile ligands.

Subsequently, a reaction optimization (see Table S1 in the Supporting Information) was achieved. The amounts of photo- and metal-catalysts (5–10 mol%) and acetonitrile concentration (0–15% v/v) were modified, attaining a slightly better conversion into ketone **2 a** (79%) when the quantity of the palladium catalyst was increased up to 10 mol% (Table 1, entry 12). Also, transformations at higher substrate concentration were performed, and while conversions close to 60% were still attained at 50 mM of **1 a**, a considerable drop of activity was observed at 100–150 mM. The use of other organic co-solvents [tetrahydrofuran (THF), DMF or DMSO] did not show any improvement (see Table S2 in the Supporting Information).

In order to gain insight into the mechanism of this oxidative transformation, several experiments were

performed (Scheme 2 and Table S2 in the Supporting Information). Hence, blank reactions were carried out in the absence of light, oxygen or catalysts (Scheme 2a). From these tests, it became clear that light irradiation and the Pd catalyst were essential. In the absence of light, 21% of the isomerized compound **6 a** was detected along with just a 22% of **2 a**. In the absence of PdCl₂(MeCN)₂, **3 a** (26%) was detected as the main product, and **2 a** was not formed at any extent. Surprisingly, the absence of the photocatalyst did not strongly affect the formation of the desired ketone **2 a**, but a higher amount of by-products was observed, especially for aldehyde **3 a** (15%). Finally, it was remarkable to find out that even under oxygen-free conditions – degasification of the reaction medium using the freeze-pump-thaw method and under argon atmosphere –, a high conversion into **2 a** (72%) was still afforded (Table S2 in the Supporting Information).

To detect possible radical intermediates, (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl radical (TEMPO, 1 equiv.) was added into the reaction mixture, but an analogous product distribution was detected (Scheme 2b).



Scheme 2. Transformations to investigate the reaction mechanism: a) Blank experiments. b) In the presence of TEMPO. c) Using compounds **4a** and **6a** as substrates in the presence (or not) of the palladium catalyst. d) Recycling the Pd particles precipitated after a first transformation under optimized oxidative conditions.

As cinnamaldehyde was usually attained as the main by-product, different reactions were performed using alcohol **4a** or alkene **6a** as possible precursors (Scheme 2c), studying in particular the effect of $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$. Hence, when using cinnamyl alcohol as substrate, a mixture of compounds **1a** and **3a** was observed in the presence of both catalysts or adding only $[\text{Acr-Mes}]\text{ClO}_4$. However, using derivative **6a** as substrate, a different picture was noticed. A mixture of products **1a**, **2a** and **5a** was obtained using both catalysts, but mainly allylbenzene just in the presence of the photosensitizer.

At this point, it must be pointed out that the precipitation of Pd(0) black particles was observed during the performance of the oxidative transformation under optimized conditions. Once we carefully filtered the solid, it was reused as the palladium source for a new oxidative transformation (Scheme 2d), attaining noticeable conversions of 1-phenylpropan-2-one (39%) and aldehyde **3a** (18%, Table S2 in the Supporting Information).

The formation of these by-products in Wacker oxidations under other conditions is known as well as the involved reaction mechanisms. Palladium catalysts have provided excellent results in the isomerization of allylarenes into the more thermodynamically stable internal alkenes (e.g. compound **6a**),^[42] which after

water addition can provide the corresponding ketones (e.g. derivative **5a**).^[2] On the other hand, the allylic functionalization of terminal alkenes via π -allyl Pd(II) complexes is also widely applied to obtain allylic alcohols (e.g. compound **4a**).^[43] Under aerobic conditions, they can be oxidized into the corresponding α,β -unsaturated aldehydes (e.g. derivative **3a**).^[43a,b,44]

With the exception of the isomerization reaction, these transformations reduce catalytically active Pd(II) into Pd(0), which obviously needs to get reoxidized. In our particular case, it was envisaged that $[\text{Acr-Mes}]\text{ClO}_4$ under blue light, in a similar approach than the one described by Fabry *et al.*,^[25] could catalyze the recovery of the Pd(II) species. However, it was noticed that the photosensitizer was not strictly necessary, as the Wacker-Tsuji oxidation also proceeded, just affecting to the product selectivity. Therefore, under our conditions oxygen was able to recycle palladium(II). We believe that the formation of palladium nanoparticles is the key for the successful development of this method.

Various experimental results and observations pointed out that Pd NPs were indeed formed during the reaction course. As mentioned in the introduction, Pd nanoparticles derived from soluble complexes are able to mediate Wacker oxidative reactions,^[16] and under the irradiation of light, they are able to promote reactions such as water splitting.^[21] Herein, we have shown that the oxidative transformation also proceeded even under the absence of molecular oxygen (entry 6, Table S2 in the SI). Thus, the formation of oxygen (and hydrogen) from water mediated by the irradiated NPs can allow the reoxidation of Pd(0) into the catalytically active Pd(II) species. In fact, traces of propylbenzene (**7a**) were detected in this experiment, which must be obtained after hydrogenation of substrate **1a**, thus demonstrating the generation of hydrogen.

A time-study of the optimized reaction under aerobic conditions was achieved (Table S5 in the SI), observing that a mixture of desired product **2a** and isomerized alkene **6a** was quickly formed. However, this mixture slowly progressed into compound **2a** along the first 3 hours, and after that time the reaction proceeded faster, reaching a conversion around 80% after 16 h. This lag time is usually related to the conversion of soluble complex precursors into catalytically active nanoparticles.^[10c] Finally, the deposit of metallic particles after the oxidative transformation and the fact that they demonstrated to be catalytically active, as shown in Scheme 2d, is probably the most relevant evidence that Pd NPs are involved in this transformation.

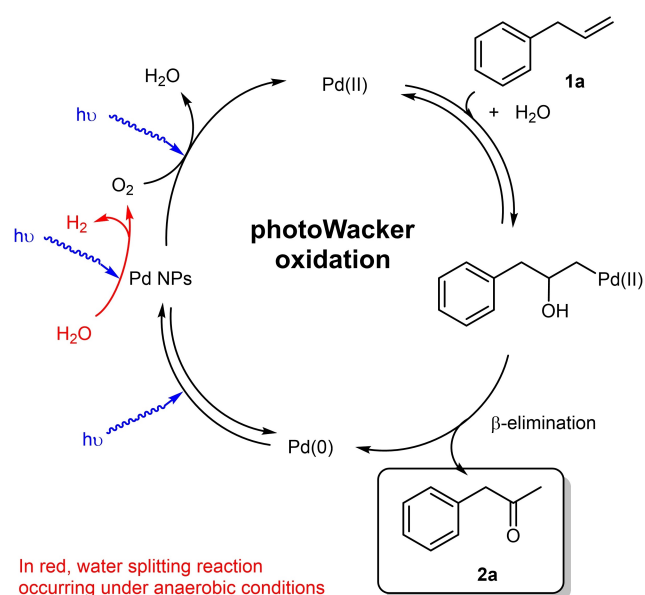
The role of the visible light irradiation could be related to the excitation of soluble Pd complex intermediates,^[19,20] but these single-electron transfer procedures usually follow radical mechanisms. In our

case, the addition in the reaction mixture of a radical scavenger such as TEMPO (Scheme 2b) did not significantly modify the product conversion, thus ruling out the intervention of these reactive species in the formation of **2a**. We believe that blue light can favor the transient formation of Pd NPs involved in the catalysis and/or can facilitate the reoxidation into the active Pd(II) species. The direct interaction of oxygen with Pd(0)-hydride species releases hydrogen peroxide,^[9,45] which later decomposes into water and oxygen, or enters in the metal-oxidative catalytic cycle as the oxidant, also providing water as final product.^[4,46] To check the possible formation of H₂O₂ in our system, aliquots were taken at different reaction times and submitted to a highly selective colorimetric assay to detect hydrogen peroxide [titanium(IV) oxysulfate, TiOSO₄].^[47] However, a conclusive positive result was not observed (see Section IV.2 in the SI). If H₂O₂ was transiently formed, it was continuously consumed in the reaction.

As mentioned before, the addition of the photocatalyst was not compulsory to obtain ketone **2a** at high extent, but it favored the process selectivity, as a higher amount of the desired ketone at expenses of a lower quantity of aldehyde **3a** was noticed (around 10%). A possible explanation can be drawn looking at the experiments done in Scheme 2c. Cinnamaldehyde (**3a**) can be obtained via Pd^[43a,b,44] or [Acr-Mes]ClO₄ mediated oxidation^[48] of cinnamyl alcohol (**4a**), or by photooxygenation of *trans*-β-methylstyrene (**6a**).^[39a] In our case it was observed that **3a** was formed from alcohol **4a** in the presence of both catalysts, and also when [Acr-Mes]ClO₄ was just added to the reaction mixture (Scheme 2c and Table S3 in the Supporting Information). These results are in agreement with those reported in the bibliography,^[43a,b,44,48] but remarkably allylbenzene **1a** was also obtained at significant extent (23%). Similar transfer hydrogenolysis transformations of allylic alcohols under photocatalytic conditions can be found in the literature in the presence of Pd NPs.^[49]

When alkene **6a** was used as the substrate, isomerization into **1a** was expected due to the action of the Pd catalyst.^[42] Interestingly, the simple addition of the photosensitizer also catalyzed the same transformation (see Scheme 2c and Table S4 in the Supporting Information). With these results, we think that [Acr-Mes]ClO₄ can promote the oxidation of cinnamyl alcohol to **3a**, but it has also an important role in our photocatalytic process isomerizing back *trans*-β-methylstyrene to provide again allylbenzene, which can enter in the main Wacker-type oxidative cycle, overall, affording a better product selectivity. With all these findings, we have summarized the proposed mechanism of the photoWacker-Tsuji oxidation in Scheme 3.

Once optimized the oxidation of **1a**, a series of allyl(hetero)arenes **1b–n** were purchased or chemically synthesized following previously described procedures



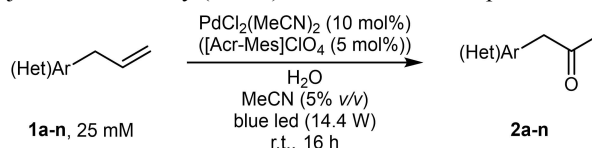
Scheme 3. Proposed mechanism for the photoWacker-Tsuji oxidation of allylbenzene (**1a**). For the whole scheme including the secondary transformations, see Scheme S1 in the Supporting Information.

(see additional information in the Supporting Information),^[50] and subsequently submitted to light-driven Wacker-Tsuji conditions to selectively obtain the corresponding ketones **2b–n** (Table 2, right).

As can be observed, this combined photo-metal-catalyzed protocol was successfully applied to most of the arene derivatives independently of their substitution pattern and electronic character. Thus, *ortho*-substituted compounds **1b–e** (entries 2–5) afforded conversions around 80% towards the corresponding ketones with excellent selectivity (>91%), and *meta*- and/or *para*-substituted derivatives **1f–k** (entries 6–11) also formed the desired carbonyl compounds at high extent (70–85%) with similar selectivity values (>89%). Just for the substrate bearing a strongly deactivating nitro group (entry 8), a negative effect in the conversion towards ketone **2h** (43%) was observed, although the selectivity remained excellent. Finally, three heteroaromatic compounds containing thiophene and furan rings (**1l–n**, entries 12–14) were tested under optimized conditions, providing ketones **2l–n** in low to moderate conversions (30–56%) and selectivities (59–70%). These results clearly demonstrated the broad applicability of this catalytic methodology under very simple reaction conditions.

The effect of the photosensitizer was reevaluated by performing the same oxidations in its absence (Table 2, left). As occurred for the model substrate **1a**, conversions slightly decay and worse selectivities into the ketone products were attained. These effects were especially noticeable for derivatives **1h, j, k** (entries 8,

Table 2. Aerobic photoWacker-Tsuji oxidation of allyl(hetero)arenes **1 a–n** under optimized conditions.^[a]



Entry	Substrate	Without [Acr-Mes]ClO ₄			With [Acr-Mes]ClO ₄		
		c [%] ^[b]	2 a–n [%] ^[b]	Selectivity [%] ^[c]	c [%] ^[b]	2 a–n [%] ^[b]	Selectivity [%] ^[c]
1	1 a (R=C ₆ H ₅)	89	70	79	90	79	88
2	1 b (R=2-CH ₃ -C ₆ H ₄)	79	73	92	83	78	94
3	1 c (R=2-OCH ₃ -C ₆ H ₄)	77	66	86	85	77	91
4	1 d (R=2-Br-C ₆ H ₄)	78	70	90	80	76	95
5	1 e (R=2-F-C ₆ H ₄)	84	78	93	86	81	94
6	1 f (R=3-F-C ₆ H ₄)	79	71	90	84	80	95
7	1 g (R=4-F-C ₆ H ₄)	85	72	85	95	85	89
8	1 h (R=4-NO ₂ -C ₆ H ₄)	22	11	50	45	43	96
9	1 i (R=4-CH ₃ -C ₆ H ₄)	87	69	79	86	82	95
10	1 j (R=4-OCH ₃ -C ₆ H ₄)	76	49	64	76	70	92
11	1 k (R=3,4-OCH ₂ O-C ₆ H ₃)	64	55	86	85	76	89
12	1 l (R=2-thienyl)	54	32	59	74	44	59
13	1 m (R=3-thienyl)	63	41	65	86	56	65
14	1 n (R=2-furyl)	39	26	67	43	30	70

^[a] Reaction conditions: Pd catalyst (10 mol%) and photocatalyst (5 mol%) were placed into a glass vial (3.5 × 2.4 cm) and dissolved in MeCN (5% v/v, 150 μL). Next, allyl(hetero)arene **1 a–n** (0.075 mmol, 25 mM) and H₂O (2.85 mL) were added to the mixture. The reaction was magnetically stirred under blue led light (14.4 W) for 16 h at room temperature.

^[b] Conversion and percentage of product values were measured by GC analysis.

^[c] Selectivity = **2 a–n** percentage divided by the total conversion.

10, and 11). These findings demonstrate that the addition of [Acr-Mes]ClO₄ was beneficial in our system.

Since this transformation can be performed in aqueous medium and at room temperature, we envisaged the possibility to couple an enzymatic transformation to get access to high added value compounds. Due to the presence of a carbonyl moiety, readily available amine transaminases^[27,28] or alcohol dehydrogenases^[27] could directly afford, respectively, the corresponding enantioenriched 1-(hetero)arylpropan-2-amines (**8 a–m**) and 1-(hetero)arylpropan-2-ols (**9 a–m**),^[51] privileged biologically active derivatives and intermediates of highly interesting drugs.^[52] The overall processes can be foreseen as formal stereoselective hydration or hydroamination of allyl(hetero)arenes (Scheme 1c).

However, it became soon clear that a sequential design might be selected, since the addition of different essential components in the biotransformations [phosphate buffer, propan-2-amine (2-PrNH₂), propan-2-ol (2-PrOH), pyridoxal 5'-phosphate (PLP), or the enzymatic preparation], negatively affected to the photocatalyzed Wacker-Tsuji oxidation of model substrate **1 a** (Table S6 in the Supporting Information). Especially noticeable was the negative effect in the presence of the buffer (<5% conversion). These results hampered the development of a concurrent cascade protocol.

Therefore, biotransamination and bioreduction screenings were performed on ketones **2 a–m** to find the best enzyme candidates. For substrates **2 a–c, i–k**, we already knew the best ATAs from a previous study in our group,^[8d] and consequently, we focused our attention on the bioamination of ketones **2 d–h, l, m** (Tables S7–S13 in the Supporting Information) and the bioreduction of compounds **2 a–m** (Tables S14–S15 in the Supporting Information). For each substrate we tried to find stereocomplementary biocatalysts, thus accessing to both product antipodes.

Regarding the amine transaminases, we selected various enzymes obtained from a commercial source, while in the case of the alcohol dehydrogenases, lyophilized cells of *E. coli* overexpressing *S*-selective ADH from *Rhodococcus ruber* (*E. coli*/ADH-A)^[53] or *Thermoanaerobacter sp.* (*E. coli*/ADH-T),^[54] and commercially available *R*-selective evo-1.1.200 were chosen. Because both families of enzymes require a cofactor to remain active [PLP for ATAs and NAD(P)H for ADHs], a sacrificial co-substrate – propan-2-amine to obtain the chiral amines^[27,28] and propan-2-ol to get access to the enantioenriched alcohols^[27] – was chosen as cofactor recycling method in the so-called coupled-substrate approach. By this way, satisfactory conversions (>90%) and excellent stereoselectivities (>99%) were obtained for all the substrates.

After making the selection, we had to face one of the main issues when developing two reactions in a one-pot sequential fashion, since these enzymes work best in slightly basic (7.5–8.5) pHs, and after the first metal-photocatalytic step it resulted clearly acid (approx. 3–4). To overcome this problem, in the case of ATAs, a mixture of propan-2-ammonium phosphate and propan-2-amine in water was added to the medium, rising the pH up to approx. 8.5, while for ADHs, a NaOH aqueous solution was supplemented, attaining a final pH value of approx. 7.5. After these pH adjustments and once provided the biocatalyst, the cofactor and the co-substrate, target enantiopure amines **8a–m** and alcohols **9a–m** were synthesized in usually high isolated yields (>70%) and *ee* values (>99%) after additional 24 h, with the exception of substrates **1h, l, m** due to lower conversions achieved in the metal-photocatalytic transformation (Figure 1 and Tables S16–S17 in the Supporting Information).

To demonstrate the applicability of this protocol, preparative sequential experiments at 1 mmol scale were performed with substrate **1a**, synthesizing (*R*)-**8a** using TA-P2-B01 (81%, >99% *ee*) and (*S*)-**9a** with *E. coli*/ADH-A as catalyst (80%, >99% *ee*). Moreover, starting from optically active amine (*R*)-**8a** and following a modified procedure to the one described by MacGregor and co-workers (Scheme 4),^[55] we could get access to selegiline (**11**), an important anti-Parkinson drug, in 54% overall yield and in enantiopure form.

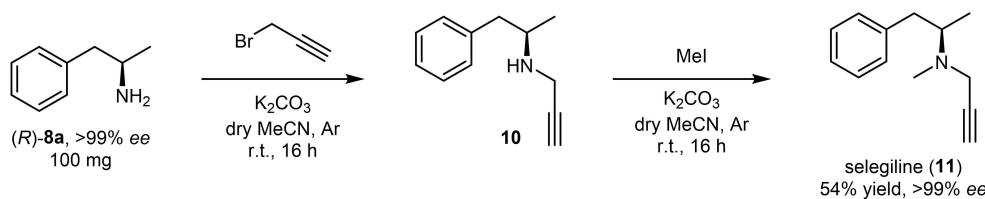
Conclusions

The transformation of alkenes into ketone derivatives is probably one of the most studied reactions in organic chemistry. The availability of the starting material and the synthetic possibilities that the carbonyl products offer, has risen the interest of researchers from different disciplines. In this field, the Wacker-Tsuji oxidation of C–C double bonds facilitates the preparation of the corresponding ketones via Markovnikov addition of water, appearing as a synthetically useful strategy that has been widely implemented at industrial level. The combination of a palladium(II) precursor in the presence of a chelating ligand and a co-oxidant such as a copper(II) salt in an organic solvent has provided

impressive results at moderate to high temperatures. However, recent environmental concerns have prompted scientists, and in particular chemists, to explore novel sustainable alternatives that keep the outstanding results attained in the traditional chemical methods, and can also be performed under mild and safe reaction conditions.

Here, a promising approach to achieve the aerobic Wacker-Tsuji oxidation of allyl(hetero)arenes is presented. This approach consists in the use of a Pd(II) complex in aqueous medium, room temperature and under visible light. The key of this transformation is the transient formation of palladium nanoparticles that can activate molecular oxygen under light conditions, recovering back the Pd(II) species necessary for the Wacker-type oxidation. Whereas the use of blue led irradiation was mandatory to reach high conversions, the addition of a photosensitizer such as [Acr-Mes]ClO₄ improved the selectivity of the process, due its reactivity with some of the by-products attained in this process, forming back the starting material which entered in the main catalytic cycle. This light-driven Wacker-Tsuji oxidative protocol was successfully applied to a series of allyl(hetero)arenes which rendered the (hetero)arylacetone derivatives typically in high yields and very high selectivities. Taking advantage of the use of an aqueous medium under mild conditions for this transformation, a second enzymatic reaction was coupled in a sequential manner towards the formation of a wide panel of chiral amines and alcohols. Thus, selecting the proper biocatalyst – an amine transaminase or an alcohol dehydrogenase –, highly valuable enantiopure 1-(hetero)arylpropan-2-amines or 1-(hetero)arylpropan-2-ols were recovered in good isolated yields, up to 83%, following a one-pot two-step procedure.

This photo-metal-biocatalytic sequence could be easily performed at preparative scale, and one of the synthesized amines was employed as precursor of selegiline, a drug which is used in the treatment of Parkinson's disease and major depressive disorders, among others. We believe that the combination of palladium and light-induced transformations shown in this contribution can open the door for further valuable synthetic applications under sustainable conditions.



Scheme 4. Synthesis of selegiline starting from (*R*)-**8a** obtained through the light-driven Wacker-Tsuji oxidation-biotransamination sequential protocol at preparative scale.

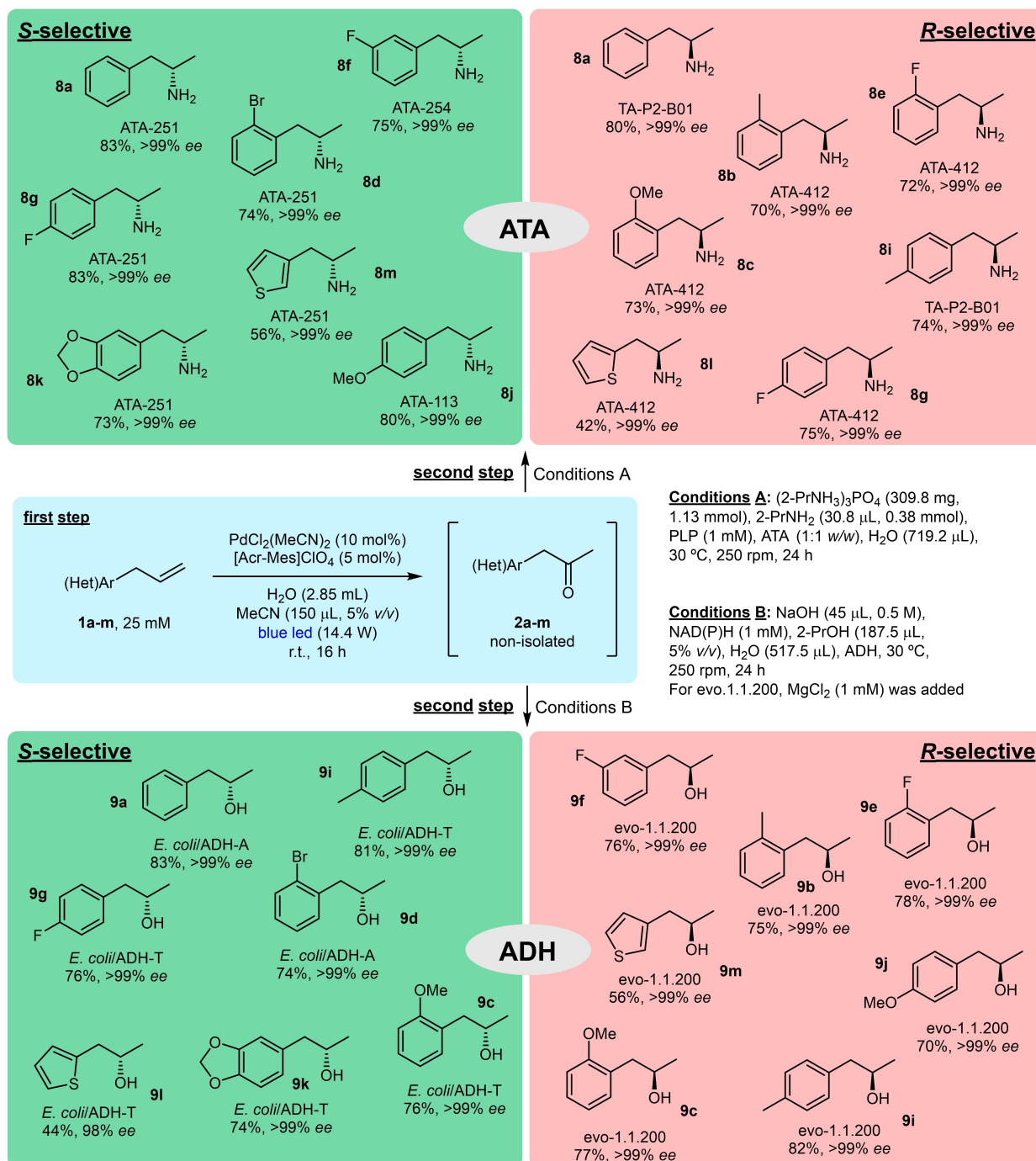


Figure 1. Synthesis of enantiopure 1-(hetero)arylpropan-2-amines and 1-(hetero)arylpropan-2-ols following a one-pot two-step photo-metal-biocatalytic sequential protocol. Isolated yields after chromatographic purification and enantiomeric excess values are indicated, and the whole set of data appears in Tables S16 and S17 of the Supporting Information.

Experimental Section

General Procedure for the Photocatalyzed Wacker-Tsuji Transformation at Analytical Scale

PdCl₂(MeCN)₂ (2.0 mg, 10 mol%) and [Acr-Mes]ClO₄ (1.6 mg, 5 mol%) were placed into a glass vial (3.5 × 2.4 cm) and dissolved in MeCN (150 μL). Next, allyl(hetero)arene **1a–n**

(0.075 mmol, 25 mM) and H₂O (2.85 mL) were added to the mixture. The reaction was magnetically stirred under blue led light (14.4 W) for 16 h at room temperature. After that time, the mixture was extracted with EtOAc (1 mL) and the organic layer was separated by centrifugation (3 min, 4,300 g). This extraction and centrifugation protocol was repeated once and, finally, the organic phases were combined, dried over Na₂SO₄, filtered,

and transferred to a GC glass vial for analysis of the conversion degree and product distribution.

Photo-Metal-Biocatalytic Sequential Process towards Enantioenriched Amines

$\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (2.0 mg, 10 mol%) and $[\text{Acr-Mes}]\text{ClO}_4$ (1.6 mg, 5 mol%) were added and dissolved in MeCN (150 μL) inside a glass vial (3.5×2.4 cm). Next, allyl(hetero)arene **1a-m** (0.075 mmol, 25 mM) was dissolved in the mixture and H_2O (2.85 mL) was added. Then, the reaction mixture was stirred under blue led light (14.4 W) for 16 h at room temperature.

To the resulting reaction crude containing the ketone intermediate **2a-m**, $(2\text{-PrNH}_2)_3\text{PO}_4$ (309.8 mg, 1.13 mmol), 2-PrNH₂ (30.8 μL , 0.38 mmol), and H_2O (719.2 μL) were added, leading to approximately concentrations of 20 mM for the ketone and 1 M for 2-PrNH₂. These additions increased the pH from an initial value of 3 to approximately 8.5, optimum for the biotransamination step. After that, PLP (0.9 mg, 1 mM) and the corresponding amine transaminase (1:1 w/w) were added to the reaction medium. Finally, the vial was covered with aluminum foil and shaken in an orbital shaker at 30 °C and 250 rpm for 24 h. After that time, the reaction was stopped by the addition of a NaOH aqueous solution (1 mL, 10 M). The mixture was extracted with EtOAc (5 mL) and the organic layer separated by centrifugation (3 min, 4,300 g). This extraction and centrifugation protocol was performed three times and, finally, the organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 . The product distribution was measured by GC analysis and the enantiomeric excess values were determined by HPLC as acetamide derivatives, after derivatization of enantioenriched amines **8a-m** with acetic anhydride and potassium carbonate. The reaction crude was purified through column chromatography (eluent: 5% NH_3/MeOH), affording the amines **8a-m** in 31–83% yield (see Table S16 in the Supporting Information).

Photo-Metal-Biocatalytic Sequential Process towards Enantioenriched Alcohols

$\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (2.0 mg, 10 mol%) and $[\text{Acr-Mes}]\text{ClO}_4$ (1.6 mg, 5 mol%) were added and dissolved in MeCN (150 μL) inside a glass vial (3.5×2.4 cm). Next, allylarene **1a-m** (0.075 mmol, 25 mM) was dissolved in the mixture and H_2O (2.85 mL) was added. Then, the reaction mixture was magnetically stirred under blue led light (14.4 W) for 16 h at room temperature.

To the resulting reaction crude containing the ketone intermediate **2a-m**, an aqueous NaOH solution (45 μL , 0.5 M), H_2O (517.5 μL), and 2-PrOH (187.5 μL , 5% v/v) were added, leading to approximately a concentration of 20 mM for the substrate and increasing the pH from an initial value of 3 to approximately 7.5, optimum for the bioreduction step. Other additives were added depending on the biocatalyst used in the second step.

In the case of evo-1.1.200-catalyzed reactions, NADH (2.7 mg, 1 mM) was added to the reaction mixture and, instead of 517.5 μL of H_2O in the second step, 375 μL of a MgCl_2 10 mM aqueous solution and 142.5 μL of H_2O were added, leading to a final concentration of 1 mM of MgCl_2 . In the case of *E. coli*/ADH-T-catalyzed reactions, NADPH (3.1 mg, 1 mM) was

added to the reaction mixture. In the case of *E. coli*/ADH-A-catalyzed reactions, NADH (2.7 mg, 1 mM) was added to the reaction mixture.

Finally, the corresponding biocatalyst (3 mg in the case of evo-1.1.200 or 30 mg in the case of lyophilized *E. coli* cells overexpressing an alcohol dehydrogenase) was added, and the vial was covered with aluminum foil and shaken in an orbital shaker at 30 °C and 250 rpm for 24 h. After that time, the reaction was stopped and the mixture extracted with EtOAc (5 mL), separating the organic layer by centrifugation (3 min, 4,300 g). This extraction and centrifugation protocol was performed three times and, finally, the organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 . The product distribution was measured by GC analysis and enantiomeric excess values were determined by chiral GC as acetylated derivatives, after derivatization of the enantioenriched alcohols **9a,b,d-m** with acetic anhydride in the presence of 4-dimethylaminopyridine. Enantiomeric excess of the alcohol **9c** was determined by chiral HPLC without derivatization. The reaction crude was purified through column chromatography (eluent: 25% EtOAc/Hexane), affording the alcohols **9a-m** in 34–83% yield (see Table S17 in the Supporting Information).

Photo-Metal-Biocatalytic Sequential Process towards Amine (R)-8a at Preparative Scale

$\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (25.9 mg, 10 mol%) and $[\text{Acr-Mes}]\text{ClO}_4$ (20.6 mg, 5 mol%) were added and dissolved in MeCN (2 mL) in a 100 mL Schlenk tube. Next, allylbenzene (**1a**, 118 mg, 1 mmol, 25 mM) was dissolved in the mixture and H_2O (38 mL) was added. Then, the reaction mixture was magnetically stirred under blue led light (14.4 W) for 16 h at room temperature.

To the resulting reaction crude containing the ketone intermediate **2a**, $(2\text{-PrNH}_2)_3\text{PO}_4$ (4.09 g, 14.85 mmol), 2-PrNH₂ (410 μL , 5.0 mmol), and H_2O (9.59 mL) were added, leading to approximately concentrations of 20 mM for the substrate and 1 M for 2-PrNH₂, and increasing the pH from an initial value of 3 to approximately 8.5, optimum for the biotransamination step. After that, PLP (12.4 mg, 1 mM) and TA-P2-B01 transaminase (118 mg, 1:1 w/w) were added to the reaction medium. Finally, the vial was shaken in the dark (using aluminum foil) at 30 °C and 250 rpm for 24 h. After that time, the reaction was stopped by the addition of an aqueous NaOH solution (5 mL, 10 M). The mixture was extracted with EtOAc (20 mL) and the organic layer separated by centrifugation (3 min, 4,300 g). This extraction and centrifugation protocol was performed three times and, finally, the organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 . The organic layer was filtered and the solvent removed under reduced pressure. The reaction crude containing (R)-**8a** was purified by column chromatography on silica gel (5% NH_3/MeOH), yielding the corresponding enantiopure amine in 81% yield (109.3 mg).

Photo-Metal-Biocatalytic Sequential Process towards Alcohol (S)-9a at Preparative Scale

$\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (25.9 mg, 10 mol%) and $[\text{Acr-Mes}]\text{ClO}_4$ (20.6 mg, 5 mol%) were added and dissolved in MeCN (2 mL)

in a 100 mL Schlenk tube. Next, allylbenzene (**1a**, 118 mg, 1 mmol, 25 mM) was dissolved in the mixture and H₂O (38 mL) was added. Then, the reaction mixture was magnetically stirred under blue led light (14.4 W) for 16 h at room temperature.

To the resulting reaction crude containing the ketone intermediate **2a**, an aqueous NaOH solution (600 µL, 0.5 M), H₂O (6.9 mL), and 2-PrOH (2.5 mL, 5% v/v) were added, leading to approximately a concentration of 20 mM for the substrate and increasing the pH from an initial value of 3 to approximately 7.5, optimum for the bioreduction step. After that, NADH (36 mg, 1 mM) and *E. coli*/ADH-A (400 mg) were added to the reaction medium. Finally, the vial was shaken in the dark (using aluminum foil) at 30 °C and 250 rpm for 24 h. After that time, the reaction was stopped and the mixture extracted with EtOAc (20 mL), separating the organic layer by centrifugation (3 min, 4,300 g). This extraction and centrifugation protocol was performed three times and, finally, the organic layers were combined and dried over Na₂SO₄. The organic layer was filtered and the solvent removed under reduced pressure. The reaction crude containing (*S*)-**9a** was purified by column chromatography on silica gel (25% EtOAc/Hexane), yielding the corresponding enantiopure alcohol in 80% yield (108.8 mg).

Acknowledgements

Financial support 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-IDI/2018/000181) are gratefully acknowledged. J. A.-V. also thanks the Asturian regional government for a predoctoral fellowship inside the Severo Ochoa programme (BP17-32). Prof. Wolfgang Kroutil (University of Graz, Austria) is acknowledged for the donation of overexpressed alcohol dehydrogenases and amine transaminases.

References

- [1] J. Smidt, W. Hafner, R. Jira, R. Sieber, J. Sedlmeier, A. Sabel, *Angew. Chem.* **1962**, *74*, 93–102; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *1*, 80–88.
- [2] Recent reviews about the Wacker oxidation and mechanistic discussions: a) S. E. Mann, L. Benhamou, T. D. Sheppard, *Synthesis* **2015**, *47*, 3079–3117; b) T. V. Baiju, E. Gravel, E. Doris, I. N. N. Namboothiri, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3993–4000; c) R. A. Fernandes, A. K. Jha, P. Kumar, *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10*, 7448–7470.
- [3] For recent reviews regarding anti-Markovnikov addition approaches, see: a) J. J. Dong, W. R. Browne, B. L. Feringa, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 744–755; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 734–744; b) Y. Ura, *Synthesis* **2021**, *23*, 848–860.
- [4] Selected examples: a) J. Tsuji, H. Nagashima, K. Hori, *Chem. Lett.* **1980**, *9*, 257–260; b) B. W. Michel, L. D. Steffens, M. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8317–8325; c) B. W. Michel, M. S. Sigman, *Aldrichimica Acta* **2011**, *44*, 55–62; d) Q. Cao, D. S. Bailie, R. Fu, M. J. Muldoon, *Green Chem.* **2015**, *17*, 2750–2757; e) X. Xia, X. Gao, J. Xu, C. Hu, X. Peng, *Synlett* **2017**, *28*, 607–610; f) S. Saha, S. Yadav, N. U. D. Reshi, I. Dutta, S. Kunnikuruvan, J. K. Bera, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 11385–11393.
- [5] a) I. Schnapperelle, W. Hummel, H. Gröger, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1073–1076; b) G. Zhang, X. Xie, Y. Wang, X. Wen, Y. Zhao, C. Ding, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2947–2950; c) M. A. Bigi, M. C. White, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7831–7834.
- [6] a) K.-F. Hu, X.-S. Ning, J.-P. Qu, Y.-B. Kang, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 11327–11332; b) Q. Huang, Y.-W. Li, X.-S. Ning, G.-Q. Jiang, X.-W. Zhang, J.-P. Qu, Y.-B. Kang, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 965–969.
- [7] D. A. Chaudhari, R. A. Fernandes, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2113–2121.
- [8] Selected recent examples: a) R. A. Fernandes, D. A. Chaudhari, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5787–5793; b) R. A. Fernandes, V. Bethi, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 4760–4767; c) V. Bethi, R. A. Fernandes, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 8577–8584; d) D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2582–2593.
- [9] Recent reviews: a) K. M. Gligorich, M. S. Sigman, *Chem. Commun.* **2009**, 3854–3867; b) D. Wang, A. B. Weinstein, P. B. White, S. S. Stahl, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 2636–2679; c) M. Hu, W. Wu, H. Jiang, *ChemSusChem* **2019**, *12*, 2911–2935.
- [10] a) J. A. Widegren, R. G. Finke, *J. Mol. Catal. A* **2003**, *198*, 317–341; b) N. T. S. Phan, M. Van Der Sluys, C. W. Jones, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 609–679; c) R. H. Crabtree, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1536–1554; d) C. Deraedt, D. Astruc, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 494–503; e) J. M. Asensio, D. Bouzouita, P. W. N. M. van Leeuwen, B. Chaudret, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 1042–1084.
- [11] a) A. Balanta, C. Godard, C. Claver, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4973–4985; b) I. Favier, D. Madec, E. Teuma, M. Gomez, *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 3127–3174; c) A. M. Trzeciak, A. W. Augustyniak, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *384*, 1–20; d) A. I. Ayad, C. B. Marín, E. Colaco, C. Lefevre, C. Méthivier, A. O. Driss, J. Landoulsi, E. Guénin, *Green Chem.* **2019**, *21*, 6646–6657; e) G. Ding, L. Hao, H. Xu, L. Wang, J. Chen, T. Li, X. Tu, Q. Zhang, *Commun. Chem.* **2020**, *3*, 43.
- [12] Recent reviews: a) S. Bulut, Z. Fei, S. Siankevich, J. Zhang, N. Yan, P. J. Dyson, *Catal. Today* **2015**, *247*, 96–103; b) D. J. Gavia, Y.-S. Shon, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 892–900; c) S. Luo, Z. Zeng, G. Zeng, Z. Liu, R. Xiao, M. Chen, L. Tang, W. Tang, C. Lai, M. Cheng, B. Shao, Q. Liang, H. Wang, D. Jiang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 32579–32598.
- [13] M. Nasrollahzadeh, M. Sajjadi, M. Shokouhimehr, R. S. Varma, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *397*, 54–75.
- [14] M. Hronec, Z. Cvengrošová, Š. Holotík, *J. Mol. Catal.* **1994**, *91*, 343–352.
- [15] J.-L. Wang, L.-N. He, C.-X. Miao, Y.-N. Li, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1317–1320.

- [16] Z. Zhang, Y. Kumamoto, T. Hashiguchi, T. Mamba, H. Murayama, E. Yamamoto, T. Ishida, T. Honma, M. Tokunaga, *ChemSusChem* **2017**, *10*, 3482–3489.
- [17] S. Donck, E. Gravel, N. Shah, D. V. Jawale, E. Doris, I. N. N. Namboothiri, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2318–2322.
- [18] For recent reviews, see: a) A. Savateev, M. Antonietti, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 9790–9808; b) A. Dhakshinamoorthy, Z. Li, H. Garcia, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 8134–8172; c) C. Michelin, N. Hoffmann, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 12046–12055; d) L. Marzo, S. K. Pagire, O. Reiser, B. König, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 10188–10228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 10034–10072; e) Q.-Q. Zhou, Y.-Q. Zou, L.-Q. Lu, W.-J. Xiao, *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 1600–1619; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 1586–1604; f) K. Sun, Q.-Y. Lv, X.-L. Chen, L.-B. Qu, B. Yu, *Green Chem.* **2021**, *23*, 232–248.
- [19] Recent reviews: a) J. Twilton, C. Le, P. Zhang, M. H. Shaw, R. W. Evans, D. W. C. MacMillan, *Nat. Chem. Rev.* **2017**, *1*, 52; b) R. Kancherla, K. Muralirajan, A. Sagadevan, M. Rueping, *Trends Chem.* **2019**, *1*, 510–523; c) W.-M. Cheng, R. Shang, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 9170–9196.
- [20] a) P. Chuentragool, D. Kurandina, V. Gevorgyan, *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 11710–11722; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 11586–11598; b) W.-J. Zhou, G.-M. Cao, Z.-P. Zhang, D.-G. Yu, *Chem. Lett.* **2019**, *48*, 181–191.
- [21] Recent examples and reviews: a) L. Liu, X. Wu, L. Wang, X. Xu, L. Gan, Z. Si, J. Li, Q. Zhang, Y. Liu, Y. Zhao, R. Ran, X. Wu, D. Weng, F. Kang, *Commun. Chem.* **2019**, *2*, 18; b) Q. Zhang, J. Guan, *Solar RRL* **2020**, *4*, 2000283; c) T. Kawawaki, Y. Mori, K. Wakamatsu, S. Ozaki, M. Kawachi, S. Hossain, Y. Negishi, *J. Mater. Chem. A* **2020**, *8*, 16081–16113; d) J.-H. Zhang, M.-J. Wei, Y.-L. Lu, Z.-W. Wei, H.-P. Wang, M. Pan, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *3*, 12108–12114; e) M. E. Potter, D. J. Stewart, A. E. Oakley, R. P. Boardman, T. Bradley, P. J. A. Sazio, R. Raja, *ACS Photonics* **2020**, *7*, 714–722.
- [22] C. Chu, D. Huang, Q. Zhu, E. Stavitski, J. A. Spies, Z. Pan, J. Mao, H. L. Xin, C. A. Schmuttenmaer, S. Hu, J.-H. Kim, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 626–631.
- [23] A. Tyagi, T. Matsumoto, T. Kato, H. Yoshida, *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 4577–4583.
- [24] G. Zhang, X. Hu, C.-W. Chiang, H. Yi, P. Pei, A. K. Singh, A. Lei, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12037–12040.
- [25] Y. A. Ho, E. Paffenholz, H. J. Kim, B. Orgis, M. Rueping, D. C. Fabry, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 1889–1892.
- [26] Recent reviews: a) L. Schmermund, V. Jurkaš, F. F. Özgen, G. D. Barone, H. C. Büchenschütz, C. K. Winkler, S. Schmidt, R. Kourist, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 4115–4144; b) P. Lauder, D. Castagnolo, *Synlett* **2020**, *31*, 737–744; c) F. F. Özgen, M. E. Runda, S. Schmidt, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 790–806.
- [27] a) C. K. Prier, B. Kosjek, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *49*, 105–112; b) F. Hollmann, D. J. Opperman, C. E. Paul, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 5706–5727; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 5644–5665.
- [28] a) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129–143; b) I. Slabu, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 8263–8284; c) M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts* **2018**, *8*, 254.
- [29] Selected recent examples of photo-biocascades involving ADHs or ATAs: a) K. Lauder, A. Toscani, Y. Qi, J. Lim, S. J. Charnock, K. Korah, D. Castagnolo, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 5905–5909; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5803–5807; b) W. Zhang, E. Fernández-Fueyo, Y. Ni, M. van Schie, J. Gacs, R. Renirie, R. Wever, F. G. Mutti, D. Rother, M. Alcalde, F. Hollmann, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 55–62; c) J. Gacs, W. Zhang, T. Knaus, F. G. Mutti, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Catalysts* **2019**, *9*, 305; d) R. C. Betori, C. M. May, K. A. Scheidt, *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 16642–16646; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 16490–16494; e) Y. Peng, D. Li, J. Fan, W. Xu, J. Xu, H. Yu, X. Lin, Q. Wu, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 821–825.
- [30] Recent examples: a) B. Laroche, H. Ishitani, S. Kobayashi, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 4699–4704; b) T. Yasukawa, R. Masuda, S. Kobayashi, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 1088–1092; c) L. Cicco, A. Salomone, P. Vitale, N. Ríos-Lombardía, J. González-Sabín, J. García-Álvarez, F. M. Perna, V. Capriati, *ChemSusChem* **2020**, *13*, 3583–3588; d) B. Gao, X. Feng, W. Meng, H. Du, *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 4528–4534; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 4498–4504; e) F.-H. Zhang, F.-J. Zhang, M.-L. Li, J.-H. Xie, Q.-L. Zhou, *Nat. Catal.* **2020**, *3*, 621–627.
- [31] Recent bibliography: a) J. Liu, B. Q. W. Pang, J. P. Adams, R. Snajdrova, Z. Li, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 425–431; b) A. Pushpanath, E. Siirola, A. Bornadel, D. Woodlock, U. Schell, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 3204–3209; c) S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 2553–2559; d) H. C. Lo, J. D. Ryan, J. B. Kerr, D. S. Clark, R. H. Fish, *J. Organomet. Chem.* **2017**, *839*, 38–52; e) P. Vitale, V. M. Abbinante, F. M. Perna, A. Salomone, C. Cardellicchio, V. Capriati, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 1049–1057; f) H. N. Hoang, Y. Nagashima, S. Mori, H. Kagechika, T. Matsuda, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 2984–2989; g) M. M. Musa, O. Bsharat, I. Karume, C. Vieille, M. Takahashi, S. M. Hamdan, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 798–805; h) R.-J. Li, A. Li, J. Zhao, Q. Chen, N. Li, H.-L. Yu, J.-H. Xu, *Catal. Sci. Technol.* **2018**, *8*, 4638–4644; i) J. Paris, A. Telzerow, N. Ríos-Lombardía, K. Steiner, H. Schwab, F. Moris, H. Gröger, J. González-Sabín, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, *7*, 5486–5493; j) A. Telzerow, J. Paris, M. Håkansson, J. González-Sabín, N. Ríos-Lombardía, M. Schürmann, H. Gröger, F. Moris, R. Kourist, H. Schwab, K. Steiner, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 1140–1148; k) F.-F. Chen, Y.-H. Zhang, Z.-J. Zhang, L. Liu, J.-P. Wu, J.-H. Xu, G.-W. Zheng, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 14987–14993; l) J. Mangas-Sanchez, M. Sharma, S. C. Cosgrove, J. I. Ramsden, J. R. Marshall, T. W. Thorpe, R. B. Palmer, G. Grogan, N. J. Turner, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 5052–5057.

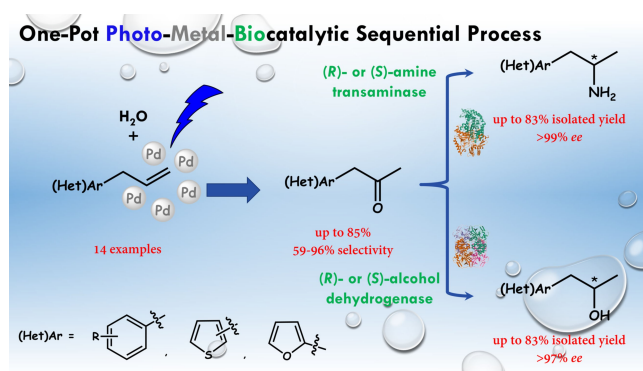
- [32] S. Yoon, M. D. Patil, S. Sarak, H. Jeon, G.-H. Kim, T. P. Khobragade, S. Sung, H. Yun, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 1898–1902.
- [33] Selected examples: a) K. Tauber, M. Fuchs, J. H. Sattler, J. Pitzer, D. Pressnitz, D. Koszelewski, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4030–4035; b) F. G. Mutti, T. Knaus, N. S. Scrutton, M. Breuer, N. J. Turner, *Science* **2015**, *349*, 1525–1529; c) M. P. Thompson, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 3833–3836; d) J. A. Houwman, T. Knaus, M. Costa, F. G. Mutti, *Green Chem.* **2019**, *21*, 3846–3857.
- [34] a) I. Karume, M. M. Musa, O. Bsharat, M. Takahashi, S. M. Hamdan, B. El Ali, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 96616–96622; b) J. Popłoński, T. Reiter, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 763–768.
- [35] a) F. Poulhès, N. Vanthuyne, M. P. Bertrand, S. Gastaldi, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7281–7286; b) E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Moris, F. Rebollo, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4768–4774; c) E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Moris, J. González-Sabín, F. Rebollo, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 3031–3035; d) R. S. Correia Cordeiro, N. Ríos-Lombardía, F. Moris, R. Kourist, J. González-Sabín, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 1272–1277.
- [36] S.-B. Ko, B. Baburaj, M.-J. Kim, J. Park, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6860–6864.
- [37] For other excellent examples of combinations of a Wacker oxidation process and a biocatalytic transformation starting from styrene derivatives to produce 1-arylethan-1-ols and 1-arylethan-1-amines, see reference 5a and: a) H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4570–4574; *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*, 9517–9521.
- [38] S. C. Hammer, G. Kubik, E. Watkins, S. Huang, H. Minges, F. H. Arnold, *Science* **2017**, *358*, 215–218.
- [39] a) A. G. Griesbeck, M. Cho, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 611–613; b) K. Ohkubo, S. Fukuzumi, D. A. Nicewicz, *e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* **2015**, 1–5; c) K. A. Margrey, D. A. Nicewicz, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1997–2006; d) N. A. Romero, D. A. Nicewicz, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 10075–10166.
- [40] H. Wang, Y. Man, Y. Xiang, K. Wang, N. Li, B. Tang, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 11426–11429.
- [41] a) K. Ohkubo, K. Mizushima, R. Iwata, K. Souma, N. Suzuki, S. Fukuzumi, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 601–603; b) N. Xu, P. Li, Z. Xie, L. Wang, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2236–2242.
- [42] M. Hassam, A. Taher, G. E. Arnott, I. R. Green, W. A. L. van Otterlo, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 5462–5569.
- [43] a) C. Li, H. Chen, J. Li, M. Li, J. Liao, W. Wu, H. Jiang, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 1600–1604; b) R. A. Fernandes, J. L. Nallasivam, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 8647–8672; c) Z. Zhang, T. Mamba, E. Yamamoto, H. Murayama, T. Ishida, T. Honma, T. Fujitani, M. Tokunaga, *Appl. Catal. B* **2019**, *246*, 100–110.
- [44] H. Chen, H. Jiang, C. Cai, J. Dong, W. Fu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 992–994.
- [45] B. V. Popp, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4410–4422.
- [46] K. L. Walker, L. M. Dornan, R. N. Zare, R. M. Waymouth, M. J. Muldoon, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 12495–12503.
- [47] G. Eisenberg, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1943**, *15*, 327–328.
- [48] H. J. Xu, X. L. Xu, Y. Fu, Y. S. Feng, *Chin. Chem. Lett.* **2007**, *18*, 1471–1475.
- [49] Y. Takada, J. Caner, S. Kaliyamoorthy, H. Naka, S. Saito, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 18025–18032.
- [50] a) F. Ek, O. Axelsson, L.-G. Wistrand, T. Frejd, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6376–6381; b) Y. Zhang, C. Wang, L. Rothberg, M.-K. Ng, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3721–3725; c) L. R. Peacock, R. S. L. Chapman, A. C. Sedgwick, M. F. Mahon, D. Amans, S. D. Bull, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 994–997.
- [51] Due to the low conversion obtained in the light-driven Wacker-Tsuji oxidation and also due to volatility issues, one-pot sequential transformations on furyl derivative **1n** were not studied.
- [52] Selected examples: a) Y. Kim, L.-S. Kang, H.-J. Ha, S. W. Ko, W. K. Lee, *Heterocycles* **2007**, *71*, 2243–2248; b) M. Lingamurthy, G. R. Nalliboina, M. V. Rao, B. V. Rao, B. S. Reddy, H. M. S. Kumar, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 1473–1481; c) D. Brenna, M. Pirola, L. Raimondi, A. J. Burke, M. Benaglia, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 6242–6247.
- [53] K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, 2402–2404.
- [54] Z. Findrik, D. Vasić-Rački, S. Lütz, T. Daussmann, C. Wandrey, *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1087–1095.
- [55] R. R. MacGregor, J. S. Fowler, A. P. Wolf, C. Halldin, B. Langström, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1988**, *25*, 1–9.

UPDATES

Markovnikov Wacker-Tsuji Oxidation of Allyl(hetero)arenes and Application in a One-Pot Photo-Metal-Biocatalytic Approach to Enantioenriched Amines and Alcohols

Adv. Synth. Catal. **2021**, *363*, 1–14

 J. Albarrán-Velo, V. Gotor-Fernández*, I. Lavandera*



CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones generales

A modo de conclusiones generales de la presente Tesis Doctoral, se puede establecer que, por un lado, se han desarrollado metodologías oxidativas en condiciones suaves de reacción, y por otro lado se han estudiados una serie de aproximaciones quimio-, multi- y metaloenzimáticas empleando diferentes familias de biocatalizadores. En concreto, se ha considerado el empleo de lacasas, alcohol deshidrogenasas y transaminasas, así como su combinación con oxidantes radicalarios, metales o fotocatalizadores para dar acceso a compuestos orgánicos de alto valor añadido de una manera eficiente y selectiva.

En el Capítulo 1 se han desarrollado nuevos sistemas quimioenzimáticos para la oxidación de compuestos modelo derivados de la estructura de la lignina empleando un sistema lacasa-mediador. De esta forma, en un primer lugar, se ha llevado a cabo la síntesis de nuevos mediadores nitrogenados, cuya estructura derivó de compuestos procedentes de la degradación de la lignina como son la vainillina y el siringaldehído. Tras ello, se ha estudiado el uso conjunto de estos mediadores con dos lacasas, como son las provenientes de los hongos *Trametes versicolor* y *Myceliophthora thermophila*, para finalmente estudiar la capacidad catalítica de estos sistemas en la oxidación del alcohol veratrílico y del adlerol.

En el Capítulo 2 se ha estudiado la posibilidad de llevar a cabo la síntesis de una gran variedad de alcoholes y aminas alílicas ópticamente activas, a través de un proceso bienzimático desarrollado de manera secuencial. De esta forma, en un primer lugar se optimizaron las condiciones de reacción dirigidas hacia la oxidación quimioenzimática de una serie de alcoholes alílicos racémicos empleando la lacasa de *Trametes versicolor* y el mediador radicalario TEMPO. Tras obtener las correspondientes cetonas α,β -insaturadas, se desarrolló tanto el proceso de biorreducción de las mismas utilizando alcohol deshidrogenasas, como su reacción de biotransaminación empleando transaminasas. Finalmente, se ha podido acoplar el proceso de oxidación de los alcoholes con el de asimetrización de las correspondientes cetonas proquirales intermedias, logrando respectivamente la desracemización o la aminación estereoselectiva de los alcoholes secundarios racémicos de partida.

Conclusiones generales

Finalmente, en el Capítulo 3 se ha llevado a cabo la síntesis quimioenzimática de diferentes 1-(hetero)arilpropan-2-oles y 1-(hetero)arilpropan-2-aminas ópticamente activas partiendo de los correspondientes alil(hetero)arenos. Para ello, se ha estudiado en profundidad la oxidación de Wacker-Tsuji de los sustratos de partida en condiciones foto-metalocatalíticas para la obtención de las 1-(hetero)arilpropan-2-onas intermedias de un modo altamente selectivo. Tras este paso realizado en medio acuoso y en condiciones suaves de reacción, ha sido posible el desarrollo de dos procesos enzimáticos diferentes, transformando las cetonas previamente mencionadas en los correspondientes alcoholes o aminas ópticamente activos con buenos rendimientos y excelentes excesos enantioméricos mediante el uso de alcohol deshidrogenasas o transaminasas, respectivamente.

Cabe destacar que las investigaciones abordadas han sido publicadas todas ellas en revistas científicas internacionales de reconocido prestigio, en las que se ha demostrado la versatilidad de las enzimas en síntesis orgánica.

REFERENCIAS CRUZADAS

CAPÍTULO 1

27. (b) M. D. Cannatelli, J. Ragauskas, *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 122-140.
32. (a) L. Munk, A. K. Sitarz, D. C. Kalyani, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 13-24; (b) A. K. Sitarz, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *36*, 70-86.
36. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/38429?lang=es®ion=ES>.
37. <https://www.novozymes.com/en/scientific-publications/characterization-of-novel-enzymes>.
41. R. M. Berka, P. Schneider, E. J. Golightly, S. H. Brown, M. Madden, K. M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf, F. Xu, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3151-3157.
45. (b) A. I. Cañas, S. Camarero, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 694-705.
107. K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2448-2453.

CAPÍTULO 2

27. (a) S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219-226; (b) M. D. Cannatelli, J. Ragauskas, *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 122-140.
30. (b) A. Zerva, S. Simić, E. Topakas, J. Nikodinovic-Runic, *Catalysts* **2019**, *9*, 1023.
44. (a) S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1187-1209.
54. (a) I. W. C. E. Arends, Y.-X. Li, R. Ausan, R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **2006**, 6659-6665.
66. W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014-1017.
67. Z. Findrik, D. Vasić-Rački, S. Lütz, T. Dausmann, C. Wandrey, *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1087-1095.
68. C. Heiss, M. Laivenieks, J. G. Zeikus, R. S. Phillips, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *7*, 1659-1666.
70. (a) I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2008**, *15*, 6003-6005; (b) H. Man, K. Kędziora, J. Kulig, A. Frank, I. Lavandera,

Referencias cruzadas

- V. Gotor-Fernández, D. Rother, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, *Top. Catal.* **2014**, *5*, 356-365.
- 71.** (a) I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *11*, 2155-2158; (b) I. Lavandera, G. Oberdofer, J. Gross, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *15*, 2539-2543.
- 72.** (a) M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306-4308; (b) S. Leuchs, L. Greiner, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, *2*, 267-281.
- 73.** S. Kara, D. Spickermann, A. Weckbecker, C. Leggewie, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 973-976.
- 107.** K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2448-2453.
- 108.** (a) F. G. Mutti, T. Knaus, N. S. Scrutton, M. Breuer, N. J. Turner, *Science* **2015**, *349*, 1525-1529; (b) T. Knaus, L. Cariati, M. F. Masman, F. G. Mutti, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8313-8325.
- 143.** (a) A. Díaz-Rodríguez, L. Martínez-Montero, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 2321-2329.
- 156.** L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Green Chem.* **2017**, *19*, 474-480.

CAPÍTULO 3

- 93.** (e) S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 2553-2559.
- 106.** (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.
- 108.** (a) F. G. Mutti, T. Knaus, N. S. Scrutton, M. Breuer, N. J. Turner, *Science* **2015**, *349*, 1525-1529.
- 209.** E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, F. Rebolledo, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4768-4774.
- 210.** (a) K. Tauber, M. Fuchs, J. H. Sattler, J. Pitzer, D. Pressnitz, D. Koszelewski, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4030-4035.
- 211.** (b) M. P. Thompson, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 3833-3836; (e) J. A. Houwman, T. Knaus, M. Costa, F. G. Mutti, *Green Chem.* **2019**, *21*, 3846-3857.

