



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

*PROGRAMA DE DOCTORADO DE QUÍMICA ORGANOMETÁLICA*

**EMPLEO DE POLIFOSFACENOS COMO SOPORTES  
ENZIMÁTICOS. PREPARACIÓN DE COMPUESTOS  
ENANTIOENRIQUECIDOS MEDIANTE PROCESOS  
BIOCATALÍTICOS TÁNDEM O DINÁMICOS**

TESIS DOCTORAL

ANÍBAL CUETOS FERNÁNDEZ

JULIO 2013

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



A	Alanina
AADH	Aminoácido deshidrogenasa
ac.	Ácido
AcOEt	Acetato de etilo
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i> DSM 44541
ADH-T	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobium</i> sp.
ADH-TB	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanerobium brockii</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADPR	Adenosín difosfato ribosa
Arg	Arginina ( <i>Arginine</i> )
Asp	Ácido aspártico ( <i>Aspartic acid</i> )
AT	Aminotransferasa
ATA	Amino transaminasa
$\alpha$ -TA	$\alpha$ -Transaminasa
Å	Ångström
BASF	<i>Badische Anilin- und Soda-Fabrik</i> , Compañía química
Bn	Bencilo
Bu	Butilo o butil
BVMO	Baeyer-Villiger monooxigenasa
°C	Grado centígrado Celsius
c	Centi
CaADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Clostridium acetobutylicum</i>
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B
CAST	Test de saturación en el centro activo, ( <i>Combinatorial active-site saturation test</i> )
cat.	Catalítico
CHMO	Ciclohexanona monooxigenasa de <i>Acinetobacter</i> sp. NCIMB 9871
CIP	Nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog
CLEA	Agregados enzimáticos obtenidos por entrecruzamiento ( <i>Cross-Linked Enzyme Aggregates</i> )
CMCR	Carbonil reductasa de <i>Candida magnoliae</i>

CPADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Candida parapsilosis</i>
CPMO	Ciclopentanona monooxigenasa
CRE	Enzima de regeneración del cofactor ( <i>Coenzyme regenerating enzyme</i> )
Cys	Cisteína ( <i>Cysteine</i> )
D	Configuración dextro
Da	Dalton
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DKR	Resolución dinámica cinética ( <i>Dynamic kinetic resolution</i> )
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DYRKR	Resolución cinética dinámica reductiva ( <i>Dynamic reductive kinetic resolution</i> )
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EC	<i>Enzyme Commission number</i>
<i>ed</i>	Exceso diastereomérico
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
EI	Ionización por impacto electrónico ( <i>Electron ionization</i> )
ESI	Ionización por electroespray ( <i>Electrospray ionization</i> )
Et	Etilo o etil
EtOH	Etanol
Et <sub>2</sub> O	Dietiléter
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FADH <sub>2</sub>	Flavín adenín dinucleótido, reducido
FADHOOH	Flavín adenín dinucleótido hidroperóxido protonado
FADHOO <sup>-</sup>	Flavín adenín dinucleótido hidroperóxido
FDH	Formiato deshidrogenasa
FMN	Flavín mononucleótido
G	Grupo voluminoso
g	Gramo
GDH	Glucosa deshidrogenasa
GEN	Grupo electronegativo o electroattractor
Glu	Ácido glutámico ( <i>Glutamic acid</i> )

Abreviaturas y Acrónimos

GP	Grupo protector
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
h	Hora
H	Histidina
HAPMO	4-Hidroxiacetofenona monooxigenasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ACB
Hhe	Halohidrina deshalogenasa
His	Histidina ( <i>Histidine</i> )
HLADH	Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo ( <i>Horse liver alcohol dehydrogenase</i> )
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución ( <i>High-resolution mass spectrometry</i> )
Hz	Hertzio
I	Isoleucina
<sup>i</sup> PrOH	Isopropanol
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
IR	Espectroscopia infrarroja
ISM	Mutagénesis por saturación iterativa ( <i>Iterative saturation mutagenesis</i> )
IT	Intermedio tetraédrico
IUB	Unión Internacional de Bioquímica ( <i>International union of biochemistry</i> )
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
k	Kilo
<i>K</i>	Constante cinética
KR	Resolución cinética ( <i>Kinetic resolution</i> )
<i>K<sub>rac</sub></i>	Constante cinética de racemización
KRED	Cetoreductasa ( <i>Ketoreductase</i> )
L	Configuración levo
L	Leucina
L	Litro

Abreviaturas y Acrónimos

LB	Caldo de lisogenia, medio de cultivo ( <i>Luria broth</i> )
LBADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
Leu	Leucina ( <i>Leucine</i> )
LI	Líquido iónico
LK-ADH o LKADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus kefir</i>
Lys	Lisina ( <i>Lysine</i> )
M	Grupo mediano
M	Mega
M	Molaridad o molar
m	Metro
m	Mili
Me	Metilo o metil
MeOH	Metanol
min	Minuto
μ	Micro
N	Normalidad o normal
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido, oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
P	Prolina
PAMO	Fenilacetona monooxigenasa de <i>Thermobifida fusca</i>
PCL	Lipasa de <i>Pseudomonas</i> (o <i>Burkholderia</i> ) <i>cepacia</i>
PDB	Banco de datos de proteínas ( <i>Protein data bank</i> )
PDC	Piruvato descarboxilasa
Phe	Fenilalanina ( <i>Phenylalanine</i> )
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PMP	Piridoxamina
p p <sup>-1</sup>	Porcentaje peso-peso
p v <sup>-1</sup>	Porcentaje peso-volumen
psi	Libra por pulgada cuadrada
PTDH	Fosfito deshidrogenasa ( <i>Phosphite dehydrogenase</i> )
P450	Citocromo P450

Q	Glutamina
RasADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Ralstonia</i> sp.
Rdto.	Rendimiento
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina ( <i>Serine</i> )
sp.	Especie ( <i>species</i> )
SsADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Sulfolobus solfataricus</i>
SSCR	Carbonil reductasa de <i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
Su	Sustrato
SyADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Sphingobium yanoikuyae</i>
T	Temperatura
TA	Transaminasa
t.a.	Temperatura ambiente
TBME	<i>tert</i> -Butil metil éter
<sup>t</sup> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TEOS	Ortosilicato de tetraetilo ( <i>Tetraethyl orthosilicate</i> )
TesADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea
THF	Tetrahidrofurano
TMOS	Ortosilicato de tetrametilo ( <i>Tetramethyl orthosilicate</i> )
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
Val	Valina ( <i>Valine</i> )
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
v v <sup>-1</sup>	Porcentaje volumen-volumen
YADH o ADH Y	Alcohol deshidrogenasa de levadura
Ymr226c	Alcohol deshidrogenasa proveniente de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ω-TA	ω-Aminoácido transaminasa





## ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
0.1. BIOCATÁLISIS.....	4
0.1.1. <i>Reseña histórica</i> .....	4
0.1.2. <i>El rol de los procesos enzimáticos. Ventajas e inconvenientes</i> .....	8
0.1.3. <i>Empleo de enzimas aislados frente a células enteras</i> .....	11
0.1.4. <i>Clasificación enzimática</i> .....	12
0.1.5. <i>Enzimas redox u oxidorreductasas</i> .....	13
0.1.5.1. Alcohol deshidrogenasas (ADHs).....	14
0.1.5.2. Oxigenasas.....	19
0.1.5.3. Cofactores en enzimas redox. Estrategias de regeneración.....	23
0.1.6. <i>Transferasas</i> .....	28
0.1.6.1. Transaminasas (TAs).....	28
0.1.6.2. Sistemas de regeneración del cofactor y desplazamiento del equilibrio en reacciones de transaminación.....	32
0.1.7. <i>Hidrolasas</i> .....	35
0.1.7.1. Lipasas.....	36
0.2. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	39
0.2.1. <i>Ventajas e inconvenientes de la inmovilización enzimática</i> .....	40
0.2.2. <i>Tipos de inmovilización enzimática</i> .....	41
0.2.2.1. Adsorción no covalente.....	41
0.2.2.2. Encapsulamiento.....	42
0.2.2.3. Enlace covalente.....	43
0.3. PROCESOS ASIMÉTRICOS CATALIZADOS POR ENZIMAS.....	45
0.3.1. <i>Asimetrización: Compuestos meso y proquirales</i> .....	46
0.3.2. <i>Resolución cinética (KR, “Kinetic Resolution”)</i> .....	47
0.3.3. <i>Resolución cinética dinámica (DKR, “Dynamic Kinetic Resolution”)</i> .....	48
0.3.4. <i>Catálisis concurrente. Procesos tándem y en cascada</i> .....	50
0.3.4.1. Procesos en cascada o dominó.....	51
0.3.4.2. Procesos tándem.....	52

## Índice

<b>Parte I: inmovilización enzimática .....</b>	<b>55</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>61</b>
I.1. POLIFOSFACENOS .....	63
I.1.1. Introducción a los polifosfacenos .....	63
I.1.2. Características de los polifosfacenos .....	66
I.2. POLIFOSFACENOS COMO SOPORTES DE BIOCATALIZADORES .....	68
I.3. INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE ALCOHOL DESHIDROGENASAS .....	70
I.4. INMOVILIZACIÓN DE BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASAS .....	72
I.4. ALCOHOL DESHIDROGENASA DE <i>Rhodococcus ruber</i> DSM 44541 (ADH-A) .....	73
I.5. LIPASA DE TIPO B DE <i>Candida antarctica</i> (CAL-B) .....	75
I.6. FENILACETONA MOOXIGENASA DE <i>Thermobifida fusca</i> (PAMO).....	76
I.7. GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	79
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>83</b>
<b>TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>95</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>113</b>
<b>Parte II: PROCESOS BIOCATALÍTICOS DINÁMICOS Y TÁNDEM.....</b>	<b>117</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>119</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>123</b>
II.1. $\beta$ -HIDROXIÉSTERES $\alpha$ -SUSTITUIDOS: IMPORTANCIA Y SÍNTESIS .....	125
II.2. $\beta$ -AMINOÉSTERES $\alpha$ -SUSTITUIDOS: IMPORTANCIA Y SÍNTESIS .....	127
II.3. 1,2,3-TRIAZOLES .....	129
II.3.1. Importancia de los 1,2,3-triazoles.....	129
II.3.2 Reacción de cicloadición [3+2] dipolar: Química de tipo “click”.....	130
II.4. APLICACIÓN DE ADHs EN PROCESOS DE TIPO DINÁMICO .....	132

*Índice*

II.5. APLICACIÓN DE ADHs EN PROCESOS CONCURRENTES O SECUENCIALES.....	135
II.6. APLICACIÓN DE $\omega$ -TRANSAMINASAS EN PROCESOS DE TIPO DINÁMICO.....	137
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>141</b>
<b>TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>155</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>181</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>187</b>
REFERENCIAS	194



## INTRODUCCIÓN





La catálisis ha sido y seguirá siendo uno de los campos de investigación más activos en Química en los últimos años dado que resulta una vía más racional, económica, energéticamente menos costosa y medioambientalmente más benigna de obtener compuestos de interés. Además, desde un punto de vista teórico, el estudio de estos sistemas catalíticos ofrece la capacidad de cambiar nuestra manera de entender y racionalizar conceptos químicos básicos que nos obligan a revisar las ‘reglas’ que gobiernan el mundo químico. La investigación en esta área se mueve a una gran velocidad, de manera que muchas de las reacciones catalíticas utilizadas hoy en día por los químicos orgánicos sintéticos eran casi impensables sólo quince años atrás.<sup>1</sup> De acuerdo a un comunicado de la compañía química alemana BASF, más del 80% de los productos químicos elaborados en el mundo se obtienen a través de procesos catalíticos. La importancia de los catalizadores heterogéneos u homogéneos se encuentra en continua expansión. Como regla general, un catalizador práctico debe dar lugar a reacciones rápidas, altamente selectivas y susceptibles de ser escaladas. Asimismo, debido a las leyes cada vez más restrictivas con respecto al medioambiente, se tiene cada vez más en cuenta la fuente de dichos catalizadores así como de los reactivos y disolventes que forman parte del proceso químico.

---

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

## 0.1. BIOCATÁLISIS

Dentro de los diferentes tipos de catálisis empleados comúnmente en procesos a gran escala, hay que destacar a la Biocatálisis, disciplina que hace referencia al uso de enzimas aislados o a complejos multienzimáticos como son las células enteras aplicados como catalizadores en reacciones químicas. Los enzimas o biocatalizadores son proteínas que catalizan reacciones químicas aumentando su velocidad sin consumirse en el proceso ni desplazar el equilibrio químico del mismo. Puesto que los biocatalizadores son capaces de operar en condiciones suaves de reacción, los procesos en los que se ven implicados son poco agresivos con el medioambiente y pueden encuadrarse dentro de la denominada ‘Química verde’.<sup>2</sup> Su modo de acción suele ser muy específico, y así tradicionalmente se han clasificado en seis grandes grupos de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan,<sup>3</sup> si bien en los últimos años se ha descubierto que algunos enzimas muestran una inusual ‘promiscuidad catalítica’, que se define como la capacidad de un biocatalizador para llevar a cabo procesos distintos a su función natural.<sup>4</sup>

### 0.1.1. Reseña histórica

La obtención de etanol a partir de glucosa catalizado por microorganismos como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* o la bacteria *Zymomonas mobilis* es conocido por la humanidad desde tiempos inmemoriales, siendo además la fermentación alcohólica uno de los primeros procesos conocidos en el campo de las biotransformaciones. En la antigua Mesopotamia hace 5000 años, ya se aprovechaba el uso de la  $\alpha$ -amilasa en la sacarificación del almidón que se utilizaba en el proceso de la producción de la cerveza. Otros procesos catalizados por enzimas descritos en la antigüedad son, por ejemplo, la producción de queso a partir de leche que se mantenía en el estómago de oveja, o la obtención de vinagre (ácido acético) a partir

---

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

<sup>3</sup> K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6ª Ed., Springer, Berlin, **2011**.

<sup>4</sup> (a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1695-1733; (b) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (c) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4504-4523; (d) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 232-238; (e) R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 195-201; (f) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6032-6040; (g) A. D. Copley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 265-272.

## Introducción

de la oxidación del etanol catalizada por *Acetobacter aceti* o *Gluconobacter suboxydans*.<sup>5</sup> Pese a que este tipo de biotransformaciones han sido aprovechadas por el hombre desde tiempos pretéritos, no es hasta entrado el siglo XIX cuando comienzan a estudiarse desde un punto de vista más riguroso.

En 1811, Kirchoff descubrió que la maltosa se formaba a partir del almidón por la acción del extracto de la cebada.<sup>6</sup> En 1833, Payen y Pesoz aislaron un complejo enzimático de la malta y lo denominaron ‘diastasa’, el cual fue usado dos años más tarde por Berzelius para llevar a cabo la hidrólisis del almidón. Posteriormente, Louis Pasteur llegó a la conclusión de que la fermentación alcohólica estaba catalizada por ‘los fermentos’ contenidos en las células de la levadura y, en un principio, se pensó que solo funcionaban con organismos vivos. En 1876, William Kühne<sup>7</sup> acuñó el término ‘enzima’, que viene del griego ‘en levadura’.

En 1894, Emil Fischer postuló el modelo teórico ‘llave-cerradura’ para intentar comprender de forma esquemática cómo se enlaza el sustrato en el centro activo del enzima, de igual manera que una llave encaja dentro de una cerradura.<sup>8</sup> Pese a no ser del todo exacto, esta representación sentó la base para tratar de entender los mecanismos enzimáticos. No fue hasta finales del siglo XX, en 1985, cuando Zaks y Klibanov descubrieron que algunos enzimas eran capaces de llevar a cabo transformaciones en medios no acuosos.<sup>9</sup> Este hallazgo supuso una auténtica revolución desde un punto de vista sintético, ya que hasta el momento sólo se había trabajado en medios acuosos. Utilizar disolventes orgánicos presenta grandes ventajas, ya que permite entre otras cosas, una mejor solubilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos, una recuperación más sencilla de los productos finales de reacción, y el desarrollo de procesos sintéticos de deshidratación o esterificación frente a otros indeseados de hidrólisis o racemización.

El avance exponencial de diferentes disciplinas como la Química, la Biología, la Bioquímica o la Ingeniería Genética han hecho que las fronteras entre ellas sean cada

---

<sup>5</sup> Revisión: P. Raspor, D. Goranovič, *Critical Rev. Biotechnol.* **2008**, *28*, 101-124.

<sup>6</sup> G. S. C. Kirchoff, *Acad. Imp. Sci., St. Petersburg, Memoires* **1811**, *4*, 27.

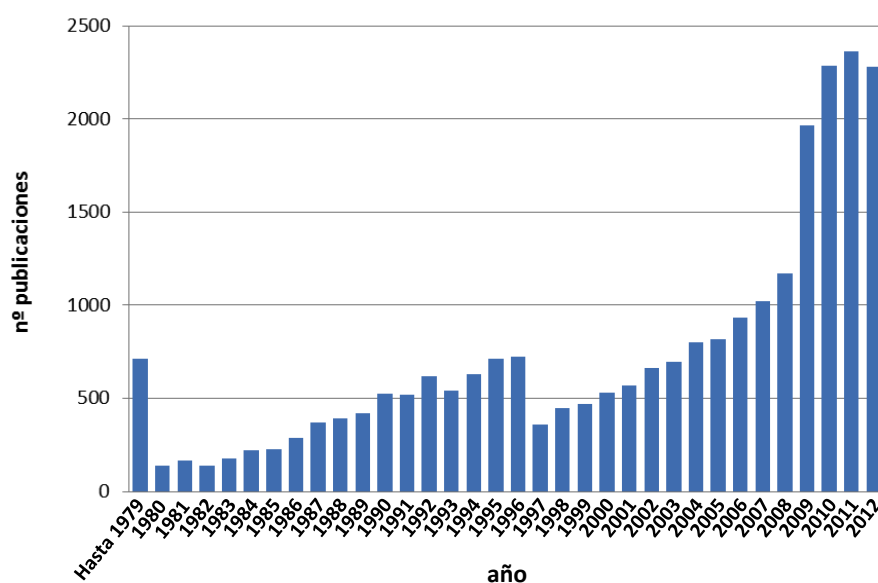
<sup>7</sup> W. Kühne, *Verhandl. Heidelb. Naturhistor. Vereins*, Carl Winter Verlag, Universitätsbuchhandlung Heidelberg, Heidelberg, **1876**.

<sup>8</sup> E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.

<sup>9</sup> A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.

## Introducción

vez más difusas, siendo su estudio y desarrollo de forma multi- e interdisciplinar la línea principal seguida durante los últimos años en el campo de la Biotecnología. Así, la colaboración entre diferentes materias ha propiciado grandes avances en la Biocatálisis,<sup>10</sup> gracias a la aplicación de técnicas de ADN recombinante cuyo desarrollo ha permitido modificar la cadena de aminoácidos de los enzimas, haciendo que los procesos que catalizan sean más eficientes y se puedan minimizar las limitaciones que presentan en relación a su estabilidad y selectividad.<sup>11</sup> Esto ha dado lugar a un gran incremento en el número de publicaciones científicas de primer nivel que hacen referencia a esta disciplina (Figura 0.1).



**Figura 0.1.** Número de publicaciones obtenidas en la base de datos Scifinder (<https://scifinder.cas.org/>) al introducir en la búsqueda el término 'Biocatálisis'

Una de las técnicas más empleadas para modificar un biocatalizador es la evolución dirigida (Esquema 0.1),<sup>12</sup> la cual consiste en generar de forma aleatoria un conjunto extenso (librería) de enzimas modificados en uno o varios residuos de

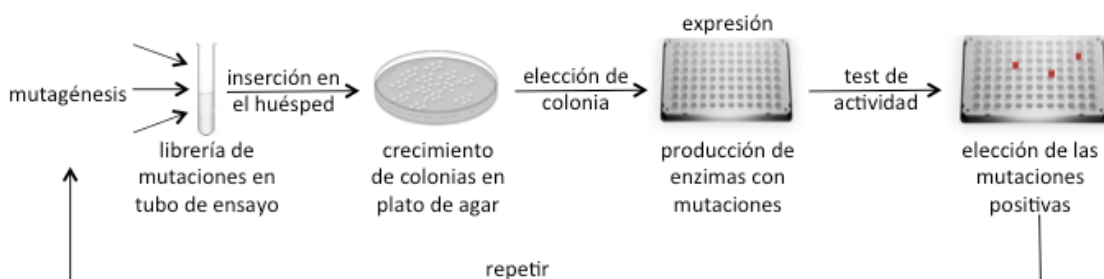
<sup>10</sup> U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185-194.

<sup>11</sup> Algunas revisiones recientes: (a) T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 215-220; (b) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, 24, 150-156; (c) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *ACS Catal.* **2011**, 1, 1017-1021; (d) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2191-2215; (e) S. Lutz, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, 21, 734-743; (f) C. Jäckl, D. Hilvert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, 21, 753-759.

<sup>12</sup> (a) M. T. Reetz, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 119-190; (b) M. J. Dougherty, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, 20, 486-491.

## Introducción

aminoácidos (mutantes) a partir de la proteína natural. Estos mutantes se clonan y expresan en una determinada célula huésped utilizando técnicas estándar de Biología Molecular, realizando a continuación el test enzimático sobre un sustrato modelo. Aquel biocatalizador que haya mostrado mejores propiedades, vuelve a ser empleado para realizar un nuevo ciclo de mutagénesis, expresión y ensayo, el cual se repite las veces que sean necesarias hasta obtener un biocatalizador con las actividades/selectividades requeridas para el proceso en cuestión. A partir de esta técnica se han generado otras variantes más selectivas, como la mutagénesis por saturación iterativa (“*iterative saturation mutagenesis*”, ISM), la cual se centra en realizar mutaciones tan sólo en los aminoácidos que se encuentran más cercanos al centro activo del enzima o que se creen que son los esenciales para modificar la propiedad deseada.<sup>13</sup>



**Esquema 0.1.** Descripción del procedimiento de mutagénesis a través de la evolución dirigida

Además de la evolución dirigida, existen otras técnicas de diseño más racional. Estas requieren de un conocimiento más profundo tanto de la estructura tridimensional del enzima como del mecanismo de la transformación, por lo que generalmente van acompañados de estudios informáticos de modelización molecular. No obstante, pese a su complejidad, se ha llegado incluso a cambiar la estereopreferencia de un biocatalizador con una simple mutación en la secuencia de los aminoácidos.<sup>14</sup> También se ha desarrollado recientemente otra técnica en la cual se hacen varias mutaciones simultáneas sobre diversos grupos de aminoácidos del centro activo del enzima que se encuentran próximos entre sí espacialmente para optimizar alguna propiedad, el llamado

<sup>13</sup> M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548.

<sup>14</sup> (a) M. Svedendahl, C. Branneby, L. Lindberg, P. Berglund, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 976-980; (b) K. Engström, J. Nyhlén, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7038-7042.

test de saturación en el centro activo (“*combinatorial active-site saturation test*”, CAST).<sup>15</sup>

### 0.1.2. El rol de los procesos enzimáticos. Ventajas e inconvenientes

El gran interés en obtener moléculas orgánicas enantiopuras ha generado el desarrollo de nuevas tecnologías y procedimientos sintéticos que persiguen este objetivo. De entre ellas, los procesos enzimáticos han sido ampliamente desarrollados en los últimos años, mejorándose la metodología desde un punto de vista tanto conceptual como práctico. Esta es una de las razones principales por las cuales el uso de enzimas se encuentra en auge en el mundo académico y en la industria. Como ya se ha resaltado, los recientes avances en los campos de la Biología Molecular y la Bioquímica han aumentado las aplicaciones reales de las biotransformaciones incluso a gran escala, adquiriendo cada vez un papel más importante en sectores como el farmacéutico, agroalimentario o cosmético, entre otros.<sup>16</sup> En este sentido, los enzimas presentan ventajas fundamentales sobre otro tipo de catalizadores.

Las unidades estructurales que forman las proteínas (los aminoácidos), se enlazan generando polipéptidos con una estructura terciaria y cuaternaria definida, creando una disposición tridimensional en su interior denominada *centro activo* en el cual se encuentran los aminoácidos clave que se verán involucrados en la reacción y selectividad enzimática. En la naturaleza, dichas unidades (excepto la glicina) pertenecen exclusivamente a la serie L (configuración *S*). De hecho, siempre se ha destacado este motivo como una de las principales desventajas que presenta la utilización de los enzimas. Sin embargo, aunque los biocatalizadores constituidos por unidades de D-aminoácidos no existen en la naturaleza, se ha demostrado lo sorprendentemente común que es encontrar enzimas que sean enantiocomplementarios. Estas proteínas poseen sitios activos que son *funcionalmente* imágenes especulares entre sí, catalizando así la misma reacción pero dando lugar al otro posible enantiómero, lo

---

<sup>15</sup> M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192-4196.

<sup>16</sup> (a) B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187-193; (b) S. Sanchez, A. L. Demain, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 224-230; (c) R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724; (d) S. Panke, M. Held, M. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 272-279; (e) A. Zaks, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 130-136.

que en la mayoría de los casos ha permitido soslayar la limitación mencionada.<sup>17</sup> Además de ser unos catalizadores capaces de trabajar en condiciones suaves de reacción (medios acuosos, bajas temperaturas y pHs entorno al neutro), llevan a cabo las transformaciones con un alto grado de eficiencia, siendo su gran selectividad<sup>3,18</sup> una de las principales razones que les hace ser, sino un sustituto, un gran complemento a los catalizadores más tradicionales. Los enzimas pueden mostrar tres tipos de selectividad:

- Quimioselectividad: Discriminación selectiva entre dos grupos funcionales de similar reactividad en una molécula frente a un sustrato dado, evitándose así el uso de grupos protectores.
- Regioselectividad: Distinción entre dos o más grupos funcionales idénticos y transformación de uno de ellos en función de su posición en una molécula.
- Estereoselectividad: Transformación preferencial de un estereoisómero frente a otro(s). En el caso de que el enzima discrimina un enantiómero de su imagen especular en una mezcla racémica, se denomina enantioselectividad. Si la distinción se produce entre varios diastereoisómeros, se dice que el proceso es diastereoselectivo. También se puede romper la simetría en un compuesto proquiral generando tan solo uno de los enantiómeros del producto final a través de un proceso de asimetrización.

La importancia de la quiralidad en la Química y en la industria farmacéutica no puede pasarse por alto, ya que una pareja de enantiómeros, pese a poseer las mismas propiedades físico-químicas (tan solo difieren en el signo del ángulo de rotación específica frente a la luz polarizada), cuando se introducen en un entorno quiral (como son los organismos vivos), pueden desarrollar una respuesta biológica muy diferente (Figura 0.2).<sup>19</sup> Como ejemplo, mientras que el enantiómero *S* de la asparagina posee un sabor amargo, el de su imagen especular es dulce. La penicilamina es un fármaco con actividad antiartrítica en su forma *S*, mientras que el enantiómero *R* es tóxico para el ser humano (actúa como inhibidor de la piridoxina). Otro ejemplo es la quetamina, sintetizado por primera vez en 1962, siendo su enantiómero *S* cuatro veces más potente

---

<sup>17</sup> P. F. Mugford, U. Wagner, Y. Jiang, K. Faber, R. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8782-8793.

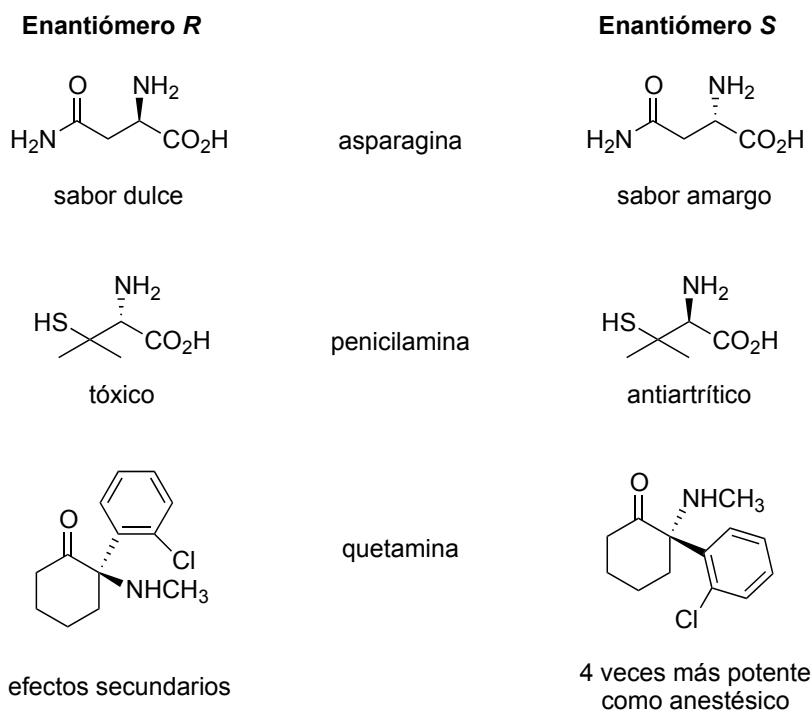
<sup>18</sup> (a) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**; (b) *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Eds. W.-D. Fessner, T. Anthonsen, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; (c) *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.

<sup>19</sup> E. Thall, *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, 481-484.



## Introducción

como anestésico que el de configuración *R*. Además, los efectos secundarios (delirios y alucinaciones) producidos por el enantiómero *S* son significativamente menores que los ocasionados tanto por el racemato como por el enantiómero *R*.



**Figura 0.2.** Diferente respuesta biológica entre dos enantiómeros en una mezcla racémica

A pesar del gran desarrollo efectuado en el campo de la Biocatálisis durante los últimos años, aún existen algunos inconvenientes que caben mencionar. La especificidad de sustrato es en muchas ocasiones un problema ya que no todos los enzimas son capaces de aceptar un gran número de compuestos. Otro aspecto negativo es la necesidad de utilizar un cosustrato o cofactor (por ejemplo, con las oxidorreductasas), lo que aumenta el coste del proceso. La baja estabilidad del enzima en condiciones más drásticas como puedan ser temperaturas elevadas, pHs extremos o presencia de disolventes orgánicos, así como problemas de inhibición por concentraciones altas tanto de sustrato como de producto son otros factores que han de tenerse en consideración. Asimismo, en algunos casos los biocatalizadores son caros y puede haber problemas de accesibilidad comercial. Sin embargo, estos problemas pueden soslayarse gracias a técnicas como la inmovilización enzimática, sistemas eficientes de regeneración del cofactor y el desarrollo de nuevos enzimas más estables

## *Introducción*

gracias a la ingeniería genética y a la búsqueda de microorganismos habituados a sobrevivir en condiciones extremas (extremófilos).

### **0.1.3. Empleo de enzimas aislados frente a células enteras**

Los sistemas utilizados en transformaciones biocatalizadas generalmente hacen uso de células enteras o enzimas aislados tras un proceso de purificación.<sup>3</sup> La elección de uno u otro tipo de biocatalizador está condicionada por la reacción que se pretende llevar a cabo, el tipo de cofactor necesario (así como el sistema de regeneración de este), además de la concentración de sustrato y el volumen a la que se requiera realizar la transformación.

El uso de células enteras, tanto en fase de crecimiento (“*growing cells*”) como en reposo (“*resting cells*”), posee como ventajas que es barato, las células pueden ser fácilmente eliminadas del medio de reacción mediante un proceso simple de filtración o centrifugación, pueden trabajar en medios acuosos, y debido a que poseen todos los cofactores necesarios en su metabolismo, no es necesaria la adición de ningún cofactor externo. Sin embargo, la presencia de otros tipos de enzimas en las células puede conllevar reacciones secundarias, tanto en los sustratos como en los productos obtenidos, y además ambos pueden actuar como inhibidores a concentraciones moderadas con lo que se suele trabajar con grandes volúmenes de reacción a diluciones altas. Las reacciones se ven ralentizadas debido a problemas de difusión del sustrato entre el interior y el exterior de la célula, y además la selectividad puede verse drásticamente afectada debido a la acción de otros biocatalizadores con estereopreferencia baja u opuesta.

Gran parte de estos problemas pueden evitarse con el uso de enzimas aislados, aunque estos también tienen la desventaja de que suelen ser caros, debido al coste del aislamiento y purificación de la proteína, y en algunos casos además debido a la necesidad de adicionar un cofactor externo junto con su sistema de regeneración. Actualmente, numerosos enzimas aislados son comercialmente accesibles y pueden

## Introducción

llevar a cabo transformaciones limpias y a mayores concentraciones de sustrato que las catalizadas por las células enteras.

Una tercera opción es la utilización de enzimas sobreexpresados. Esta metodología se basa en la inserción de un plásmido (el cual contiene la información genética del biocatalizador que queremos sobreexpresar), en un organismo huésped modificado genéticamente (por ejemplo, *Escherichia coli*). Una vez insertado, el enzima será expresado dentro del organismo y para emplearlo, además del uso como células en crecimiento o en reposo, se suele utilizar el sobrenadante una vez rotas las paredes celulares mediante, por ejemplo, ultrasonificación (previo centrifugado para eliminar los restos insolubles de las células). También se usan preparaciones liofilizadas por congelación y posterior eliminación del agua, obteniéndose un sólido que contiene el enzima y que puede almacenarse durante largos periodos de tiempo. El uso de enzimas sobreexpresados es una técnica que agrupa las ventajas de los dos métodos descritos anteriormente ya que es más barata que la utilización de biocatalizadores purificados, y al mismo tiempo minimiza en gran medida las posibles reacciones secundarias que pueden ocurrir en las células enteras además de los problemas de difusión puesto que las paredes celulares se encuentran parcialmente destruidas por el proceso de liofilización.

### 0.1.4. Clasificación enzimática

A lo largo de la década de los 50s el descubrimiento e identificación de nuevos biocatalizadores fue rápidamente en aumento, quedando en evidencia la necesidad de un sistema para la clasificación de los mismos. Consecuentemente, la Unión Internacional de Bioquímicos (IUB) en colaboración con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) decidieron crear en 1956 la Comisión Internacional de Enzimas, siendo su tarea la de ‘considerar la clasificación y nomenclatura de enzimas y coenzimas, sus unidades de actividad y los métodos estándar de análisis, junto con los símbolos usados en la descripción en la cinética enzimática’.<sup>20</sup>

---

<sup>20</sup> International Union of Biochemistry and Molecular Biology, *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, San Diego, 1992. [www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme).

## Introducción

Como consecuencia de ello, los enzimas se agrupan en seis grandes familias (Tabla 0.1) en función de la reacción que catalizan, y son descritos por un código numérico de cuatro dígitos (EC x.x.x.x) los cuales indican: (i) el tipo de reacción, (ii) el tipo de sustrato o molécula transferida, (iii) la naturaleza del cosustrato, y (iv) el número individual del enzima.

**Tabla 0.1.** Clasificación enzimática en función del tipo de reacción que catalizan

tipo de enzima	número EC	tipo de reacción (ejemplos)
oxidorreductasas	1	oxidación-reducción: oxidación de C-H, C=C, C-N y C-O; reducción de C=O y C=C, aminación reductiva de C=O
transferasas	2	transferencia de grupos funcionales: acilo, amino, glucosilo, metilo y fosforilo
hidrolasas	3	hidrólisis y formación de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilos, anhídridos y glucósidos
liasas	4	adición y eliminación de pequeñas moléculas a dobles enlaces como C=C, C=N y C=O
isomerasas	5	isomerizaciones como racemización, epimerización y reagrupamientos intramoleculares
ligasas	6	formación y ruptura de enlaces tipo C-O, C-S, C-N y C-C

A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha realizado un amplio estudio y desarrollo en la obtención de compuestos enantioenriquecidos utilizando para ello diversos biocatalizadores. Por ello, se describirán de manera general las características de los enzimas que han sido utilizados en esta Memoria.

### 0.1.5. Enzimas redox u oxidorreductasas

Los biocatalizadores empleados en reacciones de tipo redox (aquellos en los que se transfieren electrones de una sustancia reductora a otra oxidante que los acepta), se pueden clasificar en tres grandes grupos: deshidrogenasas, oxigenasas y oxidasas.<sup>21</sup> El

<sup>21</sup> (a) D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111-4140; (b) M. Hall, A. S. Bommaris, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110; (c) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmey, B. Bühler, *Green Chem.* **2011**, *13*, 226-265; (d) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285-2313; (e) *Modern Biooxidation. Enzymes, Reactions and Applications*, Eds. R. D. Schmid, V. B. Urlacher, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.

primer grupo ha sido ampliamente utilizado para llevar a cabo la reducción de grupos carbonilo y dobles enlaces carbono-carbono. Dependiendo del patrón de sustitución en el sustrato, estas reacciones ofrecen la posibilidad de asimetrizar sustratos proquirales pudiéndose obtener los productos finales enantiopuros con un rendimiento máximo teórico del 100%, por lo que resultan de especial interés.

Los enzimas que catalizan la incorporación directa del oxígeno molecular en una molécula orgánica reciben el nombre de oxigenasas. La oxigenación enzimática es un proceso particularmente interesante, ya que la oxifuncionalización directa de sustratos orgánicos sigue siendo una tarea complicada en síntesis químicas convencionales, especialmente cuando los procesos deben ser regio- y/o estereoespecíficos. En cuanto a las oxidasas, responsables de procesos de transferencia electrónica, desempeñan todavía un papel minoritario aplicadas a las biotransformaciones de sustratos no naturales.

Entre las ventajas más destacables de emplear estos biocatalizadores frente a otros métodos para realizar procesos redox, están la alta estereo- y regioselectividad que presentan en condiciones suaves de reacción en medio acuoso usando oxidantes muy adecuados como el oxígeno, o procesos de transferencia de hidrógeno utilizando, por ejemplo, 2-propanol o acetona. Entre las desventajas más claras están la baja disponibilidad en casas comerciales de estos enzimas, la frecuente baja estabilidad frente a disolventes orgánicos, lo que conlleva muchas veces tener que trabajar a concentraciones muy bajas de sustrato, y la necesidad de utilizar un cofactor, normalmente muy caro, para poder llevar a cabo el proceso redox. Entre los diferentes cofactores existentes hay autores que hacen una distinción entre aquellos que no se encuentran fuertemente unidos a la estructura tridimensional del enzima (coenzimas) y aquellos que sí lo están (grupos prostéticos).

### ***0.1.5.1. Alcohol deshidrogenasas (ADHs)***

Estos enzimas, también denominados carbonil reductasas o cetoreductasas<sup>22</sup> llevan a cabo la reducción de grupos carbonilo a los correspondientes alcoholes debido

---

<sup>22</sup> Recopilaciones recientes: (a) F. Hollmann, K. Bühler, B. Bühler, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1325-1438; (b) M. M. Musa, R. S. Phillips, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1311-1323; (c) G. W. Huisman, J. Liang, A.

## Introducción

a la cesión de un hidruro a una de las caras del enlace C=O proquiral. Asimismo, son capaces de realizar la oxidación de alcoholes primarios o secundarios para formar los correspondientes derivados carbonílicos. Las ADHs que comúnmente se emplean con fines sintéticos en procesos redox y se hallan disponibles comercialmente pertenecen principalmente a dos tipos de familias: las ADHs de cadena media (“*medium chain ADHs*”, Figura 0.3a) y las ADHs de cadena corta (“*short chain ADHs*”, Figura 0.3c). En ambos casos es necesaria la presencia de un cofactor pirimidínico [NAD(P)H, en la forma reducida, o NAD(P)<sup>+</sup>, en la forma oxidada] para llevar a cabo la transferencia del hidruro. Las primeras poseen en el centro activo un ión Zn<sup>2+</sup> tetracoordinado por dos residuos de cisteína y uno de histidina junto con una molécula de agua (Figura 0.3b). Esta última es sustituida por el ión alcóxido resultante de la reducción del grupo carbonilo o facilita la ruptura del enlace O-H del alcohol cuando es oxidado.<sup>23</sup> Normalmente, la incubación de la proteína con agentes quelantes no es capaz de inactivar al biocatalizador por extracción del átomo de Zn<sup>2+</sup> presente en el sitio activo, lo que evidencia la fuerza de su unión con los aminoácidos presentes en la proteína.<sup>24</sup>

Las segundas poseen un mecanismo de acción en el cual no se encuentran implicados metales, aunque suelen estar presentes iones Mg<sup>2+</sup> que estabilizan la estructura cuaternaria del enzima y le confieren de una mayor resistencia frente a las altas temperaturas y a los disolventes orgánicos. En ocasiones, estos iones se encuentran coordinados a los extremos terminales carboxilato de dos homodímeros de la proteína por lo que, por ejemplo, habría dos iones Mg<sup>2+</sup> por tetrámero. Se ha demostrado que la eliminación de estos cationes mediante el uso de agentes quelantes da lugar a la inactivación del biocatalizador aunque la estructura cuaternaria no se vea drásticamente modificada.<sup>25</sup> Las ADHs de cadena corta, en lugar de emplear Zn<sup>2+</sup> para activar el grupo

---

Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 122-129; (d) S. Buchholz, H. Gröger, en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industry*, Ed. R. N. Patel, CRC Press, Boca Raton, **2007**, pp. 757-790; (e) S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260-1266; (f) J. C. Moore, D. J. Pollard, B. Kosjek, P. N. Devine, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1412-1419; (g) K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237-248; (h) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125-142; (i) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120-126.

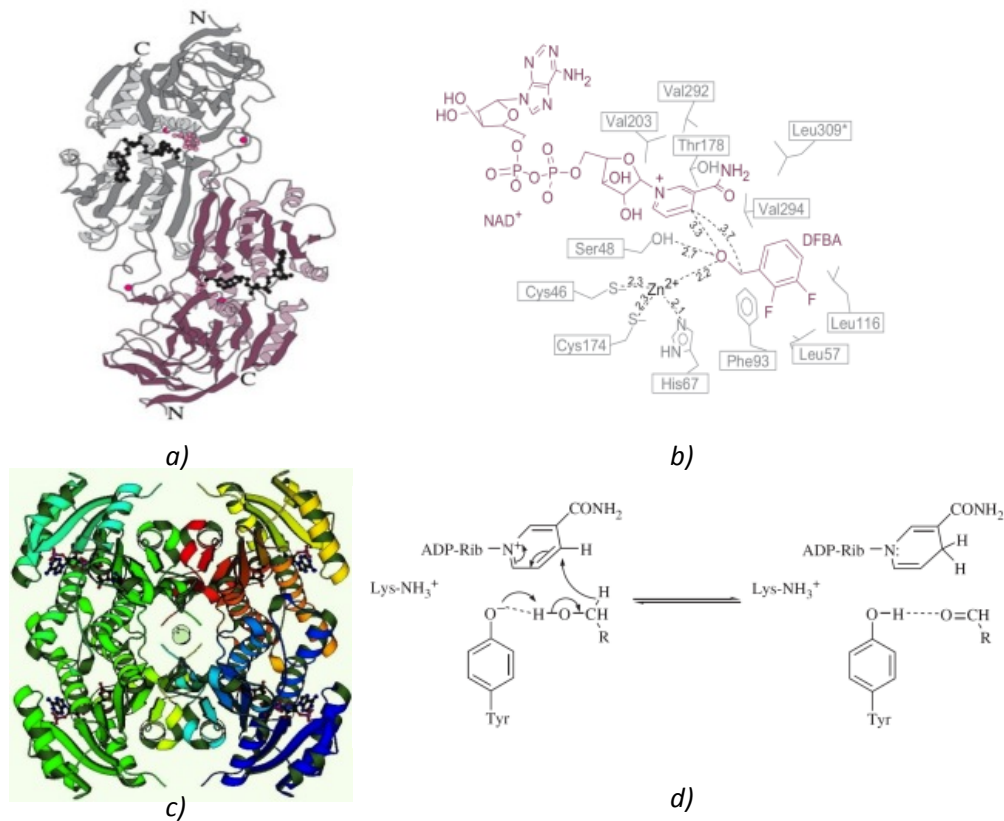
<sup>23</sup> *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Eds. P. A. Frey, A. D. Hegeman, Oxford University Press, Nueva York, **2007**.

<sup>24</sup> (a) B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 55-62; (b) O. Danielsson, S. Atrian, T. Luque, L. Hjelmqvist, R. González-Duarte, H. Jörnvall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4980-4984.

<sup>25</sup> N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813.

## Introducción

carbonilo y favorecer la transferencia de hidrógeno, utilizan un residuo de tirosina que debe encontrarse en su forma ionizada para abstraer el protón del alcohol cuando este es oxidado, o en su forma protonada para ceder el protón al ion alcóxido y así generar el enlace O-H en el proceso de reducción (Figura 0.3d).

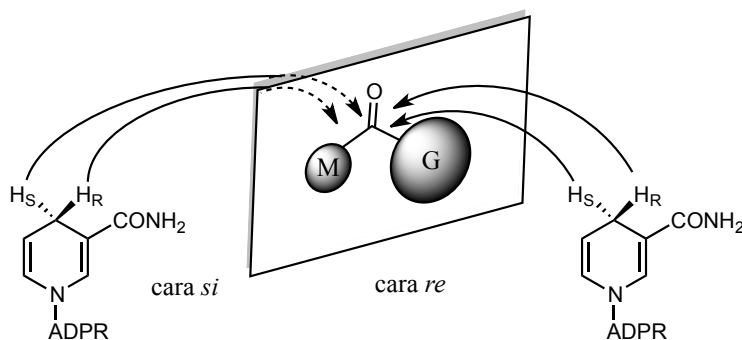


**Figura 0.3.** a) Representación de una ADH de cadena media (ADH de hígado de caballo): en negro se destaca el cofactor, en rosa el sustrato y en magenta los átomos de  $Zn^{2+}$ . b) Representación del sitio activo de dicha ADH, donde puede apreciarse la ubicación del cofactor, del  $Zn^{2+}$  y su esfera de coordinación, además del sustrato (2',3'-difluorofenilmetanol). c) Representación de una ADH de cadena corta (ADH de *Lactobacillus brevis*, LBADH). Puede apreciarse el homotetrámero con los dos iones  $Mg^{2+}$  en la zona central (gris) y las cuatro moléculas de cofactor (negro). d) Rol de la tirosina en el mecanismo de reacción de una ADH de cadena corta. Tomado de la referencia 23 (Figuras a, b y d) y del Protein Data Bank (PDB), estructura INXQ, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=INXQ> (Figura c).

Una de las características más importantes de las ADHs es su gran selectividad catalizando la cesión del hidruro por una de las estereocaras de la cetona proquiral cuando es reducida, o de abstraerlo exclusivamente a uno de los dos enantiómeros del alcohol racémico secundario cuando es oxidado, siendo biocatalizadores muy útiles

## Introducción

aplicados a la obtención de alcoholes enantiopuros. La estereoselectividad de estas enzimas con respecto a la entrada del hidruro por una de las caras de la cetona suele estar de acuerdo con lo establecido por el Prof. Prelog en 1964.<sup>26</sup> Según dicho comportamiento estereoquímico las ADHs suelen seguir la llamada ‘regla de Prelog’, basada en un principio empírico en el que se estableció que las reducciones microbianas usando células de *Curvularia falcata*<sup>26</sup> transferían el hidruro por la cara *re* de la cetona proquiral dando lugar preferentemente al alcohol de configuración *S* (Esquema 0.2).<sup>27</sup>



**Esquema 0.2.** Transferencia estereoselectiva del hidruro del NAD(P)H al carbono carbonílico de una cetona (M: sustituyente de menor tamaño; G: sustituyente de mayor tamaño)

En base a esta definición comúnmente aceptada y aplicada en el campo de la Biocatálisis, cuando la estereoquímica del alcohol resultante en una bioconversión es de configuración *S*, se dice que la ADH sigue la ‘regla de Prelog’, siendo la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH)<sup>28</sup> o la alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus ruber* (ADH-A)<sup>29</sup> ejemplos representativos de enzimas con este tipo de selectividad. En cambio, cuando la configuración absoluta en el carbono del alcohol obtenido es *R*, la transformación es de tipo ‘anti-Prelog’, como se da en el caso de la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir* (LK-ADH).<sup>30</sup> En este sentido, hay que señalar que existen en la bibliografía muchos más ejemplos de ADHs con selectividad ‘Prelog’. Por ello, el descubrimiento de nuevas alcohol deshidrogenasas con actividad ‘anti-Prelog’ conlleva un gran interés. En los últimos años se están descubriendo nuevas enzimas realizando investigaciones en diferentes organismos que puedan contenerlas, o

<sup>26</sup> V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130.

<sup>27</sup> El alcohol obtenido será de configuración *S* siempre que el grupo de mayor tamaño unido a la cetona presente también la prioridad siguiendo las reglas de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog (CIP).

<sup>28</sup> T. Fukui, M. H. Zong, T. Kawamoto, A. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 209-213.

<sup>29</sup> K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, *23*, 2402-2404.

<sup>30</sup> A. Weckbecker, W. Hummel, *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 380-389.



## Introducción

a través de la obtención de nuevas ADHs con mutaciones a partir de los enzimas naturales.

Un ejemplo representativo a este respecto es el desarrollado por Zhu y colaboradores,<sup>31</sup> los cuales basándose en estudios de modelización molecular consiguieron, con la metodología por saturación iterativa, no solo aumentar la actividad de una alcohol deshidrogenasa, sino invertir su estereopreferencia. Así, se observó para la carbonil reductasa de *Sporobolomyces salmonicolor* (SSCR) que al cambiar el residuo de glutamina 245 por una histidina, una prolina o una leucina (Q245H, Q245P o Q245L), se obtuvo un cambio en la estereopreferencia de la biorreducción de varios derivados de acetofenona sustituidas en *para* pasando de ser *R*-selectiva a *S*. Otro ejemplo fue reportado por el grupo de Phillips,<sup>32</sup> en el cual partiendo de la alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TesADH), y realizando una mutación en el centro activo del enzima cambiando un residuo de isoleucina por una alanina (I86A), se consiguió aumentar el tamaño del hueco pequeño presente en el centro activo del biocatalizador, con lo que esta nueva ADH no sólo fue capaz de catalizar la formación de los alcoholes con una preferencia opuesta, sino que también pudo reducir cetonas con grupos voluminosos a diferencia del enzima natural.

Un factor crucial a tener en cuenta a la hora de planificar una reacción catalizada es el medio de reacción. A pesar de que el medio natural de las oxidorreductasas es el agua, el uso de estas en disolventes no convencionales como pueden ser los disolventes orgánicos, los líquidos iónicos (LIs)<sup>33</sup> o los fluidos supercríticos<sup>34</sup> es un campo estudiado y que puede aportar ciertas ventajas a la hora de llevar a cabo la biorreducción. Así, se han mostrado ejemplos donde alcohol deshidrogenasas pueden trabajar en presencia de altos porcentajes de disolventes orgánicos,<sup>35</sup> generando sistemas bifásicos que facilitan la solubilidad de los sustratos hidrofóbicos y evitan problemas de inhibición del enzima causados por altas concentraciones de sustrato o producto. También se ha descrito que la adición de disolventes orgánicos o líquidos

---

<sup>31</sup> D. Zhu, Y. Yang, S. Majkiewicz, T. H.-Y. Pan, K. Kantardjieff, L. Hua, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 525-528.

<sup>32</sup> M. M. Musa, N. Lott, M. Laivenieks, L. Watanabe, C. Vieille, R. S. Phillips, *ChemCatChem.* **2009**, *1*, 89-93.

<sup>33</sup> M. Eckstein, M. V. Filho, A. Liese, U. Kragl, *Chem. Commun.* **2004**, 1084-1085.

<sup>34</sup> T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, *Chem. Commun.* **2000**, 1367-1368.

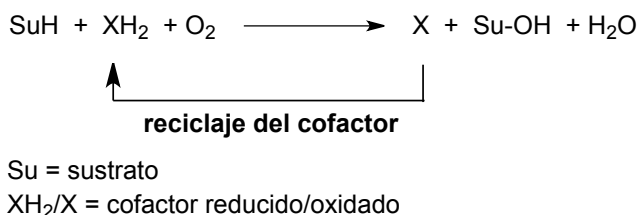
<sup>35</sup> P. Fernandes, J. M. S. Cabral, *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, Eds. G. Carrea, S. Riva, Wiley-VCH, **2008**, pp. 191-210.

## Introducción

iónicos puede llegar a mejorar la estabilidad, la actividad e incluso la estereoselectividad del biocatalizador. La alcohol deshidrogenasa ADH-A es capaz de trabajar en presencia de un 90% (v v<sup>-1</sup>) de hexano,<sup>36</sup> e incluso se puede llevar a cabo la biorreducción usando el mismo sustrato como disolvente<sup>37</sup> sin necesidad de adicionar ningún otro utilizando la ADH de *Candida parapsilosis*.

### 0.1.5.2. Oxigenasas

Dentro de este grupo de enzimas, aquellos que activan el oxígeno en condiciones reductoras para su inserción en compuestos orgánicos pueden clasificarse en dioxigenasas y monooxigenasas, según incorporen al sustrato los dos o sólo uno de los átomos del oxígeno. En el caso de las monooxigenasas, tras la incorporación de un átomo de oxígeno, el otro se convierte en agua en presencia de un donador de protones, que será desprendida como subproducto del proceso oxidativo tal como se observa en el Esquema 0.3.<sup>38</sup>



**Esquema 0.3.** Representación general de una reacción catalizada por una monooxigenasa

Las monooxigenasas son capaces de catalizar una amplia variedad de procesos de oxidación, desde reacciones de hidroxilación de alcanos y epoxidación de alquenos, hasta la oxidación de heteroátomos o la reacción de Baeyer-Villiger. Así, entre los diferentes tipos destacan las monooxigenasas P450, las no dependientes del grupo hemo, las dependientes de Cu y las dependientes de flavina. En un principio se creyó

<sup>36</sup> G. de Gonzalo, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2163-2166.

<sup>37</sup> A. Jakoblinert, R. Mladenov, A. Paul, F. Sibilla, U. Schwaneberg, M. B. Ansorge-Schumacher, P. Domínguez de María, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12230-12232.

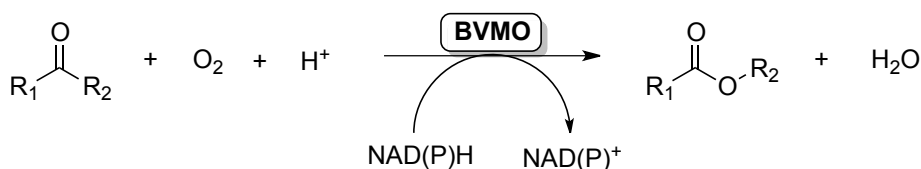
<sup>38</sup> (a) V. B. Urlacher, R. D. Schmid, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 156-161; (b) J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, B. Witholt, *Trends. Biotechnol.* **2003**, *21*, 170-177; (c) S. G. Burton, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 543-549.

## Introducción

que todos estos enzimas necesitaban un cofactor para poder actuar, aunque en años recientes se han identificado nuevos tipos de monooxigenasas que no lo requieren.<sup>39</sup>

Aunque los mecanismos de reacción de las distintas monooxigenasas existentes difieren enormemente dependiendo del subtipo, su modo de activación es el mismo. Así, para activar el oxígeno molecular, las monooxigenasas utilizan como agente reductor un grupo prostético unido al biocatalizador que puede ser, bien un metal de transición (hierro o cobre), o bien un cofactor orgánico (pterinas o flavinas), que a su vez es generalmente regenerado por un cofactor de nicotinamida. Las reacciones de hidroxilación o epoxidación están catalizadas por monooxigenasas dependientes de un metal como las citocromo P450,<sup>40</sup> mientras que las monooxigenasas flavoproteínicas en las que el grupo prostético es una flavina (flavín adenín dinucleótido, FAD, o flavín mononucleótido, FMN), intervienen como catalizadores en oxidaciones de heteroátomos y reacciones de Baeyer-Villiger.<sup>41</sup>

Las Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMOs) son un tipo de monooxigenasas flavoproteínicas capaces de catalizar, entre otras, la oxidación de Baeyer-Villiger de forma regio- y/o enantioselectiva en condiciones suaves de reacción empleando oxígeno como oxidante inocuo, como se muestra en el Esquema 0.4.



**Esquema 0.4.** Reacción de Baeyer-Villiger catalizada por BVMOs

Las BVMOs son sintetizadas por un gran número de microorganismos, fundamentalmente bacterias y hongos. La actividad *in vivo* de estos enzimas consiste en la degradación de hidrocarburos alicíclicos originando productos oxidados inocuos, aunque también participan en la síntesis de compuestos de interés biológico. *In vitro*

<sup>39</sup> S. Fetzner, R. A. Steiner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 791-804.

<sup>40</sup> (a) M. K. Julsing, S. Cornelissen, B. Bühler, A. Schmid, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 177-186;

(b) J. R. Cashman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 599-604; (c) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, Ed. P. R. Ortiz de Montellano, Kluwer Academic/Plenum, Nueva York, **2005**.

<sup>41</sup> W. J. H. van Berkel, N. M. Kamerbeek, M. W. Fraaije, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 670-689.

han demostrado ser biocatalizadores tremendamente versátiles, ya que no sólo catalizan de forma selectiva la oxidación nucleofílica de grupos carbonilo y de compuestos de boro, sino también la epoxidación de ciertos alquenos, y la oxidación electrofílica de diferentes heteroátomos tales como azufre, nitrógeno, selenio y fósforo.<sup>42</sup>

El primer indicio de la existencia natural de Baeyer-Villiger monooxigenasas data de 1948 y consistió en la biotransformación (vía oxidación de Baeyer-Villiger) de esteroides (progesterona y colesterol) por diversos hongos.<sup>43</sup> En 1965, la primera BVMO fue purificada de una *Pseudomonas* sp.<sup>44</sup> En las últimas décadas otras muchas BVMOs han sido purificadas y caracterizadas, revelando la existencia de distintas clases, que pueden ser básicamente englobadas dentro de los tipos denominados I y II.<sup>45</sup>

Mientras que para las de tipo II no se conoce una secuencia característica, la mayoría de las BVMOs conocidas pertenecen al tipo I. Estas enzimas están compuestas por un sólo polipéptido de unos 500 aminoácidos, contienen FAD como grupo prostético y usan casi siempre NADPH como donador de electrones.<sup>42i</sup> Estas monooxigenasas poseen una secuencia común característica (GXGXXG), localizada cerca del extremo *N*-terminal, que representa el sitio de unión al FAD. Como ejemplos más representativos podemos mencionar la ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) de

---

<sup>42</sup> (a) M. D. Mihovilovic, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1439-1485; (b) K. Balke, M. Kadow, H. Mallin, S. Sass, U. T. Bornscheuer, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6249-6265; (c) H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165-4222; (d) G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208-2231; (e) V. Alphand, R. Wohlgemuth, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1928-1965; (f) M. M. Kayser, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 947-974; (g) D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, en *Future Directions in Biocatalysis*, Ed. T. Matsuda, Elsevier, Dordrecht, **2007**, pp. 107-127; (h) M. D. Mihovilovic, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1265-1287; (i) N. M. Kamerbeek, D. B. Janssen, W. J. H. van Berkel, M. W. Fraaije, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 667-678.

<sup>43</sup> G. E. Turfitt, *Biochem. J.* **1948**, *42*, 376-383.

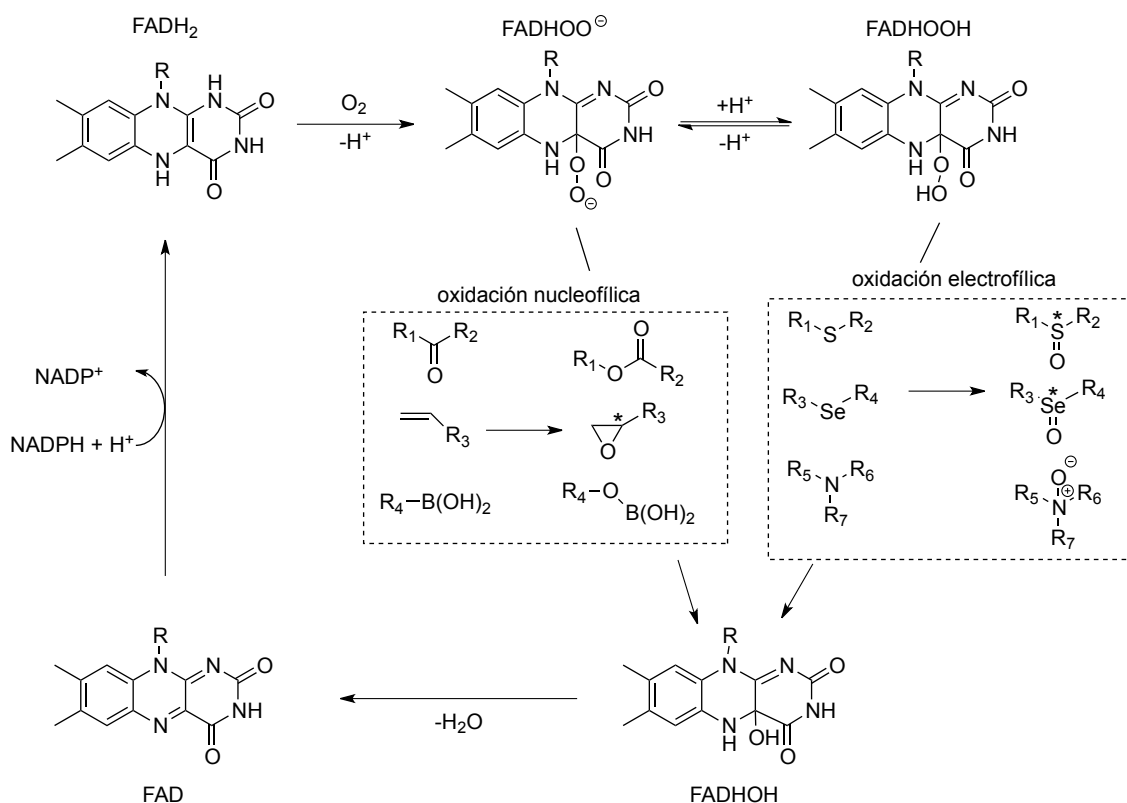
<sup>44</sup> H. E. Conrad, R. Dubus, M. J. Namtvedt, I. C. Gunsalus, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 495-503.

<sup>45</sup> Para algún ejemplo reciente de nuevas BVMOs, ver: (a) A. Riebel, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *88*, 20-25; (b) A. Willetts, I. Joint, J. A. Gilbert, W. Trimble, M. Muehling, *Microb. Biotechnol.* **2012**, *5*, 549-559; (c) A. Riebel, H. M. Dudek, G. de Gonzalo, P. Stepniak, L. Rychlewski, M. W. Fraaije, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 1479-1489; (d) C. N. Jensen, J. Cartwright, J. Ward, S. Hart, J. P. Turkenburg, S. T. Ali, M. J. Allen, G. Grogan, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 872-878; (e) C. Szolkowy, L. D. Eltis, N. C. Bruce, G. Grogan, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1208-1217; (f) D. V. Rial, P. Cernuchova, J. B. van Beilen, M. D. Mihovilovic, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *50*, 61-68; (g) A. Völker, A. Kirschner, U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *77*, 1251-1260.

## Introducción

*Acinetobacter* sp. NCIMB 9871<sup>46</sup> y la 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO) de *Pseudomonas fluorescens* ACB.<sup>47</sup>

La investigación del mecanismo de oxidación de la CHMO fue publicada originalmente por Walsh en 1982<sup>46</sup> y corroborada posteriormente por Massey en 2001. Este ciclo catalítico se resume en el Esquema 0.5.<sup>48</sup>



**Esquema 0.5.** Mecanismo catalítico de las BVMOs de tipo I

El grupo prostético FAD, que está en su forma oxidada y unido fuertemente al enzima (aunque no de manera covalente), es reducido por el cofactor NADPH a FADH<sub>2</sub>, generándose al mismo tiempo la especie oxidada NADP<sup>+</sup>. El FADH<sub>2</sub> reacciona con el oxígeno atmosférico para formar el intermedio peróxido (FADHOO<sup>-</sup>), que será la especie activa en las oxidaciones nucleofílicas, o bien se protona (FADHOOH) para actuar como oxidante electrófilo. Cuando reacciona con una cetona, la peroxiflavina

<sup>46</sup> C. C. Ryerson, D. P. Ballou, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2644-2655.

<sup>47</sup> (a) N. M. Kamerbeek, A. J. J. Olsthoorn, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 419-426; (b) N. M. Kamerbeek, M. J. H. Moonen, J. G. M. van der Ven, W. J. H. van Berkel, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2547-2557.

<sup>48</sup> (a) S. Yamabe, S. Yamazaki, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3031-3041; (b) D. Sheng, D. P. Ballou, V. Massey, *Biochemistry* **2001**, *40*, 1156-1167.

ataca al grupo carbonilo del sustrato para formar el intermedio tetraédrico de Criegee. Por último, se libera el producto de la oxidación y el ciclo catalítico se completa con la eliminación de una molécula de agua, generándose de nuevo el FAD en su forma oxidada.

### 0.1.5.3. Cofactores en enzimas redox. Estrategias de regeneración

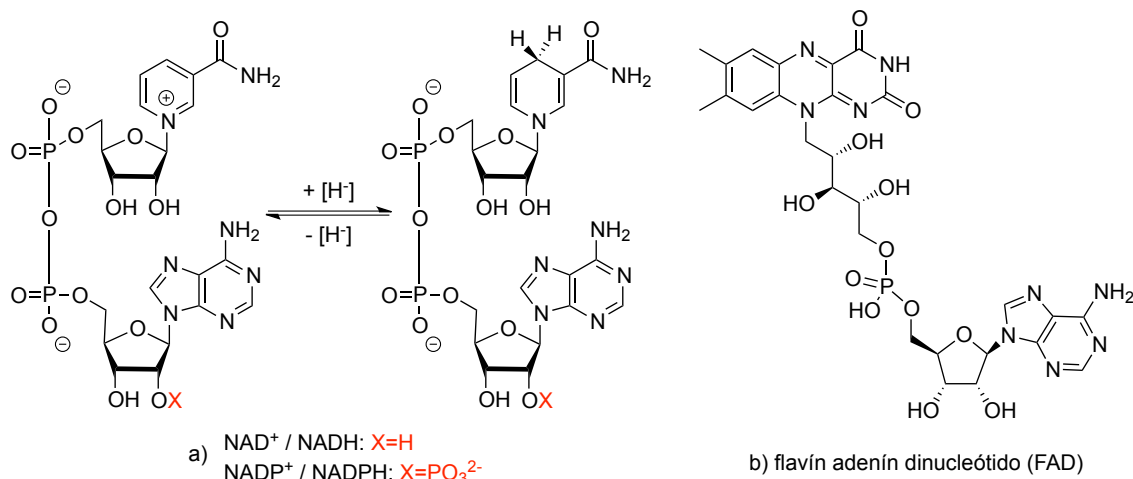
Un cofactor es una molécula no proteica o ion necesario en el centro activo de un enzima para que este pueda llevar a cabo la actividad catalítica. Este puede ser de origen orgánico (pterina, flavina, nicotinamida) o inorgánico (Cu, Fe, Zn). Asimismo, puede estar unido covalentemente o enlazado fuertemente al biocatalizador formando parte del centro activo (grupo prostético), o difundir libremente uniéndose de manera no permanente al sitio activo del enzima, llamándose en este caso coenzima.

En las aplicaciones a gran escala de los procesos biocatalíticos dependientes de un cofactor, la regeneración de este último no es un asunto trivial y merece una consideración especial. Los cofactores de nicotinamida (Figura 0.4a) o de flavina (Figura 0.4b) son necesarios en las reacciones catalizadas por los enzimas de tipo redox actuando como agente de transferencia de electrones tanto en su forma reducida como en la oxidada [NAD(P)H / NAD(P)<sup>+</sup> o FADH<sub>2</sub> / FAD]. Especialmente las especies reducidas resultan demasiado costosas como para poder ser utilizadas en cantidades estequiométricas, además de los problemas asociados de inhibición enzimática que pueden derivarse en estos casos. Por consiguiente, la regeneración de cantidades catalíticas del cofactor mediante metodologías *cuasi*-irreversibles es una manera apropiada de desplazar el equilibrio en reacciones termodinámicamente desfavorecidas hacia los productos deseados además de disminuir los costes del proceso.<sup>21b,49</sup>

---

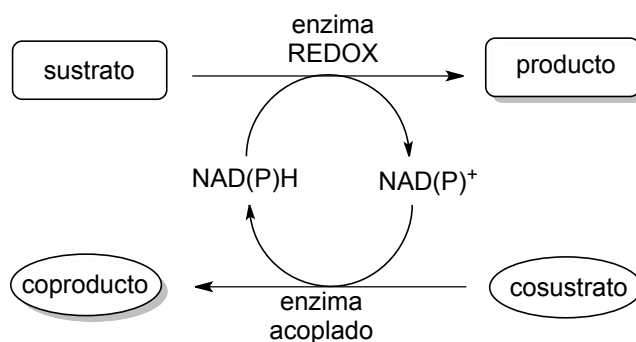
<sup>49</sup> Revisiones recientes: (a) H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773-1789; (b) C. Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2525-2541; (c) A. Weckbecker, H. Gröger, W. Hummel, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2010**, *120*, 195-242.

## Introducción



**Figura 0.4.** Algunos cofactores comunes en procesos redox

Probablemente la estrategia más utilizada hasta ahora para llevar a cabo el reciclaje del cofactor de nicotinamida en procesos redox es la denominada del ‘enzima acoplado’ (“*coupled-enzyme*”), en la cual un segundo enzima cataliza una reacción muy favorecida termodinámicamente sobre un cosustrato regenerando de nuevo el cofactor a su estado redox original (Esquema 0.6).



**Esquema 0.6.** Sistema de regeneración del cofactor utilizando un enzima acoplado

Para regenerar la forma reducida del cofactor, debido a la fácil accesibilidad de los azúcares glucosa y glucosa-6-fosfato, se han utilizado ampliamente como cosustratos junto con la glucosa deshidrogenasa (GDH) de *Bacillus subtilis*<sup>50</sup> o la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de *Bacillus stearothermophilus* o de *Leuconostoc mesenteroides*,<sup>51</sup> respectivamente. Sales de formiato han sido también empleadas como cosustratos dado que el producto de oxidación es el  $\text{CO}_2$  y por lo tanto

<sup>50</sup> M. Kataoka, K. Kita, M. Wada, Y. Yashoara, J. Hasegawa, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 62, 437-445.

<sup>51</sup> C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 4890-4899.

puede eliminarse fácilmente del medio de reacción. Para tal fin se emplea normalmente la formiato deshidrogenasa (FDH) de *Candida boidinii*<sup>52</sup> que las oxida a expensas de la reducción del NAD<sup>+</sup>. Puesto que estos procesos se encuentran muy favorecidos termodinámicamente, no es necesario emplear grandes cantidades del cosustrato para desplazar el equilibrio hacia los productos deseados. Para regenerar el cofactor en su forma oxidada, hay que destacar que aunque la estabilidad de estos coenzimas es mucho mayor que la de los reducidos, no se disponen de tantas variantes eficaces. Entre otras, se puede destacar el empleo de la L-lactato deshidrogenasa que cataliza la reducción del ácido pirúvico o glioxálico para formar ácido L-láctico o glicólico a expensas de oxidar NADH,<sup>53</sup> la glutamato deshidrogenasa que realiza la aminación reductiva del ácido  $\alpha$ -cetoglutárico usando NAD(P)H,<sup>54</sup> o las NAD(P)H oxidasas, que son capaces de regenerar la forma oxidada del cofactor utilizando simplemente O<sub>2</sub> molecular y generando agua o peróxido de hidrógeno como subproducto.<sup>55</sup>

Otra estrategia desarrollada ha sido la utilización de otro alcohol o derivado carbonílico barato y fácilmente accesible (cosustrato) como fuente de hidrógeno para reciclar el cofactor empleándose solamente un biocatalizador (Esquema 0.7). Esta metodología se utiliza en procesos catalizados por ADHs y se denomina del ‘sustrato acoplado’ (“*coupled-substrate*”).<sup>56</sup> El mismo enzima que lleva a cabo la reacción enzimática sobre el sustrato de interés, también reacciona con el cosustrato, con lo que no es necesario el uso de un segundo biocatalizador. Puesto que tanto la oxidación como la reducción presentan un carácter reversible, para desplazar el equilibrio hacia la formación del producto de interés se necesita un gran exceso molar del cosustrato, con lo que se suele utilizar un derivado fácilmente accesible (generalmente 2-propanol o acetona).

---

<sup>52</sup> (a) A. S. Bommarius, M. Schwarm, K. Drauz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 1-11; (b) A. S. Bommarius, K. Drauz, W. Hummel, M. R. Kula, C. Wandrey, *Biocatalysis* **1994**, *10*, 37-47.

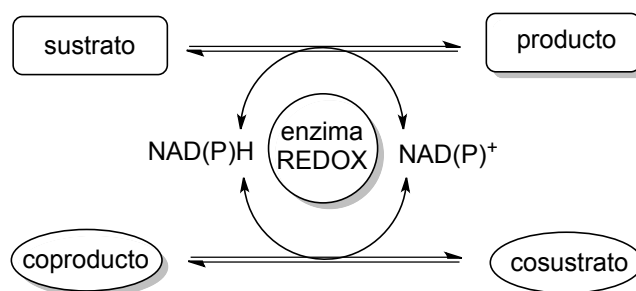
<sup>53</sup> H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* **1989**, *17*, 400-409.

<sup>54</sup> H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *14*, 147-197.

<sup>55</sup> B. R. Riebel, P. R. Gibbs, W. B. Wellborn, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 707-712.

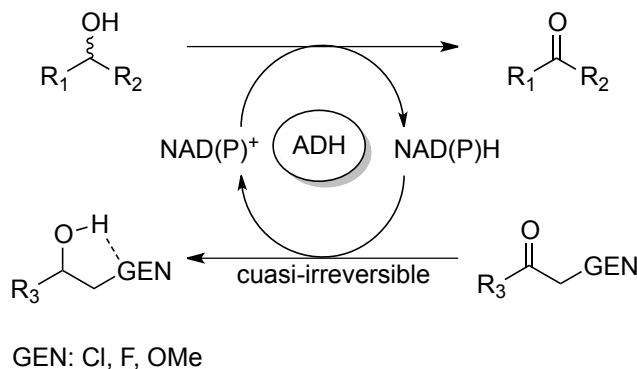
<sup>56</sup> J. Grunwald, B. Wirz, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6732-6734.





**Esquema 0.7.** Sistema de regeneración utilizando un cosustrato acoplado con un enzima redox

Recientemente se han descrito algunas estrategias que hacen uso de cosustratos con los que se obtienen procesos *cuasi-irreversibles*. Así, empleando cetonas con un grupo electronegativo (por ej., un halógeno) en posición  $\alpha$  al grupo carbonilo,<sup>57</sup> puesto que su biorreducción con ADHs está muy favorecida termodinámicamente, el proceso global también transcurre de manera muy favorable (Esquema 0.8). Se ha postulado que este hecho podría ser debido a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el residuo hidroxilo formado y el grupo electronegativo (GEN), lo que brindaría una estabilidad adicional al alcohol formado y por lo tanto el potencial redox sería demasiado elevado para conseguir la reoxidación catalizada por la ADH.<sup>58</sup>



**Esquema 0.8.** Proceso de oxidación cuasi-irreversible de alcoholes secundarios con ADHs mediante la estrategia del 'sustrato acoplado'

De esta forma ya no es necesario usar un gran exceso del cosustrato para desplazar el equilibrio hacia la formación de los productos de interés. Así, en teoría, con un solo equivalente de la cetona  $\alpha$ -sustituida por cada equivalente del alcohol sería

<sup>57</sup> I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155-2158.

<sup>58</sup> F. R. Bisogno, E. García-Urdiales, H. Valdés, I. Lavandera, W. Kroutil, D. Suárez, V. Gotor, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11012-11019.

posible lograr la oxidación total del mismo (siempre y cuando el biocatalizador no sea selectivo y sea capaz de oxidar ambos enantiómeros). Asimismo, se ha descrito recientemente la versión opuesta en la cual se emplea un cosustrato que hace que la reducción de una serie de aldehídos ocurra de manera *cuasi*-irreversible.<sup>59</sup> En este caso se emplea 1,4-butanodiol como cosustrato el cual, cuando es oxidado, forma un intermedio hidroxialdehído que cicla espontáneamente en el medio de reacción dando lugar a un hemiacetal que de nuevo puede ser oxidado por la ADH dando lugar a una lactona ( $\gamma$ -butirolactona). En teoría, 1 mol de este diol podría ser usado para reducir 2 moles del compuesto carbonílico de interés. Estos procesos ofrecen una nueva perspectiva ya que brindan la posibilidad de diseñar sistemas enzimáticos interconectados que presenten una mayor eficacia en cuanto a los recursos empleados referidos tanto a su ‘economía redox’<sup>60</sup> como a su ‘economía de átomos’.<sup>61</sup>

En los últimos años se están desarrollando nuevas metodologías para realizar la regeneración de los cofactores de nicotinamida o flavina en condiciones que sean medioambientalmente benignas.<sup>49b,62</sup> Así, de entre todos los sistemas se pueden destacar los electroquímicos y los (foto)químicos. Sin lugar a dudas los más sencillos y menos costosos son los que hacen uso de un electrodo para transferir o aceptar los electrones del cofactor puesto que no requieren ni de un segundo enzima ni de ningún cosustrato. Sin embargo, hasta ahora estos métodos se han mostrado poco efectivos debido a los problemas derivados de los sobrepotenciales observados, además de la obtención de reacciones no deseadas como la dimerización del cofactor o la desactivación del electrodo por deposiciones inespecíficas, aunque se siguen realizando avances al respecto.<sup>63</sup> Además, ya se han mostrado algunos ejemplos en los que el empleo de la energía lumínica puede resultar relativamente efectivo para la regeneración del cofactor de nicotinamida.<sup>64</sup>

---

<sup>59</sup> 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.

<sup>60</sup> N. Z. Burns, P. S. Baran, R. W. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2854-2867.

<sup>61</sup> (a) R. A. Sheldon, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1233-1246; (b) B. M. Trost, *Science* **1991**, *254*, 1471-1477.

<sup>62</sup> (a) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 762-782; (b) C. Kohlmann, W. Märkle, S. Lütz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *51*, 57-72; (c) F. Hollmann, K. Hofstetter, A. Schmid, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 163-171.

<sup>63</sup> F. Hildebrand, S. Lütz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4998-5001.

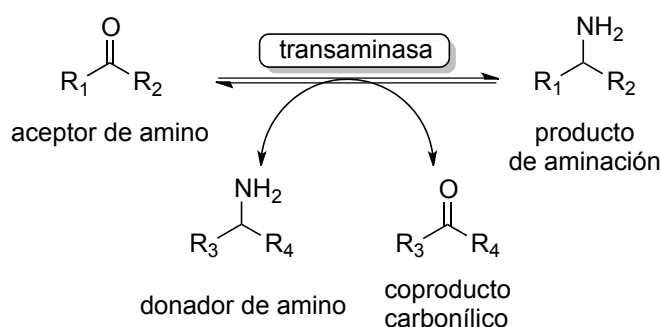
<sup>64</sup> (a) S. Gargiulo, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 338-342; (b) A. Taglieber, F. Schulz, F. Hollmann, M. Rusek, M. T. Reetz, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 565-572.

### 0.1.6. Transferasas

Este tipo de biocatalizadores se engloban en el segundo grupo de enzimas (EC.2), y suelen ser herramientas muy versátiles aplicadas con fines sintéticos debido a que son capaces de llevar a cabo reacciones difíciles de conseguir mediante métodos químicos convencionales como son la transferencia de grupos funcionales entre dos sustratos (uno actúa como agente donador y otro como aceptor del grupo funcional). Entre ellas se encuadran enzimas como las metiltransferasas, las quinanas, o las cada vez más importantes transaminasas.

#### 0.1.6.1. Transaminasas (TAs)

Las transaminasas, también denominadas aminotransferasas (ATs), se engloban dentro del grupo de las transferasas (EC 2.6.1.x) y son probablemente los enzimas más importantes en la síntesis y degradación de aminas y aminoácidos quirales en la naturaleza.<sup>65</sup> Estos biocatalizadores se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (tanto en animales como en plantas), ya que son una parte crucial en las rutas metabólicas de los organismos.<sup>66</sup> La reacción que llevan a cabo (Esquema 0.9) es la transferencia reversible de un grupo amino desde un compuesto que actúa como donador de amino (generalmente un  $\alpha$ -aminoácido) al carbono carbonílico del aceptor de amino (pueden ser cetoácidos, cetonas o aldehídos) utilizando piridoxal 5'-fosfato (PLP) como cofactor.



**Esquema 0.9.** Principio de transaminación catalizado por una transaminasa

<sup>65</sup> M. Höhne, U. T. Bornscheuer, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 779-820.

<sup>66</sup> J. Moore, R. Langley, *Biochemistry for Dummies*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2008.

## Introducción

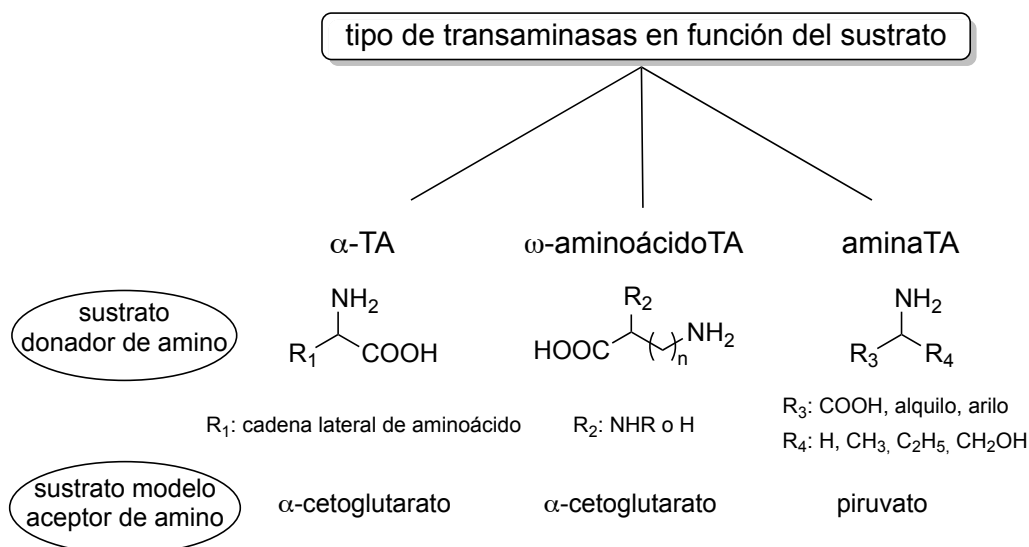
La primera evidencia de la existencia de un enzima capaz de llevar a cabo reacciones de transaminación fue publicada por Needham en 1930, quien observó una relación entre las concentraciones de ácido L-glutámico, ácido L-aspartico y el ácido oxalacético en el músculo de una paloma.<sup>67</sup> Desde entonces numerosas transaminasas han sido descubiertas y caracterizadas con la capacidad de catalizar la transaminación de aminas primarias o  $\beta$ -aminoácidos, entre otros.

En función de su especificidad de sustrato estas enzimas se han clasificado hasta en tres grupos (Esquema 0.10): las  $\alpha$ -transaminasas ( $\alpha$ -TAs), las  $\omega$ -aminoácido transaminasas ( $\omega$ -TAs) y las amino transaminasas (ATAs). La diferencia entre ellas reside en la presencia y posición de un grupo con carga electronegativa (generalmente un carboxilato) con respecto al grupo amino que es transferido en los sustratos donadores de amino. Las del primer grupo sólo aceptan sustratos que posean en su estructura un grupo carboxílico en posición  $\alpha$  al grupo amino. Un buen ejemplo es la aspartato transaminasa, la cual está involucrada en el metabolismo de aminoácidos proteínogénicos. Este tipo de enzimas son capaces de realizar la síntesis de aminoácidos no naturales (no proteínogénicos o de configuración D). El segundo grupo, el más reducido, transfiere grupos amino terminales unidos a carbonos primarios separados al menos en un carbono del grupo carboxílico. La transaminación del grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina o la conversión de la  $\beta$ -alanina o el  $\gamma$ -aminobutirato son ejemplos típicos de estas transaminasas. El hecho de que el átomo de carbono al cual está unido el grupo amino sea acquiral, limita el interés de estas enzimas aplicados con fines sintéticos. Por último, el tercer grupo engloba a biocatalizadores que son capaces de aceptar sustratos carentes de grupo carboxílico (como por ejemplo cetonas o aldehídos) con lo que ofrecen la posibilidad de generar aminas quirales, siendo en los últimos años una herramienta versátil aplicadas en síntesis orgánica.<sup>68</sup> En este punto hay que reseñar que también en muchas ocasiones a este grupo de enzimas se las ha denotado como  $\omega$ -TAs puesto que son capaces de convertir  $\beta$ - u  $\omega$ -aminoácidos.

---

<sup>67</sup> D. M. Needham, *Biochem. J.* **1930**, *24*, 208-227.

<sup>68</sup> Revisiones recientes: (a) M. S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163-1171; (b) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993-1001; (c) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324-332; (d) H. C. Hailes, P. A. Dalby, G. J. Lye, F. Baganz, M. Micheletti, N. Szita, J. M. Ward, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1883-1893; (e) D. Zhu, L. Hua, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1420-1431; (f) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51.



**Esquema 0.10.** Clasificación de las transaminasas en función de la estructura del sustrato donador de amino

En comparación con las α-TAs y las ω-aminoácido TAs, las ATAs suelen usar piruvato como agente aceptor del grupo amino, mientras que los otros dos grupos usan α-cetoglutarato como aceptor más adecuado. Otra diferencia destacada se encuentra en el equilibrio de la reacción, ya que mientras que en las reacciones de transaminación catalizadas por las α-TAs el equilibrio termodinámico se mantiene cercano a la unidad, en el caso de las ATAs, está fuertemente favorecido hacia la producción de la alanina, con lo que si se desea sintetizar una amina a partir de un compuesto carbonílico, se requieren metodologías especiales para poder desplazar el equilibrio. De hecho, para el caso de realizar la resolución cinética de una amina racémica empleando piruvato como aceptor de amino, solo se necesita un equivalente para llevar a cabo dicha transformación, mientras que para el caso contrario se necesita un gran exceso molar de alanina como donador de amino.<sup>69</sup>

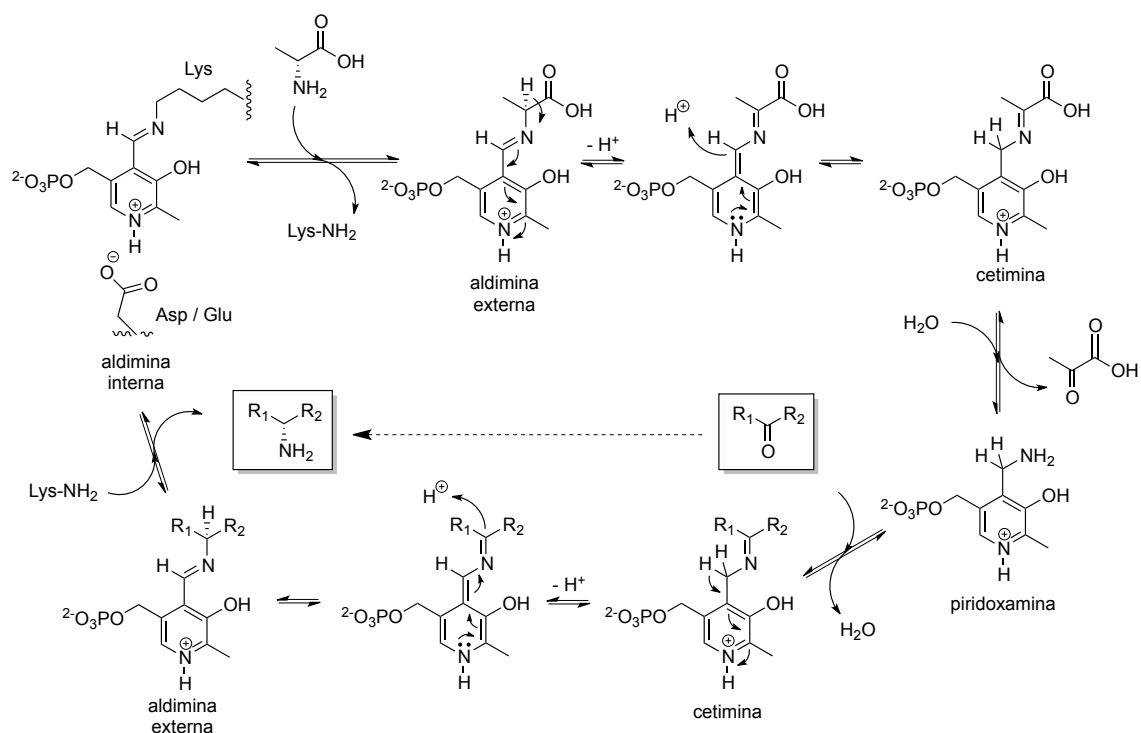
El mecanismo de la reacción de transaminación se ha dilucidado y estudiado en detalle en el caso de la aspartato aminotransferasa.<sup>70</sup> El cofactor piridoxal 5'-fosfato es el encargado de transferir el grupo amino desde el sustrato donador de amino hasta el carbonilo que actúa como aceptor. Así, en un principio, el PLP se encuentra enlazado al

<sup>69</sup> J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206-211.

<sup>70</sup> (a) H. Mizuguchi, H. Hayashi, K. Okada, I. Miyahara, K. Hirotsu, H. Kagamiyama, *Biochemistry* **2001**, *40*, 353-360; (b) J. M. Goldberg, J. F. Kirsch, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5280-5291.

## Introducción

grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina en el centro activo del enzima mediante un enlace imínico reversible y está activado por un grupo aspartato o glutamato (Esquema 0.11).

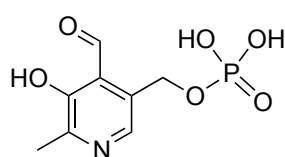


**Esquema 0.11.** Mecanismo de transaminación catalítico en el centro activo de una transaminasa

El mecanismo, totalmente reversible, puede dividirse en dos pasos. En un primer lugar el PLP, que se encuentra unido al centro activo del enzima, se une al donador de amino (L-alanina en el Esquema 0.11) generando una aldimina que por isomerización del doble enlace da lugar a una cetimina que posteriormente se hidroliza obteniéndose la especie piridoxamina (PMP) y ácido pirúvico como subproducto. En el segundo paso, de nuevo formando enlaces imínicos, la PMP reacciona con el carbonilo, de por ejemplo una cetona que actúa como agente aceptor, formándose la cetimina que posteriormente isomerizará a una aldimina externa, que por reacción con la lisina del centro activo permite obtener el producto de transaminación con un centro quiral creado regenerando a su vez el cofactor PLP que se podrá incorporar de nuevo a otro ciclo catalítico.

**0.1.6.2. Sistemas de regeneración del cofactor y desplazamiento del equilibrio en reacciones de transaminación**

En los últimos años las transaminasas han sido utilizadas como biocatalizadores para la producción de una amplia familia de aminas y aminoácidos.<sup>68</sup> Como se ha mostrado en el mecanismo, el cofactor piridoxal 5'-fosfato (necesario en una concentración entorno a 50-100  $\mu\text{M}$ ) es el responsable, a través de la especie piridoxamina generada, de transferir el grupo amino al sustrato carbonílico para regenerar el PLP actuando así de manera catalítica (Figura 0.5).



piridoxal 5'-fosfato (PLP)

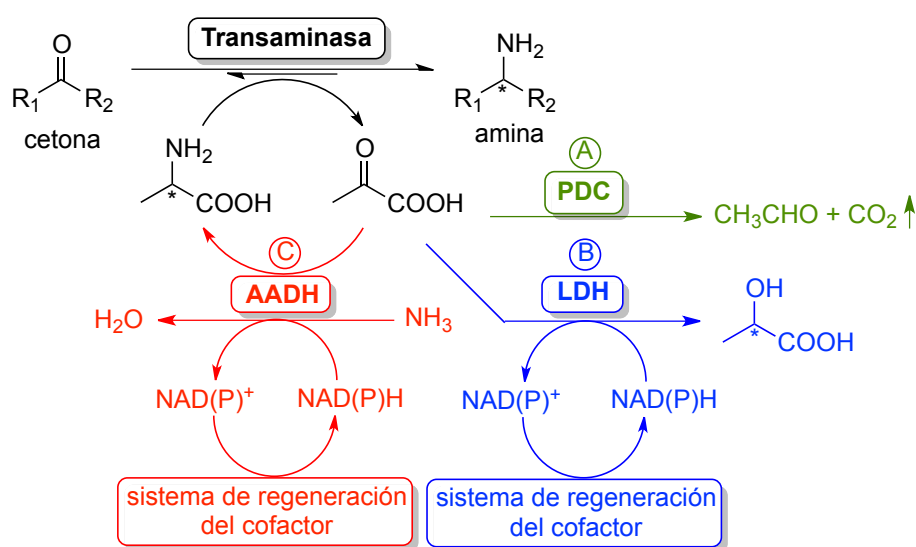
**Figura 0.5.** Cofactor necesario en las reacciones de transaminación

Desde un punto de vista sintético, estas enzimas pueden catalizar la resolución cinética de una mezcla racémica de una amina dando lugar, en el mejor de los casos, a un 50% de un compuesto carbonílico junto con otro 50% de la amina enantiopura, o la aminación asimétrica de un compuesto carbonílico. Generalmente, siempre y cuando el sustrato carbonílico de partida sea fácilmente accesible, la ruta que se suele utilizar es la aminación asimétrica ya que en este caso el rendimiento máximo teórico del producto es del 100%. Sin embargo, en el caso de las ATAs, y debido a que el equilibrio de la reacción está favorecido hacia la formación de la alanina que actúa como donador de amino, es necesario utilizar un sistema adicional para desplazar el equilibrio hacia la formación de la amina deseada.

El donador de amino natural de este tipo de enzimas es la alanina, la cual una vez donado el grupo amino, se transforma en ácido pirúvico. Una metodología comúnmente utilizada para evitar la reversibilidad del proceso y aumentar la conversión de la reacción es la eliminación de dicho coproducto (en este caso el piruvato). Para llevar a cabo este proceso se han desarrollado varias alternativas enzimáticas que se comentarán a continuación (Esquema 0.12).

## Introducción

La utilización de la lactato deshidrogenasa (LDH)<sup>53</sup> simultáneamente junto con la transaminasa, consigue reducir el piruvato formado a lactato desplazando el equilibrio hacia el producto deseado.<sup>69</sup> Para poder usar esta metodología es necesaria también la adición de un cofactor pirimidínico [NAD(P)H] y de un sistema de regeneración del tipo del enzima acoplado para regenerarlo. Los biocatalizadores más comúnmente utilizados son la GDH y glucosa como sustrato o la FDH junto con el formiato de amonio.



**Esquema 0.12.** Metodologías enzimáticas para desplazar el equilibrio mediante la eliminación del piruvato. AADH: aminoácido deshidrogenasa, PDC: piruvato descarboxilasa, LDH: lactato deshidrogenasa

Otra técnica de eliminación del piruvato se basa en la utilización de una piruvato descarboxilasa (PDC),<sup>71</sup> la cual genera como subproductos acetaldehído y CO<sub>2</sub>. Esta es una reacción más simple ya que tan solo necesita la adición de un enzima y no es necesaria la presencia de NADH, además la reacción está desplazada hacia la formación de los productos de manera *cuasi*-irreversible al generarse dióxido de carbono. El inconveniente que posee es que se necesita un mayor exceso de agente donador de amino ya que algunas transaminasas son capaces de reaccionar con el acetaldehído formado generando etilamina como subproducto de la reacción.<sup>72</sup>

<sup>71</sup> (a) K. C. Raj, L. A. Talarico, L. O. Ingram, J. A. Maupin-Furrow, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2869-2876; (b) G. Goetz, P. Iwan, B. Hauer, M. Breuer, M. Pohl, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *74*, 317-325.

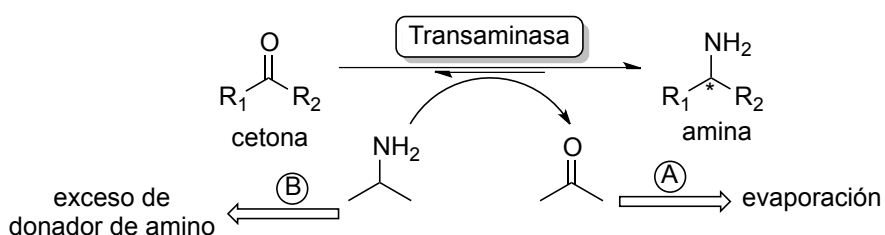
<sup>72</sup> M. Höhne, S. Köhl, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 363-365.



## Introducción

Mientras que la utilización de los enzimas ya citados implica una presencia (al menos) equimolar de la alanina con respecto al sustrato, la utilización de una aminoácido deshidrogenasa (AADH) como la alanina deshidrogenasa conlleva el reciclaje de la alanina usando una sal inorgánica de amonio como fuente de nitrógeno, consiguiéndose de esta manera que su adición a la reacción pueda ser de manera catalítica, evitándose así posibles problemas de inhibición debido a altas concentraciones de la alanina. Esta metodología también requiere de la presencia de un cofactor como el NADH con su respectivo sistema de regeneración.<sup>73</sup>

A pesar de que el sustrato más utilizado como donador de amino con las ATAs es la alanina debido a que es su sustrato natural, gracias a los avances en Biología Molecular se han desarrollado transaminasas más estables y con un abanico mayor de sustratos aceptando por lo tanto diferentes aminas como donadores. Entre ellas, una de las más utilizadas debido a su fácil accesibilidad y bajo precio es la isopropilamina (Esquema 0.13). En este caso el subproducto generado es la acetona, la cual puede ser eliminada del medio mediante evaporación<sup>74</sup> debido a su punto de ebullición relativamente bajo, siempre y cuando los sustratos y/o productos formados no sean volátiles. Sino es factible la evaporación de la acetona formada, hay que utilizar un gran exceso (entorno a 50 equivalentes con respecto al sustrato), del donador de amino, forzando así la reacción a desplazarse hacia la formación del producto deseado. El inconveniente de esta técnica es el posible problema de inhibición causado por las altas concentraciones de la isopropilamina adicionada.



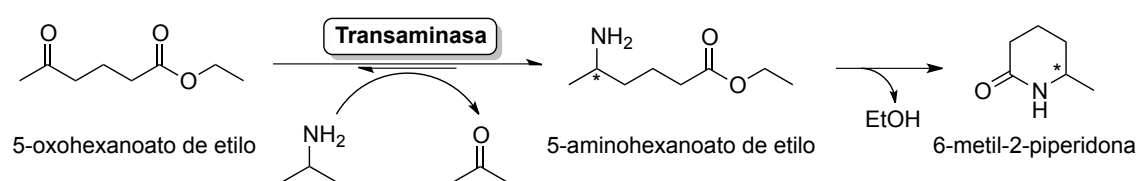
**Esquema 0.13.** Empleo de isopropilamina como agente donador de amino en procesos de transaminación

<sup>73</sup> D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337-9340.

<sup>74</sup> G. Matcham, M. Bhatia, W. Lang, C. Lewis, R. Nelson, A. Wang, W. Wu, *Chimia* **1999**, *53*, 584-589.

## Introducción

Una estrategia elegante para desplazar el equilibrio es la utilización del producto generado como sustrato de una segunda reacción *cuasi*-irreversible, o bien obtener un intermedio inestable que evolucione hacia la formación de otra especie de manera muy favorecida termodinámicamente. Ejemplos recientes de ello son la formación de lactamas a partir de  $\delta$ -cetoésteres (Esquema 0.14),<sup>75</sup> ya que tras la reacción de transaminación, el aminoéster generado es inestable ciclando intramolecularmente de manera espontánea formándose las lactamas quirales de manera cuantitativa. Otro sistema recientemente descrito es la formación de iminas cíclicas a partir de 1,5-dicetonas.<sup>76</sup>



**Esquema 0.14.** Desplazamiento del equilibrio por ciclación intramolecular del producto obtenido en la reacción de aminación

El desarrollo de estas metodologías está abocado al diseño de sistemas autosuficientes más prácticos para su posterior aplicación en la síntesis asimétrica de aminas a escala industrial. La obtención de células enteras capaces de sobreexpresar la transaminasa conjuntamente con el enzima utilizado para la eliminación del piruvato y un tercer biocatalizador para realizar el reciclado del NADH, o el desarrollo de transaminasas más robustas y capaces de aceptar aminas comerciales y baratas como cosustratos son dos ejemplos de la línea a seguir en este sentido. Todo esto ha conllevado un mayor desarrollo en procesos catalizados por TAs a nivel industrial.<sup>77</sup>

### 0.1.7. Hidrolasas

Estos biocatalizadores, encargados de llevar a cabo la hidrólisis o formación de derivados de ácido carboxílico, son los enzimas más utilizados en procesos

<sup>75</sup> M. D. Truppo, J. D. Rozzell, N. J. Turner, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 234-237.

<sup>76</sup> (a) R. C. Simon, F. Zepeck, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2859-2865; (b) R. C. Simon, B. Grischek, F. Zepeck, A. Steinreiber, F. Belaj, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6713-6716.

<sup>77</sup> C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309.

biocatalíticos a nivel industrial. Esto es debido a que por lo general poseen una gran estabilidad, pueden ser inmovilizados sobre diferentes soportes (con lo que se pueden reutilizar durante varios ciclos de reacción), pueden trabajar tanto en medios acuosos como orgánicos y además no necesitan cofactores para llevar a cabo la catálisis abaratando los costes finales del proceso. Además son sin lugar a dudas los biocatalizadores más fácilmente accesibles de manera comercial. Los enzimas hidrolíticos son los que mayor versatilidad han mostrado en síntesis orgánica<sup>78</sup> debido a que la mayor parte de ellos muestran una gran actividad en disolventes no acuosos, siendo necesaria una pequeña proporción de agua para tener actividad, la que comúnmente se ha denominado como ‘capa esencial de agua’.

### 0.1.7.1. Lipasas

Dentro de la familia de las hidrolasas se encuentran las lipasas, que pertenecen al subgrupo de las triacilglicerol hidrolasas siendo su función natural catalizar la hidrólisis de lípidos y ácidos grasos. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en bacterias, hongos, plantas y animales, y se diferencian del resto de hidrolasas por el gran incremento en su actividad catalítica cuando están en una interfase agua/lípido. Este fenómeno es conocido como activación interfacial.<sup>79</sup> Las lipasas han sido aplicadas con éxito en la preparación de detergentes, alimentos y productos de alto valor añadido.<sup>80</sup> Esto se debe, principalmente, a que cuando se utilizan en medios orgánicos, su nucleófilo natural (el agua) puede ser reemplazado por otros como son los alcoholes, peróxidos, amoniaco, aminas, hidracinas o tioles (Esquema 0.15).<sup>81</sup> Estos catalizadores muestran una gran quimio-, regio- y/o estereoselectividad en los procesos que catalizan,

---

<sup>78</sup> U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.

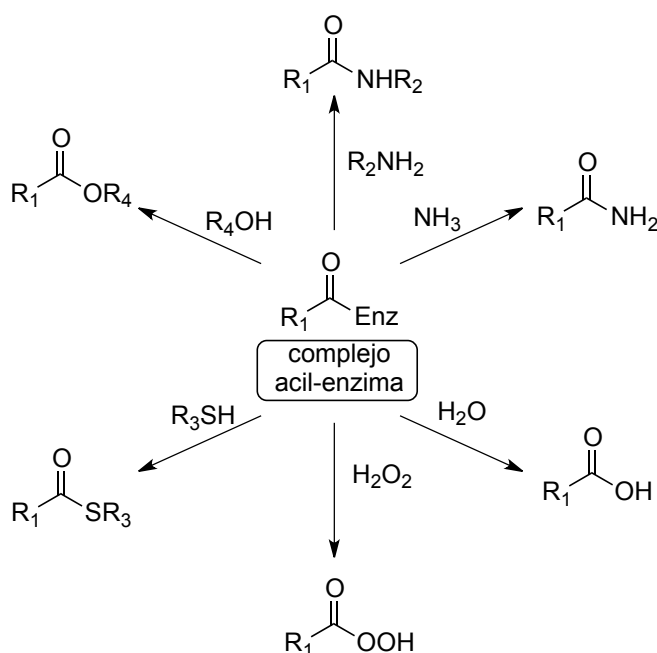
<sup>79</sup> R. Verger, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32-38.

<sup>80</sup> (a) M. Paravidino, P. Boehm, H. Gröger, U. Hanefeld, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 251-362; (b) U. T. Bornscheuer, en *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, Vol. 5, Ed. M. C. Flickinger, John Wiley & Sons, Hoboken, **2010**, pp. 3165-3180; (c) V. Gotor-Fernández, F. Rebolledo, V. Gotor, en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, Ed. R. N. Patel, CRC Press, Boca Raton, **2007**, pp. 203-248; (d) V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120.

<sup>81</sup> (a) V. Gotor-Fernández, V. Gotor, en *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 171-192; (b) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197.

## Introducción

lo que permite llevar a cabo con éxito una gran cantidad de transformaciones sintéticas.<sup>78,82</sup>



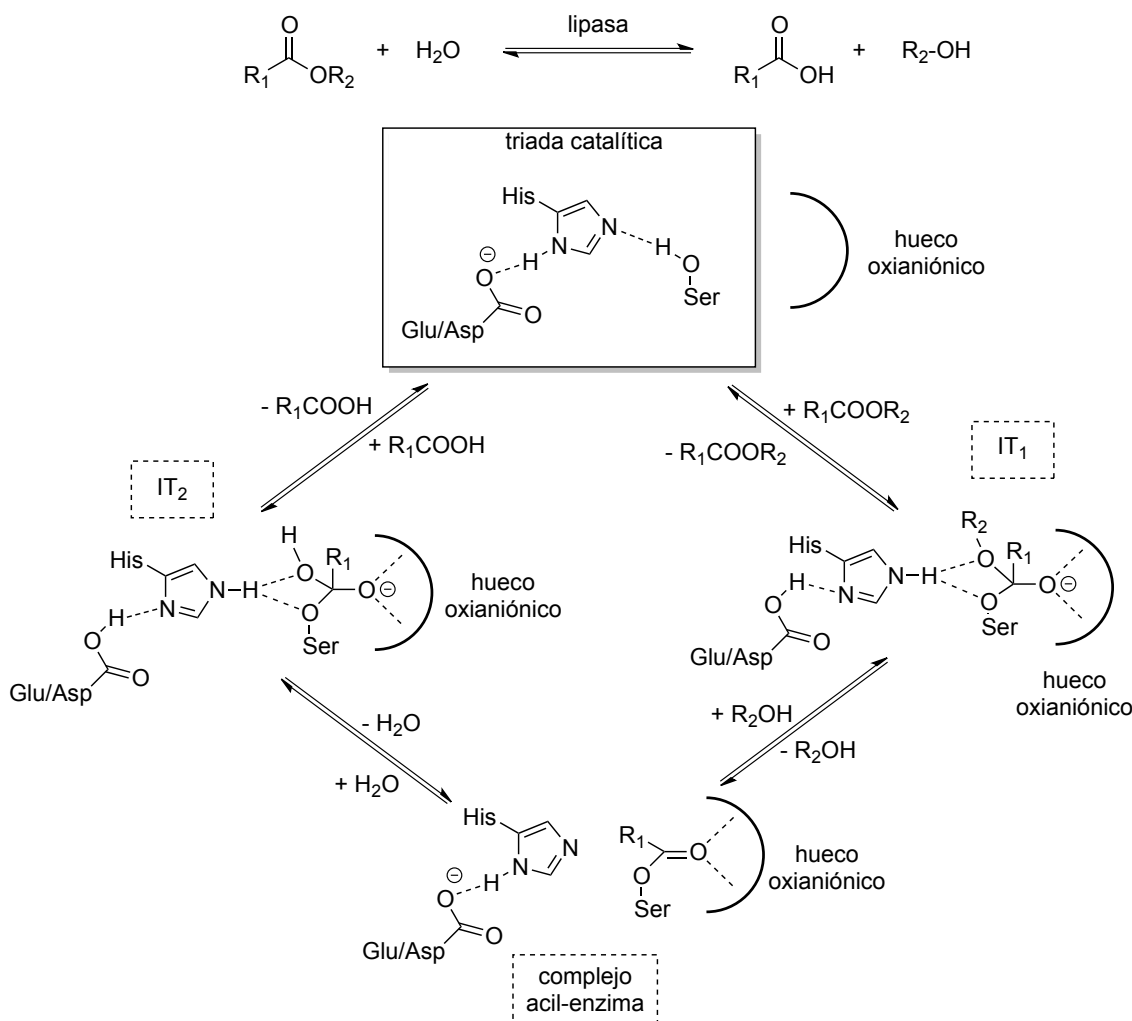
**Esquema 0.15.** Reacciones catalizadas por lipasas utilizando distintos nucleófilos

La hidrólisis enzimática de un éster (Esquema 0.16) tiene lugar en el centro activo del enzima y para ello es fundamental la presencia de tres aminoácidos (aspartato o glutamato, histidina y serina), denominados la *triada catalítica*, y un hueco donde el oxoanión que se forma es estabilizado mediante puentes de hidrógeno establecidos por los aminoácidos que lo integran (*hueco oxianiónico*). La deslocalización de la carga entre estos tres aminoácidos consigue desprotonar el grupo hidroxilo de la serina a pHs neutros e incluso ligeramente ácidos. Seguidamente, el alcóxido de la serina ataca al éster generando un intermedio tetraédrico (IT<sub>1</sub>). El oxoanión generado se sitúa en el hueco oxianiónico, quedando esta especie cargada estabilizada. La consiguiente eliminación del alcohol una vez protonado por la histidina genera el complejo acil-enzima que está unido de manera covalente. Esta especie es atacada por una molécula de agua activada por el imidazol de la histidina de la triada catalítica generándose el segundo intermedio tetraédrico (IT<sub>2</sub>), que de nuevo está estabilizado por los aminoácidos del hueco oxianiónico. La expulsión del ácido regenera el enzima libre que queda preparado para el siguiente ciclo catalítico. Como ya se ha mencionado, este

<sup>82</sup> A. Ghanem, H. Y. Aboul-Eneim, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3331-3351.

## Introducción

proceso es reversible con lo que puede llevarse a cabo en el sentido contrario generando un éster a partir de un ácido carboxílico y un alcohol.<sup>80a</sup>



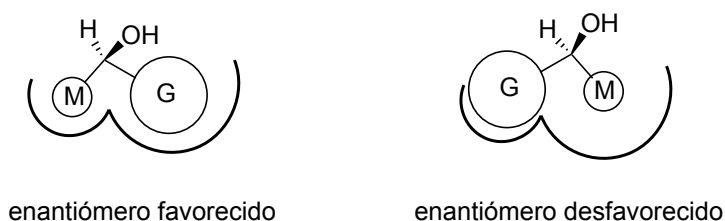
**Esquema 0.16.** Ciclo catalítico de la hidrólisis de un éster catalizado por una lipasa

La enantioselectividad de estos enzimas sobre alcoholes secundarios sigue la regla semiempírica conocida como *Regla de Kazlauskas*.<sup>83</sup> Con ella se predice, con gran fiabilidad, la preferencia estereogénica de las lipasas en la reacción de acilación de alcoholes secundarios y la hidrólisis de sus ésteres correspondientes, basándose en el tamaño de los sustituyentes unidos al estereocentro. En la Figura 0.6 se muestra la configuración del enantiómero favorecido en una resolución cinética de alcoholes secundarios catalizada por una lipasa. Así, cuando el enantiómero del alcohol que

<sup>83</sup> (a) Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *Chirality* **2008**, *20*, 724-735; (b) M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serrequi, A. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186; (c) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

## Introducción

reacciona más rápido (enantiómero *R*)<sup>27</sup> se une a la lipasa, el sustituyente más voluminoso (G) se aloja en el hueco del centro activo de mayor tamaño, mientras que el hueco más pequeño es el que acomoda al grupo mediano (M). La situación para el enantiómero desfavorecido es la contraria, de esta manera, cuanto mayor es la diferencia entre los tamaños de ambos sustituyentes la reacción transcurre con una mayor selectividad, siempre que estos se puedan acomodar correctamente en los huecos del centro activo de la lipasa. De este modo, lipasas como la *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B)<sup>84</sup> o la lipasa de *Pseudomonas* (o *Burkholderia*) *cepacia* (PCL)<sup>85</sup> son capaces de catalizar procesos asimétricos a partir de aminas o alcoholes rracémicos, además de ser catalizadores versátiles en procesos de resolución de ésteres mediante reacciones de transesterificación, hidrólisis, aminólisis y amonólisis. En este sentido hay que destacar de nuevo que el desarrollo de técnicas de Biología Molecular ha permitido obtener, a partir de los enzimas naturales, nuevas mutantes que mejoren su actividad, su estabilidad y su selectividad, incluso llegando a tener una estereopreferencia opuesta a la del biocatalizador natural.<sup>14b,86</sup>



**Figura 0.6.** Enantiómero favorecido y desfavorecido según la regla semiempírica de Kazlauskas

## 0.2. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

La percepción general que existe sobre los enzimas es que estos catalizadores son muy sensibles a variaciones en el medio de reacción y que mayoritariamente solo pueden utilizarse en medios acuosos, aspectos que no suelen ser las condiciones ideales

<sup>84</sup> V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.

<sup>85</sup> (a) T. Schulz, J. Pleiss, R. D. Schmid, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1053-1062; (b) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6266-6273; (c) K. K. Kim, H. K. Song, D. H. Shin, K. Y. Hwang, S. W. Suh, *Structure* **1997**, *5*, 173-185.

<sup>86</sup> Ejemplos recientes: (a) Q. Wu, S. Pankaj, M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1872-1881; (b) P.-O. Syren, P. Hendil-Forssell, L. Aumailley, W. Besenmatter, F. Gounine, A. Svendsen, M. Martinelle, K. Hult, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 645-648.

en catálisis y en muchas de las rutas sintéticas debido a los problemas de estabilidad y solubilidad de otros reactivos.

Por otra parte, los reactores utilizados en la industria para el desarrollo de procesos en continuo se están implantando cada vez con más frecuencia, debido tanto al alto volumen de producción con el que se puede trabajar como a la reducción en los pasos de operación asociados a dichos procesos.<sup>87</sup> Sin embargo, hasta ahora solamente un cuarto de los procesos biotecnológicos escalados a nivel industrial se realizan empleando técnicas de trabajo en continuo. Para el desarrollo de este tipo de procesos, el reciclaje del biocatalizador es uno de los pasos cruciales. Así, una de las maneras más eficaces para poder soslayar estos inconvenientes es la inmovilización enzimática.<sup>88</sup>

### 0.2.1. Ventajas e inconvenientes de la inmovilización enzimática

El empleo de biocatalizadores inmovilizados presenta una serie de ventajas frente a la utilización de enzimas en disolución.<sup>88,89</sup>

- Estas preparaciones son más fácilmente manejables y reutilizables que las proteínas libres. Esto adquiere especial relevancia cuando son usadas en reactores y dichos procesos son llevados a escala industrial.
- Pueden ser fácilmente separados del medio de reacción mediante una filtración simple, lo que facilita el tratamiento de la reacción y previene posibles contaminaciones del producto final debidas a la proteína libre.
- En muchos casos, el enzima anclado es más resistente (tolerando una mayor alteración de la temperatura o del pH) e incluso es más selectivo que en el caso del biocatalizador libre.

A pesar de esta serie de ventajas, también existen algunas limitaciones de tipo práctico a la hora de utilizar enzimas inmovilizados que cabe mencionar:

---

<sup>87</sup> A. J. J. Straathof, en *Industrial Biotransformations*, Eds. A. Liese, C. Seebach, C. Wandrey, 2ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, pp. 515-520.

<sup>88</sup> (a) D. N. Tran, K. J. Balkus, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956-968; (b) J. M. Guisán, L. Betancor, G. Fernández-Lorente, en *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, Vol. 5, Ed. M. C. Flickinger, John Wiley & Sons, Hoboken, **2010**, pp. 2917-2933; (c) U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453-468; (d) R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307.

<sup>89</sup> C. Garcia-Galan, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885-2904.

## Introducción

- El anclaje de la proteína rara vez es cuantitativo, teniendo lugar con un rendimiento bajo.
- La actividad enzimática del biocatalizador anclado suele ser menor. Este hecho puede ser debido a la modificación química del enzima, a interacciones de tipo estérico o a problemas de difusión y transferencia de masa.
- La proporción de biocatalizador activo inmovilizado en el soporte suele ser muy baja, no superando normalmente el 5-10% ( $p\ p^{-1}$ ).

Pese a todas estas limitaciones, los avances logrados gracias al empleo de enzimas unidos a un soporte aplicados a la industria química son indudables, y por lo tanto la inmovilización de biocatalizadores está llamada a ser uno de los pilares fundamentales en la implantación de la ‘Química sostenible’.

### 0.2.2. Tipos de inmovilización enzimática

No existe una metodología universal que pueda ser aplicada a la hora de inmovilizar un biocatalizador. Por norma general, el procedimiento seguido se basa en la técnica de ‘prueba y error’, siendo el factor principal a tener en cuenta la estabilidad y actividad del enzima tanto en el proceso de inmovilización como en su posterior utilización. Las técnicas de inmovilización enzimática más frecuentes suelen agruparse principalmente en tres grupos, presentando cada uno de los métodos ciertas ventajas e inconvenientes.

#### 0.2.2.1. Adsorción no covalente

Se puede realizar mediante diferentes tipos de interacciones inespecíficas. Así, enzimas con grandes superficies lipofílicas pueden interaccionar con soportes hidrofóbicos a través de uniones de tipo van der Waals.<sup>90</sup> También se pueden inmovilizar sobre soportes hidrofílicos mediante enlaces de hidrógeno con alguno de los residuos polares que el biocatalizador posea en la superficie.<sup>91</sup> Una de las ventajas de usar este tipo de inmovilización es que el enzima no necesita un tratamiento previo y

---

<sup>90</sup> L. Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

<sup>91</sup> C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* 2007, 40, 1451-1463.



## Introducción

puede ser utilizado directamente sin necesidad de aislamiento o purificación. Esta inmovilización presenta como desventaja la pérdida de la proteína en las reutilizaciones (“*leaching*”).

Dentro de este grupo se pueden incluir las inmovilizaciones a través de enlaces iónicos, puesto que dependiendo del pH del medio, determinados aminoácidos de la superficie del biocatalizador pueden encontrarse cargados. Debido a esta característica, y utilizando como soporte un intercambiador iónico adecuado, se pueden conseguir interacciones fuertes de tipo polar (Figura 0.7a).<sup>92</sup> La cohesión resina-enzima en este tipo de anclaje depende enormemente del pH y de la fuerza iónica del medio.

### 0.2.2.2. Encapsulamiento

La manera más segura de evitar influencias negativas sobre la estructura de la proteína es encapsulándola. Este método se ha estudiado ampliamente siendo la técnica de tipo ‘*sol-gel*’ la más comúnmente empleada.<sup>93</sup> En este caso la proteína se confina físicamente dentro de una matriz polimérica supramolecular. El material obtenido, además de poseer una gran estabilidad térmica y mecánica, resulta ser muy poroso con lo que el sustrato puede difundir fácilmente hasta llegar a la proteína, la cual no puede a su vez salir hacia el medio de reacción puesto que tiene un tamaño mucho mayor que el de los poros del material.

Durante los últimos años ha cobrado una importancia relevante la utilización de polimersomas como medios de encapsulamiento de enzimas y de otro tipo de biomoléculas como pueden ser fármacos o marcadores.<sup>94</sup> Un polimersoma está formado por copolímeros de bloque anfifílicos, y de igual modo que los liposomas, en medios acuosos se alinean en bicapas formando esferas capaces de almacenar diferentes sustancias en su interior (Figura 0.7b). Al contrario que los liposomas, formados por fosfolípidos de pequeño tamaño, los polimersomas están constituidos por copolímeros

---

<sup>92</sup> A. Basso, B. A. Maltman, S. L. Flitsch, G. Margetts, I. Brazendale, C. Ebert, P. Linda, S. Verdellia, L. Gardossi, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 971-976.

<sup>93</sup> (a) D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1013-1030; (b) A. C. Pierre, *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 145-170.

<sup>94</sup> (a) S. A. Meeuwissen, A. Rioz-Martínez, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, V. Gotor, J. C. M. van Hest, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 18923-18926; (b) M. Nallani, H.-P. M. de Hoog, J. J. L. M. Cornelissen, A. R. A. Palmans, J. C. M. van Hest, R. J. M. Nolte, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3723-3728; (c) D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, *297*, 967-973.

de alto peso molecular y poseen una mayor estabilidad y resistencia mecánica. Además estos copolímeros pueden ser modificados fácilmente consiguiendo así polimersomas con diferentes propiedades.

### 0.2.2.3. Enlace covalente

En este caso el biocatalizador se encuentra covalentemente unido al soporte (Figura 0.7c), favoreciendo en algunos casos la estabilización de la proteína ya que con la formación de los enlaces covalentes la flexibilidad conformacional del enzima disminuye, y debido a ello, puede tolerar condiciones más drásticas de temperatura y de pH. Por otro lado, como el biocatalizador se modifica químicamente cuando se une al soporte, existe un mayor riesgo de pérdida de actividad.

La forma tradicional para realizar este anclaje consiste en el aprovechamiento de la nucleofilia de los grupos amino existentes en la superficie del enzima. Así, se les hace reaccionar con un conector (“*linker*”) que ya se encuentra unido a la resina. Como conector se suele utilizar una molécula bifuncionalizada que pueda unirse por un extremo al soporte y por el otro a alguno de los grupos amino de la proteína (suelen emplearse diepóxidos, dialdehídos como el glutaraldehído o también anhídridos de ácido cíclicos como el anhídrido maléico).<sup>95</sup> En el caso de que la reacción se haga sobre un dialdehído, las iminas formadas pueden ser reducidas con el fin de obtener enlaces covalentes más estables.

El conector juega un papel clave en la inmovilización, ya que si se usan conectores de cadena carbonada larga, la flexibilidad del biocatalizador será mayor puesto que podrá variar su conformación con una mayor facilidad.<sup>96</sup> En cambio, si posee una cadena carbonada corta, las interacciones del enzima con el soporte serán mayores restringiendo así su movilidad pero confiriendo una mayor estabilidad térmica a la proteína.

---

<sup>95</sup> J. M. S. Cabral, J. F. Kennedy, en *Protein Immobilization: Fundamentals and Applications*, Ed. R. F. Taylor, Marcel Dekker, Nueva York, **1991**.

<sup>96</sup> A. Basso, P. Braiuca, S. Cantone, C. Ebert, P. Linda, P. Spizzo, P. Caimi, U. Hanefeld, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 877-886.

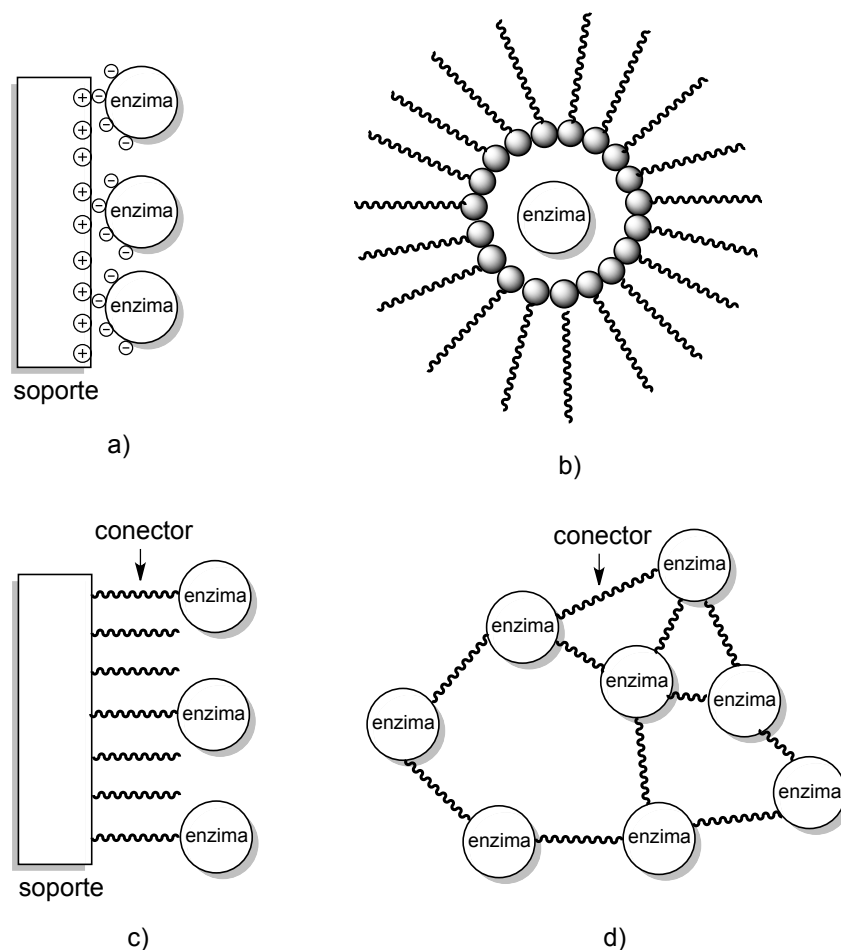
## Introducción

Dentro de este tipo de inmobilizaciones se puede incluir la realizada mediante *entrecruzamiento* (Figura 0.7d). Este es un caso extremo de unión covalente en el cual las proteínas en disolución se entrelazan entre sí empleando un agente químico bifuncionalizado, como por ejemplo el glutaraldehído, quedando unidas unas a otras mediante enlaces de tipo covalente. En este método, en lugar de anclar el enzima a un soporte externo, se forman agregados enzimáticos (en inglés “*Cross-Linked Enzyme Aggregates*”, CLEA) obviándose los problemas derivados del empleo de las resinas,<sup>88d,97</sup> aunque este método presenta como contrapartida una mayor probabilidad de pérdida en la actividad enzimática puesto que es una metodología que puede modificar en gran medida la estructura tridimensional del biocatalizador. Más recientemente se han desarrollado nuevos preparados que combinan el entrecruzamiento de más de un enzima, las llamadas combi-CLEAs.<sup>98</sup>

---

<sup>97</sup> L. Cao, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361-1364.

<sup>98</sup> (a) S. Van Pelt, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 397-404; (b) S. Dalal, M. Kapoor, M. N. Gupta, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *44*, 128-132.



**Figura 0.7.** Ejemplos de inmovilización enzimática. a) Inmovilización por enlace iónico. b) Encapsulamiento en el interior de micelas. c) Inmovilización covalente a través de un conector. d) Entrecruzamiento (por ej., CLEAs)

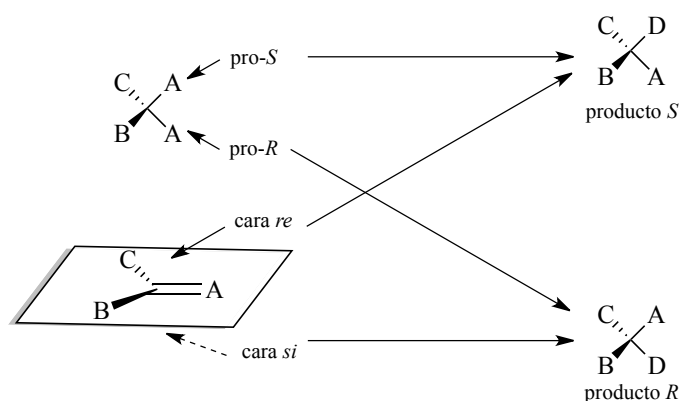
### 0.3. PROCESOS ASIMÉTRICOS CATALIZADOS POR ENZIMAS

Sintetizar un compuesto de interés con un rendimiento químico alto, y lo que es más importante, con una pureza enantiomérica elevada, rebajando los costes del proceso (reduciendo los tiempos y los requerimientos energéticos de la reacción o disminuyendo el número de pasos de la ruta sintética), son factores que en su conjunto expresan la rentabilidad y eficiencia en la obtención del producto deseado. Es por ello que se han desarrollado multitud de procesos (bio)catalíticos durante los últimos años empleando como base las metodologías ya conocidas, pero aumentando la eficiencia en la síntesis de compuestos enantioenriquecidos de interés. A continuación se comentarán las

estrategias más comunes empleadas en Biocatálisis para la obtención de derivados de manera enantiopura.<sup>99</sup>

### 0.3.1. Asimetrización: Compuestos *meso* y proquirales

La asimetrización de compuestos simétricos consiste en la eliminación de uno o varios de sus elementos de simetría (Esquema 0.17).<sup>100</sup> En el momento que esa simetría es eliminada, se forma un producto quiral, el cual se puede obtener con un rendimiento teórico del 100%. Dentro de los compuestos que pueden presentar elementos de simetría se encuentran moléculas proquirales como las cetonas o alquenos y compuestos *meso* como los diésteres, dioles y diaminas.



**Esquema 0.17.** Modificación de un compuesto *meso* o proquiral para la síntesis de un producto enantiopuro con un rendimiento máximo teórico del 100%

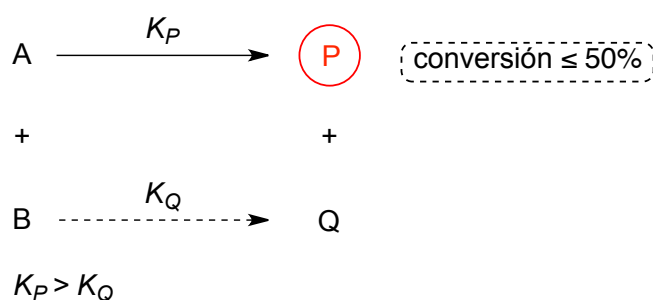
Ejemplos típicos de asimetrizaciones enzimáticas son la biorreducción de grupos carbonilo con alcohol deshidrogenasas, la oxidación de Baeyer-Villiger de cetonas o sulfoxidación de sulfuros catalizada por BVMOs, la reducción de dobles enlaces C=C mediante el uso de enoato reductasas, y la modificación de compuestos *meso* catalizada por lipasas, entre otros.<sup>100</sup>

<sup>99</sup> E. García-Urdiales, I. Lavandera, V. Gotor, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 43-66.

<sup>100</sup> (a) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* 2011, 111, PR110-PR180; (b) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* 2005, 105, 313-354.

### 0.3.2. Resolución cinética (KR, “Kinetic Resolution”)

Estadísticamente hablando, es mucho más probable la existencia de un compuesto en forma racémica que de un derivado proquiral o en su forma *meso*, por lo que son necesarias metodologías que sean eficientes para resolver racematos.<sup>101</sup> Históricamente, los primeros procesos desarrollados estaban relacionados con el empleo de resoluciones cinéticas.<sup>102</sup> La base de esta metodología es la diferente velocidad de reacción que existe entre dos enantiómeros de un racemato cuando reaccionan en un entorno quirral (en este caso el biocatalizador). Así, cada enantiómero del sustrato se transforma en el correspondiente producto enantiomérico. Para conseguir una buena resolución cinética la velocidad de reacción de un enantiómero ha de ser mucho mayor que la del otro ( $K_P > K_Q$ ). Además, la reacción tiene que ser *cuasi*-irreversible para conseguir una buena resolución (Esquema 0.18). Puesto que este proceso implica la transformación selectiva de uno de los dos enantiómeros, esto conlleva la limitación intrínseca de la obtención del producto final enantiopuro con una conversión máxima teórica del 50%, lo que comporta, además de una disminución en el rendimiento aislado del producto de interés, a la más que probable dificultad en su separación del sustrato de partida remanente. Ejemplos de este tipo de transformación son las resoluciones de alcoholes, aminas o ésteres racémicos catalizadas por lipasas o la oxidación selectiva de alcoholes secundarios empleando ADHs.



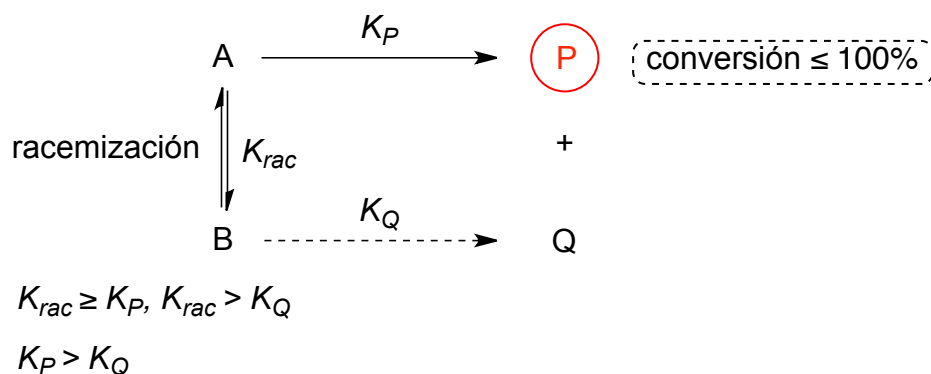
**Esquema 0.18.** Resolución cinética de una mezcla racémica. *A* y *B* son enantiómeros; *P* y *Q* son enantiómeros

<sup>101</sup> C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789-1805.

<sup>102</sup> H. B. Kagan, J. C. Fiaud, *Top. Stereochem.* **1988**, *18*, 249-330.

### 0.3.3. Resolución cinética dinámica (DKR, “Dynamic Kinetic Resolution”)

En este caso se combina una resolución cinética con la racemización *in situ* del enantiómero remanente del sustrato de partida, obteniéndose en teoría el producto enantiopuro con un rendimiento máximo teórico del 100% (Esquema 0.19).<sup>103</sup> Las metodologías más empleadas para llevar a cabo la racemización se basan en el uso de metales de transición, como por ejemplo el catalizador de Shvo,<sup>104</sup> de racemasas,<sup>105</sup> o a causa del propio medio de reacción en el caso de sustratos que posean, por ejemplo, un protón con carácter ácido.<sup>106</sup> En el caso de utilizar un catalizador para la racemización, este no debe reaccionar con el producto final, y tanto el proceso de racemización como la biotransformación han de ser compatibles en las condiciones del proceso.<sup>107</sup> Además, para poder llevar a cabo una resolución cinética dinámica satisfactoriamente, la velocidad de racemización ha de ser mayor que la velocidad de reacción del biocatalizador con el enantiómero desfavorecido.



**Esquema 0.19.** Resolución cinética dinámica de una mezcla racémica para obtener un producto enantioméricamente puro con un rendimiento máximo teórico del 100%. A y B son enantiómeros; P y Q son enantiómeros

<sup>103</sup> Revisiones recientes: (a) H. Pellisier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769-3802; (b) H. Pellisier, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 659-676; (c) N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115-121; (d) M.-J. Kim, J. Park, Y. K. Choi, en *Multi-Step Enzyme Catalysis*, Ed. E. García-Junceda, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 1-19; (e) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, en *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 89-113.

<sup>104</sup> Y. Shvo, D. Czarkie, Y. Rahamim, D. F. Chodosh, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7400-7402.

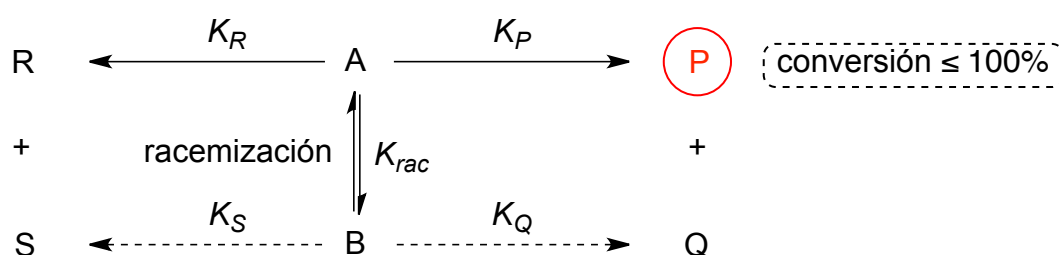
<sup>105</sup> B. Schnell, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 653-666.

<sup>106</sup> C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1121-1125.

<sup>107</sup> I. Hussain, J. E. Bäckvall, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1777-1806.

Dentro de este tipo de sistemas dinámicos, sin lugar a duda el ejemplo más representativo es la resolución de alcoholes o aminas racémicas empleando un catalizador metálico de rodio o iridio junto con la resolución enzimática utilizando una lipasa, obteniendo los correspondientes ésteres o amidas enantioenriquecidos con conversiones excelentes.<sup>103</sup>

Hay otras resoluciones cinéticas dinámicas en las que cada enantiómero del sustrato de partida puede transformarse enzimáticamente en dos productos (diastereoisómeros) diferentes, con lo que pueden obtenerse hasta cuatro derivados estereoisoméricos diferentes (en el Esquema 0.20, el enantiómero A puede transformarse en dos diastereoisómeros diferentes como son P y R mientras que el enantiómero B da lugar a la formación de los diastereoisómeros Q y S). En este caso, como en una resolución cinética dinámica convencional, en condiciones óptimas el producto final P se puede obtener con un rendimiento máximo teórico del 100% frente a la formación de los otros tres posibles productos. Un ejemplo típico es la biorreducción de  $\beta$ -cetoésteres sustituidos en posición  $\alpha$ , pudiéndose obtener cuatro isómeros de los  $\beta$ -hidroxiésteres  $\alpha$ -sustituidos productos de la reacción. Recientemente, este tipo de resolución se puede encontrar en la bibliografía denotada como resolución cinética dinámica reductiva (DYRKR, del inglés “*Dynamic Reductive Kinetic Resolution*”).<sup>108</sup>



$$K_{rac} \geq K_P, K_{rac} > K_Q, K_{rac} > K_R, K_{rac} > K_S$$

$$K_P > K_Q, K_P > K_R, K_P > K_S$$

**Esquema 0.20.** Resolución cinética dinámica de una mezcla racémica para obtener un producto diastereomericamente puro con un rendimiento máximo teórico del 100%. A y B son enantiómeros; P y Q son enantiómeros; R y S son enantiómeros; P/Q y R/S son diastereoisómeros

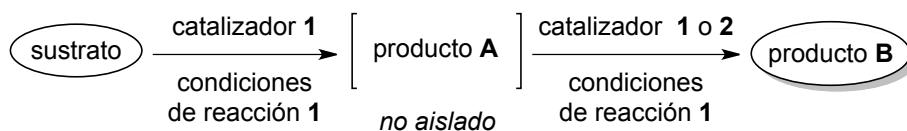
<sup>108</sup> J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930-5931.



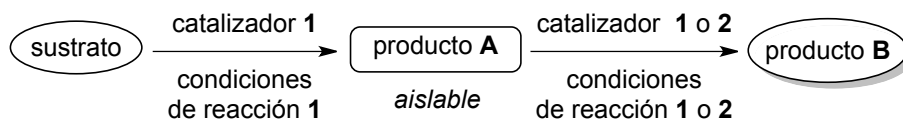
### 0.3.4. Catálisis concurrente. Procesos tándem y en cascada

Los procesos en los que varias reacciones se combinan en una única operación están siendo hoy en día ampliamente reconocidos por los químicos sintéticos y por tal motivo cualquier desarrollo en esta dirección se tiene muy en cuenta, de ahí el gran número de publicaciones que aparecen al respecto.<sup>109</sup> En este ámbito, la catálisis concurrente<sup>110</sup> puede definirse como aquella en la que existe una acción, que puede ser cooperativa, de dos o más ciclos catalíticos en un único reactor. En estos casos, cada uno de los catalizadores debe ser compatible con los sustratos, intermedios y demás reactivos presentes, y además deben ser lo más selectivos posible en la secuencia de reacciones. Por estos motivos, este tipo de sistemas constituyen un gran desafío para los químicos de síntesis y ofrece muchas oportunidades para mejorar una transformación química compleja. Cuando se logra que varios catalizadores trabajen de manera simultánea, se disminuyen las pérdidas de rendimiento y tiempo comúnmente asociadas al aislamiento de los productos intermedios, hechos que se traducen en una disminución de los costes globales.

#### **dominó o cascada**



#### **tándem o por pasos**



**Esquema 0.21.** Representación general de los tipos de transformaciones concurrentes

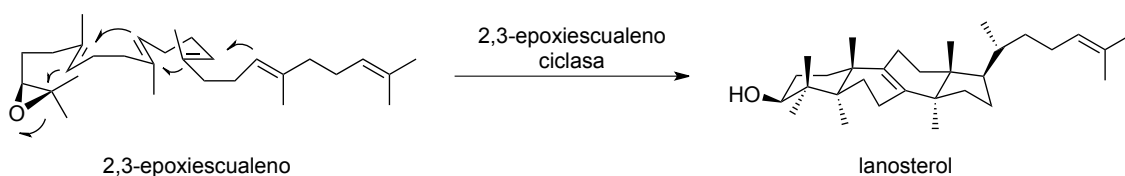
<sup>109</sup> Revisiones recientes: (a) E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2239-2262; (b) J. H. Schrittwieser, J. Sattler, V. Resch, F. G. Mutti, W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 249-256; (c) F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor, en *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2011**, pp. 1-20; (d) *Multi-step Enzyme Catalysis*, Ed. E. García-Junceda, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**; (e) J.-C. Wasilke, S. J. Obrey, R. T. Baker, G. C. Bazán, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1001-1020.

<sup>110</sup> Dícese de dos o más procesos catalíticos que tienen lugar al mismo tiempo o en paralelo (del inglés, “concurrent catalysis”, y este del latín *concurrere*-concurrent del verbo *concurrere*: coincidir).

Una característica que no debe desestimarse en este tipo de sistemas, es que en los casos de reacciones limitadas termodinámicamente, estas pueden acoplarse a otras muy favorecidas y de esta manera conseguir que ambos procesos tengan lugar con éxito.<sup>109</sup> Es muy frecuente encontrar en la bibliografía científica transformaciones químicas bajo el nombre de procesos *en cascada*, *dominó* o *tándem* (Esquema 0.21). A menudo, estos términos se emplean de manera indiscriminada incluso a lo largo del mismo manuscrito. Este tipo de procesos ocurren en un mismo reactor, lo que en inglés se denomina “*one-pot*”.

#### 0.3.4.1. Procesos en cascada o dominó

Estos procesos tienen lugar cuando el material de partida sufre una transformación en la que dos o más reacciones ocurren una a continuación de la otra de manera inseparable. Como consecuencia, las reacciones individuales son muy difícilmente llevadas a cabo de manera independiente. Por esta razón, el producto de la primera reacción es generalmente inestable y a menudo su aislamiento y caracterización no es posible. Al ser tan inestable, dicho intermedio evoluciona rápidamente hacia el producto final (o hacia el siguiente intermedio) sin acumularse y así se evitan en gran medida reacciones secundarias, dando lugar generalmente a procesos globales con buenos rendimientos. En la naturaleza, los sistemas multienzimáticos constituyen un ejemplo soberbio de catálisis concurrente en un medio acuoso, como por ejemplo la biosíntesis de policétidos,<sup>111</sup> o la compleja red de reacciones que tienen lugar en la duplicación del ADN.<sup>112</sup> Otro buen ejemplo es la formación en cascada del lanosterol a partir del 2,3-epoxiesqualeno (Esquema 0.22).<sup>113</sup>



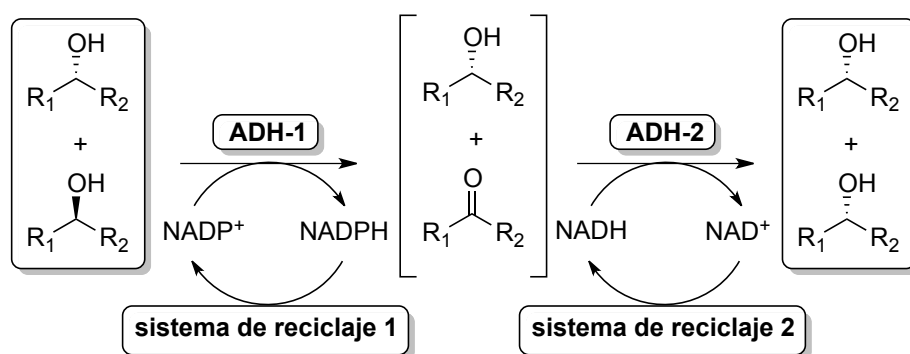
**Esquema 0.22.** Proceso en cascada en la biosíntesis del lanosterol

<sup>111</sup> C. Khosla, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2577-2590.

<sup>112</sup> D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 4ª Ed., W.H. Freeman, Nueva York, **2004**.

<sup>113</sup> (a) E. J. Corey, S. C. Virgil, D. R. Liu, S. Sarshar, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1524-1525; (b) E. J. Corey, S. C. Virgil, S. Sarshar, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8171-8172; (c) E. J. Corey, S. C. Virgil, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4025-4026.

Un ejemplo elegante de procesos en cascada multienzimáticos involucra la desracemización de diversos alcoholes secundarios utilizando dos ADHs de estereoselectividad opuesta usando dos sistemas de regeneración del cofactor independientes, uno ligado al reciclado del NADH y el otro al del NADPH (Esquema 0.23).<sup>114</sup> Así, partiendo de una mezcla racémica de alcoholes secundarios se consigue superar la limitación intrínseca de toda resolución cinética, pudiéndose obtener los alcoholes con rendimientos cuantitativos y excesos enantioméricos (*ees*) excelentes (>99%).



**Esquema 0.23.** Sistema en cascada empleando dos ADHs enantiocomplementarias para desracemizar alcoholes secundarios

#### 0.3.4.2. Procesos *tándem* o *por pasos*

En este caso, los procesos también tienen lugar de manera consecutiva, pero puesto que las condiciones de reacción pueden variar entre etapa y etapa, en ocasiones son considerados como transformaciones *por pasos*. Así, cada una de las reacciones puede llevarse a cabo por separado y cada intermediario es, al menos, relativamente estable como para poder ser aislado y caracterizado.

De hecho, algunos autores diferencian estos procesos de aquellos en cascada de acuerdo a la estabilidad del intermedio.<sup>115</sup> Otros, con una perspectiva eminentemente práctica, no profundizan en tal separación, resaltando la calidad o elegancia de una ruta sintética más que la estricta clasificación del proceso en cuestión. Para estos últimos la

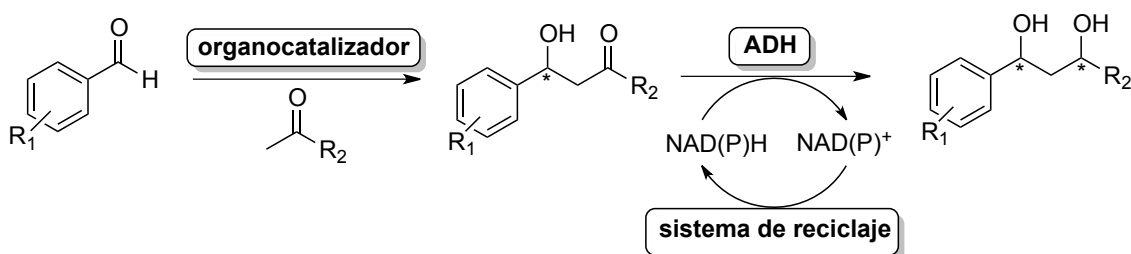
<sup>114</sup> (a) C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Synlett* **2010**, 991-998; (b) C. V. Voss, C. C. Gruber, K. Faber, T. Knaus, P. Macheroux, W. Kroutil, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969-13972.

<sup>115</sup> S. E. Denmark, A. Thorarensen, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 137-166.

## Introducción

única diferencia desde el punto de vista del operador es el cambio de alguna condición experimental o el añadido de uno o más reactivos o catalizadores tanto en la *iniciación* (procesos dominó o en cascada) como en la *propagación* hacia la segunda reacción (procesos tándem o consecutivos).<sup>116</sup>

Durante los últimos años el estudio de estrategias más eficientes ha conllevado el desarrollo de procesos en los que se combinan múltiples biocatalizadores en varios pasos, o un enzima con un catalizador orgánico o un complejo metálico (sin tener en cuenta las ya mencionadas DKRs). Un buen ejemplo es la obtención de 1,3-dioles diastereoméricamente puros por combinación de una oxidorreductasa y un organocatalizador (Esquema 0.24).<sup>117</sup> En un primer paso, un catalizador quiral derivado de prolina genera la hidroxicetona producto de la condensación aldólica para seguidamente, en un segundo paso, obtener el diol enantioenriquecido a través de una biorreducción con una ADH. En función de la estereopreferencia de los catalizadores se puede obtener uno de los cuatro posibles diastereoisómeros con buenas conversiones y excesos enantio- y diastereoméricos excelentes.



**Esquema 0.24.** Proceso tándem combinando una reacción aldólica catalizada por un derivado de prolina y una alcohol deshidrogenasa para obtener 1,3-dioles quirales

<sup>116</sup> T. Hudlicky, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3-30.

<sup>117</sup> K. Baer, M. Kraußer, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *49*, 9355-9359.



Parte I

INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA



## OBJETIVOS





El trabajo realizado durante los últimos años y que ha sido plasmado en esta Memoria se ha encaminado a cumplir los objetivos iniciales fijados, así como nuevas metas que se han ido proponiendo a lo largo del desarrollo de esta Tesis Doctoral. A continuación, se muestran los objetivos generales perseguidos en el primer bloque:

Desarrollar una síntesis de nuevos derivados de polifosfaceno a través de una ruta sencilla y eficaz para su posterior estudio en la aplicación de estos polímeros como soportes de biocatalizadores.

Optimizar la inmovilización covalente de varias enzimas: la alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus ruber* ADH-A, la lipasa de tipo B de *Candida antarctica*, y la fenilacetona monooxigenasa de *Thermobifida fusca* (PAMO). Optimizar para ello la activación del soporte utilizando glutaraldehído como conector entre el polifosfaceno y la proteína además de verificar que el biocatalizador se encuentra unido covalentemente y no debido a uniones inespecíficas.

En el caso de la PAMO, realizar la co-inmovilización de esta junto con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa necesaria para reciclar el cofactor NADPH con el fin de generar un biocatalizador redox autosuficiente.

Demostrar que los nuevos catalizadores pueden ser reutilizados durante varios ciclos de reacción sin un descenso en su actividad enzimática y comprobar que la selectividad del enzima no varía en comparación con la de la proteína en disolución.

Estudiar la estabilidad de la alcohol deshidrogenasa ADH-A inmovilizada realizando un estudio de su actividad enzimática vs tiempo de almacenamiento y comprobar la actividad del biocatalizador redox autosuficiente para llevar a cabo biooxidaciones.



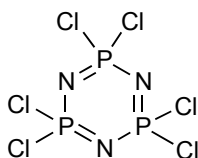
ANTECEDENTES



## I.1. POLIFOSFACENOS

### I.1.1. Introducción a los polifosfacenos

Mientras que el inicio de los estudios dentro del campo de los fosfacenos data del año 1834 gracias a los descubrimientos pioneros de Liebig y Wöhler<sup>118</sup> y de Rose,<sup>119</sup> el estudio de los polímeros derivados de fosfacenos no comenzó hasta finales del siglo XIX, cuando Stokes sugirió una estructura cíclica trimérica para el derivado  $(\text{NPCl}_2)_3$  (Figura I.1),<sup>120</sup> y demostró que al calentarse dicho compuesto se formaba un material plástico y deformable al que llamó ‘goma inorgánica’. También demostró que si se calentaba a altas temperaturas y a presión reducida, dicho material se descomponía revirtiendo de nuevo al trímero inicial.



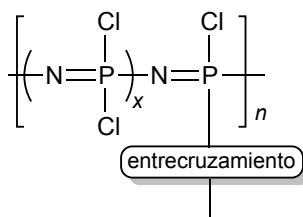
**Figura I.1.** Trímero cíclico de  $(\text{NPCl}_2)_3$

<sup>118</sup> J. Liebig, F. Wöhler, *Ann. Chem.* **1834**, *11*, 139.

<sup>119</sup> H. Rose, *Ann. Chem.* **1834**, *11*, 131.

<sup>120</sup> H. N. Stokes, *Am. Chem. J.* **1897**, *19*, 782-796.

Durante los siguientes 40 años dicha ‘goma inorgánica’ apenas fue mencionada nada más que como mera curiosidad científica, hasta que Meyer y Mark, entre los años 1920 y 1930, demostraron que el compuesto era en realidad una macromolécula lineal tal como había predicho Staudinger.<sup>121</sup> Este hecho fue confirmado mediante estudios de difracción de rayos X que sugerían la existencia de un compuesto de largas cadenas poliméricas con una unidad estructural básica que se repetía (Figura I.2).<sup>122</sup>



**Figura I.2.** Unidad estructural de la ‘goma inorgánica’

Uno de los principales problemas del polímero era su inestabilidad en agua, y dicha propiedad fue usada por Allcock<sup>123</sup> para hacerlo reaccionar con diferentes nucleófilos con diversos grupos orgánicos hidrolíticamente estables, aprovechando la gran reactividad de los enlaces P-Cl. Así, este derivado pudo ser usado como precursor de una gran variedad de polímeros.

Otra de las desventajas del compuesto precursor era su gran insolubilidad en la mayoría de los disolventes. Así, aunque en ocasiones no llegaba a disolverse, atrapaba moléculas del disolvente con lo que se hinchaba, del mismo modo que hacen los polímeros entrecruzados. Es por ello que para obtener el mayor porcentaje posible del polifosfaceno lineal se tuvieron que optimizar los diferentes parámetros de reacción tales como el tiempo, la temperatura y la pureza del trímero inicial, llegándose a obtener hasta un 70% del polímero esencialmente de carácter lineal.<sup>124</sup> Este precursor sí era completamente soluble en diferentes disolventes orgánicos tales como benceno, tetrahidrofurano (THF) o tolueno. Cuando se sometía a un mayor calentamiento, dicho polímero se entrecruzaba dando lugar de nuevo a la ‘goma inorgánica’ descrita por Stokes. En los años posteriores, esta ha sido la metodología usada para preparar nuevos

<sup>121</sup> H. Staudinger, *Chem. Ber.* **1920**, 53, 1073-1085.

<sup>122</sup> K. H. Meyer, W. Lotmar, G. W. Pankow, *Helv. Chim. Acta* **1936**, 19, 930-948.

<sup>123</sup> (a) H. R. Allcock, R. L. Kugel, K. J. Valan, *Inorg. Chem.* **1966**, 5, 1709-1715; (b) H. R. Allcock, R. L. Kugel, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 4216-4217.

<sup>124</sup> H. R. Allcock, R. J. Best, *Can. J. Chem.* **1964**, 42, 447-455.

tipos de polifosfacenos por reacción del precursor lineal con diferentes nucleófilos tales como alcoholes, fenoles y aminas primarias o secundarias, entre otros.



**Figura I.3.** a) Estructura general de un fosfaceno. b) Fórmula estructural de la mayoría de los polifosfacenos y oligómeros cíclicos derivados de fosfaceno

Llegados a este punto, se puede definir a un *fosfaceno* como aquella molécula que contiene átomos de fósforo y nitrógeno unidos entre ellos mediante enlaces covalentes insaturados (Figura I.3a). Estas unidades pueden encontrarse unidas dando lugar a cadenas o anillos. En el caso de que las cadenas obtenidas formen macromoléculas de gran tamaño se denominan *polifosfacenos* (Figura I.3b).<sup>125</sup> Un polímero es una macromolécula con estructura de cadena larga formada por cientos o miles de unidades estructurales que se repiten y se encuentran enlazadas unas a otras. Así, los más conocidos poseen un esqueleto interno carbonado y unidos a él están los residuos de las cadenas laterales que pueden ser de naturaleza muy diversa. Ejemplos clásicos son el polietileno, el polipropileno, el poliestireno, el nylon y los poliésteres.<sup>126</sup> A diferencia de ellos, los polifosfacenos poseen un esqueleto interno de naturaleza ‘inorgánica’, es decir, átomos de fósforo y nitrógeno unidos entre sí, y a su vez enlazados a través del átomo de fósforo a las cadenas laterales, que pueden poseer grupos de tipo orgánico, organometálico o inorgánico.

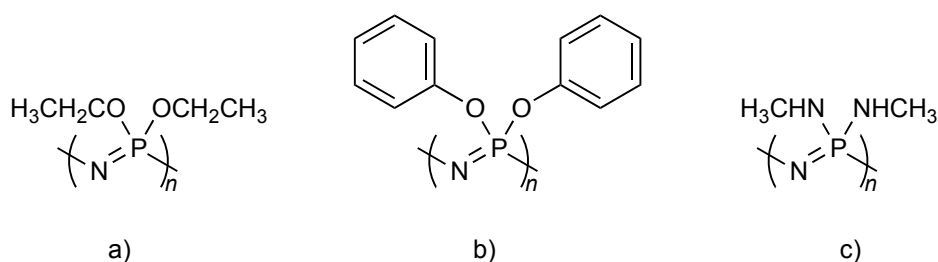
La estructura representada en la Figura I.3b donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos orgánicos, engloba a la gran mayoría de los polifosfacenos descritos hasta la fecha. Dichas macromoléculas pueden contener 15.000 o más unidades (*n*). Esto significa que dependiendo de los grupos laterales existentes, su peso molecular puede variar entre 2 y 10 millones de Daltons. No obstante, también se puede acceder a polímeros de bajo

<sup>125</sup> (a) *Synthesis and Applications of Poly(organophosphazenes)*, Eds. M. Gleria, R. De Jaeger, Nova Sci., Nueva York, **2004**; (b) H. R. Allcock, *Chemistry and Applications of Polyphosphazenes*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2003**.

<sup>126</sup> (a) G. Odian, *Principles of Polymerization*, 3ª Ed., Wiley-Interscience, Nueva York, **1991**; (b) H. R. Allcock, F. W. Lampe, *Contemporary Polymer Chemistry*, 2ª Ed., Prentice-Hall, Nueva Jersey, **1990**.



peso molecular y su polidispersión puede variar dependiendo del método de síntesis empleado. Entre los diversos polifosfacenos descritos existen solo pequeñas diferencias estructurales en la cadena principal, aunque sus propiedades cambian enormemente dependiendo de los grupos de las cadenas laterales. Algunos ejemplos se muestran en la Figura I.4.



**Figura I.4.** a) Polímero elastómero. b) Forma películas microcristalinas. c) Polímero soluble en agua

Los polifosfacenos poseen una gran aplicabilidad en muchos campos, ya que pueden ser usados como elastómeros, como aislantes tanto térmicos como eléctricos, así como materiales para fibra óptica, material biomédico,<sup>127</sup> electrolitos sólidos de batería y materiales de soporte, entre otros.

A efectos de representación, los enlaces de unión en la cadena principal del polifosfaceno se muestran como una serie alternada de enlaces simples y dobles. Sin embargo, mediciones estructurales sugieren que todos los enlaces a lo largo del esqueleto del polímero son iguales o muy semejantes en longitud, pero a diferencia de las moléculas carbonadas poliinsaturadas no poseen conjugación electrónica a lo largo de la cadena.

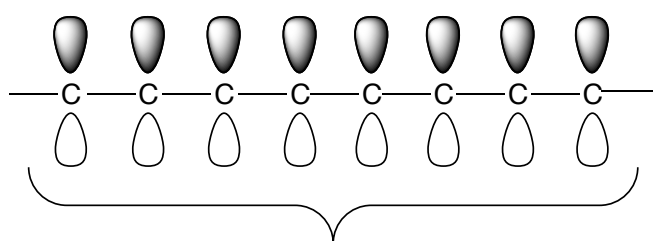
### I.1.2. Características de los polifosfacenos

Algunas de las características y propiedades principales que hacen de los polifosfacenos materiales interesantes para su investigación y desarrollo son debidas al esqueleto inorgánico que confiere unas propiedades especiales que en el caso de los polímeros orgánicos son muy difíciles o imposibles de obtener:

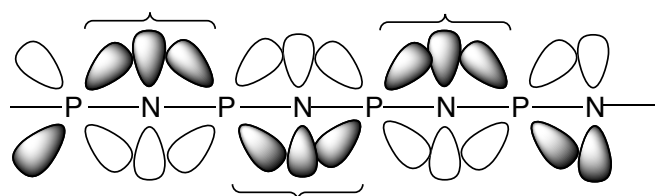
<sup>127</sup> (a) I. Teasdale, O. Brüggemann, *Polymers* **2013**, *5*, 161-187; (b) *Polyphosphazenes for Biomedical Applications*, Ed. A. K. Andrianov, John Wiley & Sons, Hoboken, **2009**.

- Como ya se ha comentado anteriormente, no poseen conjugación electrónica a lo largo del esqueleto interno. Esto es debido a que las deslocalizaciones electrónicas tan solo tienen lugar en puntos concretos de la cadena, y no se extienden a todo el conjunto como en el caso de los polímeros orgánicos insaturados conjugados (Figura I.5). Esta característica hace que los polifosfacenos puedan actuar como aislantes eléctricos.
- Además, las cadenas laterales pueden ser de muy distinta naturaleza y fácilmente intercambiables mediante técnicas sintéticas conocidas. Las propiedades del polímero varían en gran medida de uno a otro con lo que podemos diseñar la síntesis de un derivado determinado en función de las características deseadas de elasticidad, estabilidad térmica, resistencia frente a determinados agentes químicos, utilidad biológica, etc.
- Así, destaca también su posible compatibilidad con sistemas biológicos, su gran resistencia al fuego, su alta flexibilidad, su transparencia en el UV cercano y su estabilidad frente a radiaciones de tipo gamma.

En resumen, los polifosfacenos representan una opción atractiva como material para el estudio y desarrollo de polímeros de naturaleza inorgánica y su posible aplicación como soporte de biomoléculas.



a) deslocalización electrónica extensiva

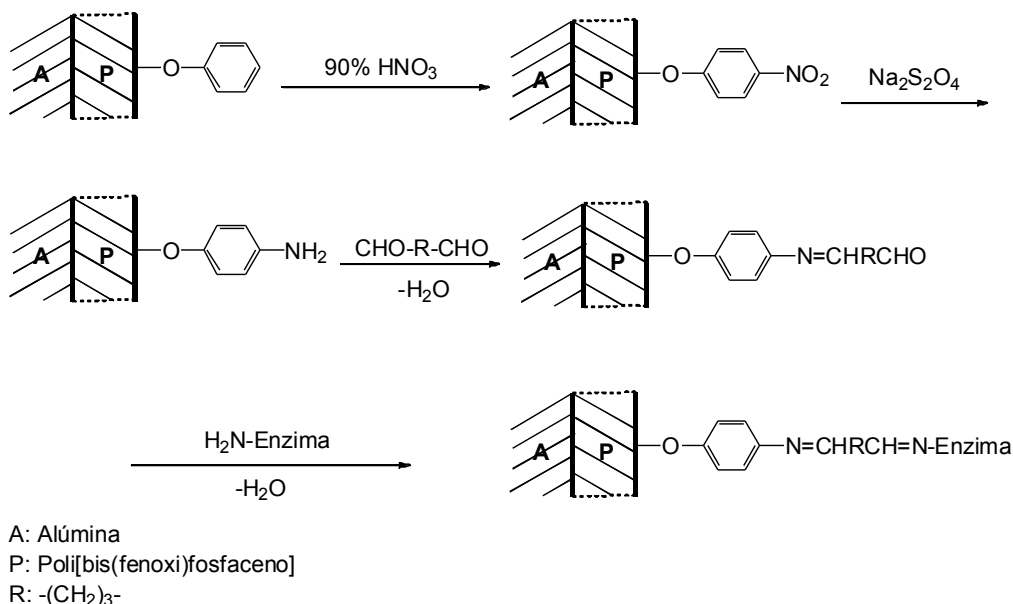


b) deslocalización electrónica en puntos aislados

**Figura I.5.** Ejemplo de deslocalización electrónica en: a) polímeros orgánicos insaturados; b) polifosfacenos.

## I.2. POLIFOSFACENOS COMO SOPORTES DE BIOCATALIZADORES

En cuanto a la utilización de polifosfacenos como soportes para inmovilizar enzimas, hay que reseñar que no existen muchos ejemplos descritos en la bibliografía. Así, en un primer artículo Kwon y Allcock lograron la inmovilización de la tripsina o la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en una superficie de  $[NP(OPh)_2]_n$  anclada a su vez sobre partículas de alúmina (Esquema I.1),<sup>128</sup> de un diámetro de entre 100 y 300 Å, para posteriormente llevar a cabo la nitración del polifosfaceno. Los grupos nitro obtenidos fueron reducidos a las correspondientes aminas que a su vez fueron tratadas con glutaraldehído para realizar la posterior unión con los biocatalizadores.



**Esquema I.1.** Proceso de inmovilización covalente de tripsina o G6PDH sobre un polifosfaceno

Hay que reseñar que el rendimiento obtenido en la inmovilización no superó el 10% en ninguno de los dos casos. A pesar de ello, los enzimas anclados mostraron una retención de la actividad durante períodos de tiempo mayores que cuando se encontraban simplemente adsorbidos al soporte o en disolución. También se comprobó que podían ser reutilizados durante varios ciclos sin que disminuyese apreciablemente su actividad.

<sup>128</sup> H. R. Allcock, S. Kwon, *Macromolecules* **1986**, *19*, 1502-1508.

Matsuki y Saiki consiguieron inmovilizar una invertasa sobre partículas esféricas de  $[\text{NP}(\text{OCH}_2\text{CF}_3)_2]_n$  mediante el desplazamiento de los residuos trifluoroetoxi con  $\text{NaOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ , seguido de la activación de los grupos amino con  $n\text{-Bu}_4\text{NBr}$  y posterior anclaje del enzima, obteniéndose una buena actividad para la proteína inmovilizada.<sup>129</sup>

Los polifosfacenos también han sido usados como soportes enzimáticos mediante la formación de hidrogeles. Así, Allcock y colaboradores<sup>130</sup> consiguieron encapsular una ureasa en un hidrogel de poli[bis(metoxietoxietoxi)fosfaceno]. El procedimiento empleado consistió en mezclar una disolución acuosa del enzima y otra del polifosfaceno, para posteriormente evaporar el agua e irradiar la mezcla con rayos de tipo gamma para llevar a cabo el entrecruzamiento del polímero, para por último realizar una rehidratación y obtener así el gel con el biocatalizador encapsulado. Se observó que la ureasa no se desprendía del mismo y además presentaba una buena actividad remanente a pesar del proceso de radiación. Otros polifosfacenos han sido utilizados también como soporte de otras moléculas bioactivas tales como inmunoglobulinas<sup>131</sup> o catecolaminas.<sup>132</sup>

El hecho de poseer un esqueleto interno compuesto por átomos de fósforo y nitrógeno confiere una flexibilidad especial al polifosfaceno que en ocasiones es un inconveniente, ya que las cadenas tienden a replegarse y formar ovillos, disminuyendo así la superficie del polímero accesible para la inmovilización. Así, se ha preparado una nanofibra de poli[bis(*p*-metilfenoxi)]fosfaceno como membrana exterior y un núcleo de poliacrilonitrilo (mediante una técnica llamada electrohilado coaxial), que se ha empleado como soporte enzimático de la lipasa de *Candida rugosa* utilizando la técnica de adsorción enzimática. Con esta metodología la nanofibra sintetizada logró conferir una mayor estabilidad a la estructura del soporte y la lipasa inmovilizada mantuvo una actividad remanente del 64%.<sup>133</sup>

---

<sup>129</sup> T. Matsuki, N. Saiki, *Patente japonesa*, 9 pp., JP 01030650, CAN 112:32652, **1989**.

<sup>130</sup> H. R. Allcock, S. R. Pucher, K. B. Visscher, *Biomater.* **1994**, *15*, 502-506.

<sup>131</sup> H. R. Allcock, C. J. Nelson, W. D. Coggio, *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 516-524.

<sup>132</sup> H. R. Allcock, W. C. Hymer, P. E. Austin, *Macromolecules* **1983**, *16*, 1401-1406.

<sup>133</sup> S.-G. Wang, X. Jiang, P.-G. Chen, A.-G. Yu, X.-J. Huang. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 14136-14148.

### I.3. INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE ALCOHOL DESHIDROGENASAS

El anclaje de lipasas se ha descrito en multitud de ocasiones debido a su fácil accesibilidad y gran estabilidad,<sup>134</sup> mientras que la inmovilización de alcohol deshidrogenasas sobre soportes poliméricos a través de métodos de adsorción ha sido también relativamente estudiada. Sin embargo, los casos de inmovilización de ADHs por enlaces covalentes son más escasos siendo aún un campo de investigación poco explorado. Algunos de los ejemplos más representativos descritos hasta ahora en la bibliografía se muestran a continuación.

El primer ejemplo publicado en este sentido<sup>135</sup> fue en el año 2001 cuando se inmovilizó una alcohol deshidrogenasa de levadura (YADH) sobre quitosano utilizando glutaraldehído como conector. Con esta metodología se observó que la YADH retenía un 24% de su actividad. Pese a que el enzima anclado mostró un aumento de la estabilidad con respecto a la proteína en disolución, en 6-8 ciclos de reutilización se perdió un 50% de actividad.

Posteriormente, Hildebrand y Lütz<sup>136</sup> lograron inmovilizar la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* (LBADH) a un soporte funcionalizado de tipo amino-epoxi Sepabeds®. Esta preparación presentaba una actividad remanente del 15%, conservándola durante al menos un mes si era almacenada adecuadamente a una temperatura de 4°C. Con el fin de aumentar la estabilización del enzima se desarrollaron dos metodologías: por una parte, el bloqueo de los grupos epóxido sin reaccionar con glicina o mercaptoetanol para así evitar interacciones desestabilizantes con la proteína, y por otra parte, un posterior entrecruzamiento de las proteínas ya inmovilizadas mediante la adición de glutaraldehído.

Guisán y colaboradores<sup>137</sup> mostraron la inmovilización covalente de la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH) sobre un soporte de agarosa

---

<sup>134</sup> Revisiones recientes: (a) S. Cantone, P. Spizzo, D. Fattor, V. Ferrario, C. Ebert, L. Gardossi, *Chim. Oggi* **2012**, *30*, 10-14; (b) M. Marciello, M. Filice, J. M. Palomo, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1531-1543.

<sup>135</sup> S. Soni, J. D. Desai, S. Devi, *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *82*, 1299-1305.

<sup>136</sup> F. Hildebrand, S. Lütz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 3219-3225.

<sup>137</sup> J. M. Bolivar, L. Wilson, S. A. Ferrarotti, J. M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, C. Mateo, *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 85-94.

derivatizado en su forma glioxilada o con bromuro de cianógeno, consiguiendo una mejora importante en la estabilización del enzima frente a variaciones de pH, temperatura y utilización de disolventes orgánicos sobre todo en el primer caso. El mismo grupo realizó la inmovilización de una alcohol deshidrogenasa proveniente de la especie *Thermus thermophilus* HB27 clonada en *E. coli* sobre diversos soportes.<sup>138</sup> En este caso se observó que la inmovilización covalente de la ADH mediante el uso de diversas técnicas mejoraba la estabilidad enzimática entre 5 y 10 veces, aunque se obtuvieron mejores resultados cuando se adsorbió sobre un intercambiador de tipo iónico. Recientemente este enzima, aislado de un organismo termófilo (su temperatura óptima de reacción es 65°C) y que posee una selectividad anti-Prelog con aril cetonas, ha sido inmovilizado covalentemente sobre una matriz de agarosa activada con grupos glioxílicos mejorándose 200 veces su estabilidad en comparación con la proteína en disolución.<sup>139</sup>

La HLADH junto con la cetoreductasa comercial KRED117 fueron inmovilizadas covalentemente sobre partículas de sílica de diferentes tamaños utilizando varios grupos conectores.<sup>140</sup> Para ser buenos biocatalizadores, la afinidad por el soporte fue elevada (>80% de enzima inmovilizado), pero en todos los casos la actividad del biocatalizador anclado fue menor en comparación con la actividad mostrada en disolución. Además se observó que las partículas de sílica ejercían un acusado efecto en la conformación del enzima inmovilizado causando cambios estructurales y la consiguiente desnaturalización del biocatalizador.

Una buena solución para mejorar la estabilidad del enzima una vez que está unido al soporte se basa en la utilización de un polímero como conector en un proceso de entrecruzamiento entre las proteínas. Esta técnica se usó para inmovilizar una alcohol deshidrogenasa de levadura de panadería (ADH Y), la cual pese a ostentar una elevada actividad, solo es estable en unas condiciones de reacción determinadas.<sup>141</sup> Así, tras anclar la proteína mediante adsorción o por enlaces de tipo iónico al soporte, la actividad remanente permanecía entorno al 80-100% de la proteína en disolución

---

<sup>138</sup> J. Rocha-Martín, D. E. Vega, Z. Cabrera, J. M. Bolívar, R. Fernández-Lafuente, J. Berenguer, J. M. Guisán, *Process Biochem.* **2009**, *44*, 1004-1012.

<sup>139</sup> J. Rocha-Martín, D. Vega, J. M. Bolívar, A. Hidalgo, J. Berenguer, J. M. Guisán, F. López-Gallego, *Bioresour. Technol.* **2012**, *103*, 343-350.

<sup>140</sup> G. A. Petkova, K. Zárumba, V. Král, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 792-801.

<sup>141</sup> J. M. Bolívar, J. Rocha-Martín, C. Mateo, J. M. Guisán, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 679-686.

aunque su estabilidad no mejoraba. Además, si se realizaba el anclaje covalente del biocatalizador por varios puntos de unión, el enzima se inactivaba por completo. El mejor resultado se obtuvo al enlazar el biocatalizador de manera covalente sobre un soporte de agarosa activado con grupos glioxílicos en presencia de *N*-acetil-L-cisteína. En este caso, la actividad del enzima tan solo era del 25% pero su estabilidad térmica era 50 veces mejor que la del biocatalizador en disolución. Tras ello, el enzima anclado se trató con un polímero (polietilenimina) quedando entrecruzado, confiriéndole una mayor rigidez estructural con la consiguiente mejora de la estabilidad térmica (entorno a unas 500 veces más estable que la proteína en disolución).

#### I.4. INMOVILIZACIÓN DE BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASAS

La inmovilización de este tipo de enzimas se encuentra aún en las primeras fases ya que hasta el momento ninguna de las metodologías descritas hasta ahora ha mostrado tener una aplicación real a gran escala debido a problemas de estabilidad y actividad de los biocatalizadores.<sup>42b</sup> De todas formas, cabe señalar algunos ejemplos en los que se han comenzado a obtener resultados destacables. Así, el primer ejemplo fue mostrado por Abril y colaboradores en el cual la ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) fue atrapada junto con una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa utilizando para ello un gel de poli(acrilamida).<sup>142</sup> Este nuevo biocatalizador conseguía mantenerse activo durante unos 10 días. Sin embargo, esta metodología estaba limitada por la baja actividad del enzima atrapado debido a los problemas de difusión tanto del sustrato como del oxígeno molecular necesario para llevar a cabo la oxidación.

Posteriormente, Zambianchi y colaboradores<sup>143</sup> clonaron y sobreexpresaron la CHMO para estudiar su actividad en oxidaciones de heteroátomos y de Baeyer-Villiger, así como su estabilidad frente a diversos aditivos. Los autores lograron co-inmovilizar la CHMO y la alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobium brockii* (ADH-TB), empleada como sistema de regeneración del cofactor, usando Eupergit C como soporte. Así, se consiguió reciclar el biocatalizador durante 16 ciclos sin pérdida apreciable de la

---

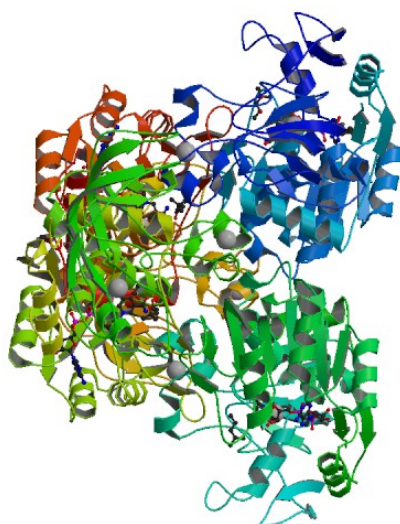
<sup>142</sup> O. Abril, C. C. Ryerson, C. Walsh, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* **1989**, *17*, 41-52.

<sup>143</sup> F. Zambianchi, P. Pasta, G. Carrea, S. Colonna, N. Gaggero, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 489-496.

actividad logrando aumentar la vida media del enzima de 1 a 2.5 días. Además, en términos de actividad, los biocatalizadores inmovilizados sufrían una pérdida de tan solo un 20% con respecto a su eficacia en disolución.

Se han inmovilizado células de *E. coli* recombinantes sobreexpresando la ciclopentanona monooxigenasa (CPMO) utilizando cápsulas de un polielectrolito [generado a partir de alginato de sodio, sulfato de celulosa, poli(metileno-co-guanidina),  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaCl}$ ].<sup>144</sup> Así, empleando como reacción modelo una oxidación de Baeyer-Villiger, se comprobó que tras 48 horas de reacción la conversión y el exceso enantiomérico obtenidos con las células inmovilizadas eran similares a los alcanzados en la reacción catalizada por las células en disolución. En cambio, tras realizar una prueba de estabilidad almacenando ambas preparaciones a 4°C, se constató que las células que permanecían en el interior de las cápsulas mantenían su actividad inicial tras 48 h mientras que aquellas que estaban en disolución perdían la mitad de su actividad enzimática inicial.

#### I.4. ALCOHOL DESHIDROGENASA DE *Rhodococcus ruber* DSM 44541 (ADH-A)

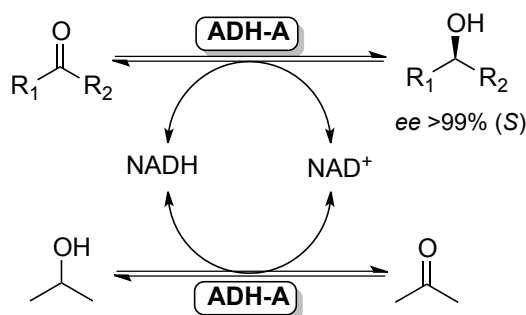


**Figura I.6.** Estructura tridimensional de la alcohol deshidrogenasa ADH-A de *Rhodococcus ruber* DSM 44541 (PDB: 3JV7)

<sup>144</sup> M. Hucík, M. Bučko, P. Gemeiner, V. Štefuca, A. Vikartovská, M. D. Mihovilovič, F. Rudroff, N. Iqbal, D. Chorvát Jr., I. Lacík, *Biotechnol Lett*, **2010**, 32, 675-680.



La alcohol deshidrogenasa de cadena media ADH-A de *Rhodococcus ruber* DSM 44541 (EC 1.1.1.1) es dependiente de NADH y fue descubierta en el año 2002.<sup>145</sup> Este enzima ha sido sobreexpresado en *Escherichia coli*<sup>29</sup> y presenta la particularidad de que es muy estable frente a diversos disolventes orgánicos. Así, es capaz de trabajar con altos porcentajes de 2-propanol (hasta un 80% v v<sup>-1</sup>) o acetona (hasta un 50% v v<sup>-1</sup>)<sup>24a</sup> o con cosolventes hidrofóbicos como el hexano (hasta un 99% v v<sup>-1</sup>).<sup>36</sup> Recientemente su estructura de rayos X ha sido elucidada (Figura I.6),<sup>146</sup> y ha mostrado poseer una estructura homotetramérica en la cual cada subunidad posee dos átomos de zinc, uno de ellos para estabilizar la proteína, mientras que el otro forma parte de la catálisis enzimática. Empleando la metodología del sustrato acoplado se ha llevado a cabo la reducción asimétrica de diversas cetonas con sustituyentes alquilo-alquilo o arilo-alquilo y de dicetonas, usando para ello un exceso de 2-propanol para reciclar el cofactor (Esquema I.2), obteniéndose en todos los casos los alcoholes de configuración Prelog con excesos enantioméricos excelentes.<sup>147</sup>



R<sub>1</sub>: alquilo, (hetero)arilo, etc.  
R<sub>2</sub>: Me, Et, CH<sub>2</sub>X (X=Cl, Br, N<sub>3</sub>)

**Esquema I.2.** Reducción asimétrica de cetonas a los correspondientes (S)-alcoholes usando 2-propanol para reciclar el cofactor

En cuanto a la inmovilización de este biocatalizador, tan solo existe un artículo publicado por Liese y colaboradores en el cual se ancló sobre tres tipos de materiales

<sup>145</sup> W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014-1017.

<sup>146</sup> M. Karabec, A. Łyskowski, K. C. Tauber, G. Steinkellner, W. Kroutil, G. Grogan, K. Gruber, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6314-6316.

<sup>147</sup> (a) F. G. Mutti, A. Orthaber, J. H. Schrittwieser, J. G. de Vries, R. Pietschnig, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8046-8048; (b) M. Kurina-Sanz, F. R. Bisogno, I. Lavandera, A. A. Orden, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1842-1848; (c) K. Edegger, W. Stampfer, B. Seisser, K. Faber, S. F. Mayer, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1904-1909; (d) W. Stampfer, B. Kosjek, K. Faber, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 402-406.

diferentes: <sup>148</sup> partículas esféricas porosas de vidrio, soportes magnéticos y nanodiamantes. En todos los casos se usó la misma metodología utilizando como agente de activación glutaraldehído. Tras la incubación de los soportes funcionalizados con una disolución del enzima a 4°C, se trataron con una disolución de glicina para bloquear los posibles grupos aldehído que quedaron sin reaccionar. Aunque el porcentaje de inmovilización enzimática fue del 100%, en todos los casos la actividad del biocatalizador anclado fue menor que la de la proteína en disolución. Además, se realizó una comparación entre los soportes comerciales empleados y se observó que en todos los casos se pudieron realizar hasta 3 ciclos de reutilización sin una pérdida significativa de actividad, siendo el material de vidrio el que mejor resultados ofreció.

### I.5. LIPASA DE TIPO B DE *Candida antarctica* (CAL-B)

La CAL-B (EC 3.1.1.3) es una proteína globular pequeña cuya cadena polipeptídica está compuesta de 317 aminoácidos, los cuales adoptan una configuración tridimensional conocida como pliegue de la hidrolasa (Figura I.7).<sup>149</sup> Este enzima proviene de la levadura *Candida antarctica*, originariamente aislada en la Antártida, que fue descubierta en 1989 por la empresa Novozymes<sup>150</sup> en un estudio acerca de biocatalizadores que fueran activos en condiciones extremas. Su estructura de rayos X fue elucidada en 1994,<sup>151</sup> y en ella se observa que su centro activo presenta dos canales casi paralelos que se extienden desde la serina del centro activo (Ser105) hasta la superficie. Estos se encuentran parcialmente separados por dos cadenas hidrofóbicas de isoleucina y en ellos se alojan los fragmentos del grupo saliente y del acilo de los reactivos. Además, se ha identificado un fragmento de hélice  $\alpha$  que posee cierta movilidad, pero que no impide el acceso del disolvente al centro activo como ocurre con otras lipasas. Esta hidrolasa puede ser sin lugar a dudas la más empleada<sup>152</sup> para llevar a cabo procesos de resolución de alcoholes, aminas o ésteres debido al amplio intervalo

---

<sup>148</sup> K. Goldberg, A. Krueger, T. Meinhardt, W. Kroutil, B. Mautner, A. Liese, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1171-1173.

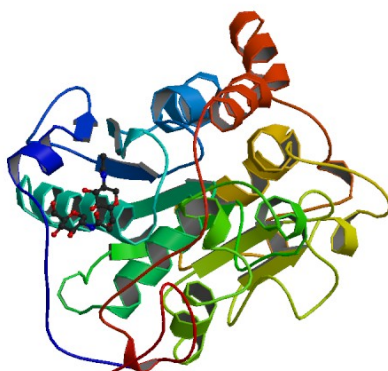
<sup>149</sup> S. Lutz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2743-2748.

<sup>150</sup> H. P. Heldt-Hansen, M. Ishii, S. A. Patkar, T. T. Hansen, P. Eigtved, *ACS Symposium Series* **1989**, *389*, 158-172.

<sup>151</sup> (a) J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T. A. Jones, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 790-792; (b) J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* **1994**, *2*, 293-308.

<sup>152</sup> A fecha de 3 de mayo de 2013, en la base de datos Scifinder (<https://scifinder.cas.org/>) aparecen 1.887 referencias que hacen mención a la lipasa de tipo B de la *Candida antarctica*.

de sustratos que acepta con una gran estereoselectividad, así como a su gran estabilidad frente a disolventes orgánicos y temperaturas altas.<sup>84</sup>



**Figura I.7.** Estructura tridimensional de la lipasa CAL-B (PDB: 1TCA)

Este enzima se comercializa tanto en disolución acuosa como anclado a diferentes materiales cerámicos o poliméricos, y existen numerosos estudios sobre su inmovilización empleando diversas metodologías (unión covalente, adsorción, encapsulamiento o entrecruzamiento), llegándose a un nivel de eficacia comparable o incluso superior con respecto a las preparaciones accesibles comercialmente de esta lipasa inmovilizada.<sup>153</sup>

## I.6. FENILACETONA MOOXIGENASA DE *Thermobifida fusca* (PAMO)

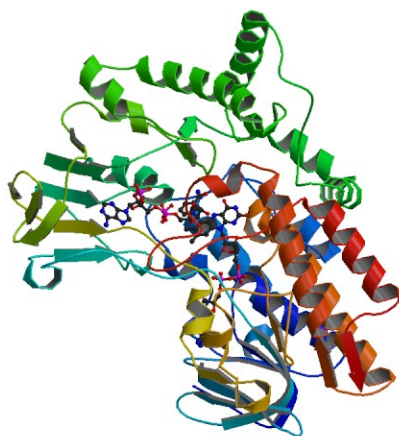
La PAMO (EC 1.14.13.92) es un enzima termoestable ya que ha sido aislado de la bacteria mesotermófila *Thermobifida fusca*. Pertenece al tipo I de las BVMOs, por lo que tiene FAD como grupo prostético y requiere NADPH como cofactor.<sup>154</sup> Además, es la primera BVMO cuya estructura ha sido elucidada por rayos X.<sup>155</sup> Es una proteína

<sup>153</sup> Algunas revisiones y ejemplos recientes: (a) M. D. Truppo, G. Hughes, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 1033-1035; (b) M. L. E. Gutarra, C. Mateo, D. M. G. Freire, F. A. G. Torres, A. M. Castro, J. M. Guisan, J. M. Palomo, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 260-266; (c) P. Saunders, J. Brask, en *Biocatalysis in Polymer Chemistry*, Ed. K. Loos, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, pp. 65-82; (d) S. J. Pierre, J. C. Thies, A. Dureault, N. R. Cameron, J. C. M. van Hest, N. Carette, T. Michon, R. Weberskirch, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1822-1826.

<sup>154</sup> M. W. Fraaije, J. Wu, D. P. H. M. Heuts, E. W. van Hellemond, J. H. Lutje Spelberg, D. B. Janssen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *66*, 393-400.

<sup>155</sup> E. Malito, A. Alfieri, M. W. Fraaije, A. Mattevi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 13157-13162.

monomérica de 64 kDa. Como se muestra en la Figura I.8, su estructura cristalina revela la presencia de dos dominios, uno de enlace con el NADPH y otro con el FAD, los cuales son típicos en todas las oxidoreductasas que contienen este grupo prostético. Además posee un tercer subdominio helicoidal típico de las BVMOs de tipo I. Los resultados obtenidos muestran la existencia de dos residuos cruciales (Arg217 y Lys336) en el reconocimiento de la adenina y el grupo 2'-fosfato del NADPH, respectivamente, lo que explica la mayor preferencia por este cofactor frente al NADH.



**Figura I.8.** Estructura de la PAMO conteniendo el cofactor pirimidínico obtenida por difracción de rayos X (PDB: 2YLR)

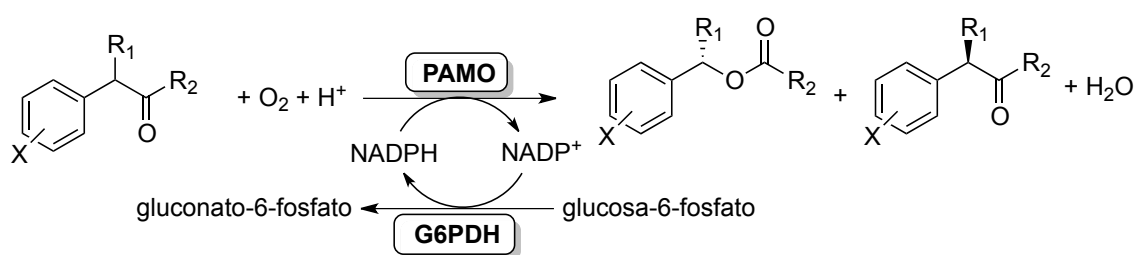
Una propiedad interesante de la PAMO es su activación cuando es incubada a elevadas temperaturas. Así, cuando el enzima se incuba a 50°C durante una hora, su actividad se dobla. Este biocatalizador presenta un intervalo de pH óptimo entre 7.0 y 9.0 para la oxidación de la fenilacetona, su sustrato modelo. Como se ha demostrado recientemente, el pH del medio tiene un efecto muy importante en la selectividad de la PAMO.<sup>156</sup>

Esta BVMO muestra una clara afinidad por los sustratos aromáticos, aunque también es capaz de aceptar otros derivados alifáticos y de llevar a cabo la oxidación de sulfuros y sulfóxidos orgánicos,<sup>157</sup> aminas y compuestos borados.<sup>158</sup> También se ha

<sup>156</sup> F. Zambianchi, M. W. Fraaije, G. Carrea, G. de Gonzalo, C. Rodríguez, V. Gotor, G. Ottolina, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1327-1331.

<sup>157</sup> G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, G. Ottolina, M. W. Fraaije, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3077-3083.

llevado a cabo con éxito la resolución cinética de una serie de compuestos carbonílicos aromáticos racémicos mediante oxidación enzimática de Baeyer-Villiger (Esquema I.3). Así, se obtuvieron los mejores resultados con bencilcetonas  $\alpha$ -sustituidas racémicas como sustratos de partida. En todos los casos, se sintetizaron los ésteres de configuración *S* con elevadas enantioselectividades en tiempos cortos de reacción.<sup>159</sup> En todos los casos anteriormente comentados se utilizó la G6PDH junto con la glucosa-6-fosfato para reciclar el cofactor de nicotinamida.



**Esquema I.3.** Oxidación enantioselectiva de cetonas racémicas catalizada por la PAMO utilizando G6PDH para reciclar el cofactor nicotinámico

Hay que reseñar también con respecto a esta BVMO que, a diferencia de otros enzimas de esta clase, es muy estable frente a disolventes orgánicos<sup>160</sup> y por ello ha recibido una gran atención en estudios de evolución dirigida y mutagénesis para obtener nuevas BVMOs con mejores propiedades en cuanto a selectividad y actividad.<sup>161</sup>

Recientemente, se han comenzado a desarrollar proteínas quiméricas empleando un constructo que lleva el gen que codifica la BVMO junto con un pequeño fragmento de material genético que codifica una pequeña cadena espaciadora polipeptídica además del enzima que regenera el cofactor (como por ejemplo, una fosfito deshidrogenasa, PTDH). Una vez expresada en la célula huésped, esta proteína quimérica regenera

<sup>158</sup> P. B. Brondani, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, L. H. Andrade, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2169-2173.

<sup>159</sup> (a) C. Rodríguez, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1338-1344; (b) C. Rodríguez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1168-1173.

<sup>160</sup> (a) F. Secundo, S. Fiala, M. W. Fraaije, G. de Gonzalo, M. Meli, F. Zambianchi, G. Ottolina, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 491-499; (b) A. Rioz-Martínez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2526-2532; (c) C. Rodríguez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 197-203; (d) F. Schulz, F. Leca, F. Hollmann, M. T. Reetz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2005**, *1*, 10.

<sup>161</sup> (a) H. L. van Beek, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3288-3290; (b) M. T. Reetz, S. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15424-15432; (c) D. E. Torres Pazmiño, R. Snajdrova, D. V. Rial, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1361-1368.

internamente el NADPH usado por la monooxigenasa comportándose de manera autosuficiente.<sup>162</sup> Un ejemplo de este tipo de quimera es la PAMO-CRE2 (fusión entre la fenilacetona monooxigenasa y una fosfito deshidrogenasa), que además fue encapsulada utilizando un polimersoma como soporte.<sup>94a</sup> De esta manera se crearon nanoreactores que contenían dicho enzima y que eran capaces de llevar a cabo la oxidación de Baeyer-Villiger regenerando el cofactor pirimidínico de manera autosuficiente. En este estudio se comparó su actividad con la PAMO y la G6PDH como sistema de regeneración en disolución, comprobándose que existía una mayor actividad con la monooxigenasa fusionada encapsulada, llegándose a una conversión completa con la fenilacetona tras 15 h de reacción. También se observó una buena actividad para los casos en los que se encapsuló la G6PDH junto con la PAMO en el interior del polimersoma o solamente la G6PDH añadiendo la PAMO a la disolución. En cambio, cuando la monooxigenasa se inmovilizó de manera covalente sobre el polimersoma que contenía la G6PDH, la actividad enzimática del complejo formado descendió drásticamente.

### I.7. GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE *Leuconostoc mesenteroides*



**Figura I.9.** Estructura de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* obtenida por difracción de rayos X (PDB: 1DPG)

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) es un enzima que está

<sup>162</sup> (a) D. E. Torres Pazmiño, A. Riebel, J. de Lange, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2595-2598; (b) D. E. Torres Pazmiño, R. Snajdrova, B.-J. Baas, M. Ghobrial, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2275-2278.

presente en los seres vivos. En los mamíferos cataliza la primera reacción en la vía de la pentosa fosfato, la ruta metabólica que aprovisiona a las células de NADPH y pentosas para la síntesis de ácidos nucleicos. Para el caso de la proveniente de *Leuconostoc mesenteroides*, su estructura ha sido elucidada por difracción de rayos X (Figura I.9).<sup>163</sup> Este biocatalizador es un dímero, consistiendo cada subunidad de dos dominios.

Aunque ya se conocía su existencia en los años 50,<sup>164</sup> no fue hasta 1981 cuando Wong y Whitesides demostraron la aplicabilidad de esta deshidrogenasa para regenerar el cofactor de nicotinamida en procesos catalizados por oxidorreductasas, utilizándolo conjuntamente con la glucosa-6-fosfato para obtener el cofactor reducido de nuevo y gluconato-6-fosfato como subproducto de la reacción.<sup>51</sup> Presenta una ligera preferencia por el NADPH, aunque es capaz de aceptar con gran eficiencia NADH. Hoy en día es fácilmente accesible y es por ello que es uno de los catalizadores más empleados en sistemas del enzima acoplado con, por ejemplo, ADHs y BVMOs.

En cuanto a su inmovilización, destaca el artículo reciente de Liese y colaboradores en el que han encapsulado la proteína mediante la técnica de *sol-gel* utilizando diferentes derivados de sílice.<sup>165</sup> Dicha encapsulación se llevó a cabo usando ortosilicatos, preparaciones de sílice coloidal y silanos solubles en medios acuosos. Además, para poder validar y sopesar la actividad y estabilidad de la proteína encapsulada, también fue inmovilizada de manera covalente sobre partículas funcionalizadas con grupos amino utilizando glutaraldehído como conector. El estudio mostró con respecto a los geles derivados de alcoxisilanos que las actividades más altas se obtenían empleando TEOS (tetraetil ortosilicato) en lugar de TMOS (tetrametil ortosilicato), aunque en ambos casos la actividad descendió drásticamente tras 4 días de encapsulamiento. Cuando se utilizó como soporte el gel soluble en agua (sílice modificada con etilenglicol), la actividad tras un día de encapsulamiento fue similar a la obtenida con el enzima en disolución, además, tras varios días mostró un descenso en la actividad bastante menor en comparación con las preparaciones anteriores. Todas ellas mostraron una mayor actividad con respecto a la G6PDH inmovilizada de manera

---

<sup>163</sup> P. Rowland, A. K. Basak, S. Gover, H. R. Levy, M. J. Adams, *Structure* **1994**, 2, 1073-1087.

<sup>164</sup> R. D. DeMoss, I. C. Gunsalus, R. C. Bard, *J. Bacteriol.* **1953**, 66, 10-16.

<sup>165</sup> S. Cumana, J. Simons, A. Liese, L. Hilterhaus, I. Smirnova, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, 85-86, 220-228.

covalente. Como contrapartida, cabe destacar que mientras que por encapsulamiento se observó una pérdida continua de actividad, la proteína enlazada de manera covalente la mantenía constante durante tiempos más largos.

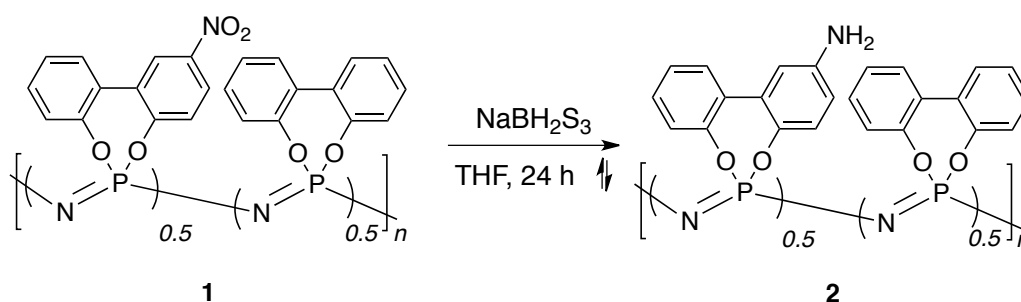




## RESULTADOS Y DISCUSION



Inicialmente se sintetizó el polifosfaceno **2** a partir del correspondiente derivado nitrado **1** previamente descrito utilizando para ello un reductor como es el reactivo de Lalancette ( $\text{NaBH}_2\text{S}_3$ ) a reflujo de tetrahidrofurano durante 24 horas, reduciendo de este modo los grupos nitro a aminas (Esquema I.4). Tras un tratamiento ácido, el polímero se agitó en una disolución de  $\text{NaOH}$  (10% p v<sup>-1</sup> en agua) durante otras 24 h. Tras ello, se filtró obteniéndose el polifosfaceno deseado con un rendimiento del 80%.

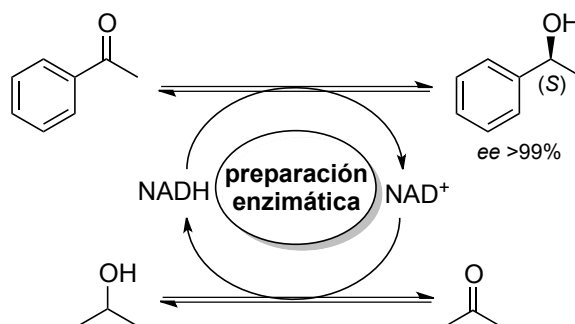


**Esquema I.4.** Reducción de los grupos nitro en el polifosfaceno **1** utilizando el agente de Lalancette

Una vez sintetizado, se llevó a cabo la optimización de la inmovilización de la alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus ruber* ADH-A. Para ello, se aprovechó la reactividad de los grupos amino presentes en el soporte para hacerlos reaccionar con

una molécula bifuncionalizada que pudiera actuar de conector entre el soporte y la biomolécula, en este sentido, se utilizó glutaraldehído ya que ha demostrado ser una excelente unión en trabajos previos de inmovilización enzimática covalente. Inicialmente se hizo reaccionar el polifosfaceno **2** con glutaraldehído (2 equivalentes) a temperatura ambiente durante 2 h, pero por RMN no se observó producto de condensación entre los grupos amino y el glutaraldehído. La reacción tuvo que ser llevada a cabo a 50°C durante 2 h para poder observar la funcionalización del soporte. Seguidamente, las partículas activadas con el conector se incubaron con una disolución del enzima en una disolución tampón con agitación magnética a 4°C durante 30 minutos. Tras ello, para eliminar los posibles grupos aldehído que no hubieran reaccionado con el biocatalizador, se trató el polímero con una disolución de glicina.

Para comprobar el anclaje del enzima, se utilizó un test de actividad enzimática (Esquema I.5). Así la reacción modelo elegida fue la biorreducción de la acetofenona para obtener (*S*)-1-feniletanol utilizando isopropanol como sistema de reciclaje del cofactor.



**Esquema I.5.** Biorreducción de acetofenona catalizada por la ADH-A anclada o en disolución

Cuando esta reacción fue llevada a cabo empleando el biocatalizador inmovilizado, tras 24 h se obtuvo un 13% de conversión con un exceso enantiomérico >99% (*S*), siendo bastante baja en comparación con la obtenida utilizando el enzima en disolución (entorno al 85%). Pero en vista de que el exceso enantiomérico del alcohol era excelente, este primer experimento representó un buen punto de partida para la optimización de la inmovilización del biocatalizador.

Se estudió por separado tanto de la activación del polifosfaceno con glutaraldehído como el consiguiente anclaje del enzima sobre el soporte. En el primer

paso se observó que la adición de un mayor exceso de glutaraldehído no aumentaba la actividad del soporte. Tampoco se apreciaron mejoras significativas cuando la reacción se realizaba en presencia de una base como la trietilamina o incluso en fase homogénea en una disolución de DMSO. Sin embargo, sí que se observó una significativa mejora al llevar a cabo la reacción en una disolución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , obteniendo una conversión enzimática del 43%. Este hecho se atribuyó a que es conocido que la presencia del sulfato amónico ayuda a extender las cadenas flexibles del polifosfaceno, evitando que se plieguen formando ovillos, y por consiguiente aumentando la efectividad de la reacción entre los grupos amino y el glutaraldehído. También se utilizó una diamina como la 1,4-butanodiamina como brazo espaciador para aumentar la distancia entre el soporte y la proteína y así evitar posibles interacciones desestabilizantes del enzima, pero la conversión obtenida no mejoró la ya mostrada anteriormente. Asimismo, se determinó mediante técnicas de resonancia magnética nuclear que la cantidad de glutaraldehído unido al polímero estaba entorno al 8%.

Para optimizar el anclaje de la ADH en el soporte activado se estudiaron diferentes condiciones como el tiempo de reacción, la temperatura y el tipo de agitación. Así tras realizar varias pruebas, se comprobó que la presencia del sulfato amónico en este paso no influía en el aumento de la proteína anclada en el soporte. En cambio, se observó una mejoría destacable al realizar la inmovilización en una disolución tampón durante 12 h a 0°C con una agitación magnética, llegándose a tener conversiones comparables (85%) a las obtenidas con la ADH-A en disolución. Se destacó la importancia de la temperatura ya que si se mantenía el mismo tiempo de reacción pero a temperatura ambiente, la actividad descendía casi a la mitad. El tipo de agitación también fue un factor a tener en cuenta, ya que al utilizarse agitación orbital en lugar de magnética a 20°C, la conversión enzimática obtenida mostró una mejoría destacable (67%) en comparación con la obtenida en la prueba a temperatura ambiente, pero no mejoró la actividad del enzima inmovilizado a 0°C, observándose además uniones inespecíficas del biocatalizador en estas condiciones.

Con el fin de facilitar el procedimiento, se realizó una prueba de actividad utilizando el preparado enzimático sin el último tratamiento con la glicina para eliminar los grupos aldehído que hubieran quedado libres en el proceso de inmovilización enzimática, observándose que la conversión obtenida no variaba. También se efectuó

una prueba en la que el enzima anclado se trató con borohidruro sódico con el fin de reducir los enlaces imínicos (los cuales son lábiles en medio acuoso y pueden romperse provocando el consiguiente desprendimiento del biocatalizador), para formar enlaces C-N estables. En este caso, el soporte obtenido mostró un descenso de la actividad (62%) el cual fue atribuido a la inactivación parcial del enzima inmovilizado.

Una vez optimizados ambos pasos de reacción, esta preparación enzimática se utilizó en la reducción de una serie de sustratos tanto alifáticos como aromáticos para obtener los correspondientes alcoholes de configuración Prelog con unas buenas conversiones y unos excesos enantioméricos excelentes. También se realizó una prueba de estabilidad térmica manteniendo tanto la ADH comercial en disolución como anclada a elevadas temperaturas durante diferentes periodos de tiempo. En este caso la inmovilización del enzima no aportó una mejora extra a la ya de por sí buena termoestabilidad de esta alcohol deshidrogenasa, y ambas preparaciones se inactivaron a una temperatura de 80°C durante una hora de incubación.

La mayor ventaja de un biocatalizador inmovilizado es la capacidad de este para ser reutilizado durante varios ciclos de reacción sin que su actividad enzimática se vea afectada. Por ello se realizó un estudio del reciclaje del enzima unido al polifosfaceno. Se observó que el biocatalizador podía ser reutilizado durante 6 reacciones sin una pérdida significativa de su actividad enzimática. Almacenando esta preparación a una temperatura de -20°C y reutilizándola en una tanda de tres ciclos de reacción, el enzima siguió manteniendo una actividad excelente incluso después de tres meses de almacenamiento demostrando la gran robustez y estabilidad del nuevo biocatalizador obtenido.

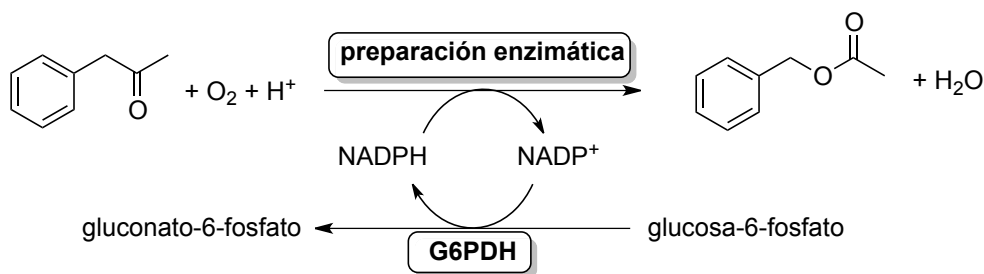
Este estudio se amplió a la inmovilización de otra biomolécula como es la lipasa de tipo B de *Candida antarctica*. Así, una vez inmovilizada utilizando las condiciones optimizadas para la alcohol deshidrogenasa, se realizó una prueba de acilación enzimática con el fin de demostrar la aplicabilidad de estos soportes en medios orgánicos. La reacción modelo elegida fue la resolución cinética del 1-feniletanol utilizando acetato de vinilo como agente acilante y *tert*-butil metil éter como disolvente a 30°C durante 24 h. La conversión obtenida fue del 49% con un exceso enantiomérico excelente tanto para el sustrato como para el producto, mientras que en cambio

utilizando la CAL-B comercial en disolución, la conversión no superó el 17% evidenciando el aumento de su estabilidad cuando la lipasa se encontraba anclada. También se realizó una prueba de reutilización de esta preparación, observándose en este caso un descenso continuado en la actividad de la lipasa inmovilizada, aunque a pesar de ello, tras 5 ciclos de reacción la conversión aún se mantenía por encima del 35%.



Debido a los buenos resultados obtenidos previamente inmovilizando tanto la ADH-A como la CAL-B covalentemente sobre derivados de polifosfaceno, nos planteamos el objetivo de anclar la fenilacetona monooxigenasa (PAMO). Para ello, se decidió utilizar para el anclaje de la proteína las mejores condiciones descritas en el estudio anterior. Así, el polifosfaceno sintetizado anteriormente **2** se activó con glutaraldehído y en un segundo paso se adicionó una disolución de la PAMO en un tampón Tris.HCl 50 mM pH 9 (este es el pH óptimo en el que trabaja la BVMO), manteniendo la reacción con agitación magnética durante 15 h a 5°C.

Para comprobar el grado de anclaje del enzima en el soporte se utilizaron varias técnicas como la espectroscopia infrarroja y la visible-ultravioleta o la resonancia magnética nuclear, pero en ningún caso se obtuvieron resultados positivos, con lo que se decidió emplear una reacción modelo para relacionar la conversión enzimática con el porcentaje de proteína anclada. La reacción elegida fue la oxidación de la fenilacetona al acetato de bencilo utilizando en este caso como sistema de regeneración del cofactor un segundo biocatalizador, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de glucosa-6-fosfato (Esquema I.6). Con el fin de poder comparar la actividad de la PAMO inmovilizada vs a la que se encontraba en disolución, la cantidad de enzima utilizada en la prueba de inmovilización, fue la misma que se añadió a la reacción biocatalítica. El resultado obtenido tras 24 h de reacción con este biocatalizador fue del 7%, un valor bastante bajo en comparación con la PAMO en disolución (>97%), sin embargo fue suficiente para demostrar que esta BVMO podía ser unida a un soporte de manera covalente, con lo que se comenzó a optimizar el proceso de anclaje de la proteína.



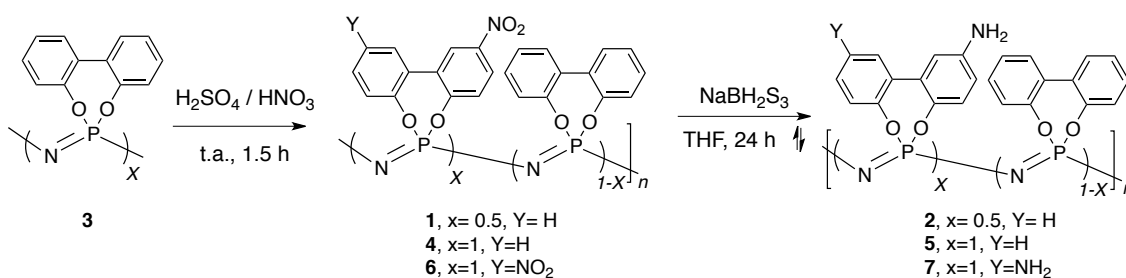
**Esquema I.6.** Biooxidación de la fenilacetona catalizada por la PAMO inmovilizada o en disolución utilizando la G6PDH como sistema de regeneración del cofactor

La fenilacetona monooxigenasa es un enzima termoestable capaz de permanecer activo a altas temperaturas, por ello se estudió su inmovilización aumentando la temperatura del proceso. Cuando la unión se realizó a temperatura ambiente durante 15 h, la conversión obtenida fue el doble (14%), y esta mejoró ligeramente al aumentar la temperatura de anclaje a 40°C obteniendo un 18% de conversión tras 15 h de inmovilización y un 20% tras 24 h. Esta fue la temperatura óptima ya que al llevarse a cabo a 50°C, la conversión descendió (11%) y a 60°C la inactivación fue casi completa no superando el 3% de conversión. El siguiente factor estudiado fue el tipo de agitación, ya que es conocido que la agitación magnética puede llegar a desnaturalizar las proteínas. Se llevó a cabo una prueba del anclaje utilizando agitación orbital (250 rpm) a 40°C. Tras 15 h de reacción, la conversión obtenida con el biocatalizador inmovilizado se vio aumentada drásticamente llegando a valores comparables a los obtenidos con la PAMO en disolución (>97%). El uso de un brazo espaciador como la 1,4-butanodiamina o la reducción con borohidruro de sodio de los enlaces imínicos formados, afectaron negativamente a la actividad del enzima, con lo que su uso fue descartado.

A continuación se realizaron una serie de pruebas para comprobar que la actividad mostrada se debía a la PAMO inmovilizada a través de los enlaces covalentes, y no a posibles uniones inespecíficas. Para ello, el polifosfaceno **2** sin activar con glutaraldehído se incubó con la BVMO en las condiciones optimizadas y posteriormente se realizó una prueba de actividad de este preparado enzimático. La conversión obtenida fue del 11%, demostrándose que la mayoría del enzima se encontraba enlazado covalentemente. Para corroborarlo, el biocatalizador anclado a través del conector al polifosfaceno se incubó en una disolución tampón durante 24 h. En este tiempo, las proteínas que se encontraran unidas al polímero de manera inespecífica, se desprenderían pasando a la fase acuosa. Tras ello, el soporte se filtró, se lavó repetidas veces, y se le realizó un test de actividad. La conversión obtenida fue del 84%, siendo este pequeño descenso en la actividad debido a la eliminación del porcentaje de la PAMO que se encontraba anclada de manera inespecífica a la superficie del polímero.

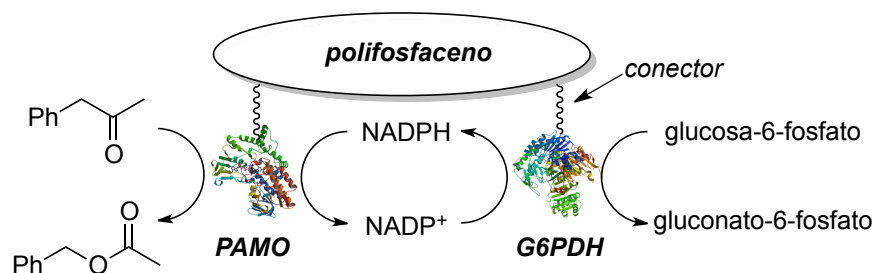
Una vez optimizadas las condiciones de inmovilización del enzima, se decidió realizar un estudio del soporte aumentando el grado de sustitución de los grupos amino presentes en el polifosfaceno (Esquema I.7). El paso crucial para variar esta proporción

es la relación de ácido nítrico utilizado en la nitración del polifosfaceno **3**. Se sintetizaron así dos nuevos derivados, **4**, con una proporción de un grupo nitro por monómero, y **6**, con dos grupos nitro presentes en cada monómero del polímero. Tras realizar la reducción y posterior activación de los nuevos soportes, se ancló la PAMO observándose que los valores de actividad obtenidos no variaban entre ellos, siendo similares a los obtenidos con el polifosfaceno con  $x=0.5$ . Con esto, se pudo concluir que el aumento de la proporción de los grupos amino en el polímero no afectó a la actividad de la preparación.



**Esquema I.7.** Formación de los polifosfacenos con diferente grado de sustitución de grupos amino a través de un proceso de nitración-reducción

En todas las pruebas de biooxidación de la fenilacetona, se ha utilizado como sistema de regeneración del cofactor la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que se adicionaba a la disolución cada vez que se realizaba una prueba. Por ello, nos planteamos la co-inmovilización de esta deshidrogenasa junto con la PAMO con el fin de preparar un sistema redox autosuficiente capaz de regenerar el cofactor pirimidínico con la sola adición de un cosustrato de fácil acceso como es la glucosa-6-fosfato (Esquema I.8). Utilizando el polifosfaceno **2**, se realizó un estudio de la unión de ambos biocatalizadores en las condiciones optimizadas anteriormente añadiendo una disolución de PAMO y G6PDH en diferentes proporciones. Se observó que al añadir una relación en unidades de 1:2.5 (PAMO:G6PDH), la conversión obtenida tras 1 h de reacción fue del 40% y esta se incrementó al aumentar la proporción de G6PDH, llegándose a obtener una conversión del 80% cuando se utilizó una relación 1:10, demostrándose la necesidad de añadir un exceso del enzima encargado de reciclar el cofactor para aumentar la actividad de la preparación co-inmovilizada.



**Esquema I.8.** Biooxidación de la fenilacetona catalizada por la PAMO co-inmovilizada con la G6PDH en un mismo soporte

Se realizaron pruebas de reutilización tanto de la BVMO inmovilizada sola como junto con la G6PDH, observándose que ambas preparaciones eran activas durante 5 ciclos de reciclado mostrando un apreciable descenso en su actividad en el 2º ciclo, y luego un descenso menos marcado y constante durante las reutilizaciones restantes. La tendencia observada para ambos fue similar, indicando que el descenso en la actividad del biocatalizador se debía en gran medida a la inactivación causada a lo largo del tiempo por la monooxigenasa. Esta disminución de la actividad se demostró realizando una prueba con la PAMO en disolución tras incubarla durante 24 h. La conversión obtenida a los 30 minutos para la oxidación de la fenilacetona descendió desde un 80% (usando la PAMO sin un tratamiento previo) a un 6% tras la incubación, corroborando que el enzima que limitaba la actividad de la preparación co-inmovilizada era la monooxigenasa.

Por último, se llevó a cabo la oxidación de un grupo de cetonas racémicas y de sulfuros con el fin de estudiar la selectividad del nuevo biocatalizador co-inmovilizado con la G6PDH, observándose en la mayoría de los casos unos valores similares de enantioselectividad a los mostrados por el enzima en disolución, aunque cabe destacar un pequeño descenso en el caso de la oxidación del tianisol, y una mejora destacable en la obtención del sulfóxido enantiopuro del 2-feniletil metil sulfuro.



## TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN



# Polyphosphazenes as Tunable and Recyclable Supports To Immobilize Alcohol Dehydrogenases and Lipases: Synthesis, Catalytic Activity, and Recycling Efficiency

Aníbal Cuetos,<sup>†</sup> María L. Valenzuela,<sup>‡</sup> Iván Lavandera,<sup>†</sup> Vicente Gotor,<sup>\*,†</sup> and Gabino A. Carriedo<sup>\*,§</sup>

*Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain, Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andrés Bello, Av. República 275, Santiago, Chile, and Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain*

Received January 26, 2010; Revised Manuscript Received February 26, 2010

The polyphosphazene  $\{NP[O_2C_{12}H_{7.5}(NH_2)_{0.5}]\}_n$ , prepared by reacting  $\{NP[O_2C_{12}H_{7.5}(NO_2)_{0.5}]\}_n$  with the Lalancette's reagent, was used for attaching enzymes such as alcohol dehydrogenase (ADH-A) and lipase (CAL-B). The resulting new biocatalysts exhibited great potential as tunable supports for enzymatic reactions in both aqueous and organic media. The material with immobilized ADH-A was as efficient as the commercial enzyme to perform stereoselective bioreductions of ketones in aqueous solutions and could be used for the reduction of various aliphatic and aromatic ketones up to 60 °C and recycled several times without significant loss of activity even after three months of storage. The biocatalyst obtained with CAL-B was more efficient than the free enzyme for kinetic resolutions in organic solvents and exhibited a moderately good capability of reutilization.

## Introduction

Polyphosphazenes are ideal compounds to tune their physical and chemical properties by selecting the appropriate functionalities linked to the phosphorus atom.<sup>1</sup> Because of their highly valuable characteristics, mainly their chemical and temperature resistance, these derivatives are potentially useful for biotechnological applications and, in fact, novel materials derived from this type of polymer have been recently designed and applied to important fields such as biomedicine.<sup>2</sup> The synthesis of functionalized polyphosphazenes by secondary reactions on pendant side groups is a fruitful alternative to the classical macromolecular substitution with nucleophiles carrying the desired functional groups.<sup>1,3</sup> The latter is a more advantageous approach in cases like the sulfonation of aryloxyphosphazenes<sup>4</sup> or the introduction of pendant  $PPh_2$  ligands.<sup>5</sup>

In the past few years, an increasing number of catalytic processes for industry have been described. The new requirements that society demands concerning greener and safer methodologies, make the immobilization of (bio)catalysts a very important issue aiming to better recycling efficiency and more economical and environmental friendly processes.<sup>6</sup> Thus, the chemical or physical fixation of enzymes on supporting carriers can be achieved by different methods.<sup>7</sup> In this context, polyphosphazenes have scarcely been used as support of biomacromolecules, and in the particular case of biocatalysts, only a few examples can be mentioned.<sup>2b</sup> In a first article, Allcock and Kwon covalently immobilized tripsine and glucose-6-phosphate dehydrogenase on a support of modified  $[NP(OPh)_2]_n$  on an alumina carrier.<sup>8</sup> The process consisted of a nitration-reduction protocol to obtain the corresponding polyaminophos-

phazene derivative that was subsequently activated with glutaraldehyde and then reacted with the enzyme solution. Later, an invertase was supported on spherical particles of  $[NP(OCH_2CF_3)_2]_n$ , first displacing the trifluoroethoxy moieties with  $NaOCH_2CH_2NH_2$  and then anchoring the enzyme, obtaining good activities for this preparation.<sup>9</sup> Finally, an urease was encapsulated on a hydrogel derived from poly[bis(methoxyethoxyethoxy)phosphazene] through irradiation with  $\gamma$ -rays to cross the polymer and trap the biocatalyst.<sup>10</sup>

Biocatalytic reactions have recently gained more relevance due to the mild conditions employed and the highly chemo-, regio-, and stereoselective transformations obtained to synthesize natural products and drugs.<sup>11</sup> Among all available enzymes, probably hydrolases and oxidoreductases are the most explored catalysts.<sup>12</sup> Thus, lipases are a class of hydrolases that have widely been used to achieve kinetic resolutions through hydrolysis, esterification, and aminolysis reactions, among others.<sup>13</sup> *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) has been used in organic solvents to perform the kinetic resolution of alcohols and especially amines.<sup>14</sup> In the case of oxidoreductases, alcohol dehydrogenases (ADHs, also called carbonyl reductases) have been employed to catalyze the stereoselective reduction of prochiral ketones with remarkable selectivities.<sup>15</sup> For instance, the nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-dependent alcohol dehydrogenase ADH-A from *Rhodococcus ruber* DSM 44541 has been isolated and overexpressed in *Escherichia coli* and can be applied to the asymmetric reduction of alkyl- and aryl-substituted ketones or diketones.<sup>16</sup>

To improve the stability of lipases in organic solvents, they have been adsorbed/immobilized in many supports. In case of immobilization of ADHs, fewer reports have been shown and most of these processes were based on adsorption techniques. Only very few examples using covalent binding are described.<sup>17</sup> There is only one previous report where ADH-A has been covalently anchored to amino-functionalized materials, including porous glass beads, magnetic particles, and nanodiamonds.<sup>18</sup>

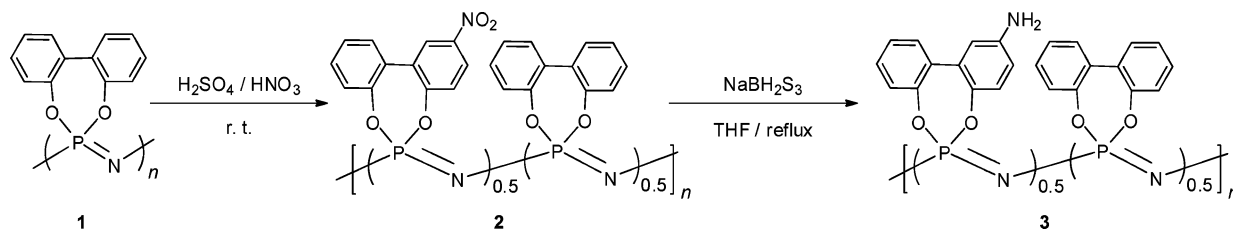
\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: vgs@fq.uniovi.es (V.G.); gac@fq.uniovi.es (G.A.C.).

<sup>†</sup> Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, University of Oviedo.

<sup>‡</sup> Universidad Andrés Bello.

<sup>§</sup> Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, University of Oviedo.



**Scheme 1.** Synthesis of Polyphosphazene **3**

Glutaraldehyde was employed as linker and, although very good immobilization yields were achieved, the activities were lower. Until three biocatalytic cycles could be performed with a minimum loss of enzymatic activity.

In earlier reports, we described the synthesis of phosphazene polymers with phosphorus-dioxy-biphenyl moieties (or the chiral binaphthyl analogues) in the repeating units, and a number of copolymers with monodentated aryloxydes carrying different functional groups.<sup>19</sup> Recently, the regioselective and controlled direct nitration of the homopolymer  $[\text{NP}(\text{O}_2\text{C}_{12}\text{H}_8)]_n$  (**1**), which is readily available,<sup>20</sup> was achieved by taking advantage of the unusual high solubility and stability of this precursor in concentrated sulfuric acid, to obtain in one pot a simple procedure for the derivatives  $\{\text{NP}[\text{O}_2\text{C}_{12}\text{H}_{8-x}(\text{NO}_2)_x]\}_n$  (**2**), with  $x$  ranging from 0.2 to 2 in excellent yields (Scheme 1).<sup>21</sup> As polymers **2**, with  $M_w$  of the order of  $10^5$ , are well characterized materials (by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ , and IR spectra) with well-defined chemical composition, and with limited but sufficient solubility in THF,<sup>21</sup> they were selected as very advantageous candidates to be converted into the  $\text{NH}_2$  derivatives  $\{\text{NP}[\text{O}_2\text{C}_{12}\text{H}_{7.5}(\text{NH}_2)_{0.5}]\}_n$  (**3**), useful to support enzymes. Herein we wish to report the use of **3** to immobilize an alcohol dehydrogenase (ADH-A) for bioreductions on aqueous solutions and a lipase (CAL-B) to achieve kinetic resolutions on organic solvents.

## Experimental Section

**General.** Ketones, racemic alcohols, racemic acetate **17**, alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* ADH-A and *Candida antarctica* lipase B were purchased from commercial sources. One unit (U) of ADH-A reduces 1.0  $\mu\text{M}$  of acetophenone to 1-phenylethanol per minute at pH 7.5 and 30 °C in the presence of NADH. Polyphosphazene **1** was synthesized as previously described.<sup>20</sup> Polyphosphazene **2** was synthesized as previously described.<sup>21</sup> Tetrahydrofuran (THF) was treated with KOH and distilled twice from Na in the presence of benzophenone.

The infrared (IR) spectra were recorded with a Perkin-Elmer FT Paragon 1000 spectrometer. NMR spectra were recorded on Bruker NAV-400, DPX-300, AV-400 and AV-600 instruments. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra in deuterated dimethylsulfoxide ( $\text{DMSO}-d_6$ ) are given in  $\delta$  relative to trimethylsilane (TMS;  $\text{DMSO}$  at 2.51 and 40.2 ppm, respectively).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR are given in  $\delta$  relative to external 85% aqueous  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . The C, H, N, analyses were performed with an Elemental Vario Macro.  $T_g$  was measured with a Mettler DSC Toledo 822 differential scanning calorimeter equipped with a TA 1100 computer. Thermal gravimetric analyses (TGA) were performed on a Mettler Toledo TG 50 TA 4000 instrument. The polymer samples were heated at a rate of 10 °C  $\text{min}^{-1}$  from ambient temperature to 900 °C under constant flow of nitrogen or under air. Gas chromatography (GC) analyses were performed on a Hewlett-Packard 6890 Series II chromatograph. The degree of enzymatic conversion corresponded to the measured area of the product in the GC chromatogram among the sum of GC areas of the substrate and product. The enantiomeric excesses were calculated dividing the subtraction of the GC area for the major enantiomer minus the GC area for the minor enantiomer among the sum of the GC areas for both enantiomers.

**Synthesis of  $[\text{NP}(\text{O}_2\text{C}_{12}\text{H}_{7.5}(\text{NH}_2)_{0.5})]_n$  (**3**).** First, the Lalancette's reagent<sup>22</sup> was prepared (in a well ventilated hood). Air and humidity must be strictly avoided. A three-necked 250 mL flask, filled with a dried  $\text{N}_2$  atmosphere and equipped with a condenser and a bubbler with paraffin oil, was cooled to 0 °C (ice bath). Then the following were added in the order  $\text{NaBH}_4$  (0.63 g, 16.7 mmol), sulfur (1.78 g, 55 mmol), and recently well-dried and distilled (twice) THF (40 mL; CARE, exothermic reaction with evolution of  $\text{H}_2\text{S}$ ). The mixture was stirred for 1 h to give a transparent yellow solution. The volatiles were evaporated in a vacuum, and the residue was washed with diethyl ether ( $2 \times 50$  mL) and dried overnight in a vacuum.

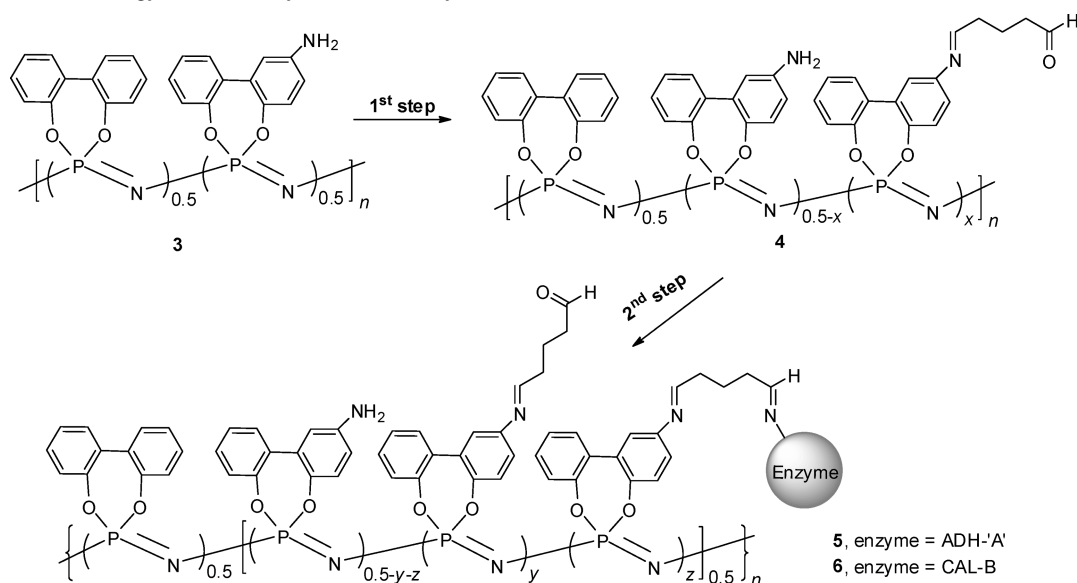
To the prepared Lalancette's reagent, THF (50 mL) and a solution of  $[\text{NP}(\text{O}_2\text{C}_{12}\text{H}_{7.5}(\text{NO}_2)_{0.5})]_n$  (**2**,  $x = 0.5$ ; **2** g, 9.96 mmol) in THF (50 mL) were added and the final volume was increased by adding 100 mL of THF. The mixture was then refluxed with stirring for 24 h (the formation of a solid in the walls of the flask was observed). After cooling to room temperature, 10%  $v/v^{-1}$  aqueous HCl (5 mL) was added and stirring was continued for 7 h. The resulting mixture was filtered and the solid was stirred with 10% aqueous NaOH (100 mL) for 24 h. The solid was separated by filtration, washed with plenty of water until neutral pH, and dried at 40 °C under vacuum for 3 days. Yield: 1.51 g (80%). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3435, 3368 m.br ( $\nu$  NH), 3065 w ( $\nu$  CH arom.), 1624 br.m, 1502 m, 1478 m ( $\nu$  CC arom.,  $\delta$  NH), 1384 sh.m (typical of biphenoxyphosphazenes, not assigned), 1347 m, 1266 s, 1247 s, 1191 vs ( $\nu$  NP), 1096 s ( $\nu$  P-OC), 1041 w, 1013 w (not assigned), 941–922 s.br ( $\delta$  POC), 870 w, 819 v.w (not assigned), 785 s, 751 s ( $\delta$  CH arom.), 607 m, 536 m.br (other);  $^1\text{H}$  NMR (ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 6–8 v.br, (aromatic protons), 4.9 v.br ( $\text{NH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ): all peaks are broad: 151 ( $\text{C}_2$ ), 149 ( $\text{C}_5-\text{NH}_2$ ), 132, 131, 128, 125 ( $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$ , and  $\text{C}_6$ );  $^{31}\text{P}$  NMR (ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ): –6.3 br; Anal. (Calcd.): C 57.0 (60.9), 3.40 (3.59), 8.50 (8.87). Sulfur retained 1%; TGA (from ambient to 900 °C): Continuous loss from 300–800 °C. Final residue 44% (under  $\text{N}_2$ ), 7% (under air); DSC:  $T_g = 129$  °C,  $\Delta C_p = 0.11$   $\text{J g}^{-1} \text{K}^{-1}$ .

**Synthesis of **5** and **6**.** Polyphosphazene **3** (60 mg) was added to a saturated solution of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (9 mL) and a solution of glutaraldehyde (1 mL, 2.5%  $v/v^{-1}$ ) in phosphate buffer (50 mM, pH 7), affording a suspension. Then it was mixed under magnetic stirring for 2 h at 50 °C. The solid obtained was filtered off, washed with phosphate buffer 50 mM pH 7 ( $3 \times 1$  mL), and dried under vacuum, affording **4** (61 mg, 87%).

Subsequently, **4** (20 mg) was added to a 1 mL of tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris·HCl) buffer 50 mM pH 7.5 with ADH-A (1 mg) or CAL-B (10  $\mu\text{L}$ ), affording a heterogeneous mixture that was magnetically stirred at 5 °C for 15 h. Afterward, the polymer was filtered, washed with Tris·HCl buffer 50 mM pH 7.5 ( $4 \times 0.5$  mL), and dried under vacuum, affording **5** or **6** (20 mg).

These formulations were obtained as fine powders, and no control of the particle size (micrometers) could be achieved, so the effects of this parameter in the catalytic activity could not be evaluated.

**Enzymatic Reduction of Ketones Employing **5** and 2-Propanol.** A total of 20 mg of **5** were placed in an eppendorf tube and then 600  $\mu\text{L}$  of Tris·HCl buffer 50 mM pH 7.5, 1 mM NADH, the corresponding ketone (35 mM), and 2-propanol (32  $\mu\text{L}$ , 5%  $v/v^{-1}$ ) were added. The heterogeneous mixture was shaken under orbital shaking at 30 °C and 250 rpm for 24 h. Afterward, this mixture was extracted with ethyl acetate ( $2 \times 0.6$  mL), and the organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Scheme 2. General Strategy To Covalently Link a Biocatalyst to **3**

Finally, conversion and enantiomeric excess was measured by achiral and chiral GC, respectively.

**Study of the Stability of **5** over a 3 Month Period.** A total of 20 mg of **5** were placed in an eppendorf tube and then 600  $\mu\text{L}$  of Tris  $\cdot$  HCl buffer 50 mM pH 7.5, 1 mM NADH, acetophenone (2.5  $\mu\text{L}$ , 35 mM), and 2-propanol (32  $\mu\text{L}$ , 5% v v<sup>-1</sup>) were added. The heterogeneous mixture was shaken under orbital shaking at 30 °C and 250 rpm for 24 h. Afterward, this mixture was extracted with ethyl acetate (2  $\times$  0.6 mL), and the organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Finally, conversion was measured by achiral GC. To avoid material loss, the second cycle was performed in the same eppendorf tube, adding to the polymer the rest of reagents, as mentioned before. After 3 consecutive cycles, dry polyphosphazene was stored for 30 days at -20 °C to achieve the following catalytic reactions. To reuse it, the support was simply allowed to warm up to room temperature.

**Kinetic Resolution of 1-Phenylethanol Employing **6** and Vinyl Acetate.** Compound **6** (20 mg) was introduced in an erlenmeyer flask with dry *tert*-butyl methyl ether (TBME; 0.82 mL). Afterward, 1-phenylethanol (10 mg, 0.08 mmol) and vinyl acetate (22  $\mu\text{L}$ , 0.24 mmol) were added. The heterogeneous mixture was shaken under orbital shaking and kept under nitrogen for 24 h at 30 °C and 250 rpm. Then, the catalyst was filtered and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2  $\times$  1 mL). Finally, conversion and enantiomeric excesses were measured by achiral and chiral GC, respectively.

## Results and Discussion

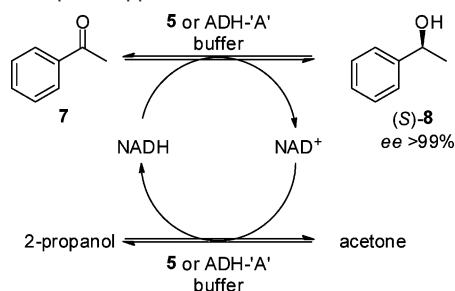
**Synthesis of [NP(O)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>H<sub>7.5</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>0.5</sub>]<sub>n</sub> (**3**) by Reduction of **2** ( $x = 0.5$ ).** The synthesis of polymer **3** (Scheme 1) was achieved in 80% yield starting from the readily available polyphosphazene **1**,<sup>20</sup> by selective nitration with a sulfonitric mixture at room temperature during 1.5 h,<sup>21</sup> followed by reduction with Lalancette's reagent<sup>22</sup> under reflux of tetrahydrofuran (see Experimental Section). The composition and structure of the product was confirmed by the analytical and spectroscopic data. The IR showed the expected bands at 3435 and 3368 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  NH) and the broadness of the band at 1624 cm<sup>-1</sup> due to the overlapping with the NH-bending absorption. The presence of the NH<sub>2</sub> group was also observed in the <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sup>6</sup>) as a very broad signal centered at 4.9 ppm and also in a weak signal at 149 ppm in the <sup>13</sup>C NMR. The low solubility in THF prevented the measurement of the *M*<sub>w</sub>. The TGA (from rt to 900 °C), showed a continuous weight loss from

300–800 °C with a final residue of 44% (under N<sub>2</sub>) or 7% (under air). The glass transition was not very clearly observed in the differential scanning calorimetry (DSC) trace (second heating run), but a value *T*<sub>g</sub> = 129 °C ( $\Delta C_p = 0.11 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) could be estimated.

**Immobilization of ADH-A on Polyphosphazene **3**.** To study the use of polymer **3** as support of biocatalysts, the reactivity of the amino groups with the appropriate linkers applied to the subsequent covalent immobilization of a biomacromolecule was considered. Glutaraldehyde, with two reactive aldehyde moieties is one of the connectors more frequently used to achieve covalent unions<sup>6</sup> and, therefore, was first considered as linker between the phosphazene chain and the enzyme (Scheme 2). Because of the low solubility of **3** in most of the solvents tested (H<sub>2</sub>O, THF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and CHCl<sub>3</sub>) and no swelling was observed in any case, it was also envisaged that the resulting materials could be very appropriate to perform heterogeneous enzymatic transformations in both aqueous and organic media.

In a first approach, we decided to anchor the alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44541 ADH-A, known for its high stability and versatility to perform bioreductions on carbonyl groups in aqueous media.<sup>16</sup> Due to the simplicity of reaction conditions, for the first step, we reproduced the methodology described by Liese and co-workers.<sup>18</sup>

Thus, **3** was treated with the linker glutaraldehyde (2 equiv) at room temperature for 2 h. To remove any excess connector, the polymer was washed with buffer. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of the product in DMSO-*d*<sup>6</sup>, where it was partially soluble, showed the absence of glutaraldehyde. Only when the reaction was performed at 50 °C for 2 h, a singlet at 9.63 ppm was observed showing the formation of **4** (see Supporting Information). The particles of **4** were then reacted with the enzyme solution under magnetic stirring at 4 °C during 30 min, and then the remaining nonreacting aldehyde residues were treated with glycine and the final product was washed with buffer to afford the enzyme attached **5**. The activity of the immobilized biocatalyst in **5** was tested using as a model reaction the stereoselective reduction of acetophenone **7** into 1-(*S*)-phenylethanol **8** in buffer, using 2-propanol to recycle the nicotinamide cofactor in a "substrate-coupled" approach (Scheme 3).<sup>23</sup> The observed enzymatic conversion (13%) was much lower than the obtained with the commercial ADH-A (around 85%),<sup>24</sup> but

**Scheme 3.** ADH-A-Catalyzed Reduction of Acetophenone in a "Substrate-Coupled" Approach**Table 1.** Optimization of the Anchoring of Glutaraldehyde to Polyphosphazene **3**<sup>a</sup>

entry	reaction conditions	enzymatic conv. <sup>b,c</sup> (%)
1	initial conditions	13
2	excess glutaraldehyde	12
3	reaction in DMSO	12
4	reaction with Et <sub>3</sub> N	17
5	reaction with satd (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	43
6	use of 1,4-diaminobutane as spacer arm	46

<sup>a</sup> For reaction conditions, see Supporting Information. <sup>b</sup> Measured by GC. In all cases, enantiopure (S)-**8** was obtained. <sup>c</sup> In all cases, buffer used to wash **5** showed remaining enzymatic activity, demonstrating that ADH-A was employed in excess when was immobilized on polyphosphazene **4**.

the result clearly demonstrated the anchoring of the enzyme to the polyphosphazene.<sup>25</sup> Interestingly, enantiopure (S)-**8** was obtained as in the case of commercial ADH-A, showing that selectivity was not affected by the immobilization.

Following these results, the immobilization protocol was optimized. First, the anchoring of glutaraldehyde to **3** was performed by varying several reaction parameters (Table 1). The products of each experiment were equally treated with the enzyme and the glycine solution, and the supported catalysts were tested with the same model reaction (Table 1).

No improvement was observed using an excess of glutaraldehyde (10 equiv) at 50 °C or in the presence of DMSO to make the reaction homogeneous, and only a very slight increase in conversion was noted employing Et<sub>3</sub>N as catalyst for the coupling reaction (entries 2–4). However, as in other recent examples,<sup>26</sup> the employment of a saturated aqueous solution of

**Table 2.** Optimization of the Immobilization of ADH-A on Polyphosphazene **4**<sup>a</sup>

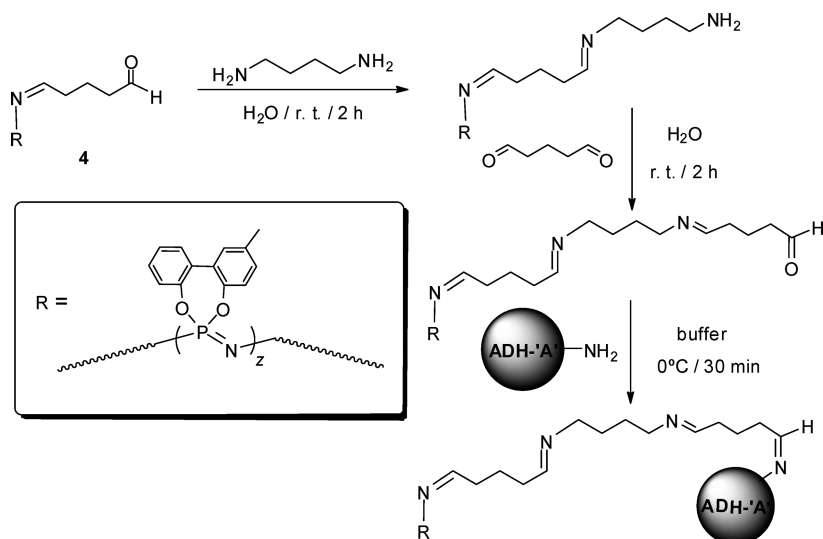
entry	reaction conditions	enzymatic conv. <sup>b</sup> (%)
1	initial conditions	43
2	using satd (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	48
3	reaction time 12 h at 0 °C	85
4	reaction at rt	44
5	orbital shaking at 20 °C	67

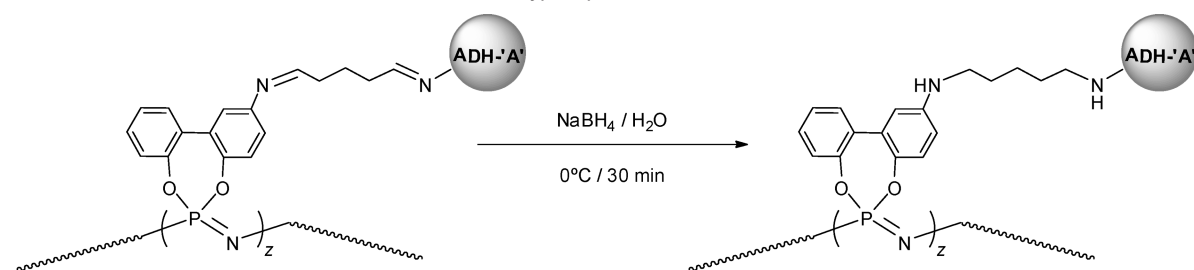
<sup>a</sup> For reaction conditions, see Supporting Information. <sup>b</sup> Measured by GC. In all cases, enantiopure (S)-**8** was obtained.

ammonium sulfate (entry 5) afforded a better anchoring of glutaraldehyde as shown by the higher enzymatic activity of the catalyst. These observations can be explained considering that the ammonium salt helps to extend the phosphazene chains facilitating the accessibility of the functionalized sites to the incoming reagents. It is known that reproducible size exclusion chromatograms (SEC) for polyphosphazenes are obtained in the presence of ammonium salts<sup>27</sup> that favor extended conformations.

The use of 1,4-diaminobutane as a spacer arm to increase the distance of the reacting groups to the phosphazene main chain, lowering the steric hindrance and minimizing undesirable interactions between the other functional groups on the carrier surface, was also investigated. It has recently been found that immobilized *Candida rugosa* lipase on silica presented a stability improvement using similar linkers.<sup>28</sup> Thus, starting from **4**, a diamine was inserted as shown in Scheme 4. Due to the higher nucleophilicity of the aliphatic amines, the coupling reactions were done at room temperature. The new biocatalytic preparation showed a good activity (entry 6), but the enhancement was similar to the one achieved with the saturated solution of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Therefore, the simpler conditions of entry 5 were chosen as the best ones to perform the first step to the preparation of the supported biocatalyst (Scheme 2). The percentage of glutaraldehyde introduced in the polymer, as estimated by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy was around 8% (Scheme 2, approximately  $x = 0.04$ ).

To optimize the enzyme immobilization protocol (second step, Scheme 2), mixtures of polyphosphazene **4** and ADH-A were stirred by varying the reaction conditions, like reaction times, temperature, and type of shaking. The effects on the final activity of the preparations are shown in Table 2.

**Scheme 4.** Use of 1,4-Diaminobutane as Spacer Arm To Immobilize ADH-A on the Polyphosphazene

Scheme 5. Use of NaBH<sub>4</sub> To Reduce the Imine Bonds in Polyphosphazene 5

Due to the good results obtained for the first step with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, we stirred a mixture of **4** and ADH-A in a saturated solution of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> during 30 min at 0 °C, but only a slight improvement was observed (entry 2). However, a great activity enhancement was achieved when ADH-A was mixed in buffer at 0 °C with magnetic stirring during 12 h (entry 3). The activity (85% conv.) was comparable to the one obtained with the commercial ADH-A.<sup>29</sup> The lower conversion observed at room temperature during 12 h with magnetic stirring (entry 4) proved that the immobilization was better performed at low temperature. Because it is known that magnetic stirring can be harmful to enzymes, the orbital shaking at 20 °C was essayed (entry 5). The activity was better in comparison with the anchoring at the same temperature with magnetic stirring, but lower than that obtained at 0 °C. This can be attributed to the fact that when incubating the enzyme directly with the unmodified polyphosphazene **3** using orbital shaking, this led to a preparation with catalytic activity (around 15% conv.), evidencing unspecific adsorptions of the biocatalyst to the polymer.

A final step using a glycine solution to block the nonreacting aldehydes was employed in all cases to obtain the supported catalyst. In an attempt to simplify the protocol, we examined the effects of this step on the enzymatic activity. The ADH-A immobilized on the polyphosphazene without the treatment with glycine exhibited a similar conversion (82%), demonstrating that this step was not necessary.

Finally, considering the potential hydrolytic instability of the imine bond present in the catalyst **5** that could diminish its activity within time, a mild reduction agent such as sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>) was employed (Scheme 5). The material obtained by treating **5** with a solution of NaBH<sub>4</sub> in water during 30 min at 0 °C showed a lower enzymatic conversion (62%), suggesting the partial inactivation of the biocatalyst during the reduction. In another experiment, after incubation of **5** in buffer at 30 °C during 24 h, filtration and wash, the buffer used to wash the polymer displayed no enzymatic activity, showing that imine bonds in **5** were stable during its use as catalyst. Therefore, the reduction protocol was not further considered.

As a consequence, the anchoring of ADH-A to polyphosphazene **3** (Scheme 2) was done using the conditions shown in Tables 1 (entry 5) and 2 (entry 3), and no glycine and reduction steps were necessary. Considering that the reaction of the enzyme with the aldehyde is almost quantitative,<sup>18</sup> the final enzymatic preparation possess approximately  $y = 0$  and  $z = 0.04$  (Scheme 2).

Several ketones were selected to investigate the effects of the immobilization of ADH-A on the catalytic selectivity (Table 3). We observed that aliphatic (**9** and **11**) and aromatic (**13** and **15**) ketones were selectively reduced to the corresponding enantiopure Prelog alcohols with similar conversions as the ones obtained with the commercial ADH-A.

The enzyme immobilization presents several advantages: the protein may become thermally stabilized, allowing its use at

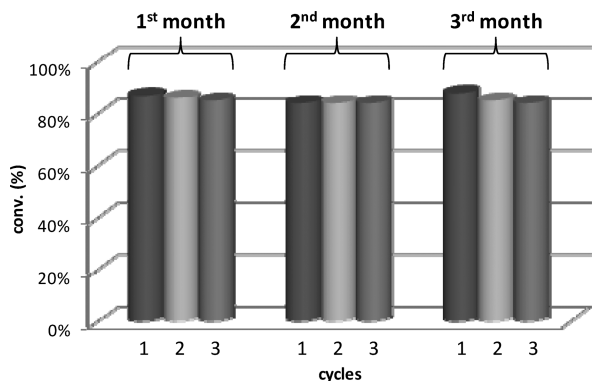
Table 3. Bioreduction of Several Ketones Employing Immobilized ADH-A<sup>a</sup>

entry	ketone	product	enzymatic conv. <sup>b</sup> (%)	e.e. <sup>c,d</sup> (config.)
1	<b>9</b>	<b>10</b>	78	98% (S)
2	<b>11</b>	<b>12</b>	85	99% (S)
3	<b>13</b>	<b>14</b>	83	99% (R) <sup>e</sup>
4	<b>15</b>	<b>16</b>	99	99% (R) <sup>e</sup>

<sup>a</sup> For reaction conditions, see Supporting Information. <sup>b</sup> Measured by GC. <sup>c</sup> Measured by chiral GC. <sup>d</sup> e.e. = enantiomeric excess. <sup>e</sup> Change in Cahn–Ingold–Prelog (CIP) priority.

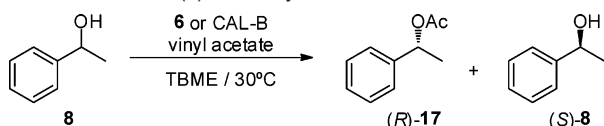
higher temperatures,<sup>30</sup> and more importantly, the possibility of recycling exists, therefore, minimizing the cost of the processes. We observed that the enzymatic activity of both commercial ADH-A (already described as a very thermostable enzyme<sup>31</sup>) and **5** remained unchanged after heating in buffer for 72 h at temperatures between 20 and 60 °C (see Supporting Information). Only at 80 °C for 1 h, a loss of 80–90% of the activity was observed in both cases. Therefore, the immobilization of the alcohol dehydrogenase to the polyphosphazene had no positive or negative effect on the thermal stability. Recycling is a key advantage of supported biocatalysts. In the case of ADHs, this is especially beneficial because this enzyme works in aqueous media, where proteins are highly soluble. Therefore, we studied the recycling capacity of **5** applied to the bioreduction of acetophenone. We observed that the immobilized enzyme could be used after six catalytic cycles without appreciable loss of activity (in all cases between 95–100% of remaining activity). We also found that storing the catalyst for 30 days at –20 °C after using it in three consecutive catalytic cycles of reduction of ketone **7**, it could be reutilized to perform three other bioreductions (Figure 1). As can be noted, the immobilized ADH-A was used after 3 months of storage without loss of enzymatic activity, showing the high stability of this preparation and its great potential as biocatalyst for stereoselective bioreductions in aqueous media.

**Immobilization of CAL-B on Polyphosphazene 3.** The use of polyphosphazene **3** as an adequate precursor to anchor biocatalysts was extended to other enzymes that work in organic media. Thus, *Candida antarctica* lipase B was selected as a stable enzyme since it has been shown as a very stable catalyst for many selective transformations over secondary alcohols or amines.<sup>14</sup> First, we tried to covalently link CAL-B employing the optimized conditions previously described for ADH-A. This product **6** (Scheme 2) was tested in the acylation reaction of



**Figure 1.** Stability study of **5** vs time in the bioreduction of acetophenone. Three consecutive catalytic cycles were performed and then **5** was kept for 30 days at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the next three catalytic cycles were done.

**Scheme 6.** Enzymatic Acylation of 1-Phenylethanol Using Immobilized CAL-B (**6**) and Vinyl Acetate

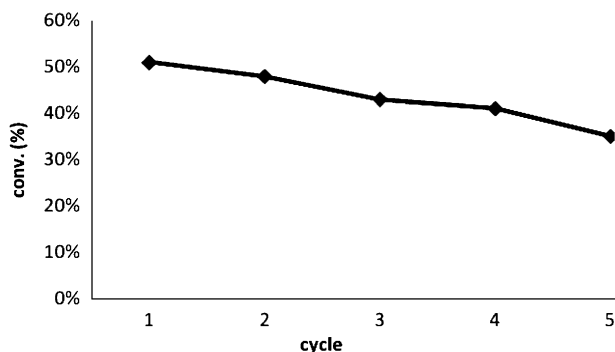


*rac*-1-phenylethanol (**8**) with vinyl acetate (3 equiv) in TBME at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Scheme 6) to achieve the kinetic resolution of this substrate. We confirmed that immobilized CAL-B was able to perform this reaction with high selectivity ( $c = 49\%$ ), affording both enantiopure substrate and product after 24 h. Interestingly, under the same conditions, commercial pure CAL-B afforded a conversion of 17%, evidencing an important stability enhancement for this lipase.

To determine the recycling potential of this novel biocatalyst, it was reutilized several times for the kinetic resolution of *rac*-**8** in TBME (Figure 2). The results showed a progressive loss of activity, although, after 5 cycles, the conversions were still higher than 35%.

### Conclusions

The novel polyphosphazene derivative  $\{\text{NP}[\text{O}_2\text{C}_2\text{H}_7.5\text{-(NH}_2)_{0.5}\text{]}\}_n$ , prepared by reduction of the nitro precursor with the Lalancette's reagent, can be advantageously used to synthesize carriers for biocatalysts such as alcohol dehydrogenases and lipases. The covalent attachment of the enzymes was achieved using glutaraldehyde as linker. Several reaction parameters were optimized to obtain good catalytic activities for both preparations. In the case of ADH-A, the catalyst was



**Figure 2.** Recycling study of **6** in the lipase-catalyzed acylation of *rac*-**8** ( $t = 24\text{ h}$ ).

highly efficient for the stereoselective bioreductions of several aliphatic and aromatic ketones in aqueous media showing a good thermal stability and an excellent recycling capacity, being equally active after three months of storage. For the immobilized CAL-B, this material showed a higher activity than the pure lipase to achieve kinetic resolutions on organic solvents and a moderately good capability of reutilization.

**Acknowledgment.** A.C. thanks Universidad de Oviedo for a predoctoral fellowship. I.L. thanks Principado de Asturias for personal funding (Clarín Program). Financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Projects CTQ2007-61126 and CTQ2007-61188) is gratefully acknowledged.

**Supporting Information Available.** Experimental procedures, analytics, and  $^1\text{H}$  NMR and TGA copies are provided. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

### References and Notes

- (1) (a) *Synthesis and Applications of Poly(organophosphazenes)*; Gleria, M., De Jaeger, R., Eds.; Nova Sci.: New York, 2004. (b) Allcock, H. R. *Chemistry and Applications of Polyphosphazenes*; Wiley: New York, 2003.
- (2) (a) *Polyphosphazenes for Biochemical Applications*; Andrianov, A., Ed.; Wiley: Hoboken, 2009. (b) See ref 1b, Chapter 15, p 516.
- (3) See Carriedo G. A. *Synthesis and Chemical Regularity in Phosphazene Copolymers*; in ref 2a, Chapter 19, p 379.
- (4) Andrianov, A. K.; Marin, A.; Chen, J.; Sargent, J.; Corbett, N. *Macromolecules* **2004**, *37*, 4075.
- (5) Carriedo, G. A.; García Alonso, F. J.; González, P. A.; Gómez Elipe, P. *Polyhedron* **1999**, *18*, 2853.
- (6) See the recent reviews: (a) Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453. (b) Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289.
- (7) (a) Wong, L. S.; Khan, F.; Micklefield, J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4025. (b) Cao, L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 217. (c) Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3336. (d) Katchalski-Katzir, E. *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 471.
- (8) Allcock, H. R.; Kwon, S. *Macromolecules* **1986**, *19*, 1502.
- (9) Matsuki, T.; Saiki, N. Patent JP 01030650 and CAN 112:32652, 1989.
- (10) Allcock, H. R.; Pucher, S. R.; Visscher, K. B. *Biomaterials* **1994**, *15*, 502.
- (11) (a) *Modern Biocatalysis*; Fessner, W.-D., Anthonsen, T., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2009. (b) *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Gotor, V., Alfonso, I., García-Urdiales, E., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008. (c) Gotor, V. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 420.
- (12) Faber, K. *Bioretransformations in Organic Chemistry*, 5th ed.; Springer: Berlin, 2004.
- (13) See the recent bibliography: (a) Patel, R. N. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 659. (b) Gotor-Fernández, V.; Rebolledo, F.; Gotor, V. In *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*; Patel, R. N., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2006; Chapter 7, p 203. (c) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111.
- (14) Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797.
- (15) Recent bibliography: (a) Buchholz, S.; Gröger, H. *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industry*; Patel, R. N., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2007; p 757. (b) de Wildeman, S. M. A.; Sonke, T.; Schoemaker, H. E.; May, O. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260. (c) Moore, J. C.; Pollard, D. J.; Kosjek, B.; Devine, P. N. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1412. (d) Kroutil, W.; Mang, H.; Edegger, K.; Faber, K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120.
- (16) (a) Bisogno, F. R.; Lavandera, I.; Kroutil, W.; Gotor, V. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1730. (b) Kurina-Sanz, M.; Bisogno, F. R.; Lavandera, I.; Orden, A. A.; Gotor, V. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1842. (c) Edegger, K.; Gruber, C. C.; Poessl, T. M.; Wallner, S. R.; Lavandera, I.; Faber, K.; Niehaus, F.; Eck, J.; Oehrlein, R.; Hafner, A.; Kroutil, W. *Chem. Commun.* **2006**, 2402. (d) Edegger, K.; Stampfer, W.; Seisser, B.; Faber, K.; Mayer, S. F.; Oehrlein, R.; Hafner, A.; Kroutil, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *8*, 1904. (e) Stampfer, W.; Kosjek, B.; Faber, K.; Kroutil, W. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 402. (f) Stampfer,

- W.; Kosjek, B.; Moitzi, C.; Kroutil, W.; Faber, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014.
- (17) (a) Rocha-Martin, J.; Vega, D. E.; Cabrera, Z.; Bolivar, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; Berenguer, J.; Guisán, J. M. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 1004. (b) Hildebrand, F.; Lütz, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 3219. (c) Bolivar, J. M.; Wilson, L.; Ferrarotti, S. A.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; Mateo, C. *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 85. (d) Soni, S. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *82*, 1299.
- (18) Goldberg, K.; Krueger, A.; Meinhardt, T.; Kroutil, W.; Mautner, B.; Liese, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1171.
- (19) For a review, see: Carriedo, G. A. *J. Chil. Chem. Soc.* **2007**, *52*, 11909.
- (20) (a) Carriedo, G. A.; García Alonso, F. J.; Gómez Elipe, P.; Fidalgo, J. I.; García Alvarez, J. L.; Presa Soto, A. *Chem.—Eur. J.* **2003**, *9*, 3833. (b) Carriedo, G. A.; Fernández Catuxo, L.; García Alonso, F. J.; Gómez Elipe, P.; González, P. A. *Macromolecules* **1996**, *29*, 5320.
- (21) Carriedo, G. A.; Presa-Soto, A.; Valenzuela, M. L. *Macromolecules* **2008**, *41*, 6972.
- (22) Lalancette, J. M.; Frêche, A. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 739.
- (23) In this approach, an excess of a cheap and easily accessible alcohol such as 2-propanol is employed to force the thermodynamic equilibrium toward the reduction of the desired ketone.
- (24) Commercial ADH-A is a powder that completely dissolved in aqueous buffer. To compare the enzymatic activities of both preparations, the quantity equivalent to 10 enzyme units (10 U) was employed in both cases.
- (25) To ensure that no unspecific adsorptions occurred, underivatized polyphosphazene **3** was incubated with ADH-A and then was washed with buffer. This carrier did not show measurable enzymatic activity, demonstrating that it came from the biocatalyst covalently linked to the support.
- (26) (a) Roberge, C.; Amos, D.; Pollard, D.; Devine, P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *56*, 41. (b) Vafiadi, C.; Topakas, E.; Christakopoulos, P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 35.
- (27) (a) Neilson, R. H.; Hani, R.; Wisian-Neilson, P.; Meister, J. S.; Roy, A.; Hagnauer, G. L. *Macromolecules* **1987**, *20*, 910. (b) Hagnauer, G. L. *J. Macromol. Sci.* **1981**, *A16*, 385. (c) Hagnauer, G. L.; Koulouris, T. N. *Chromosome Sci.* **1981**, *19*, 99. (d) Hagnauer, G. L.; Laliberte, B. R. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **1987**, *20*, 910.
- (28) Ozyilmaz, G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *56*, 231.
- (29) Due to the thermodynamic properties of the “substrate-coupled” system, no quantitative conversion can be obtained. See Goldberg, K.; Edegger, K.; Kroutil, W.; Liese, A. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95*, 192.
- (30) Burdette, D. S.; Tchernajenko, V.; Zeikus, J. G. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 11.
- (31) Stampfer, W.; Kosjek, B.; Kroutil, W.; Faber, K. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 865.

BM100091A





## Immobilized redox enzymatic catalysts: Baeyer–Villiger monoxygenases supported on polyphosphazenes

Aníbal Cuetos<sup>a</sup>, Ana Rioz-Martínez<sup>a</sup>, María L. Valenzuela<sup>b</sup>, Iván Lavandera<sup>a</sup>, Gonzalo de Gonzalo<sup>a</sup>, Gabino A. Carriedo<sup>c,\*</sup>, Vicente Gotor<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, University of Oviedo, C/Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andrés Bello, Av. República 275, Santiago, Chile

<sup>c</sup> Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, University of Oviedo, C/Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 August 2011

Received in revised form

23 September 2011

Accepted 5 October 2011

Available online 12 October 2011

#### Keywords:

Enzyme immobilization

Polyphosphazenes

Oxidoreductases

Baeyer–Villiger monoxygenases

Cofactor recycling

### ABSTRACT

A novel method has been employed for the selective covalent co-immobilization of a Baeyer–Villiger monoxygenase (phenylacetone monoxygenase from *Thermobifida fusca*) and a NADPH recycling enzyme (glucose-6-phosphate dehydrogenase) on the same polyphosphazene carrier for the first time starting from  $\{NP[O_2C_{12}H_{8-x}(NH_2)_x]\}_n$  ( $x$  ranging from 0.5 to 2) using glutaraldehyde as connector. In all cases the preparation was active and it was found that the optimum proportion of amino groups in the starting polyphosphazene was 0.5 per monomer. The immobilized biocatalysts showed similar selectivity when compared with the isolated monoxygenase, demonstrating the potential of this novel type of immobilizing material, although their recyclability must still be improved.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Economy and productivity have been for decades the main criteria to evaluate industrial processes. However, in the last few years, the design of chemical routes which involve less quantity of reagents and generate less waste and hazardous materials is becoming a very important issue, embracing the so called ‘Green Chemistry’ [1]. In this sense, more and more chemical transformations are changing from a ‘stoichiometric mode’ to a catalytic one. The use of these methodologies diminishes costs and enhances productivity affording better atom economy, higher energy efficiency, and less waste production [2]. Among all the catalytic protocols developed, biocatalytic reactions have recently gained more relevance due to the mild conditions employed and the high chemo-, regio-, and/or stereoselectivities achieved [3–6]. Although undoubtedly enzymes offer several advantages regarding other catalysts, they still suffer from certain drawbacks such as high price and relatively low stability and medium flexibility. These problems can be minimized by employing techniques of enzyme

immobilization [7–9]. When, e.g. a biocatalyst is covalently attached to a support in an active form, it can be reused, the enzyme stability can be improved and the final product is enzyme-free. An ideal support should offer various characteristics like high chemical stability and temperature resistance.

In this sense, polyphosphazenes are good model polymers because their physical and chemical properties can be easily tuned by selecting the appropriate functionalities linked to the phosphorous atom [10,11]. The synthesis of functionalized polyphosphazenes by secondary reactions on pendant side groups is a fruitful alternative to the classical macromolecular substitution with nucleophiles carrying the desired functional groups [10–12]. Due to their high chemical resistance, these derivatives possess a great potential for biotechnological applications and, in fact, novel materials derived from this type of polymer have recently been used in the field of medicine [13,14]. Functionalized polyphosphazenes have proven to be an efficient material to covalently attach different types of enzymes like trypsin or glucose-6-phosphate dehydrogenase on a support of  $[NP(OPh)_2]_n$  on an alumina carrier [15], or an invertase on spherical particles of  $[NP(OCH_2CF_3)_2]_n$  [16]. In another contribution, an urease was encapsulated on a hydrogel derived from poly[bis(methoxyethoxyethoxy)phosphazene] through irradiation with  $\gamma$ -rays to cross-link the polymer and trap the biocatalyst [17]. Recently, we have developed the synthesis of an amino polyphosphazene derivative that

\* Corresponding author. Tel.: +34 985103462; fax: +34 985103446.

\*\* Corresponding author. Tel.: +34 985103448; fax: +34 985103448.

E-mail addresses: [gac@uniovi.es](mailto:gac@uniovi.es) (G.A. Carriedo), [vgs@uniovi.es](mailto:vgs@uniovi.es), [vgs@fq.uniovi.es](mailto:vgs@fq.uniovi.es) (V. Gotor).



could be used as tunable support to immobilize different enzymes. The polyphosphazene  $\{NP[O_2C_{12}H_{7.5}(NH_2)_{0.5}]\}_n$  was prepared by a nitration–reduction sequence and was successfully employed as carrier to attach *Candida antarctica* lipase B and alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* (ADH-A). Using these supports we could demonstrate that the immobilized lipase was stable in organic solvents while the immobilized alcohol dehydrogenase (ADH) was used in aqueous solution [18]. These biocatalysts could be recycled several times in both aqueous and organic media.

Oxidoreductases are very interesting catalysts to achieve highly stereoselective reactions. One of the members of this enzyme family are the Baeyer–Villiger monooxygenases (BVMOs, EC 1.14.13.x) [19–22], a group of NAD(P)H dependent flavoproteins. Apart from the Baeyer–Villiger reaction, these enzymes are able to catalyze several oxidative processes with high regio- and stereoselectivities employing molecular oxygen as mild oxidant. One of the main drawbacks for scaling-up BVMO-catalyzed reactions is the need of the expensive nicotinamide cofactor NAD(P)H. For this, usually another enzyme like glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) is employed coupled with the BVMO to allow the cost effective utilization of a catalytic amount of the cofactor. Recently, a more sophisticated ‘self-sufficient’ approach was described by covalently fusing both BVMO and a recycling enzyme [23,24]. In this case, several BVMOs were linked to a phosphite dehydrogenase (PTDH), which catalyzes the oxidation of phosphite into phosphate by which it reduces  $NADP^+$  into NADPH.

There are few examples concerning BVMO immobilization. Zambianchi and co-workers co-immobilized cyclohexanone monooxygenase (CHMO) from *Acinetobacter* sp. and an ADH from *Thermoanaerobium brockii* (ADHTB) on Eupergit C to carry out the sulfoxidation of thioanisole. Under these conditions, the BVMO half-life time increased and several reuses could be performed [25]. In a previous report, Abril et al. showed another CHMO immobilization example, but no information concerning its recycling was given [26]. Very recently, recombinant *Escherichia coli* whole-cells overexpressing cyclopentanone monooxygenase (CPMO) were encapsulated in polyelectrolyte complex capsules which rendered a biocatalyst more active and stable than the corresponding free cells [27]. In this study we explored the potential of several amino polyphosphazenes to covalently attach phenylacetone monooxygenase (PAMO) from *Thermobifida fusca* [28] and G6PDH. PAMO is an attractive BVMO since it is a thermostable protein able to selectively oxidize a range of ketones [29–33] and sulfides [34–37]. We report for the first time the attachment of PAMO on several polyphosphazene carriers  $\{NP[O_2C_{12}H_{8-x}(NH_2)_x]\}_n$  (5–7) and their properties as new biocatalysts. These polymers were used to immobilize to the same chain both PAMO and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) enzymes.

## 2. Experimental

### 2.1. General

Ketone **14**, ester **15**, sulfides **19** and **21**, sulfoxide **20**, glucose-6-phosphate, and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* were purchased from commercial sources. Compounds **17**, **18**, **22**, **23**, and **24** were synthesized as previously shown [33,37]. PAMO from *T. fusca* was purified as previously described [28]. 1 unit (U) of PAMO oxidizes 1.0  $\mu$ mol of phenylacetone to benzyl acetate per minute at pH 9.0 and 25 °C in the presence of NADPH. Polyphosphazenes **1** [38,39], **2–4** [40], and **5** [18] were synthesized as previously described. Tetrahydrofuran (THF) was treated with KOH and distilled twice from Na in the presence of benzophenone.

The infrared (IR) spectra were recorded with a Perkin-Elmer FT Paragon 1000 spectrometer. NMR spectra were recorded on Bruker NAV-400, DPX-300, AV-400, and AV-600 instruments. The  $^1H$  and  $^{13}C\{^1H\}$  NMR spectra in deuterated dimethylsulfoxide (DMSO- $d_6$ ) are given in  $\delta$  relative to trimethylsilane (TMS) (DMSO at 2.51 ppm and 40.2 ppm, respectively).  $^{31}P\{^1H\}$  NMR are given in  $\delta$  relative to external 85% aqueous  $H_3PO_4$ . The C, H, N, analyses were performed with an Elemental Vario Macro. Tg was measured with a Mettler DSC Toledo 822 differential scanning calorimeter equipped with a TA 1100 computer. Thermal gravimetric analyses (TGA) were performed on a Mettler Toledo TG 50 TA 4000 instrument. The polymer samples were heated at a rate of 10 °C  $min^{-1}$  from ambient temperature to 900 °C under constant flow of nitrogen or under air. Gas chromatography (GC) analyses were performed on a Hewlett Packard 6890 Series II chromatograph. High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were carried out with an UV detector at 210 nm using a chiral HPLC column. For the determination of enzymatic conversions and stereoselectivities, see Supplementary Data.

### 2.2. Synthesis of $\{NP[O_2C_{12}H_{8-x}(NH_2)_x]\}_n$ (5–7)

To the prepared Lalancette's reagent [18,41], THF (50 mL) and a solution of  $\{NP[O_2C_{12}H_{8-x}(NO_2)_x]\}_n$  **2–4** [40] (2 g, 9.96 mmol) in THF (50 mL) were added and the final volume was increased adding 100 mL of THF. The mixture was then refluxed with stirring for 24 h (the formation of a solid in the walls of the flask was observed). After cooling to room temperature, 10% (v/v) aqueous HCl (5 mL) were added and stirring was continued for 7 h. The resulting mixture was filtered and the solid was stirred with 10% aqueous NaOH (100 mL) for 24 h. The solid was separated by filtration, washed with plenty of water until neutral pH, and dried at 40 °C under vacuum for 3 days (76–87% yield).

**6** ( $x=1$ ): IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3430, 3366 m.br ( $\nu$  NH), 3064 w ( $\nu$  CH arom.), 1623 br.m, 1499 m, 1479 m ( $\nu$  CC arom.,  $\delta$  NH), 1384 sh.m (typical of biphenoxyphosphazenes, not assigned), 1346 m, 1267 s, 1246 s, 1192 vs ( $\nu$  NP), 1096s ( $\nu$  P-OC), 1040 w, 1013 w (not assigned), 943–923 s.br ( $\delta$  P-OC), 820 v.w (not assigned), 785 s, 751 s ( $\delta$  CH arom.), 606 m, 536 m.br (other).  $^1H$  NMR (ppm, DMSO- $d_6$ ): 6.6–7.4 v.br (aromatic protons), 4.5 v.br ( $NH_2$ ).  $^{31}P$  NMR (ppm, DMSO- $d_6$ ): –5.0 br. Analysis (Calcd.): C 55.2 (59.0), N 10.9 (11.4), H 3.5 (3.7), sulfur retained 2%. TGA (from ambient to 900 °C): Continuous loss from 400 to 800 °C; final residue 47% (under  $N_2$ ), 13% (under air). Tg: 132 °C.

**7** ( $x=2$ ): IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3435, 3367 m.br ( $\nu$  NH), 3065 w ( $\nu$  CH arom.), 1623 br.m, 1521 m, 1499 m ( $\nu$  CC arom.,  $\delta$  NH), 1389 sh.m (typical of biphenoxyphosphazenes, not assigned), 1347 s, 1231 s, 1194 vs ( $\nu$  NP), 1120 s, 1094 s ( $\nu$  P-OC), 1041 w, 1027 w (not assigned), 945–925 s.br ( $\delta$  P-OC), 834 w, 781 s, 744 s ( $\delta$  CH arom.), 636 m, 578 m.br (other). Analysis (Calcd.): C 47.8 (55.6), N 14.8 (16.2), H 2.8 (3.9), sulfur retained 2%. TGA (from ambient to 900 °C): Continuous loss from 300 to 800 °C with a significant loss at 365 °C; final residue 37% (under  $N_2$ ), 19% (under air). Tg: 149 °C.

### 2.3. Immobilization of PAMO on polyphosphazenes 5–7 to obtain 11–13

Polyphosphazene **5–7** (60 mg) was added to a saturated solution of  $(NH_4)_2SO_4$  (9 mL) and a solution of glutaraldehyde (1 mL, 2.5%, v/v) in phosphate buffer 50 mM pH 7. Then it was mixed under magnetic stirring during 2 h at 50 °C. The solid obtained was filtered off, washed with phosphate buffer 50 mM pH 7 ( $3 \times 1$  mL), and dried under vacuum, affording **8–10** (71–85% yield).

Intermediate **8–10** (20 mg) was added to 1 mL of Tris–HCl buffer 50 mM pH 9 with PAMO (20  $\mu$ L, 100  $\mu$ M, 1 U) and was orbitally stirred (250 rpm) at 40 °C during 15 h. Afterwards, the polymer

was filtered, washed with Tris–HCl buffer 50 mM pH 9 ( $4 \times 0.5$  mL) and dried under vacuum. These formulations were obtained as fine powders, and no control of the particle size (microns) could be achieved, so the effects of this parameter in the catalytic activity could not be evaluated. In all cases, buffer employed to wash **11** showed remaining enzymatic activity ( $\leq 5\%$ ), demonstrating that PAMO was in excess when it was immobilized on polyphosphazene **8**.

#### 2.4. Co-immobilization of PAMO and G6PDH on polyphosphazene **5** to obtain **16**

To a suspension of **8** at  $40^\circ\text{C}$  in 1 mL of Tris–HCl buffer 50 mM pH 9, 20  $\mu\text{L}$  of PAMO (100  $\mu\text{M}$ , 1 U) and 10  $\mu\text{L}$  of G6PDH (10 U) were added. The reaction mixture was stirred under orbital shaking at  $40^\circ\text{C}$  and 250 rpm overnight. Then, it was centrifuged and washed with buffer Tris–HCl 50 mM pH 9 ( $3 \times 1$  mL) and dried under vacuo. This formulation was obtained as fine powder, and no control of the particle size (microns) could be achieved, so the effects of this parameter in the catalytic activity could not be evaluated.

#### 2.5. Enzymatic oxidation of phenylacetone employing **11–13** as biocatalyst

20 mg of biocatalysts **11–13** were placed in an Eppendorf tube and then 500  $\mu\text{L}$  of Tris–HCl buffer 50 mM 1 mM NADPH pH 9, D-glucose-6-phosphate (20  $\mu\text{L}$ , 500 mM), phenylacetone (5  $\mu\text{L}$ , 1 M in DMSO), and G6PDH (5  $\mu\text{L}$ , 10 U) were also added. The reaction was shaken at  $30^\circ\text{C}$  and 250 rpm during 24 h. Afterwards, the reaction was extracted with ethyl acetate ( $2 \times 0.6$  mL), and the organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Conversion was measured by GC (see Supplementary Data).

#### 2.6. Enzymatic oxidation employing **16** as biocatalyst

20 mg of biocatalyst **16** were placed in an Eppendorf tube and then 500  $\mu\text{L}$  of Tris–HCl buffer 50 mM 1 mM NADPH pH 9, D-glucose-6-phosphate (20  $\mu\text{L}$ , 500 mM), and the substrate (5  $\mu\text{L}$ , 1 M in DMSO) were also added. The reaction was shaken at  $30^\circ\text{C}$  and 250 rpm during 24 h. Afterwards, the reaction was extracted with ethyl acetate ( $2 \times 0.6$  mL), and the organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Conversions and enantioselectivities were measured by GC or HPLC (see Supplementary Data).

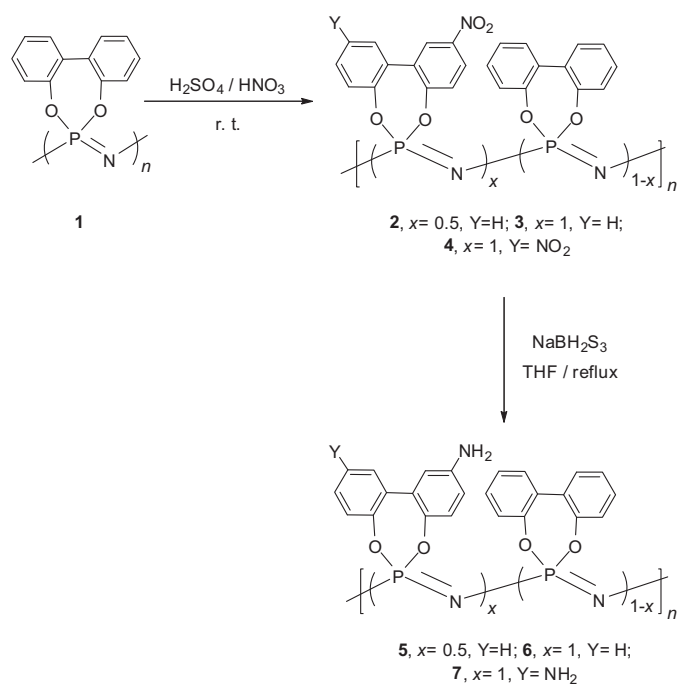
#### 2.7. Recycling study for the oxidation of **14** with polyphosphazenes **11** or **16**

20 mg of biocatalysts **11** or **16** were placed in an Eppendorf tube and then 500  $\mu\text{L}$  of Tris–HCl buffer 50 mM 1 mM NADPH pH 9, D-glucose-6-phosphate (20  $\mu\text{L}$ ), phenylacetone (5  $\mu\text{L}$ , 1 M in DMSO), and G6PDH (5  $\mu\text{L}$ ) in case of polyphosphazene **11** were also added. The reaction was shaken at  $30^\circ\text{C}$  and 250 rpm during 24 h. Afterwards, the reaction was extracted with ethyl acetate ( $2 \times 0.6$  mL), and the organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . To avoid material loss, the next cycles were performed in the same eppendorf tube, adding to the polymer the rest of reagents as mentioned before. Finally, conversion was measured by GC (see Supplementary Data).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Synthesis of $\{NP[O_2C_{12}H_{8-x}(NH_2)_x]\}_n$ (**5–7**)

The synthesis of polymers **5–7** (Scheme 1) was achieved as previously described starting from polyphosphazene **1** [38,39], by selective nitration with a sulfonitric mixture at room temperature during 1.5 h [40], followed by reduction with Lalancette's reagent

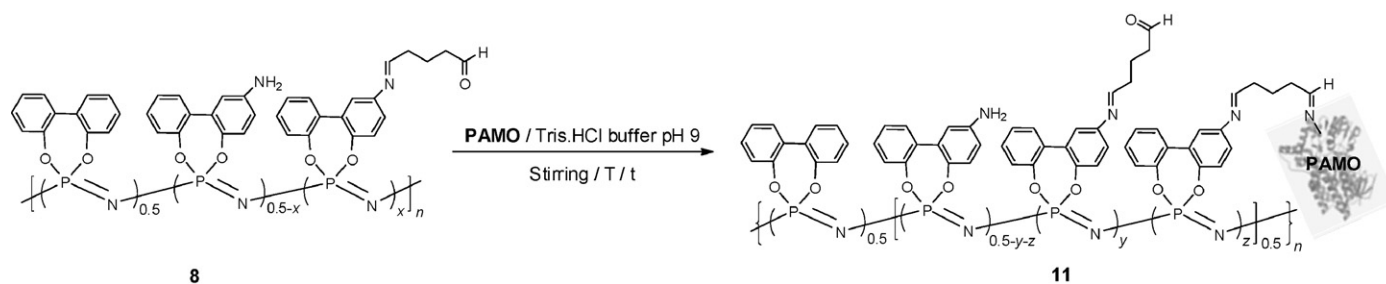


Scheme 1. Synthesis of polyphosphazenes **5–7**.

[41] under reflux of THF (see Section 2). The composition and structure of the products was confirmed by the analytical and spectroscopic data. The IR showed the expected bands at  $>3300\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  NH) and the broadness of the band around  $1620\text{ cm}^{-1}$  due to the overlapping with the NH-bending absorption. The relative intensities of the IR signals at 1527 and  $1478\text{ (in cm}^{-1}\text{)}$  was consistent with the  $x$  value in the chemical formula of the nitro polyphosphazenes **2–4** [40]. It must be mentioned that experimental carbon contents lower than the calculated values are frequent in polyphosphazenes containing amino groups and is related to high char residues, as confirmed by the TGA data. The presence of the  $\text{NH}_2$  group was also observed in the  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) as a very broad signal centered between 4.5 and 4.9 ppm. The very low solubility of these compounds in THF prevented the measurement of the  $M_w$ . In fact, there was clear a trend: the more percentage of amino groups present in the polymer, the more insoluble it was. TGAs from r.t. to  $900^\circ\text{C}$  showed a continuous weight loss from 300 to  $800^\circ\text{C}$  with a significant loss between 360 and  $420^\circ\text{C}$  obtaining as final residues 37–47% under  $\text{N}_2$  or 13–19% under air.

#### 3.2. Immobilization of PAMO on polyphosphazene **5**. Study of the carrier structure

Due to our previous experience with polymer **5** [18], we started the study with this carrier. Thus, it was envisaged to use the same covalent methodology in view of the excellent results obtained for ADH-A and CAL-B. Initially, amino polyphosphazene **5** was activated employing glutaraldehyde due to the fact that this molecule possesses two reactive aldehydes moieties, being a logical choice to act as linker between the polymer and the protein. In the same conditions as previously shown [18], polyphosphazene with glutaraldehyde **8** was obtained in high yields. In the following step, we tried to link PAMO (polymer **11**, Scheme 2) in the same conditions that were found for ADH-A. Therefore, a PAMO solution in Tris–HCl 50 mM pH 9 buffer, due to the fact that this is the optimal pH for this enzyme [28], was added to **8** under magnetic stirring at  $5^\circ\text{C}$  for 15 h.



**Scheme 2.** General strategy to covalently link PAMO to activated polyphosphazene **8**.

To find out if a biocatalyst has been attached in a support, several techniques like IR spectroscopy or NMR can be employed, although in our specific case, the very low solubility of these preparations led us to use an indirect probe such as the enzymatic activity. After 15 h of incubation, the immobilized PAMO preparation **11** was tested using as a model reaction the oxidation of phenylacetone **14** into benzyl acetate **15** in Tris–HCl buffer. For this, G6PDH and G6P were added to recycle the cofactor in a ‘coupled enzyme’ approach (Scheme 3). Although the observed enzymatic conversion (7%), was much lower than the one obtained with purified PAMO (>97%), the result clearly demonstrated the anchoring of the enzyme to the polyphosphazene. In this case, in order to compare the enzymatic activities of both preparations, the quantity equivalent to one enzyme unit (1 U) was used.

To optimize the enzyme immobilization (Scheme 2), different parameters, like reaction time, temperature, and type of shaking were tested when mixing **8** with PAMO. Due to the fact that PAMO is thermostable [42], higher temperatures for its immobilization were tried. Thus, when the reaction was done at room temperature during 15 h, the enzymatic conversion was doubled (14%), although still very low. This process was repeated at 40 °C during 15 h (18% conv.) or 24 h (20% conv.), at 50 °C for 15 h (11% conv.), and 60 °C for 15 h ( $\leq 3\%$  conv.), but still enzymatic conversions were not high enough. Since it has been described that in some cases the magnetic stirring can be harmful for enzymes [43], orbital shaking was selected to immobilize PAMO at 40 °C on polyphosphazene with glutaraldehyde **8**. After one night of incubation, we observed comparable activity to that obtained with the purified enzyme (>97%). Higher incubation temperatures did not improve this result. To ensure that unspecific adsorption did not occur, underivatized polymer **5** was incubated with PAMO and then washed with buffer. The resulting treated carrier showed very low enzymatic activity ( $\sim 10\%$ ). Another control experiment was the incubation of polyphosphazene with PAMO **11** in Tris–HCl buffer 50 mM pH 9 for 24 h at 30 °C and 250 rpm. After that time, the polymer was filtered off, washed, and the oxidation of **14** was performed again, obtaining 84% of conversion after 24 h. The small reduction

of the activity can be ascribed to some inactivation of the protein during the whole process.

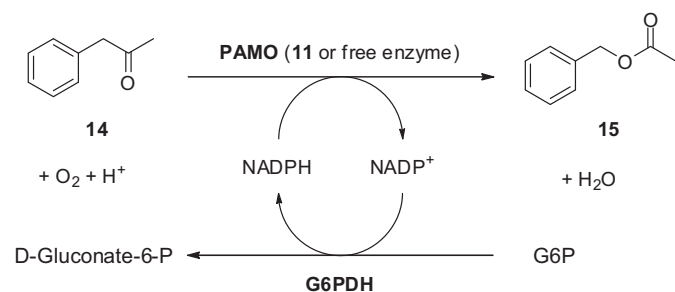
In order to measure the units of PAMO attached per mg of polyphosphazene, a calibration curve plotting U of PAMO vs enzymatic conversion in the oxidation of **14** was made (see Supplementary Data), obtaining that  $8 \text{ mU mg}^{-1}$  of polyphosphazene were present in this preparation.

It has been recently found that an immobilized lipase on silica presented a stability improvement using 1,4-diamines as a space arm between two molecules of glutaraldehyde [44]. This could be attributed to a lower steric hindrance between the carrier and the protein, therefore minimizing undesirable interactions between other functional groups on the carrier surface. Starting from activated polyphosphazene with glutaraldehyde **8**, 1,4-diaminobutane was firstly inserted [18]. Due to the higher nucleophilicity of the aliphatic diamine, the first and second coupling reactions were done at room temperature, while the last one was achieved at 40 °C in the previous optimal conditions. This new biocatalytic preparation showed very low enzymatic conversion (9% after 1 h) in comparison to **11** (77% after 1 h). Therefore, these conditions were dismissed.

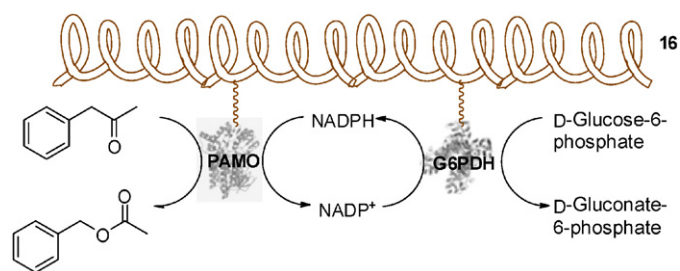
Considering the potential hydrolytic instability of the imine bond present in the biocatalyst **11** that could diminish its activity within time, a mild reductive agent such as sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ ) was employed to transform these bonds into stable amino-ones [18]. Unfortunately, the material obtained by treating **11** with a solution of  $\text{NaBH}_4$  (0.026 M) in water for 30 min at 0 °C did not show any measurable enzymatic conversion, indicating the total inactivation of the monooxygenase during the reduction protocol. So, it was not further considered.

Once the best conditions of immobilization for PAMO on **5** were established, the next step was the study of the polyphosphazene carrier. At this point, we were interested in the possible effect of enhancing the quantity of linkers present in the polymer. Thus, polyphosphazenes  $\{\text{NP}[\text{O}_2\text{C}_{12}\text{H}_{8-x}(\text{NH}_2)_x]\}_n$  with a higher (**6**,  $x=1$  and **7**,  $x=2$ ) proportion of amino groups were synthesized in high yields using the same protocol as for polymer **5** (Scheme 1). The key step to control the amino ratio was the molar quantity of nitric acid (ranging from 0.1 to 0.4 M) employed in the nitration step. Subsequently, the activation with glutaraldehyde and immobilization of PAMO were performed in the best conditions found for **5** to obtain biocatalysts **12** and **13**. In order to compare the effect of the support, the oxidation reaction of phenylacetone **14** was done in the same reaction conditions as for polymer **11**.

After 1 h of reaction, the three supported enzymes gave a similar conversion of 80%, showing that a percentage of  $x=0.5$  was a sufficient quantity to get full reactivity. As an increase in the presence of the amino groups did not lead to an improvement in the enzymatic conversion, polyphosphazene **11** was selected as suitable biocatalyst to perform further experiments. It is important to notice, however, that polymers **6** and **7** can also be selected as carriers to immobilize PAMO and that the presence of a higher



**Scheme 3.** PAMO-catalyzed oxidation of phenylacetone **14** employing a ‘coupled enzyme’ approach.



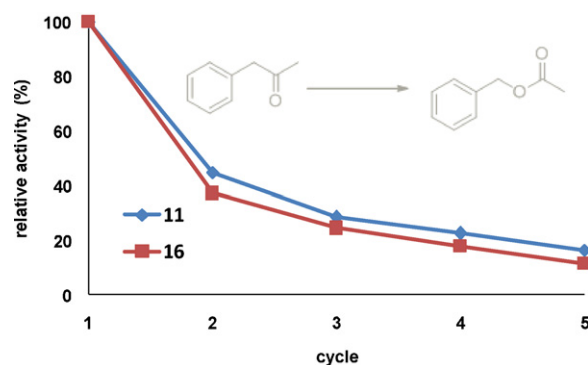
**Scheme 4.** Schematic representation of the co-immobilization of PAMO and G6PDH on a polyphosphazene carrier (**16**).

number of reactive moieties does not interfere with the enzymatic activity.

### 3.3. Co-immobilization of PAMO and G6PDH on polyphosphazene **5**

Until now PAMO was successfully attached on different polyphosphazenes using G6PDH and G6P to recycle internally the cofactor. In case of recycling the supported biocatalyst, it would be highly desirable to co-immobilize the recycling enzyme to diminish costs, thus being only necessary the addition of G6P to perform the biocatalytic reaction in each cycle (polyphosphazene **16**, Scheme 4). This novel biocatalyst would resemble a 'self-sufficient' redox enzyme [23,24], where the BVMO and the dehydrogenase are covalently linked.

Thus, a suspension at different proportions of PAMO and G6PDH was mixed with **8** in Tris-HCl buffer 50 mM pH 9 in the best immobilization conditions to afford **16** (Scheme 4). In order to study the effect of the presence of G6PDH in the immobilization process, the PAMO/G6PDH ratio was varied among 1–10 U, 1–5 U, and 1–2.5 U. As mentioned before, to perform the biooxidation of **14**, only G6P was added into the buffer. It was observed that a lower proportion of the recycling enzyme led to a lower biocatalytic conversion, probably due to the fact that less protein was present in the polyphosphazene, and therefore, the overall process was slower. While a conversion around 80% was achieved with a proportion 1–10 U after 1 h, it diminished when a proportion 1–5 U was employed (58% conv.), and was even lower (40% conv.) in the case of 1–2.5 U. Therefore, for subsequent experiments a PAMO/G6PDH proportion 1–10 U was used to prove that G6PDH



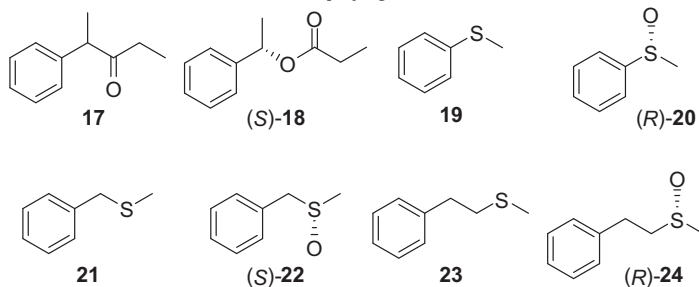
**Fig. 1.** Recycling study of **11** and **16** in the enzymatic oxidation of **14**.

was able to work when supported on a polyphosphazene carrier, as previously shown for other similar supports [15]. Attempts to quantify the proportion of PAMO and G6PDH in **16** were achieved. Thus, treatment of the polymer with SDS to extract the flavin of the BVMO into the solution [28], and then measurement of the UV spectra at 450 nm (maximum of flavin absorption) was recorded in order to determine the decrease of the intensity of this signal comparing polyphosphazenes **11** (only PAMO) and **16** (PAMO plus G6PDH). Unfortunately, the quantity of PAMO attached to these polymers was too low and any absorption was observed in any case. Another probe was done making this experiment with the same concentration of pure protein in solution, but any absorption of the flavin was observed, demonstrating again that the quantity of enzyme (and therefore flavin), was under the detection limit.

### 3.4. Recycling capacity and stereoselectivity

Enzyme immobilization presents as main advantage the possibility of its recycling during several times, therefore minimizing the cost of the enzymatic process. This is especially interesting in the case of oxidoreductases, since these proteins work mainly in aqueous solutions and are soluble in this medium, avoiding the possibility of their reuse. Herein, we have studied the recycling capability of both **11** and **16** applied to the biooxidation of phenylacetone (Fig. 1). It was observed that both preparations were active

**Table 1**  
Biooxidation of different substrates employing co-immobilized PAMO and G6PDH **16**.<sup>a</sup>



Entry	Substrate	Product	% Relative activity <sup>b</sup>	e.e. <b>16</b> <sup>c</sup> (conf.)	e.e. Pure PAMO <sup>d</sup> (conf.)
1	<b>17</b>	<b>18</b>	28	>99% (S)	>99% (S)
2	<b>19</b>	<b>20</b>	11	33% (R)	44% (R)
3	<b>21</b>	<b>22</b>	58	91% (S)	94% (S)
4	<b>23</b>	<b>24</b>	69	>99% (R)	80% (R)

<sup>a</sup> For reaction conditions, see Section 2.

<sup>b</sup> In comparison with model substrate **14**. Measured by GC.

<sup>c</sup> Measured by chiral GC or HPLC, see Supplementary Data.

<sup>d</sup> Obtained for isolated PAMO as previously described [33,37].

after five catalytic cycles, but an appreciable loss of activity was noticed in the second cycle, and later a constant decrease in the activity of these biocatalysts. It is important to note that a very similar trend was obtained for both polyphosphazenes, independently if fresh G6PDH (for **11**) or not (for **16**) was added in the reaction medium. This seems to indicate that the loss of activity is mainly due to PAMO and not due to G6PDH, which is very stable under these conditions. In a parallel test, purified PAMO was tested against phenylacetone, measuring the enzymatic conversion at 30 min without previous treatment (80%) or after 24 h of incubation in Tris–HCl buffer 50 mM pH 9 at 30 °C (6%). As can be seen, PAMO is clearly inactivated, what supports the assumption that it is the enzyme that can be more sensitive.

Finally, we were interested in studying the immobilization effect on PAMO selectivity performing oxidations on a racemic ketone (**17**) and on prochiral sulfides (**19**, **21**, and **23**). Co-immobilized PAMO and G6PDH biocatalyst **16** was employed (Table 1), resulting in a very similar selectivity to that obtained for purified PAMO [33,37], except for the case of sulfide **19**, where a slight decrease in the stereoselective oxidation process was observed. Interestingly, in the case of sulfide **23**, a remarkable improvement on the selectivity was observed.

#### 4. Conclusions

The amino polyphosphazenes  $\{NP[O_2C_{12}H_{8-x}(NH_2)_x]\}_n$  (**5–7**), prepared by nitration followed by a reduction protocol starting from precursor  $[NP(OC_{12}H_8)]_n$ , have been successfully used to covalently immobilize for the first time a BVMO catalyst (PAMO) through glutaraldehyde connectors. As the enzyme works in aqueous solution, its attachment to a solid support presents several advantages for the recycling performance. After optimization of the temperature, reaction time and type of shaking, a good catalytic activity for these immobilized preparations was obtained with a proportion of 0.5 amino groups per monomeric unit ( $x = 0.5$ ). The same enzymatic activity was observed with  $x = 1$  or 2. It was also found that the cofactor recycling enzyme G6PDH could be attached on the same polyphosphazene carrier **5** together with PAMO to obtain a synthetic 'self-sufficient' redox biocatalyst. The good stability observed for the recycling enzyme G6PDH on this type of support is very promising to design immobilized biocatalysts to be used in a 'coupled enzyme' approach [45] with other oxidoreductases. This bifunctionalized preparation did not significantly affect PAMO stereoselectivity, and was tried to reuse, although probably due to the lower stability of the monoxygenase, these preparations lost their activity in a great extent after few cycles.

#### Acknowledgments

Authors thank Prof. Marco W. Fraaije for helpful discussion. A.C. thanks the Principado de Asturias for a predoctoral fellowship. A.R.-M. (FPU program) thanks the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) for her predoctoral fellowship which is financed by the European Social Fund. I.L. acknowledges MICINN for a research contract under the Ramón y Cajal Program. Financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Project CTQ2007-61126 and CTQ2010-18330) is gratefully acknowledged.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molcatb.2011.10.002.

#### References

- [1] P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 301–312.
- [2] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, 1998.
- [3] S. Sanchez, A.L. Demain, *Org. Process Res. Dev.* 15 (2011) 224–230.
- [4] R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (2010) 713–724.
- [5] W.-D. Fessner, T. Anthonen (Eds.), *Modern Biocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [6] V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales (Eds.), *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [7] J.M. Guisán, L. Betancor, G. Fernández-Lorente, in: M.C. Flickinger (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, vol. 5, second ed., John Wiley & Sons, UK, 2010, pp. 2917–2933.
- [8] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 453–468.
- [9] R.A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007) 1289–1307.
- [10] M. Gleria, De Jaeger F. R. (Eds.), *Synthesis and Applications of Poly(organophosphazenes)*, Nova Sci., New York, 2004.
- [11] H.R. Allcock, *Chemistry and Applications of Polyphosphazenes*, Wiley, New York, 2003.
- [12] G.A. Carriedo, in: A. Andrianov (Ed.), *Polyphosphazenes for Biochemical Applications*, Wiley, Hoboken, 2009, pp. 379–410.
- [13] A. Andrianov (Ed.), *Polyphosphazenes for Biochemical Applications*, Wiley, Hoboken, 2009.
- [14] H.R. Allcock, *Chemistry Applications of Polyphosphazenes*, Wiley, New York, 2003, p. 516.
- [15] H.R. Allcock, S. Kwon, *Macromolecules* 19 (1986) 1502–1508.
- [16] T. Matsuki, N. Saiki, Japanese Patent, JP 01030650, CAN 112:32652, 1989.
- [17] H.R. Allcock, S.R. Pucher, K.B. Visscher, *Biomaterials* 15 (1994) 502–506.
- [18] A. Cuetos, M.L. Valenzuela, I. Lavandera, V. Gotor, G.A. Carriedo, *Biomacromolecules* 11 (2010) 1291–1297.
- [19] G. de Gonzalo, M.D. Mihovilovic, M.W. Fraaije, *ChemBioChem* 11 (2010) 2208–2231.
- [20] D.E. Torres Pazmiño, H.M. Dudek, M.W. Fraaije, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 138–144.
- [21] W.-D. Fessner, T. Anthonen (Eds.), *Modern Biocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009, pp. 339–368.
- [22] M.M. Kayser, *Tetrahedron* 65 (2009) 947–974.
- [23] D.E. Torres Pazmiño, A. Riebel, J. de Lange, F. Rudroff, M.D. Mihovilovic, M.W. Fraaije, *ChemBioChem* 10 (2009) 2595–2598.
- [24] D.E. Torres Pazmiño, R. Sandoval, B.-J. Baas, M. Gerbil, M.D. Mihovilovic, M.W. Fraaije, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 2275–2278.
- [25] F. Zambianchi, P. Pasta, G. Carrea, S. Colonna, N. Gaggero, J.M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* 78 (2002) 489–496.
- [26] O. Abril, C.C. Ryerson, C. Walsh, G.M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* 17 (1989) 41–52.
- [27] M. Hucík, M. Bučko, P. Gemeiner, V. Štefuca, A. Vikartovská, M.D. Mihovilović, F. Rudroff, N. Iqbal, D. Chorvát, I. Lačík, *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 675–680.
- [28] M.W. Fraaije, J. Wu, D.P.H.M. Heuts, E.W. van Hellemond, J.H. Lutje Spelberg, D.B. Janssen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (2005) 393–400.
- [29] C. Rodríguez, G. de Gonzalo, M.W. Fraaije, V. Gotor, *Green Chem.* 12 (2010) 2255–2260.
- [30] A. Ríoz-Martínez, F.R. Bisogno, C. Rodríguez, G. de Gonzalo, I. Lavandera, D.E. Torres Pazmiño, M.W. Fraaije, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 1431–1437.
- [31] C. Rodríguez, G. de Gonzalo, D.E. Torres Pazmiño, M.W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* 20 (2009) 1168–1173.
- [32] C. Rodríguez, G. de Gonzalo, D.E. Torres Pazmiño, M.W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* 19 (2008) 197–203.
- [33] C. Rodríguez, G. de Gonzalo, M.W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* 18 (2007) 1338–1344.
- [34] A. Ríoz-Martínez, G. de Gonzalo, D.E. Torres Pazmiño, M.W. Fraaije, V. Gotor, *Eur. J. Org. Chem.* (2010) 6409–6416.
- [35] F.R. Bisogno, A. Ríoz-Martínez, C. Rodríguez, I. Lavandera, G. de Gonzalo, D.E. Torres Pazmiño, M.W. Fraaije, V. Gotor, *ChemCatChem* 2 (2010) 946–949.
- [36] G. de Gonzalo, G. Ottolina, F. Zambianchi, M.W. Fraaije, G. Carrea, *J. Mol. Catal. B: Enzyme* 39 (2006) 91–97.
- [37] G. de Gonzalo, D.E. Torres Pazmiño, G. Ottolina, M.W. Fraaije, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry* 16 (2005) 3077–3083.
- [38] G.A. Carriedo, F.J. García Alonso, P. Gómez Elipse, J.I. Fidalgo, J.L. García Alvarez, A. Presa Soto, *Chem. Eur. J.* 9 (2003) 3833–3836.
- [39] G.A. Carriedo, L. Fernández Catuxo, F.J. García Alonso, P. Gómez Elipse, P.A. González, *Macromolecules* 29 (1996) 5320–5325.
- [40] G.A. Carriedo, A. Presa-Soto, M.L. Valenzuela, *Macromolecules* 41 (2008) 6972–6976.
- [41] J.M. Lalancette, A. Frêche, *Can. J. Chem.* 47 (1969) 739–742.
- [42] It is well-known that enzymes coming from extremophile microorganisms can tolerate more extreme reaction conditions. See, for instance: G. Antranikian, C.E. Vorgias, C. Bertoldo, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96 (2005) 219–262.
- [43] W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 1014–1017.
- [44] G. Ozyilmaz, *J. Mol. Catal. B: Enzyme* 56 (2009) 231–236.
- [45] W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8 (2004) 120–126.





**CONCLUSIONES**





Se puede concluir que se ha llevado a cabo la síntesis eficiente de diversos polifosfacenos con diferente grado de funcionalización y que se han utilizado de forma satisfactoria como soportes para la inmovilización covalente de varios enzimas como son la alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus ruber* ADH-A, lipasa de tipo B de *Candida antarctica* y la fenilacetona monooxigenasa de *Thermobifida fusca*.

Así, para el caso de la ADH, utilizando glutaraldehído como conector entre el soporte y la biomolécula, se ha conseguido inmovilizarla sin que la selectividad del enzima se viera alterada. Además se ha constatado la gran estabilidad de esta nueva preparación enzimática ya que pudo ser reutilizada durante varios ciclos de reacción sin apreciarse un descenso en su actividad, e incluso pudo ser almacenada durante 3 meses sin que su actividad enzimática se viera alterada. La CAL-B fue inmovilizada de igual forma, y se comprobó que el nuevo biocatalizador mantenía su actividad en medios orgánicos catalizando la reacción de acetilación del 1-feniletanol, consiguiéndose su resolución cinética con una selectividad excelente.

Aprovechando las condiciones de inmovilización ya optimizadas, se logró anclar también la PAMO y posteriormente este enzima fue co-inmovilizado junto con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa generando un sistema redox autosuficiente. Se demostró que este sistema era capaz de reciclar el cofactor pirimidínico con la simple adición al medio de un azúcar accesible como la glucosa-6-fosfato. El sistema co-inmovilizado fue también reutilizado hasta los cinco ciclos de reacción aunque en este caso la actividad enzimática no permaneció constante observándose un descenso a lo largo del tiempo.



Parte II

PROCESOS BIOCATALÍTICOS DINÁMICOS  
Y TÁNDEM



## OBJETIVOS



En la segunda parte de esta Memoria se ha llevado a cabo el estudio de varias resoluciones cinéticas dinámicas catalizadas por alcohol deshidrogenasas y  $\omega$ -transaminasas. Además, se ha desarrollado la utilización secuencial de una ADH y de un catalizador metálico para la síntesis “*one-pot*” de dioles enantioenriquecidos con un grupo triazol en su estructura. Los objetivos marcados se describen a continuación:

Sintetizar de una manera eficaz una serie de  $\beta$ -cetoésteres sustituidos en posición  $\alpha$  que serán empleados como sustratos de partida y así aprovechar la acidez del hidrógeno en posición  $\alpha$  para llevar a cabo su racemización *in situ* y realizar las DKRs.

Obtener los  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxiésteres enantio- y diastereomericamente puros a través de DKRs catalizadas por alcohol deshidrogenasas tanto purificadas como sobreexpresadas. Demostrar además la *cuasi*-irreversibilidad de este tipo de procesos llevando a cabo las biorreducciones con un pequeño exceso molar del cosustrato.

Demostrar la posible aplicación de diferentes  $\omega$ -transaminasas en procesos dinámicos aplicados a la síntesis de  $\beta$ -aminoésteres sustituidos en  $\alpha$  de manera enantio- y diastereo-enriquecida. Estudiar el efecto causado en la selectividad de los enzimas debido a la variación en el tamaño de los sustituyentes en los sustratos de partida así como a la presencia de un sistema cíclico.

Optimizar la reacción de tipo “*click*” empleando una metodología para generar Cu(I) que sea sencilla, barata y que permita su reciclabilidad, aplicada a la síntesis de dioles con un grupo 1,2,3-triazol en su estructura.

Una vez desarrollada, emplearla junto la biorreducción simultánea de dos compuestos carbonílicos (una  $\alpha$ -azido cetona y una  $\alpha,\beta$ -alquilcetona), para así realizar su posterior cicloadición [3+2] catalizada por Cu(I) de una manera secuencial en un mismo recipiente y así sintetizar los productos finales de manera enantio- y diastereomericamente pura.





ANTECEDENTES



## II.1. $\beta$ -HIDROXIÉSTERES $\alpha$ -SUSTITUIDOS: IMPORTANCIA Y SÍNTESIS

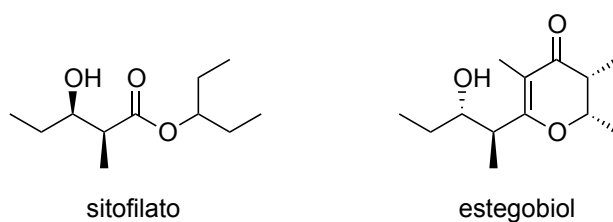
La obtención de  $\beta$ -hidroxiésteres de manera enantiopura conlleva un interés especial debido a que esta unidad suele encontrarse en numerosos productos naturales y otros compuestos bioactivos. Además, son precursores de moléculas de gran relevancia como los oxetanos, las lactonas, los  $\beta$ -hidroxiácidos o los  $\beta$ -aminoácidos, y son intermedios de diversos derivados con actividad farmacológica como los policétidos, las estatinas y los inhibidores de proteasas.<sup>166</sup> Este tipo de estructuras se encuentran formando parte de compuestos como el sitofilato (Figura II.1),<sup>167</sup> feromona perteneciente a una familia de coleópteros que se alimentan principalmente de cereales y que provocan grandes pérdidas económicas, o como el estegobiol (Figura II.1),<sup>168</sup> producto natural presente en las feromonas sexuales del insecto comúnmente conocido como el carcoma del pan (*Stegobium paniceum*) y que se encuentra especialmente extendido en climas cálidos.

---

<sup>166</sup> (a) G. F. Liou, C. Khosla, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 279-284; (b) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380-416; (c) M. Chartrain, P. M. Salmon, D. K. Robinson, B. C. Buckland, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 209-214.

<sup>167</sup> D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, D. J. Rozzell, I. Smonou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418-2426.

<sup>168</sup> D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *1*, 43-46.



**Figura II.1.** Compuestos provenientes de  $\beta$ -hidroxiésteres con propiedades bioactivas

La síntesis de los derivados de  $\beta$ -hidroxiésteres sustituidos en posición  $\alpha$  es especialmente interesante debido a que estos compuestos poseen dos centros estereogénicos definidos en su estructura que dan lugar a cuatro posibles diastereoisómeros, lo que hace que la obtención estereopreferente de uno de los isómeros sea un reto sintético. De entre todas las metodologías empleadas para obtener este tipo de moléculas, se pueden destacar las reacciones de adición-1,4 a dobles enlaces conjugados, las alquilaciones estereoselectivas en posición  $\alpha$ , o las reacciones de tipo aldólico, aunque sin duda aquellas que se basan en la reducción de un  $\beta$ -cetoéster sustituido en posición  $\alpha$  a través de una resolución cinética dinámica son las que más se han empleado. En este caso, aprovechando la alta acidez del H en  $\alpha$ , la racemización del sustrato de partida puede tener lugar *in situ* catalizado por el propio medio de reacción incluso a pHs neutros, lo que hace que acoplada con un agente reductor quiral, pueda conducir a la obtención preferencial de uno de los cuatro posibles diastereoisómeros de los correspondientes  $\beta$ -hidroxiésteres con un rendimiento teórico del 100%. De hecho, el término DKR fue acuñado por primera vez por Noyori<sup>169</sup> en un proceso de hidrogenación para sintetizar  $\beta$ -hidroxiésteres enantiopuros sustituidos en posición  $\alpha$  utilizando un complejo quiral de rutenio como catalizador. En este sentido, hay que destacar que en los últimos años se han realizado grandes avances en este tipo de reacciones, tanto en las hidrogenaciones<sup>170</sup> como en los procesos de transferencia de hidrógeno<sup>171</sup> catalizados por complejos metálicos.

<sup>169</sup> R. Noyori, T. Ikeda, T. Ohkuma, M. Widhalm, M. Kitamura, H. Takaya, S. Akutagawa, N. Sayo, T. Saito, T. Taketomi, H. Kumobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9134-9135.

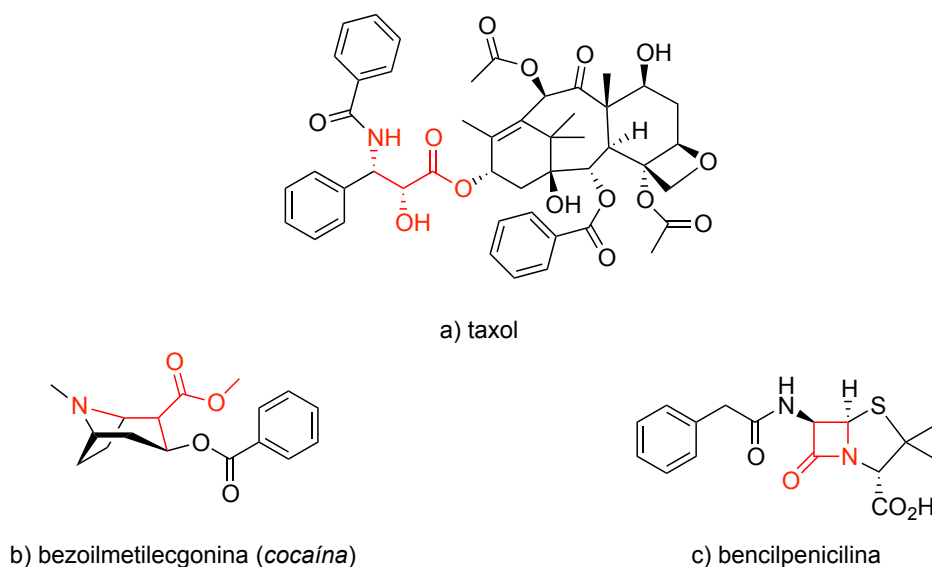
<sup>170</sup> Bibliografía reciente: (a) T. Maeda, K. Makino, M. Iwasaki, Y. Hamada, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11954-11962; (b) Y. Hamada, Y. Koseki, T. Fujii, T. Maeda, T. Hibino, K. Makino, *Chem. Commun.* **2008**, 6206-6208.

<sup>171</sup> Ejemplos recientes: (a) B. Seashore-Ludlow, F. Saint-Dizier, P. Somfai, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6334-6337; (b) B. Seashore-Ludlow, P. Villo, C. Hacker, P. Somfai, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5274-5277; (c) D. Cartigny, K. Puntener, T. Ayad, M. Scalone, V. Ratovelomanana-Vidal, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3788-3791.

## II.2. $\beta$ -AMINOÉSTERES $\alpha$ -SUSTITUIDOS: IMPORTANCIA Y SÍNTESIS

En la naturaleza los  $\beta$ -aminoácidos y sus derivados aminoésteres y aminoamidas, están presentes en multitud de compuestos naturales con actividad biológica, de ahí que la síntesis y el estudio de nuevos derivados tengan una gran importancia y reciban una especial atención por parte del sector de la química sintética. En comparación con los  $\alpha$ -aminoácidos, sus análogos  $\beta$ , los cuales poseen un carbono más entre los grupos funcionales amino y ácido carboxílico, presentan una gran versatilidad ya que pueden contener diferentes radicales que confieran nuevas propiedades a los compuestos sintetizados. Además los  $\beta$ -aminoésteres sustituidos en posición  $\alpha$ , puesto que poseen dos centros estereogénicos dan lugar a la formación de hasta cuatro posibles diastereoisómeros.

Este tipo de compuestos ha demostrado tener una gran relevancia en diversas proteínas ya que son capaces de generar estructuras secundarias helicoidales de gran estabilidad, así como de integrar péptidos miméticos sintetizados artificialmente.<sup>172</sup> Además son sintones de productos importantes con actividad biológica como son las  $\beta$ -lactamas o los  $\beta$ -aminoácidos sustituidos.

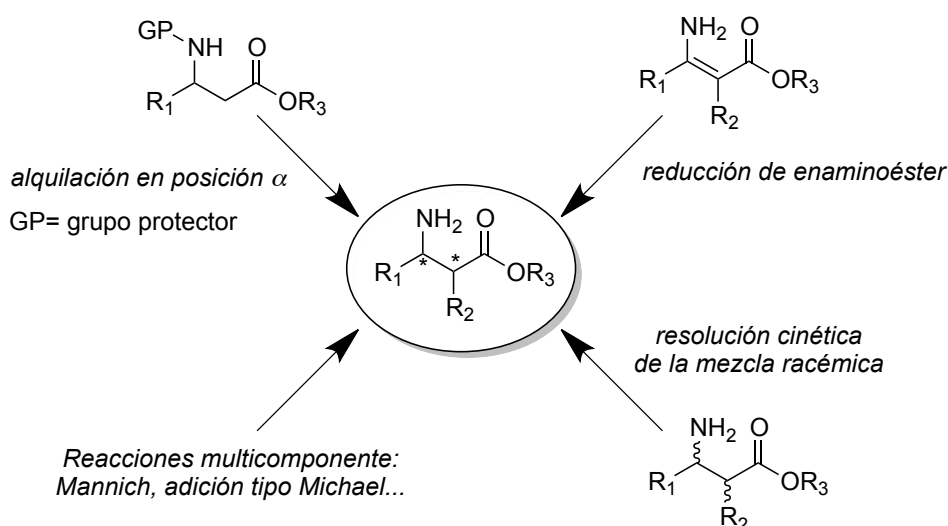


**Figura II.2.** Compuestos con propiedades bioactivas con una unidad de  $\beta$ -aminoéster o  $\beta$ -lactama en su estructura

<sup>172</sup> (a) P. G. Vasudev, S. Chatterjee, N. Shamala, P. Balaram, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 657-687; (b) B. B. Toure, D. G. Hall, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4439-4486; (c) J. W. Blunt, B. R. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170-244; (d) D. Seebach, J. Gardiner, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1366-1375; (e) E. Juaristi, en *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids*, 2<sup>a</sup> Ed., Eds. E. Juaristi, V. A. Soloshonok, **2005**, pp. 1-17.

En la Figura II.2 se muestran algunos compuestos de interés con una unidad de  $\beta$ -aminoéster o  $\beta$ -lactama en su estructura. El taxol, cuya estructura fue elucidada en 1971,<sup>173</sup> es un conocido producto natural que se extrae de la corteza del tejo y que se usa en tratamientos de quimioterapia contra el cáncer de mama, ovario o pulmón. Otra familia de especial interés son las  $\beta$ -lactamas ya que son estructuras muy comunes en un gran número de antibióticos como son las penicilinas o las cefalosporinas.

Pese a existir diferentes rutas sintéticas descritas en la bibliografía (Esquema II.1), no existe una metodología general y sencilla para la obtención de los  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -aminoésteres a través de una aminación directa en un solo paso de reacción y sin la necesidad de usar grupos protectores a partir de los correspondientes  $\beta$ -cetoésteres sustituidos en  $\alpha$ .



**Esquema II.1** Diferentes rutas sintéticas para la obtención de  $\beta$ -aminoésteres enantio- y diastereo-enriquecidos sustituidos en posición  $\alpha$

La alquilación en  $\alpha$  de  $\beta$ -aminoésteres utilizando bases y auxiliares quirales,<sup>174</sup> la reducción de  $\beta$ -enaminoésteres usando triacetoxiborohidruro de sodio como agente reductor,<sup>175</sup> o la resolución cinética de los racematos utilizando la penicilina G

<sup>173</sup> M. C. Wani, M. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.

<sup>174</sup> A. J. McNeil, G. E. S. Toombes, S. M. Gruner, E. Lobkovsky, D. B. Collum, S. V. Chandramouli, B. J. Vanasse, T. A. Ayers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16559-16568.

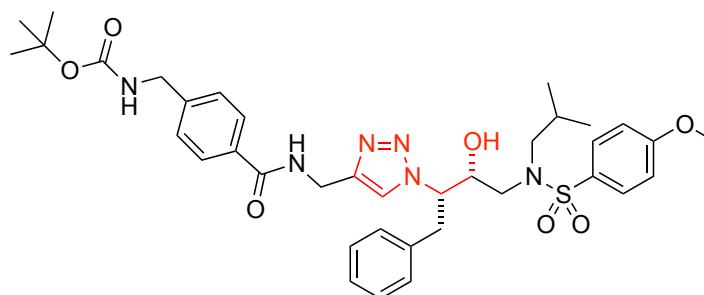
<sup>175</sup> C. Cimarelli, G. Palmieri, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5557-5563.

acilasa,<sup>176</sup> son algunos ejemplos utilizados para la obtención de estos derivados en un solo paso de reacción, aunque por lo general los rendimientos y las selectividades obtenidas no eran totalmente satisfactorias. Otros procedimientos implicaron varios pasos de reacción con la consiguiente pérdida de rendimiento. Entre ellos se encuentran procesos que involucraban reacciones de tipo Mannich,<sup>177</sup> cicloadiciones 1,3-dipolares<sup>178</sup> o adiciones de tipo Michael<sup>179</sup> junto con la subsiguiente alquilación en posición  $\alpha$ .

### II.3. 1,2,3-TRIAZOLES

#### II.3.1. Importancia de los 1,2,3-triazoles

Los 1,2,3-triazoles son farmacóforos de gran interés en sectores como el farmacéutico o el agroalimentario debido a sus múltiples propiedades biológicas.<sup>180</sup> Así, se han descrito derivados hidroxilados con una estructura presente de 1,2,3-triazol como potentes bloqueadores de receptores  $\beta$ -adrenérgicos o formando parte de moléculas más complejas con actividad antiviral o antitumoral (Figura II.3).<sup>181</sup>



**Figura II.3** Ejemplo de un derivado hidroxilado con un grupo 1,2,3-triazol presente con actividad inhibitoria sobre la proteasa del VIH

<sup>176</sup> G. Cardillo, A. Tolomelli, C. Tomasini, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8651-8654.

<sup>177</sup> (a) T. Kano, Y. Yamaguchi, K. Maruoka, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6678-6687; (b) M. Periasamy, S. Suresh, S. S. Ganesan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1323-1331; (c) S. Kobayashi, J. Kobayashi, H. Ishiani, M. Ueno, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4185-4190.

<sup>178</sup> J.-P. G. Seerden, M. M. M. Kuypers, H. W. Scheeren, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1441-1450.

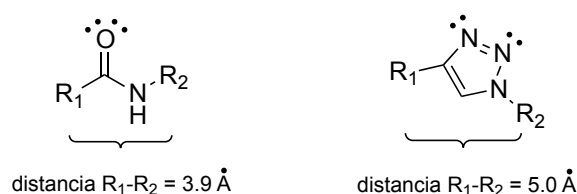
<sup>179</sup> (a) S. G. Davies, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1129-1139; (b) S. G. Davies, O. Ichihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1141-1147; (c) S. G. Davies, O. Ichihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1153-1155.

<sup>180</sup> (a) S. G. Agalave, S. R. Maujan, V. S. Pore, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2696-2718; (b) R. Kharb, P. C. Sharma, M. S. Yar, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 1-21; (c) R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 3-50.

<sup>181</sup> (a) W. Yan, X. Ye, N. G. Akhmedov, J. L. Petersen, X. Shi, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2358-2361; (b) H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128-1137.



El anillo de 1,2,3-triazol tiene la posibilidad de actuar como mimético de un enlace peptídico pudiendo ejercer como conector entre diferentes moléculas creando así estructuras supramoleculares. Esto es debido a que este heterociclo posee una localización atómica y unas propiedades electrónicas similares a las de la función amida (Figura II.4) con la ventaja de su resistencia frente a condiciones hidrolíticas y a procesos de oxidación y reducción. Además, los nitrógenos presentes en el anillo tienen la posibilidad de actuar como dadores o aceptores de enlaces por puente de hidrógeno, siendo estas características las que han hecho que los 1,2,3-triazoles se hayan usado para un amplio número de aplicaciones en ciencias biomédicas, síntesis orgánica o ciencia de los materiales.



**Figura II.4** Similitudes topológicas y electrónicas entre una amida y un 1,2,3-triazol

### II.3.2 Reacción de cicloadición dipolar [3+2]: Química de tipo “click”

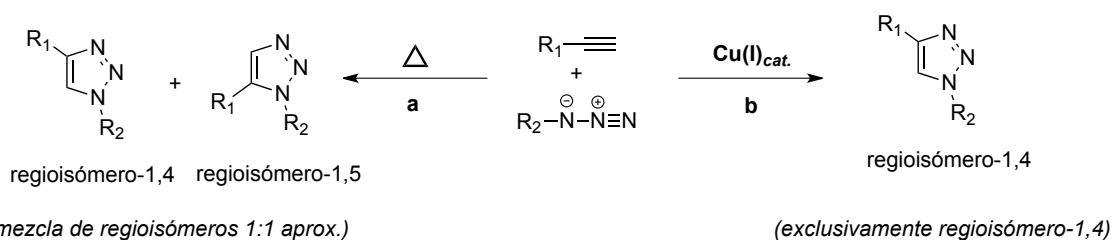
El concepto de química de tipo “click” fue introducido por Sharpless y colaboradores<sup>182</sup> en el año 2001 para definir un nuevo tipo de metodologías sintéticas que utilizaran exclusivamente transformaciones químicas que fueran lo más prácticas y eficientes posibles para generar, a partir de reactivos sencillos, moléculas de una mayor complejidad con una gran eficiencia atómica. La formación de 1,2,3-triazoles a través de una cicloadición dipolar [3+2] entre un alquino y una azida fue descrita por primera vez por Huisgen en 1963,<sup>183</sup> y se ha establecido como el prototipo de reacción de tipo “click”.

La gran ventaja de esta reacción radica en la facilidad para introducir grupos alquinos o azidas en moléculas orgánicas a través de metodologías sintéticas conocidas, y al hecho de que tanto estas funciones como los triazoles generados son estables y

<sup>182</sup> H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

<sup>183</sup> R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *10*, 565-598.

permanecen inalterados en presencia de agua, disolventes orgánicos u oxígeno molecular. Además, la formación de triazoles mediante cicloadición 1,3-dipolar es un proceso termodinámicamente favorecido, aunque requiere temperaturas elevadas y tiempos de reacción prolongados dando lugar, en la mayoría de los casos, a mezclas de los dos posibles triazoles regioisoméricos en posiciones 1,4 y 1,5 (Esquema II.2).



**Esquema II.2** Cicloadición dipolar de alquinos terminales y azidas en condiciones térmicas o catalizada por una especie de Cu(I)

Si bien la facilidad para generar este tipo de triazoles fue un gran avance en el campo de la química sintética, el verdadero impacto tuvo lugar tras el descubrimiento del proceso catalizado por Cu(I), el cual no solo aumentaba la velocidad de la reacción drásticamente eliminando el uso de temperaturas elevadas, sino que también daba lugar a la formación del isómero 1,4 de manera totalmente regioselectiva.<sup>184</sup> Esta reacción puede llevarse a cabo tanto en fase sólida como en disolución utilizando comúnmente como disolvente agua o mezclas con diferentes disolventes orgánicos como alcoholes o DMSO con el fin de aumentar la solubilidad de los compuestos de partida. En estas condiciones los triazoles finales suelen ser insolubles precipitando en el propio medio de reacción, con lo que por simple filtración pueden ser recuperados.

El factor más importante en estos procesos es la elección de la estrategia utilizada para formar la especie de Cu(I). Así, la metodología más extendida es la reducción *in situ* de sales estables de Cu(II). Este método posee la ventaja de no requerir atmósferas inertes a pesar de la inestabilidad del ión formado. Tradicionalmente, el sulfato cúprico pentahidratado como fuente de cobre, y el ascobarto de sodio como

<sup>184</sup> (a) J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302-1315; (b) M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015; (c) M. V. Gil, M. J. Arévalo, O. López, *Synthesis* **2007**, 1589-1620; (d) J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262; (e) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

agente reductor, han sido los más comúnmente empleados.<sup>185</sup> Otra estrategia es la obtención de Cu(I) por comproporción entre una sal de cobre(II) y cobre metálico.<sup>186</sup> La comproporción o conmutación es el proceso químico en el cual un elemento presente en dos estados de oxidación diferentes, pasa a tener un único estado de oxidación intermedio a los anteriores a través de una reacción de tipo redox, denominándose al proceso contrario dismutación o desproporción. De este modo se consigue generar especies de Cu(I) *in situ* de una manera simple, pudiéndose eliminar el cobre metálico presente en la reacción de una manera fácil y permitiéndose su reciclado durante varios ciclos. Otro método comúnmente utilizado es la adición directa de sales solubles de Cu(I), aunque debido a la inestabilidad del catión, en estos casos suele ser necesaria la adición de una base nitrogenada como pueda ser la trietilamina, la piridina o la *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), con el fin de estabilizar la especie Cu(I) y evitar así su oxidación.

#### II.4. APLICACIÓN DE ADHs EN PROCESOS DE TIPO DINÁMICO

La biorreducción de  $\beta$ -cetoésteres sustituidos en posición  $\alpha$  catalizada por oxidorreductasas en condiciones dinámicas es un campo de investigación estudiado desde hace décadas utilizando tanto enzimas purificadas como células enteras. Los primeros ejemplos al respecto hacían uso de microorganismos puesto que las técnicas para aislar y purificar proteínas no se encontraban muy desarrolladas. Así en 1976, Deol y colaboradores<sup>187</sup> reportaron la obtención de una serie de  $\alpha$ - y  $\beta$ -hidroxiésteres con una pureza óptica excelente aunque con rendimientos moderados, a través de la biorreducción de los correspondientes cetoésteres por fermentación utilizando diversas levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*.

Durante las décadas de los 80s y los 90s se extendió el empleo de células enteras como catalizadores (especialmente levaduras como la de panadería, *Saccharomyces cerevisiae*), aplicados a la biorreducción de este tipo de compuestos, aunque por

---

<sup>185</sup> V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

<sup>186</sup> F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.

<sup>187</sup> B. S. Deol, D. D. Ridley, G. W. Simpson, *Aust. J. Chem.* **1976**, *29*, 2459-2467.

supuesto hoy en día se siguen utilizando debido a su bajo coste y fácil accesibilidad.<sup>188</sup> Pese a obtener buenos rendimientos y excelentes excesos enantioméricos en muchos de los casos, el empleo de células enteras acarrea ciertos problemas intrínsecos como ya se ha comentado en la introducción de esta Memoria, ya que diversos enzimas con una selectividad opuesta u otras actividades no deseadas pueden interferir disminuyendo la estereoselectividad y el rendimiento global del proceso, y su escalado muchas veces no es factible debido a las altas diluciones de sustrato necesarias. Para soslayar este tipo de problemas, recientemente se ha comenzado a utilizar en este tipo de procesos ADHs tanto purificadas como sobreexpresadas en *E. coli*.<sup>167,168,189</sup>

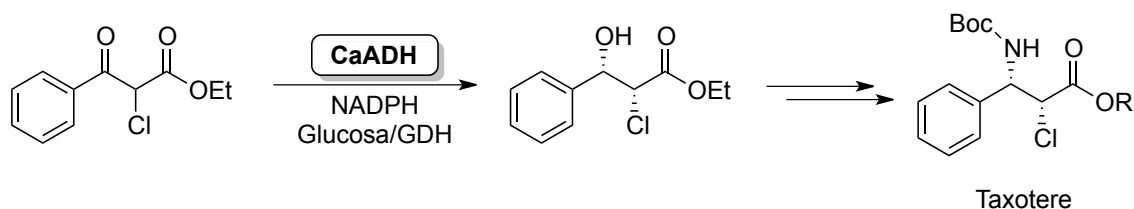
Un ejemplo reciente de este tipo de reacciones hizo uso de una nueva alcohol deshidrogenasa de *Clostridium acetobutylicum* (CaADH), la cual se empleó en la reducción de diferentes  $\beta$ -cetoésteres a través de procesos de resolución cinética dinámica.<sup>190</sup> Este enzima fue expresado en *E. coli* y posteriormente purificado. Así, utilizando este biocatalizador se llevó a cabo la síntesis estereoselectiva de un  $\alpha$ -cloro- $\beta$ -hidroxiéster (Esquema II.3). Este compuesto es un intermedio importante en la obtención del fármaco Taxotere o Taxol (comercializado bajo el nombre genérico de Docetaxel). De esta manera, y utilizando como sistema de regeneración del cofactor glucosa y GDH, se llevó a cabo la preparación de este precursor con una conversión del 95% y con unos excesos enantio- y diastereoméricos del 99% y 95%, respectivamente. Además, esta reacción pudo llevarse a cabo en una escala de varios gramos manteniéndose la misma selectividad.

---

<sup>188</sup> (a) R. Bhuniya, T. Mahapatra, S. Nanda, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 1597-1602; (b) P. Rodríguez, B. Reyes, M. Barton, C. Coronel, P. Menéndez, D. González, S. Rodríguez, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *71*, 90-94; (c) S. P. Ravía, I. Carrera, G. A. Seoane, S. Vero, D. Gaménara, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1393-1397; (d) H. Stecher, K. Faber, *Synthesis* **1997**, 1-16; (e) K. Ishihara, K. Iwai, H. Yamaguchi, N. Nakajima, K. Nakamura, T. Ohshima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 1896-1898; (f) K. Nakamura, T. Miyai, K. Fukushima, Y. Kawai, B. R. Babu, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 1713-1715; (g) K. Nakamura, T. Miyai, K. Nozaki, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3155-3156; (h) G. Fráter, *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 2825-2828.

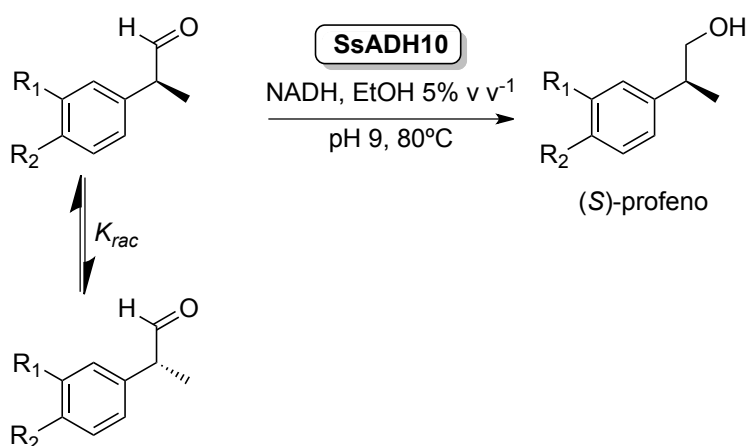
<sup>189</sup> (a) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799-4801; (b) I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12827-12832; (c) P. Bingfeng, G. Jianxing, L. Zuyi, O. P. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 853-855.

<sup>190</sup> G. A. Applegate, R. W. Cheloha, D. L. Nelson, D. B. Berkowitz, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2420-2422.



**Esquema II.3.** Obtención de un precursor del fármaco Taxotere a través de un proceso de DKR catalizado por una alcohol deshidrogenasa

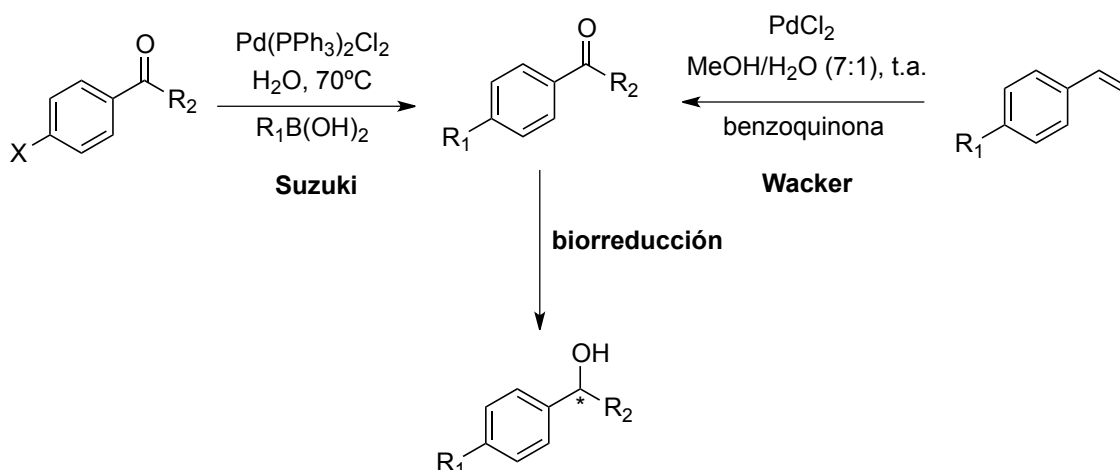
Otro ejemplo destacable de un proceso dinámico catalizado por una ADH fue publicado por Berkowitz y colaboradores,<sup>108</sup> en el que partiendo de nuevo de un racemato, en lugar de obtenerse una mezcla de diastereoisómeros, se formó un alcohol con un centro quiral solamente. En este caso, utilizando una alcohol deshidrogenasa aislada de un microorganismo termófilo (*Sulfolobus solfataricus*, SsADH), se sintetizaron de manera enantiopura una familia de (*S*)-profenos, compuestos antiinflamatorios no esteroideos, a través de un proceso de DKR (en el trabajo denotado como DYRKR). Aprovechando la gran estabilidad del enzima en condiciones drásticas de reacción, se pudieron llevar a cabo las biorreducciones a pH 9 y 80°C de temperatura, facilitándose de esta manera la racemización de los aldehídos de partida (Esquema II.4), obteniéndose los (*S*)-profenos en una escala de varios gramos y con conversiones y estereoselectividades muy altas.



**Esquema II.4.** Preparación de varios (*S*)-profenos enantioenriquecidos mediante un proceso de DKR catalizado por una alcohol deshidrogenasa proveniente de un microorganismo termófilo

## II.5. APLICACIÓN DE ADHs EN PROCESOS CONCURRENTES O SECUENCIALES

La combinación de alcohol deshidrogenasas con catalizadores de diferente naturaleza (metálicos, organocatalíticos o incluso otros biocatalizadores) en procesos de tipo secuencial, tándem o en cascada, es un campo de investigación que está siendo abordado por numerosos investigadores hoy en día, ya que facilita la obtención de productos complejos a través de varios pasos de reacción con una mayor eficacia y rendimientos de reacción elevados sin necesidad de aislar los intermedios, ofreciendo además la posibilidad de utilizar un medio benigno como es el agua. Así, por ejemplo, la aplicación de ADHs junto con derivados de prolina o complejos de zinc para obtener 1,3-dioles enantiopuros,<sup>117,191</sup> o en combinación con reacciones de tipo Wacker-Tsuji,<sup>192</sup> Heck,<sup>193</sup> Suzuki,<sup>194</sup> o Suzuki-Miyaura<sup>195</sup> catalizadas por complejos de paladio ha abierto un sinfín de posibilidades (Esquema II.5).



**Esquema II.5.** Obtención de alcoholes enantioenriquecidos en procesos "one-pot" por combinación de una ADH con catalizadores de paladio

<sup>191</sup> S. Sonoike, T. Itakura, M. Kitamura, S. Aoki, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 64-74.

<sup>192</sup> I. Schanapperelle, W. Hummel, H. Gröger, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1073-1076.

<sup>193</sup> (a) A. Boffi, S. Cacchi, P. Ceci, R. Cirilli, G. Fabrizi, A. Prastaro, S. Niembro, A. Shafir, A. Vallribera, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 347-353; (b) S. Sgalla, G. Fabrizi, R. Cirilli, A. Macone, A. Bonamore, A. Boffi, S. Cacchi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2791-2796.

<sup>194</sup> E. Burda, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9551-9554.

<sup>195</sup> A. Prastaro, P. Ceci, E. Chiancone, A. Boffi, R. Cirilli, M. Colone, G. Fabrizi, A. Stringaro, S. Cacchi, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1929-1932.

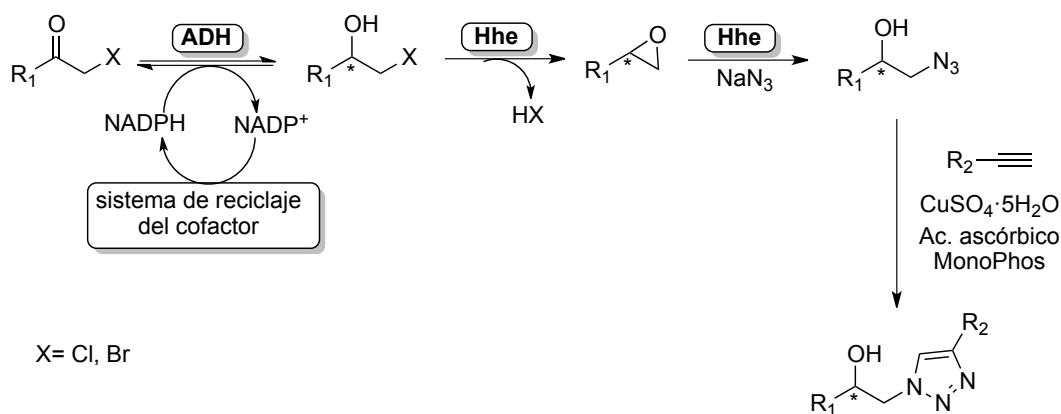
En este sentido, la cicloadición 1,3-dipolar también ha sido descrita en procesos concurrentes o secuenciales con biocatalizadores. Hua y colaboradores<sup>196</sup> describieron la síntesis de ambos enantiómeros de una familia de derivados de 2-azido-1-arietanol con excelentes excesos enantioméricos y elevadas conversiones. Para ello se realizó la biorreducción de las correspondientes  $\alpha$ -azidoacetofenonas precursoras con dos alcohol deshidrogenasas en forma recombinante y con una estereopreferencia opuesta, la ADH de *Candida magnoliae* (CMCR) y una proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (Ymr226c). Una vez obtenidos los  $\alpha$ -azido alcoholes enantiopuros, estos fueron usados junto con diversos alquinos terminales en presencia de Cu(I) (generado a través del sistema de CuSO<sub>4</sub>/ácido ascórbico), para obtener los alcoholes derivados de 1,2,3-triazol mediante cicloadición, demostrándose así la potencial aplicabilidad de estos procesos en la obtención de compuestos enantioenriquecidos.

Otro ejemplo reciente para obtener alcoholes enantiopuros con un anillo de 1,2,3-triazol presente en la estructura ha sido descrita por Feringa, Janssen y colaboradores,<sup>197</sup> haciendo uso de una ADH junto con una halohidrina deshalogenasa (Hhe), enzima capaz de catalizar la formación selectiva de epóxidos a partir de las correspondientes halohidrinas y su posterior apertura con diversos tipos de nucleófilos. Así, partiendo de una serie de  $\alpha$ -bromo- o  $\alpha$ -cloroacetofenonas, y utilizando células recombinantes de *E. coli* que co-expresaban una alcohol deshidrogenasa (ADH de *Thermoanaerobacter* sp. o de *Lactobacillus brevis*) junto con una halohidrina deshalogenasa (Hhe de *Agrobacterium radiobacter* AD1 o de *Mycobacterium* sp. GP1, respectivamente) y en presencia de azida de sodio, se sintetizaron los correspondientes 1,2-azidoalcoholes enantiopuros. Posteriormente se estudiaron las condiciones de cicloadición con un alquino terminal utilizando como catalizador Cu(I) obtenido por reducción de sulfato de cobre (II) con ascorbato de sodio en presencia de un ligando (MonoPhos), que se suele emplear en este tipo de procesos ya que está descrito que acelera la velocidad de esta reacción. Tras optimizar las condiciones, se consiguió llevar a cabo la síntesis de una serie de 1,2,3-triazoles combinando ambas reacciones en un mismo recipiente a través de un proceso tándem (Esquema II.6).

---

<sup>196</sup> H. Ankati, Y. Yang, D. Zhu, E. R. Biehl, L. Hua, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6433-6436.

<sup>197</sup> W. Szymanski, C. P. Postema, C. Tarabiono, F. Berthiol, L. Campbell-Verduyn, S. de Wildeman, J. G. de Vries, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 2111-2115.



**Esquema II.6.** Obtención de alcoholes derivados de 1,2,3-triazol enantioenriquecidos en un proceso tándem empleando una alcohol deshidrogenasa y una halohidrina deshalogenasa

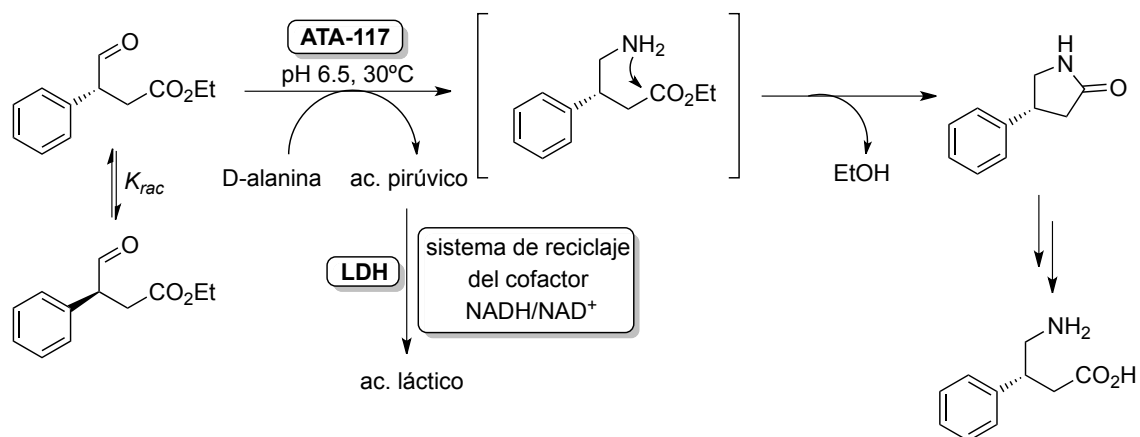
## II.6. APLICACIÓN DE $\omega$ -TRANSAMINASAS EN PROCESOS DE TIPO DINÁMICO

Como ya se ha comentado, el empleo de las  $\omega$ -transaminasas en el campo de la Biocatálisis está en constante desarrollo debido a las aplicaciones prometedoras de este tipo de enzimas en la obtención de aminas enantiopuras de una manera sencilla y altamente selectiva en condiciones suaves y en un solo paso de reacción. Cabe destacar que, pese a estar en auge su estudio y existir numerosos trabajos en los que se usan como catalizadores en resoluciones cinéticas de aminas racémicas con el fin de obtener la amina remanente enantiopura, o en procesos de aminación de grupos carbonilos pudiéndose obtener hasta un 100% de rendimiento teórico de la amina quiral, apenas existe un ejemplo descrito en el que se haya aplicado este tipo de enzimas en sistemas dinámicos. En este trabajo, Kroutil y colaboradores<sup>198</sup> llevaron a cabo la obtención de manera enantioenriquecida del compuesto (*R*)-4-fenilpirrolidin-2-ona, intermedio en la obtención del ácido 3-fenil- $\gamma$ -aminobutírico, fármaco que actúa sobre el sistema nervioso y que se administra para controlar enfermedades como el Parkinson o brotes psicóticos.<sup>199</sup>

<sup>198</sup> D. Koszelewski, D. Clay, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *60*, 191-194.

<sup>199</sup> (a) J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. G. Gilman, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10ª Ed., McGraw-Hill, **2001**; (b) P. L. McGeer, E. G. McGeer, en *Basis Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspect*, 4ª Ed., Eds. G. J. Siegel, B. Agranoff, R. W. Albers, P. Molinoff, Raven, **1989**.





**Esquema II.7.** Aplicación de una  $\omega$ -TA en un proceso dinámico para la obtención de un precursor del ácido (R)-3-fenil- $\gamma$ -aminobutírico

Aprovechando la racemización espontánea de un aldehído sustituido en posición  $\alpha$  en el medio de reacción, se estudió su aminación con varias  $\omega$ -transaminasas. Así, la amina primaria obtenida reaccionaba espontáneamente mediante una adición nucleofílica intramolecular sobre el grupo éster obteniéndose la lactama enantioenriquecida (Esquema II.7), precursor del fármaco deseado. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando la enzima *R*-selectiva ATA-117 y la alanina como agente donador del grupo amino, obteniéndose el producto deseado con un 92% de rendimiento y un exceso enantiomérico del 68% (*R*). Además se pudo llevar a cabo la reacción en una escala de 100 mg en presencia de un 15% v v<sup>-1</sup> de DMSO que actuaba como cosolvente facilitando la solubilidad del sustrato de partida.

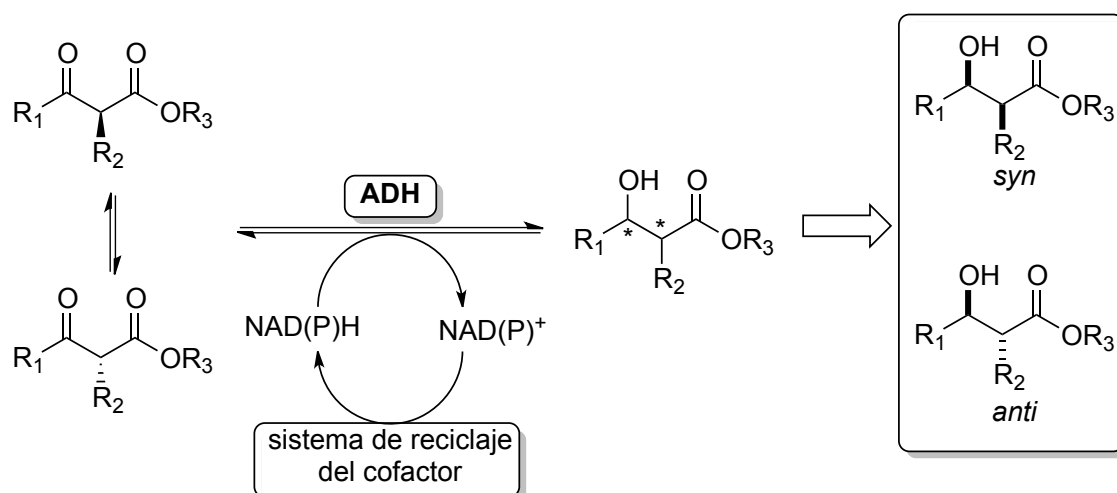




## RESULTADOS Y DISCUSION



En un primer proyecto se ha llevado a cabo la biorreducción de una serie de derivados de  $\beta$ -cetoésteres sustituidos en posición  $\alpha$  tanto con grupos alifáticos como aromáticos, catalizada por alcohol deshidrogenasas (sobreexpresadas en *E. coli* o parcialmente purificadas) a través de un proceso de resolución cinética dinámica con el fin de obtener de manera enantio- y diastereomericamente pura los alcoholes finales con una conversión cuantitativa (Esquema II.8).



**Esquema II.8.** Esquema de la obtención de  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxiésteres enantioenriquecidos catalizada por una alcohol deshidrogenasa a través de un proceso dinámico

Inicialmente se sintetizaron los sustratos de partida a través de una alquilación en la posición  $\alpha$  de los  $\beta$ -cetoésteres con los correspondientes halogenuros de alquilo en medio básico. Seguidamente se sintetizaron los  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxiésteres racémicos mediante una reducción con borohidruro sódico, con el fin de obtener los productos finales y desarrollar un método analítico con el que poder separar los cuatro diastereoisómeros generados.

Las alcohol deshidrogenasas utilizadas en este trabajo se clasificaron en tres grupos diferentes en función de su preferencia en cuanto a su estereoespecificidad (Prelog o anti-Prelog) y de acuerdo al tipo de sustrato modelo que aceptaban (Tabla II.1).

**Tabla II.1.** Alcohol deshidrogenasas utilizadas en este estudio agrupadas según su selectividad y sustrato modelo

grupo	ADH	microorganismo	selectividad	cofactor	regeneración del cofactor
1 <sup>a</sup>	ADH-A	<i>Rhodococcus ruber</i>	S	NADH	2-propanol
	CPADH	<i>Candida parapsilosis</i>	S	NADH	2-propanol
	<i>E. coli</i> /TesADH	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	S	NADPH	2-propanol
2 <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> /RasADH	<i>Ralstonia</i> sp.	S	NADPH	GDH/glucosa
	<i>E. coli</i> /SyADH	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	S	NADPH	2-propanol
3 <sup>c</sup>	LBADH	<i>Lactobacillus brevis</i>	R	NADPH	2-propanol
	LKADH	<i>Lactobacillus kefir</i>	R	NADPH	GDH/glucosa

<sup>a</sup> Selectividad de tipo Prelog aceptando sustratos con al menos un sustituyente pequeño. <sup>b</sup> Selectividad de tipo Prelog aceptando sustratos voluminosos. <sup>c</sup> Selectividad de tipo anti-Prelog.

Se realizó un estudio minucioso de la biorreducción de los diferentes sustratos con todos los enzimas observándose por lo general una tendencia clara hacia la formación de los diastereoisómeros *syn* frente a los *anti*. Estructurando el estudio en los tres grupos de enzimas mostrados en la Tabla II.1, se observó que de entre las primeras, la alcohol deshidrogenasa TesADH sobreexpresada en *E. coli* era el enzima que mejores resultados mostró con la mayoría de los sustratos, obteniéndose el diastereoisómero *syn*-(2*R*,3*S*) con unos excesos enantio- y diastereoméricos excelentes, especialmente con los

$\alpha$ -etil- y  $\alpha$ -alil- $\beta$ -cetoésteres, los cuales demostraron ser sustratos ideales para esta alcohol deshidrogenasa. En el caso de los  $\alpha$ -metil- $\beta$ -cetoésteres, el enzima más apropiado fue la CPADH. Esta alcohol deshidrogenasa mostró además una marcada dependencia en su diastereoselectividad con respecto al tamaño del grupo alquilo presente en el éster. Así, en la biorreducción de los derivados sustituidos con un grupo etilo en posición  $\alpha$ , se pasó de una ligera diastereopreferencia hacia el alcohol *anti* con el éster de metilo, a una selectividad entorno al 90% hacia la formación del diastereoisómero *syn* con el éster de isopropilo. Con derivados más voluminosos los resultados ya no fueron satisfactorios, mientras que en el caso de la  $\alpha$ -acetilbutirolactona la ADH-A mostró resultados positivos.

En el caso de las alcohol deshidrogenasas capaces de aceptar sustratos más voluminosos, la SyADH demostró de nuevo una elevada preferencia por la formación de los derivados *syn*-(2*R*,3*S*) con una buena conversión especialmente en los casos de los  $\beta$ -cetoésteres sustituidos en posición  $\alpha$  con grupos metilo o etilo. En cuanto a la RasADH, la selectividad mostrada fue baja en la mayoría de los casos, aunque demostró una diastereoselectividad elevada (90%) en la obtención del diastereoisómero *anti*-(2*S*,3*S*) del alcohol 2-bencil-3-hidroxi-butanoato de isopropilo. Este enzima también fue capaz de reducir sustratos más voluminosos que no eran aceptados por el resto de las alcohol deshidrogenasas.

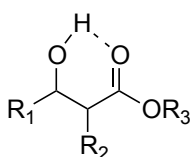
Puesto que la LBADH y la LKADH son enzimas con selectividad anti-Prelog, en la mayoría de los casos la configuración obtenida para los alcoholes fue 3*R*, sin embargo se pudo apreciar que en algunos casos, especialmente con la LKADH, el alcohol preferencial fue el de configuración 3*S*. Se comprobó además que a medida que el grupo alquilo del éster aumentaba su tamaño, tanto la enantio- como la diastereoselectividad disminuían drásticamente. Los sustratos voluminosos no fueron aceptados por la LBADH, aunque se obtuvo el alcohol *syn*-(2*S*,3*R*) resultante de la biorreducción de la  $\alpha$ -acetilbutirolactona con elevada diastereoselectividad.

Con el fin de aumentar la selectividad para alguno de estos procesos, se realizaron diferentes pruebas disminuyendo la temperatura de las reacciones de 30°C a 20°C, pero en todos los casos tan solo se observó un descenso en la conversión y no se apreció una mejoría en los excesos diastereoméricos. Asimismo, varias reacciones



podieron ser escaladas fácilmente a 50 mg obteniendo los alcoholes enantioenriquecidos con rendimientos entre un 60-80%.

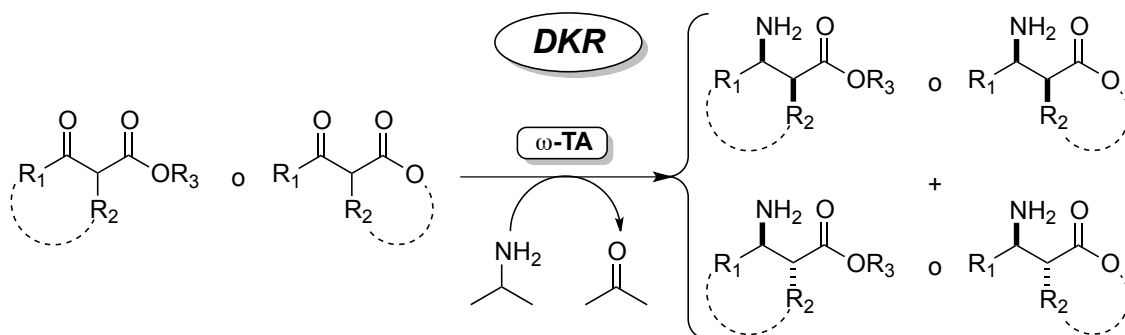
Los hidroxiésteres formados son susceptibles de formar un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo hidroxilo y el átomo de oxígeno del carbonilo del éster (Figura II.5), confiriendo a estos compuestos de una estabilidad adicional, como también ocurre en el caso de las 1,2- y las 1,3-dicetonas, las cuales han mostrado que pueden ser reducidas por ADHs de una manera *cuasi*-irreversible empleando un pequeño exceso de cosustrato.



**Figura II.5.** Interacción estabilizante en los β-hidroxiésteres obtenidos por formación de un puente de hidrógeno intramolecular

Para comprobar si este fenómeno también ocurría con estos sustratos, se llevó a cabo la biorreducción de los mismos catalizada por las ADHs utilizando como sistema de regeneración 2 equivalentes de isopropanol solamente. Así, se observó tras 24 h de reacción que las conversiones obtenidas apenas variaban en comparación con las pruebas realizadas con un 5% en volumen del cosustrato, demostrándose que para este tipo de derivados no era necesaria la utilización de un gran exceso molar de isopropanol, lo que conlleva un aumento en la eficiencia atómica y redox del proceso.

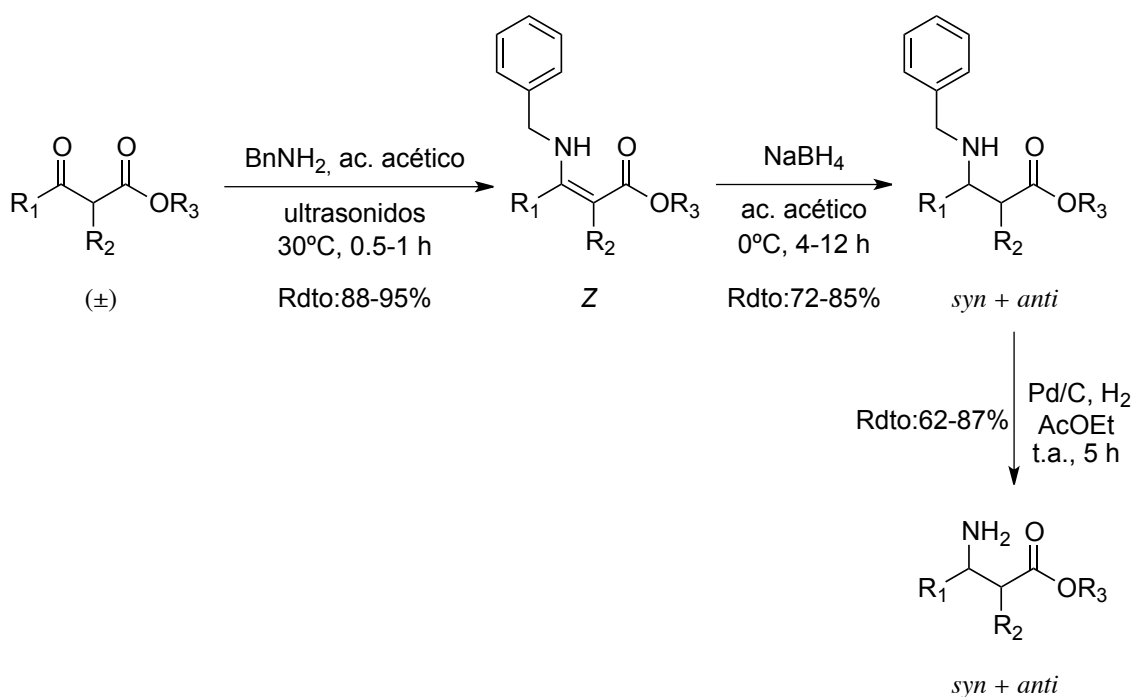
Aprovechando la obtención de los  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -cetoésteres sintetizados para el proyecto anterior, se propuso emplear algunos de estos derivados con una serie de transaminasas comerciales y así, en condiciones dinámicas, dar lugar a los correspondientes  $\beta$ -aminoésteres sustituidos en posición  $\alpha$  a través de un proceso de transaminación (Esquema II.9).



**Esquema II.9.** Síntesis estereoselectiva de  $\beta$ -aminoésteres sustituidos en posición  $\alpha$  catalizada por una transaminasa a través de un proceso dinámico

De esta manera se sintetizaron los sustratos de partida por alquilación en posición  $\alpha$  de los acetoacetatos precursores comerciales empleando halogenuros de alquilo en medio básico, obteniéndose así una serie de derivados con diferentes grupos en posición  $\alpha$  al carbonilo ( $R^2$ = metilo, etilo, bencilo) y como sustituyentes en el éster ( $R^3$ = metilo, etilo, isopropilo).

Posteriormente, para tener la referencia analítica de los productos finales de los procesos enzimáticos, se diseñó una ruta sintética para obtener los  $\beta$ -aminoésteres racémicos sustituidos en  $\alpha$  que constaba de tres etapas (Esquema II.10): 1) formación de una enamina de configuración *Z* por reacción del  $\beta$ -cetoéster con bencilamina usando catálisis por ultrasonidos a 30°C en tiempos cortos (0.5-1 h); 2) reducción de las enaminas a los correspondientes  $\beta$ -aminoésteres *N*-bencilados empleando para ello  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  a 0°C durante unas horas (4-12 h); y 3) desprotección del grupo bencilo mediante una hidrogenación catalizada por Pd sobre C en acetato de etilo durante una noche dando lugar a los derivados racémicos finales. En cuanto a la diastereoselectividad, hay que señalar que en el proceso de reducción de la enamina se obtuvo normalmente el isómero *syn* en exceso, tal como está descrito.



**Esquema II.10.** Síntesis de los  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -aminoésteres racémicos

Una vez sintetizados todos los materiales de referencia y puestos a punto los métodos analíticos, se procedieron a estudiar los procesos de aminación dinámicos con 24 TAs de origen comercial. En un primer lugar se realizó la transaminación sobre un  $\beta$ -cetoéster sin ninguna sustitución en posición  $\alpha$  (acetoacetato de etilo), empleando para ello alanina o isopropilamina como dadores de amino y DMSO como cosolvente (2.5% v v<sup>-1</sup>) para favorecer la solubilidad del sustrato, para así observar cuales de estos enzimas podían ofrecer una buena actividad con los compuestos sustituidos. De esta forma se detectaron varias TAs con selectividades opuestas que dieron lugar al correspondiente producto con muy buenas selectividades, obteniéndose mejores resultados con la isopropilamina.

A continuación se realizó la aminación selectiva de un sustrato alquilado en posición  $\alpha$  con un grupo etilo, formándose los aminoésteres *syn* y *anti* con buenas conversiones y excesos enantioméricos, aunque los *eds* normalmente eran bajos o moderados. Con el fin de mejorar estos resultados, se trató de emplear medios básicos o adicionar resinas básicas para aumentar la velocidad de racemización, o disminuir la temperatura o la carga de enzima, para rebajar la velocidad de la reacción enzimática,

pero los resultados apenas mejoraron en términos de diastereoselectividad, de ahí que se tomara un pH de 7.5 y una temperatura de 30°C como las condiciones óptimas.

En un siguiente paso se procedió a la extensión del estudio con todos los sustratos utilizando las TAs. Se observó que de entre los 24 biocatalizadores la mitad mostraban una preferencia hacia la formación de los productos de configuración *S* mientras que otros tantos hacia los de configuración *R*.

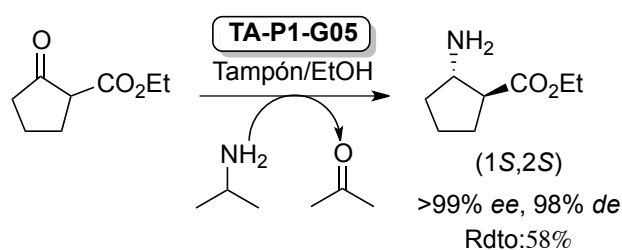
En cuanto a la familia de las transaminasas (*S*)-selectivas, la mayoría dio lugar a los β-aminoésteres enantiopuros de conformación *syn*-(2*R*,3*S*) de manera preferencial, aunque normalmente con diastereoselectividades muy bajas (hasta un 60/40). En cambio la TA-P1-A06, la TA-P1-G06 y la ATA-103 mostraron una selectividad opuesta formando el isómero *anti*-(2*S*,3*S*) mayoritariamente con mejores diastereoselectividades (hasta casi un 80/20). En la mayoría de los casos no se detectó una influencia muy marcada por el cambio en el patrón de sustitución de estos derivados, aunque en algún caso, como con la TA-P1-A06, sí que se apreció un efecto significativo cuando el grupo en posición α era voluminoso (grupo bencilo), llegándose a obtener diastereopreferencias opuestas.

Las TAs (*R*)-selectivas mostraron también por lo general una predilección por la formación del isómero *syn*-(2*S*,3*R*) de manera enantiopura aunque de nuevo con selectividades bajas (hasta un 60/40). De entre todas ellas la que mejor *eds* ofreció fue la TA-P2-A07. En cambio, la ATA-301 dio lugar al isómero enantiopuro *anti*-(2*R*,3*R*) para varios de los sustratos con moderadas diastereoselectividades, siendo en algún caso mayores de 80/20. De nuevo para este biocatalizador se observó una influencia muy marcada cuando el grupo en posición α era un bencilo.

Puesto que los resultados obtenidos en cuanto a diastereoselectividad no eran muy satisfactorios, se procedió a utilizar compuestos con una mayor rigidez estructural y que pudieran dar lugar a mejores selectividades. Así, se emplearon dos sustratos cíclicos en la reacción de transaminación. En un primer ejemplo se usó la α-acetilbutirolactona que presentaba un grupo carbonilo exocíclico, y en este caso se observaron mejores *eds* con las enzimas (*S*)-selectivas, formándose los derivados *anti*-(2*S*,1'*S*) de manera preferencial mientras que con las (*R*)-selectivas no se apreciaron

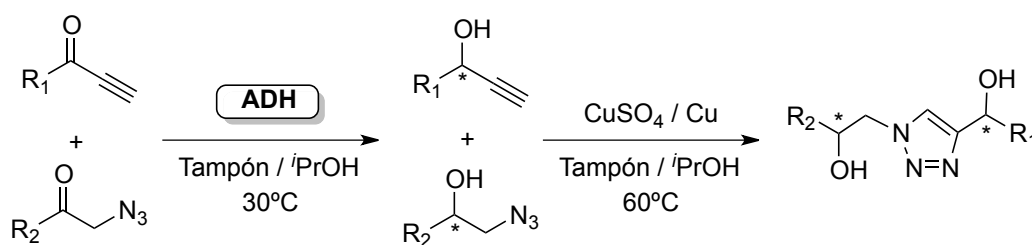
grandes mejoras. En cambio cuando se usó como sustrato el 2-oxociclopentanocarboxilato de etilo, que poseía el grupo carbonilo dentro del ciclo, sí que se identificaron dos enzimas, la ATA-113 y la TA-P1-G05, que dieron lugar al isómero *anti*-(1*S*,2*S*) con muy buenas conversiones y estereoselectividades (>99% *ee*, >94 *de*).

Debido a estos buenos resultados, se procedió a realizar el proceso de transaminación a una escala de 50 mg del sustrato obteniendo, tras 24 h de reacción utilizando en esta ocasión EtOH como cosolvente para facilitar el aislamiento del producto final, y después de una extracción simple ácido-base, el (1*S*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxilato de etilo con un 58% de rendimiento aislado de manera prácticamente enantiopura (Esquema II.11).



**Esquema II.11.** Síntesis estereoselectiva del *anti*-(1*S*,2*S*)-2-aminociclopentanocarboxilato de etilo a través de un proceso dinámico de transaminación

En el último proyecto se ha desarrollado la síntesis de 1,2,3-triazoles con dos centros estereogénicos de manera enantio- y diastereomericamente pura empleando una ruta secuencial hecha en un mismo recipiente. Utilizando como sustratos de partida dos cetonas proquirales (una  $\alpha$ -azido cetona y una  $\alpha,\beta$ -alquinil cetona), se realizó un estudio de la biorreducción simultánea de ambos compuestos con el fin de obtener ambos alcoholes de manera cuantitativa y enantiopura. Una vez obtenidos, y sin necesidad de ser aislados del crudo de reacción, se llevó a cabo la reacción de cicloadición [3+2] catalizada por Cu(I) entre ambos intermedios, generándose de esta manera los dioles derivados de 1,2,3-triazol con unas conversiones altas y unos excesos enantio- y diastereoméricos excelentes (Esquema II.12).



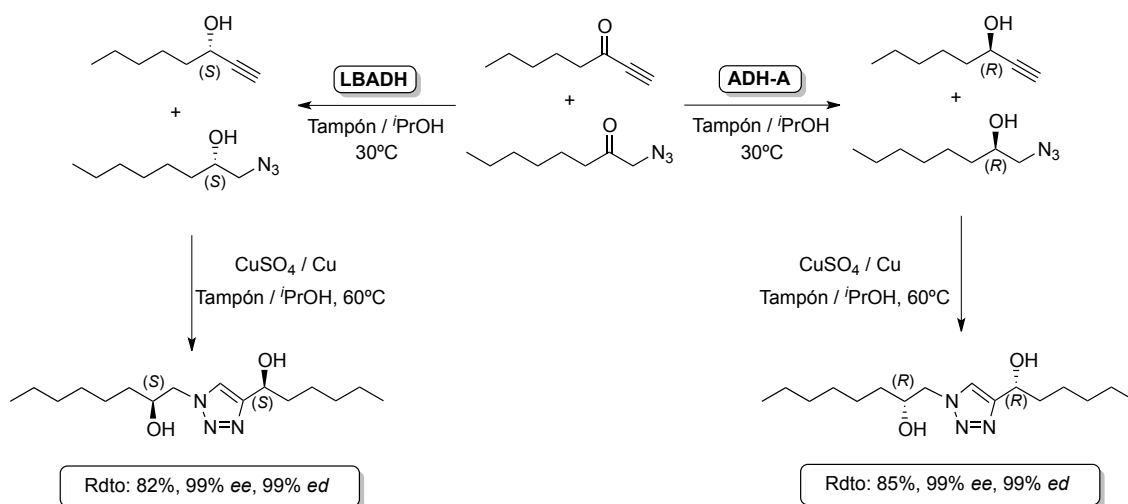
**Esquema II.12.** Ruta general para la síntesis enantio- y diastereo-enriquecida de derivados de 1,2,3-triazol a través de un proceso de tipo tándem

En un primer paso, una vez sintetizadas, se optimizó la biorreducción de una serie de  $\alpha$ -azido cetonas y  $\alpha,\beta$ -alquinil cetonas tanto alifáticas como aromáticas catalizada por alcohol deshidrogenasas. La ADH-A de *Rhodococcus ruber* (sobreexpresada en *E. coli*) con selectividad de tipo Prelog y la LBADH de *Lactobacillus brevis* con una preferencia opuesta, fueron los enzimas que mejores resultados mostraron de entre una serie de ADHs, obteniéndose una conversión completa y unos excesos enantioméricos excelentes con la mayoría de los sustratos. Hay que reseñar que se eligió un tampón fosfato 50 mM pH 7.5 para realizar las biorreducciones puesto que con la reguladora Tris se observó que las alquinil cetonas se descomponían al cabo de unas horas. En vista de los buenos resultados alcanzados para obtener de manera enantiopura los alcoholes, se llevó a cabo una prueba de biorreducción simultánea de ambos compuestos para comprobar que no hubiera ninguna interferencia entre ambos sustratos o con el enzima. Así, tras 24 horas de reacción se

obtuvieron los alcoholes productos de las biorreducciones con conversiones completas y de manera enantiopura.

El siguiente paso fue la optimización del proceso de cicloadición [3+2] entre los alcoholes obtenidos. Para ello, y utilizando dos derivados modelo en su forma racémica, se realizó un estudio de la reacción controlando factores como el disolvente, la temperatura o el catalizador. Así, cuando la reacción se llevó a cabo utilizando una disolución de  $\text{CuSO}_4$  y ácido ascórbico para generar *in situ* Cu(I) a temperatura ambiente en una mezcla de  $\text{H}_2\text{O} : ^t\text{BuOH}$  1:1 v v<sup>-1</sup>, no se obtuvieron conversiones completas. Con el fin de estudiar otras fuentes de Cu(I), se contempló la posibilidad de generarlo de una manera fácil y económica a través de un proceso de comproporción empleando cobre metálico y una disolución catalítica de sulfato de cobre (II). Así, se enrolló un filamento de cobre metálico alrededor de un imán permitiendo de esta forma la agitación de la reacción, a la vez que una fácil recuperación del catalizador y su reutilización durante varios ciclos. Así, puesto que el metal se pasivaba con el uso continuado del mismo, se procedió a un simple lavado del mismo con HCl 2 N durante 5 minutos y así poder recuperarlo.

Utilizando este sistema como fuente de cobre (I), se estudiaron las condiciones de reacción variando el disolvente y la temperatura, observándose tras 24 h de reacción a 60°C la formación de los derivados de 1,2,3-triazol con muy buenas conversiones en una mezcla de  $\text{H}_2\text{O} : ^i\text{PrOH}$  1:1 v v<sup>-1</sup>. Con el objetivo de poder desarrollar la síntesis de estos compuestos a través de un proceso de tipo tándem variando lo menos posible las condiciones de reacción, se llevó a cabo una prueba utilizando el mismo medio necesario para la biorreducción de las cetonas de partida catalizada por las ADHs, comprobándose que al utilizar como disolvente una mezcla de tampón fosfato :  $^i\text{PrOH}$  95:5 v v<sup>-1</sup> la conversión de la cicloadición no disminuía.



**Esquema II.13.** Ejemplo de la obtención de dioles derivados de 1,2,3-triazol de manera enantio- y diastereomericamente pura a través de una síntesis quimioenzimática de tipo tándem dirigida por la estereopreferencia de la alcohol deshidrogenasa

Una vez optimizadas por separado tanto la biorreducción como la cicloadición, se realizó la síntesis secuencial en dos pasos de los dioles derivados de 1,2,3-triazol en un mismo recipiente. Para ello, primero se llevaron a cabo las biorreducciones a 30°C, obteniéndose los alcoholes enantiopuros tras 24 h de reacción. Tras ello, en un segundo paso, se adicionó una disolución catalítica de CuSO<sub>4</sub> y el cobre metálico, manteniéndose la reacción a 60°C durante otras 24 h. De esta manera, y en función de la estereopreferencia de la alcohol deshidrogenasa utilizada en las biorreducciones, se pudo dirigir la síntesis hacia la formación de uno de los cuatro posibles diastereoisómeros de varios 1,2,3-triazoles con muy buenas conversiones y unos excesos enantio- y diastereoméricos excelentes (Esquema II.13).





## TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN



# Access to Enantiopure $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -hydroxy Esters through Dynamic Kinetic Resolutions Employing Purified/Overexpressed Alcohol Dehydrogenases

Aníbal Cuetos,<sup>a</sup> Ana Rioz-Martínez,<sup>a</sup> Fabricio R. Bisogno,<sup>a</sup> Barbara Grischek,<sup>b</sup> Iván Lavandera,<sup>a</sup> Gonzalo de Gonzalo,<sup>a</sup> Wolfgang Kroutil,<sup>b</sup> and Vicente Gotor<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, University of Oviedo, C/Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

Fax: (+34)-985-103-448; e-mail: vgs@uniovi.es

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Organic and Bioorganic Chemistry, University of Graz, Heinrichstrasse 28, 8010 Graz, Austria

Received: February 17, 2012; Published online: May 29, 2012



Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201200139>.

**Abstract:**  $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -hydroxy esters were obtained via dynamic kinetic resolution (DKR) employing purified or crude *E. coli* overexpressed alcohol dehydrogenases (ADHs). ADH-A from *R. ruber*, CPADH from *C. parapsilosis* and TesADH from *T. ethanolicus* afforded *syn*-(2*R*,3*S*) derivatives with very high selectivities for sterically not impeded ketones ('small-bulky' substrates), while ADHs from *S. yanoikuyae* (SyADH) and *Ralstonia* sp. (RasADH) could also accept bulkier keto esters ('bulky-bulky' substrates). SyADH also provided preferentially *syn*-(2*R*,3*S*) isomers and RasADH showed in some cases good selectivity towards the formation of *anti*-

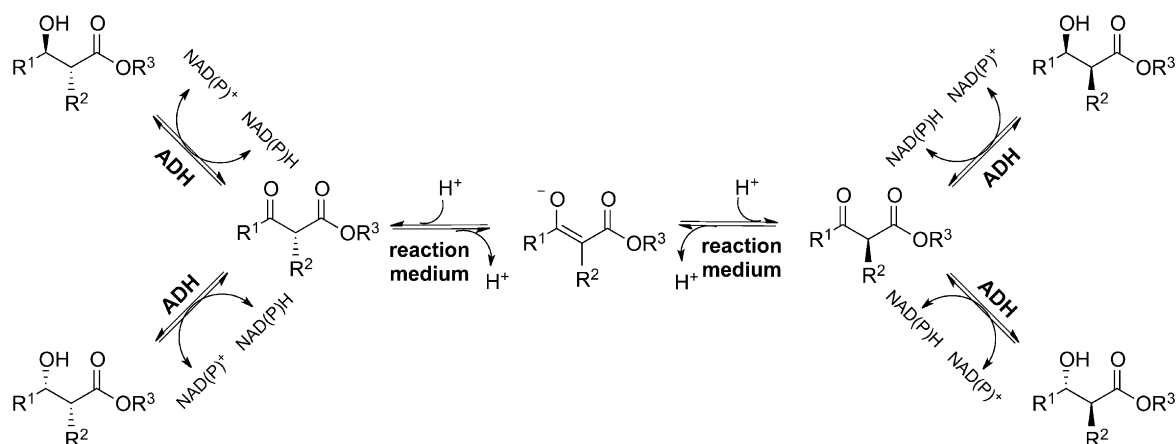
(2*S*,3*S*) derivatives. With *anti*-Prelog ADHs such as LBADH from *L. brevis* or LKADH from *L. kefir*, *syn*-(2*S*,3*R*) alcohols were obtained with high conversions and diastereomeric excess in some cases, especially with LBADH. Furthermore, due to the thermodynamically favoured reduction of these substrates, it was possible to employ just a minimal excess of 2-propanol to obtain the final products with quantitative conversions.

**Keywords:** alcohol dehydrogenases; biocatalysis; dynamic kinetic resolution; hydrogen transfer;  $\beta$ -hydroxy esters

## Introduction

During the last years, the development of dynamic protocols in order to obtain enantio- or diastereomerically pure compounds starting from easily available racemic substrates has been intensified. An increasing number of processes involving enzymatic and homogeneous catalysis in dynamic conditions has been designed to achieve successful transformations for synthesising optically pure derivatives in quantitative yields. It is accepted that when these reactions involve the deracemisation of a racemic mixture, a *dynamic kinetic resolution* (DKR) is taking place,<sup>[1]</sup> while the de-epimerisation of a mixture of diastereomers is classified as a *dynamic kinetic asymmetric transformation* (DYKAT).<sup>[2]</sup> Thus, employing DKRs, the deracemisation of *sec*-alcohols<sup>[3]</sup> and *rac*-primary amines<sup>[4]</sup> among others have been performed, while DYKATs have often been applied for the de-epimerisation of polyalcohols.<sup>[5]</sup>

One example of a dynamic process is the reduction of an  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto ester (Scheme 1) to obtain the corresponding alcohols with high diastereomeric excess (*de*).<sup>[1g,6]</sup> This reaction has been successfully achieved using metal and enzyme catalysis, due to the high acidity of the  $\alpha$ -hydrogen that ensures a fast substrate racemisation even at neutral pH. Historically this transformation has been categorised as a DKR-type process.<sup>[7]</sup> In fact, the first time where this term was implemented by Noyori,<sup>[8]</sup> corresponds to an Ru-catalysed hydrogenation of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto esters. Initial examples of the biocatalysed reduction of these compounds were shown by Deol et al. in 1976 employing baker's yeast.<sup>[9]</sup> In the 1980s and 1990s, whole cells were mainly employed as biocatalysts, especially baker's yeast,<sup>[6b,10]</sup> and despite the excellent conversions and enantiomeric excess (*ee*) achieved in some cases, the presence of several active enzymes with different selectivities depleted the global stereoselectivity. More recently, the development of dynamic protocols using isolated or overex-



**Scheme 1.** ADH-catalysed reduction of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto esters to afford a mixture of two diastereomeric pairs of alcohols through base-catalysed racemisation.

pressed alcohol dehydrogenases (ADHs),<sup>[11]</sup> has overcome this drawback along with the development of efficient techniques<sup>[12]</sup> to recycle the expensive cofactor required in these processes.

Herein, a set of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto esters has been successfully reduced with several purified or crude preparations containing overexpressed ADHs in *E. coli* affording the corresponding  $\beta$ -hydroxy esters in many cases with excellent enantio- and diastereoselectivities. Taking into account that enantioenriched  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy esters are building blocks of many natural and bioactive structures such as statins,<sup>[13]</sup> pheromones,<sup>[11h]</sup> polyketides, and other pharmaceuticals,<sup>[13]</sup> we selected a series of  $\beta$ -keto esters for their preparation. On the other hand, the ADHs studied here have not been previously assayed toward this type of derivative.<sup>[14]</sup>

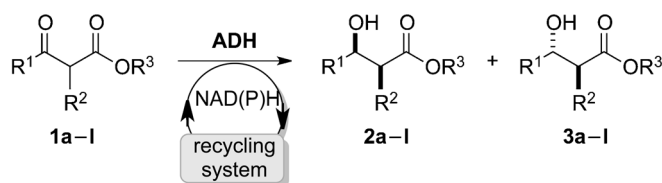
## Results and Discussion

Initially, several  $\alpha$ -alkylated  $\beta$ -keto esters were synthesised following a methodology previously described,<sup>[15]</sup> consisting of the treatment of the  $\beta$ -keto ester with the corresponding alkyl halide in basic medium (**1a–l**, Scheme 2). Then, the biotransforma-

tion conditions were optimised in order to ensure a successful DKR process. As previously shown with isolated enzymes,<sup>[11]</sup> neutral pH is enough to achieve a fast substrate racemisation (Scheme 1). Thus, the enantiomers of the  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto ester are quickly interconverted through an achiral intermediate, giving access to each of the four diastereomeric products after reduction. Since, at first, ADH-catalysed redox transformations are reversible and are mediated by the action of either the reduced or the oxidised form of the nicotinamide cofactor,<sup>[12a]</sup> it is necessary the use of a huge excess of 2-propanol in a ‘coupled-substrate’ approach or to employ, e.g., glucose dehydrogenase (GDH)/glucose in a ‘coupled-enzyme’ methodology to both recycle the nicotinamide cofactor and force the thermodynamic equilibrium to the product side. Therefore, Tris-HCl buffer 50 mM pH 7.5 was chosen as a suitable medium to carry out these bioreductions. In all cases, a catalytic amount of NAD(P)H (1 mM) was added.

### DKRs with ‘Small-Bulky’ Prelog ADHs

*Rhodococcus ruber* ADH (ADH-A),<sup>[16]</sup> *Candida parapsilosis* ADH (CPADH),<sup>[17]</sup> and *Thermoanaerobacter*



- 1a**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me; **1b**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Et; **1c**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = *i*-Pr;  
**1d**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Bn; **1e**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Et, R<sup>3</sup> = Me; **1f**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Et, R<sup>3</sup> = Et;  
**1g**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Et, R<sup>3</sup> = *i*-Pr; **1h**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = allyl, R<sup>3</sup> = *i*-Pr; **1i**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Bn, R<sup>3</sup> = *i*-Pr;  
**1j**, R<sup>1</sup> = Et, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Me; **1k**, R<sup>1</sup> = Ph, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = Et; **1l**, R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = -[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]-

**Scheme 2.** DKRs of  $\beta$ -keto esters **1a–l** using ADHs purified or overexpressed on *E. coli*.

**Table 1.** Selected bioreductions of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto esters **1a–l** employing ‘small-bulky’ Prelog ADHs through DKR processes ( $t=24$  h).<sup>[a]</sup>

Substrate	ADH	Conversion [%] <sup>[b]</sup>		<i>ee</i> [%] <sup>[c,d]</sup>	<i>de</i> [%] <sup>[c,d]</sup>
		<b>2a–l</b>	<b>3a–l</b>		
<b>1a</b>	CPADH	77	3	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	93 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1a</b>	TesADH	90	3	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	93 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1b</b>	CPADH	99	1	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	98 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1c</b>	CPADH	97	<1	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1d</b>	CPADH	68	<1	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1e</b>	TesADH	97	<1	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	98 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1f</b>	TesADH	97	<1	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	98 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1g</b>	TesADH	97	<1	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	98 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1h</b>	TesADH	99	<1	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1i</b>	TesADH	65	<1	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1j</b>	ADH-A	19	1	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	90 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1l</b>	ADH-A	95	2	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	96 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )

<sup>[a]</sup> For experimental details and other bioreduction results, see Experimental Section and Supporting Information.

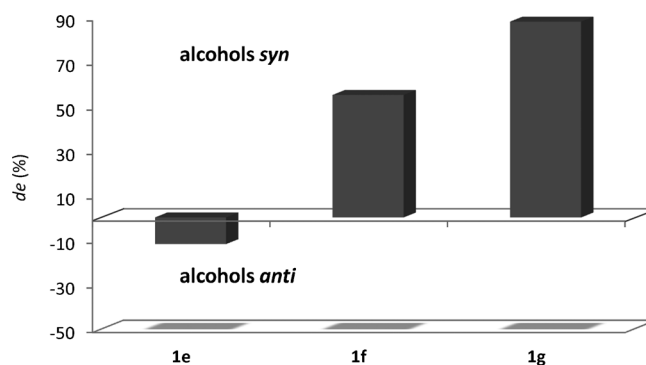
<sup>[b]</sup> Measured by GC.

<sup>[c]</sup> Measured by GC or HPLC on a chiral phase.

<sup>[d]</sup> The major diastereomer appears in brackets.

*ethanolicus* ADH (TesADH),<sup>[18]</sup> were firstly studied as biocatalysts to perform these reactions. While the first two ADHs were used in a purified form, the last one was employed as a lyophilised *E. coli* preparation containing the overexpressed enzyme.<sup>[19]</sup> These enzymes present in general an excellent Prelog selectivity,<sup>[20]</sup> and while the first two are highly active toward methyl alkyl or aryl ketones,<sup>[16,17,21]</sup> the last one can also accept ethynyl ketones and ethynyl keto esters.<sup>[18,22]</sup> Furthermore, all of them have demonstrated tolerance against organic solvents, and therefore they can be used in a ‘coupled-substrate’ approach employing an excess of 2-propanol (5% v v<sup>-1</sup>) to recycle the cofactor.<sup>[16–18,19a,21,22]</sup> Selected results of the bioreduction of substrates **1a–l** with these three biocatalysts are shown in Table 1.

These ADHs displayed excellent stereoselectivities leading to the Prelog products, exclusively affording an (*S*)-configured centre at position 3 with very high conversions in many cases. For  $\alpha$ -methylated  $\beta$ -keto esters **1a–d**, CPADH showed excellent enantio- and diastereoselectivities towards the formation of *syn*-(2*R*,3*S*)-**2a–d** alcohols, while TesADH and ADH-A achieved excellent *ee* although lower *de*, especially in the case of the last one (entries 1–5 in Table 1 and Table S1 in the Supporting Information). However, with  $\alpha$ -ethylated ketones **1e–g** TesADH allowed the selective formation of alcohols (2*R*,3*S*)-**2e–g** (entries 6–8) while CPADH and ADH-A showed lower diastereoselectivities (see the Supporting Information, Table S1). There is a remarkable trend observed for CPADH toward this family of compounds (Figure 1).

**Figure 1.** Influence of alkyl ester chain in the bioreductions of ketones **1e–g** with CPADH.

Depending on the ester alkyl moiety, a pronounced change in *de* was observed. The bulkier the alkyl chain was, the more favoured was the formation of *syn* isomer **2e–g**. In fact, for methyl ester derivative **1e**, a slight preference for *anti* isomer **3e** was found, while the isopropyl derivative **1g** afforded a 15:1 mixture of **2g** and **3g**. Interestingly, bulkier ketones **1h** and **1i** could be reduced by these ADHs, although TesADH afforded the best stereoselectivities to achieve (2*R*,3*S*)-**2h** and **2i** (entries 9 and 10, Table 1). Ethyl ketone **1j** could only be reduced by ADH-A with very high *ee* and *de* (entry 11, Table 1), although at low conversion. Phenyl keto ester **1k** was not a suitable substrate for any of these ADHs, as expected due to high sterical hindrance (see the Supporting Information, Table S1). Finally, cyclic derivative **1l** was stereoselectively reduced by ADH-A at very high conversions to form *syn* alcohol **2l** (entry 12, Table 1), while CPADH and especially TesADH gave lower conversions and *de* (see the Supporting Information, Table S1).

### DKRs with ‘Bulky-Bulky’ Prelog ADHs

The study was continued employing *Sphingobium yanoikuyae* ADH (SyADH),<sup>[23]</sup> and *Ralstonia* sp. ADH (RasADH).<sup>[24]</sup> These enzymes are known to accept ‘bulky-bulky’ ketones. Therefore, we expected in some cases a complementary behaviour to the previous ADHs (Table 2 and the Supporting Information, Table S2). The glucose/GDH system was employed to recycle the nicotinamide cofactor in the case of RasADH,<sup>[24]</sup> while for SyADH-catalysed bioreductions, a ‘coupled-substrate’ approach using 2-propanol was chosen.<sup>[23]</sup>

SyADH showed a very high preference for the formation of *syn*-(2*R*,3*S*) isomers of the  $\alpha$ -methylated, ethylated, allylated, and benzylated derivatives **2a–i** with excellent conversions, while RasADH showed lower diastereoselectivities with the exception of sub-

**Table 2.** Selected bioreductions of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto esters **1a–k** employing ‘bulky-bulky’ ADHs overexpressed on *E. coli* through DKR processes ( $t=24$  h).<sup>[a]</sup>

Substrate	ADH	Conversion [%] <sup>[b]</sup>		<i>ee</i> [%] <sup>[c,d]</sup>	<i>de</i> [%] <sup>[c,d]</sup>
		<b>2a–k</b>	<b>3a–k</b>		
<b>1a</b>	SyADH	90	2	> 99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	96 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1b</b>	SyADH	98	2	> 99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	96 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1c</b>	SyADH	76	4	> 99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	90 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1d</b>	SyADH	99	< 1	> 99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1f</b>	SyADH	96	4	> 99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	92 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1h</b>	RasADH	38	62	> 99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	> 99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1i</b>	RasADH	5	95	> 99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	24 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1j</b>	RasADH	37	29	78 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	90 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )
<b>1k</b> <sup>[e]</sup>	RasADH	4	72	> 99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	12 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )
				> 99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	89 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )

<sup>[a]</sup> For experimental details and other bioreduction results, see Experimental Section and Supporting Information.

<sup>[b]</sup> Measured by GC.

<sup>[c]</sup> Measured by GC or HPLC on a chiral phase.

<sup>[d]</sup> The major diastereomer appears in brackets.

<sup>[e]</sup> Switch in Cahn–Ingold–Prelog (CIP) priority at position 3.

strate **1i**, leading to *anti*-(2*S*,3*S*)  $\beta$ -hydroxy ester **3i** with 90% *de* (entry 7, Table 2).  $\beta$ -Keto esters **1j** and **1k**, which could not be transformed by the ‘small-bulky’ ADHs, were reduced by RasADH at some extent, and although for **1j** the diastereoselectivity was low, bulky ketone **1k** was accepted showing good conversion and very high stereoselectivity for the formation of *anti*-(2*S*,3*R*) isomer **3k** (entry 9, Table 2). Finally, **1l** was not a suitable substrate for these biocatalysts (see the Supporting Information, Table S2). Both ADHs displayed excellent stereoselectivities leading to the Prelog products, exclusively affording an (*S*)-configured centre at position 3 for products **a–j** and an (*R*)-configured centre for **k**, due to a switch in the CIP priority (Scheme 2).

### DKRs with *anti*-Prelog ADHs

Until this stage, all ADHs employed showed Prelog selectivity, therefore affording only 2 out of 4 possible diastereomers presenting an (*S*)-configured carbon at position 3. So, we tested two ADHs with *anti*-Prelog selectivity, namely *Lactobacillus brevis* ADH (LBADH)<sup>[25]</sup> and *Lactobacillus kefir* ADH (LKADH)<sup>[26]</sup> as purified enzymes. For the first one 2-propanol was used to recycle the cofactor while for the second one a system with GDH/glucose was employed. Results with LBADH and LKADH are summarised in Table 3 and the Supporting Information, Table S3.

As expected, in most cases the (3*R*)-isomers were obtained with high preference, but with some substrates there were noticeable changes in the stereoselectivity, especially with LKADH (see the Supporting

**Table 3.** Selected bioreductions of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto esters **1a–l** employing LBADH through DKR processes ( $t=24$  h).<sup>[a]</sup>

Substrate	ADH	Conversion [%] <sup>[b]</sup>		<i>ee</i> [%] <sup>[c,d]</sup>	<i>de</i> [%] <sup>[c,d]</sup>
		<b>2a–l</b>	<b>3a–l</b>		
<b>1a</b>	LBADH	68	7	94 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	81 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )
<b>1b</b>	LBADH	34	15	> 99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	20 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
<b>1c</b>	LBADH	6	8	n.d.	38 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )
<b>1d</b>	LBADH	21	35	24 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	n.d.
<b>1e</b>	LBADH	38	3	49 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )	25 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
<b>1f</b>	LBADH	11	4	> 99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	85 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )
<b>1g</b>	LBADH	12	3	45 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	47 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )
<b>1j</b>	LBADH	27	2	83 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	60 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )
<b>1l</b>	LBADH	27	2	> 99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	86 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )
		95	5	> 99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	90 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )

<sup>[a]</sup> For experimental details and other bioreduction results, see Experimental Section and Supporting Information.

<sup>[b]</sup> Measured by GC.

<sup>[c]</sup> Measured by GC or HPLC on a chiral phase.

<sup>[d]</sup> The major diastereomer appears in brackets.

Information, Table S3). The nature of the alkyl ester moiety has a significant influence, leading to diminished enantio- and diastereoselectivities the bigger the alkyl ester moiety was. In fact, a clear trend can be observed with ketones **1a–d** and **1e–g**. Especially for methyl, although also with ethyl ester derivatives, the stereoselectivity of the enzymes usually favoured the formation of (2*S*,3*R*)-*syn* isomers, but for bulkier compounds such as **1c**, **1d** and **1g**, the Prelog  $\beta$ -hydroxy esters were formed in high amounts. These biocatalysts did not accept bulky substrates showing in

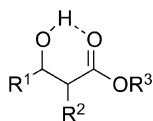
addition low selectivity. Apart from methyl  $\beta$ -keto esters **1a** and **1e**, cyclic substrate **11** (entry 9, Table 3) was nicely reduced by LBADH affording (2*S*,3*R*)-**21** with very high stereoselectivity.

At this point it has to be mentioned that in order to improve the diastereoselectivity in some of these dynamic processes, a lower temperature (20 °C) was tried, but in all cases just lower conversions were achieved with no improvement in the selectivities (data not shown). When using lyophilised *E. coli* cells containing overexpressed ADHs, where some lipases or esterases can be present in the host microorganism, a study of the substrate stability was performed to discard hydrolysis or transesterifications of methyl or ethyl esters with 2-propanol employed in the 'coupled-substrate' approach. Due to the easy handling of lyophilised *E. coli* cells, these reactions could be readily performed at a 50-mg scale isolating the enantioenriched  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -hydroxy esters with high *de* and isolated yields (60–80%).

### DKRs under 'Quasi-Irreversible' Conditions

In previous contributions we have shown that biocatalysed hydrogen transfer processes using ADHs in a 'coupled-substrate' fashion can be carried out employing a small excess of the co-substrate at determined conditions. Since these transformations mainly rely on the thermodynamic equilibrium between the redox pairs of substrate and co-substrate,<sup>[27]</sup> depending on the chemical structure of compounds reduced/oxidised, the reaction equilibrium will be easily (or not) displaced into the final products. Thus, we have observed that carbonyl groups presenting an electron-withdrawing moiety at the  $\alpha$ -position can be quasi-irreversibly reduced by ADHs.<sup>[23,27,28]</sup>

This effect has also been observed in the case of bioreductions of 1,2- and 1,3-diketones, probably due to the fact that an intramolecular H-bond is formed between the formed alcohol moiety and the remaining carbonyl group, hampering their oxidation reaction.<sup>[29]</sup> With this in mind, we envisaged that bioreductions of these  $\beta$ -keto ester derivatives could be highly favoured due to the formation of an intramolecular H-bond affording a stabilised 6-membered ring (Figure 2), and therefore a small excess of 2-propanol could be used to achieve quantitative conversions of the corresponding  $\beta$ -hydroxy esters.



**Figure 2.** Intramolecular H-bond interaction in  $\beta$ -hydroxy esters **2** or **3**.

Consequently, substrate **1b** was reduced with several ADHs that accept 2-propanol as co-substrate (ADH-A, CPADH, and LBADH), using only 2 equivalents of the hydrogen donor (corresponds to 0.45% v/v<sup>-1</sup>). In all cases similar conversions were obtained as when employing an excess of donor (5% v/v<sup>-1</sup>, 23 equivalents). For instance, ADH-A and CPADH gave conversions around 95% after 24 h. This shows that a large excess of 2-propanol is not required for these substrates, thus being possible to improve both atom<sup>[30a]</sup> and redox<sup>[30b]</sup> economies. To the best of our knowledge, this is the first example of a DKR process *via* hydrogen transfer under 'quasi-irreversible' conditions.

### Conclusions

Enantioenriched  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy esters are building blocks of many natural and pharmaceutical compounds, so studies about catalysts that allow their preparation with high selectivity under mild conditions are of high relevance. Herein we have shown the DKR process *via* reduction of various  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto esters employing purified or lyophilised *E. coli* cells containing overexpressed ADHs, affording the corresponding  $\beta$ -hydroxy esters generally with excellent conversions and stereoselectivities. The high acidity of the  $\alpha$ -proton ensured a fast substrate racemisation yielding the enantioenriched products at conversions close to 100% even at almost neutral pH.

Depending on the biocatalyst, the substrate scope and selectivity were different. While 'small-bulky' ADHs such as ADH-A, CPADH and TesADH rendered *syn*-(2*R*,3*S*) derivatives with very high diastereoselectivities for substrates that are not very sterically demanding, 'bulky-bulky' ADHs from *S. yanoikuyae* and *Ralstonia* sp. could also accept bulkier keto esters. While the former also afforded preferentially *syn*-(2*R*,3*S*) isomers, the latter showed in some cases a good selectivity towards the formation of *anti*-(2*S*,3*S*) derivatives. Finally, with *anti*-Prelog ADHs such as LBADH or LKADH, *syn*-(2*S*,3*R*) alcohols were obtained in some cases with high conversions and *ee*. Furthermore, with some of these enzymes a trend could be observed, which can be very useful for further applications. While for CPADH isopropyl esters gave better diastereoselectivities than methyl ones, for LBADH methyl esters were more appropriate than bulkier alkyl chains.

On the other hand, processes employing lower amounts of reagents are advisable for economical and environmental reasons. Since 1,2- or 1,3-diketones could be reduced with ADHs under quasi-irreversible conditions,<sup>[29]</sup> i.e., by employing a low excess of the required co-substrate (2-propanol), we took advantage of this principle to show that this methodology



can also work for performing DKRs over these  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto esters.

## Experimental Section

### General Remarks

Ketones **1b**, **1e**, **1f** and **1l** were purchased from commercial sources. All other reagents and solvents were of the highest quality available. Glucose dehydrogenase (GDH 002, 30 U mg<sup>-1</sup>), ADH-A from *Rhodococcus ruber* (20 U mg<sup>-1</sup>), CPADH from *Candida parapsilosis* (0.4 U  $\mu$ L<sup>-1</sup>), and LBADH from *Lactobacillus brevis* (3.7 U  $\mu$ L<sup>-1</sup>) were obtained from Jülich-Codexis. LKADH from *Lactobacillus kefir* (0.42 U mg<sup>-1</sup>) was obtained from Fluka. Overexpressed ADHs have been obtained following the methodology previously described.<sup>[23,24]</sup> One unit (U) of ADH reduces 1.0  $\mu$ M of 2-octanone to 2-octanol (for TesADH) or propiophenone to 1-phenylpropanol (for RasADH or SyADH) per minute at pH 7.5 and 30 °C in the presence of NADPH.

### General Procedure for the DKR over the Racemic $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -keto Esters 1a–l Employing Purified ADHs

The corresponding racemic  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto ester (50 mg) was dissolved in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.5, 12 mL). Then, NAD(P)H (1 mM), the ADH (30 U), and 2-propanol (650  $\mu$ L) for ADH-A, CPADH or LBADH [glucose dehydrogenase (50  $\mu$ L) and glucose (50 mM) for LKADH] were added. The mixture was shaken at 250 rpm at 30 °C from 24 to 72 h. The reaction was stopped by extraction with EtOAc (3  $\times$  10 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent was evaporated under reduced pressure and conversions were measured by GC. The final products were isolated after flash chromatography on silica gel, using hexane/EtOAc or diethylether/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mixtures as eluent with yields ranging from 60 to 80%.

### General Procedure for the DKR over the Racemic $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -keto Esters 1a–l Employing Overexpressed ADHs

The corresponding racemic  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto ester (50 mg) was dissolved in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.5, 12 mL). Then, NADPH (1 mM), the lyophilised cells of *E. coli* overexpressing the ADH (150 mg), and 2-propanol (650  $\mu$ L) for TesADH or SyADH [glucose dehydrogenase (50  $\mu$ L) and glucose (50 mM) for RasADH] were added. The mixture was shaken at 250 rpm at 30 °C from 24 to 72 h. The reaction was stopped by centrifugation and extraction with EtOAc (3  $\times$  10 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the solvent was evaporated under reduced pressure and conversions were measured by GC. The final products were isolated after flash chromatography on silica gel, using hexane/EtOAc or diethylether/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mixtures as eluent with yields ranging from 60 to 80%.

## Acknowledgements

A.C. thanks the Principado de Asturias for his predoctoral fellowship. A.R.-M. (FPU program) and I.L. (Ramón y Cajal Program) thank the Spanish MICINN for personal funding. Financial support from MICINN (Project CTQ2007-61126) is gratefully acknowledged. This project is supported from BIOTRAINS Marie Curie ITN, financed by the European Union through the Seventh Framework People Programme (Grant Agreement no. 238531).

## References

- [1] Recent bibliography: a) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226–232; b) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1563–1601; c) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, in: *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, (Eds.: V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp 89–113; d) M.-J. Kim, J. Park, Y. K. Choi, in: *Multi-Step Enzyme Catalysis*, (Ed.: E. García-Junceda), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp 1–19; e) N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115–121; f) H. Pellissier, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 659–676; g) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769–3802.
- [2] J. Steinreiber, K. Faber, H. Griengl, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8060–8072.
- [3] a) R. Azerad, D. Buisson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 565–571; b) Y. Ahn, S.-B. Ko, M.-J. Kim, J. Park, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 569–592.
- [4] a) O. Pamies, J.-E. Bäckvall, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247–3261; b) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999–1015; c) Y.-W. Kim, J.-W. Park, M.-J. Kim, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 271–277.
- [5] a) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9191–9195; b) M. Edin, B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 708–715; c) B. Martín-Matute, M. Edin, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6053–6061; d) K. Leijondahl, L. Boren, R. Braun, J.-E. Bäckvall, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2027–2030; e) K. Leijondahl, L. Boren, R. Braun, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1988–1993; f) P. Krumlinde, K. Bogar, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4031–4036.
- [6] a) R. S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1475–1490; b) H. Stecher, K. Faber, *Synthesis* **1997**, 1–16.
- [7] Very recently, these processes have also been defined as *dynamic reductive kinetic resolutions* (DYRKR), but in order to avoid confusion, we will refer to them as DKRs. To see more: a) J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930–5931; b) G. A. Applegate, R. W. Cheloha, D. L. Nelson, D. B. Berkowitz, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2420–2422.
- [8] R. Noyori, T. Ikeda, T. Ohkuma, M. Widhalm, M. Kitamura, H. Takaya, S. Akutagawa, N. Sayo, T. Saito, T. Taketomi, H. Kumabayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9134–9135.
- [9] B. S. Deol, D. D. Ridley, G. W. Simpson, *Aust. J. Chem.* **1976**, *29*, 2459–2467.

- [10] Using baker's yeast: a) G. Fráter, *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 2825–2828; b) K. Nakamura, T. Miyai, K. Nozaki, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3155–3156; c) K. Nakamura, T. Miyai, A. Nagar, S. Oka, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 1179–1187; d) K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3631–3632; e) K. Nakamura, Y. Kawai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2927–2928; f) M. Takeshita, H. Yanagihara, S. Yoshida, *Heterocycles* **1992**, *33*, 489–492. Employing other microorganisms: g) H. Akita, A. Furuichi, H. Koshiji, K. Horikoshi, T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 4376–4383; h) D. Buisson, C. Sanner, M. Larcheveque, R. Azerad, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3939–3940; i) K. Nakamura, T. Miyai, K. Fukushima, Y. Kawai, B. R. Babu, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 1713–1715; j) G. Fantin, M. Fogagnolo, P. Giovannini, A. Medici, E. Pagnotta, P. Pedrini, A. Trincone, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1631–1634; k) H. Miya, M. Kawada, Y. Sugiyama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 95–98; l) K. Ishihara, K. Iwai, H. Yamaguchi, N. Nakajima, K. Nakamura, T. Ohshima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 1896–1898; m) S. P. Ravía, I. Carrera, G. A. Seoane, S. Vero, D. Gamenara, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1393–1397; n) P. Rodríguez, B. Reyes, M. Barton, C. Coronel, P. Menéndez, D. Gonzalez, S. Rodríguez, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *71*, 90–94.
- [11] a) K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, S. Honda, N. Nakajima, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 1467–1470; b) W.-R. Shieh, C. J. Sih, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1259–1269; c) P. Bingfeng, G. Jianxing, L. Zuyi, O. P. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 853–855; d) Y. Kawai, K. Hida, K. Nakamura, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 591–592; e) I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12827–12832; f) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799–4801; g) D. Zhu, C. Mukherjee, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, L. Hua, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 901–905; h) D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, D. J. Rozzell, I. Smonou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418–2426.
- [12] a) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120–126; b) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 762–782; c) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285–2313.
- [13] a) R. W. Hoffmann, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 503–517; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 489–503; b) M. Chartrain, P. M. Salmon, D. K. Robinson, B. C. Buckland, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 209–214; c) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416; d) G. F. Liou, C. Khosla, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 279–284.
- [14] From all ADHs tested in this contribution, just *Lactobacillus brevis* ADH has been employed in a DKR-reductive process with  $\gamma$ -alkyl  $\beta,\delta$ -diketo esters. See, for instance: a) A. Ji, M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Chem. Commun.* **2001**, 57–58; b) S. Lüdeke, M. Richter, M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 253–259.
- [15] a) M. Lee, D. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 913–922; b) A. Rioz-Martínez, A. Cuetos, C. Rodríguez, G. de Gonzalo, I. Lavandera, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8537–8540; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8387–8390.
- [16] This (*S*)-selective ADH has a strong preference for NADH. See: W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1056–1059; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014–1017.
- [17] This (*S*)-selective enzyme shows a preference for NADH. See, for instance: J. Peters, T. Minuth, M.-R. Kula, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 950–958.
- [18] This (*S*)-selective ADH highly prefers NADPH. See: C. Heiss, M. Laivenieks, J. G. Zeikus, R. S. Phillips, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1659–1666.
- [19] See, for instance: a) G. de Gonzalo, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2163–2166; b) I. Lavandera, A. Kern, M. Schaffnerberger, J. Gross, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil, *ChemSusChem* **2008**, *1*, 431–436.
- [20] V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119–130.
- [21] See, for instance: a) J. Peters, T. Zelinski, T. Minuth, M. R. Kula, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1683–1692; b) T. Schubert, W. Hummel, M.-R. Kula, M. Müller, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4181–4187; c) K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poeschl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, 2402–2404.
- [22] C. Heiss, R. S. Phillips, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 2821–2825.
- [23] This 'bulky-bulky' (*S*)-selective ADH is NADP-dependent. See, for instance: I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155–2158.
- [24] This (*S*)-selective biocatalyst shows a high preference for NADPH. See: I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6003–6005.
- [25] This (*R*)-selective enzyme has a strong preference for NADPH. See: M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4476–4478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306–4308.
- [26] W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *34*, 15–19.
- [27] F. R. Bisogno, E. García-Urdiales, H. Valdés, I. Lavandera, W. Kroutil, D. Suárez, V. Gotor, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11012–11019.
- [28] F. R. Bisogno, I. Lavandera, W. Kroutil, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1730–1732.
- [29] M. Kurina-Sanz, F. R. Bisogno, I. Lavandera, A. A. Orden, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1842–1848.
- [30] a) B. M. Trost, *Science* **1991**, *254*, 1471–1477; b) N. Z. Burns, P. S. Baran, R. W. Hoffmann, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2896–2910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2854–2867.



## Moving Forward Dynamic Kinetic Protocols: Transaminase-Catalyzed Synthesis of $\alpha$ -Substituted $\beta$ -Amino Ester Derivatives

Aníbal Cuetos,<sup>[a]</sup> Iván Lavandera,\*<sup>[a]</sup> and Vicente Gotor\*<sup>[a]</sup>

**Abstract:** Several  $\alpha$ -alkylated  $\beta$ -amino esters have been obtained *via* DKR process employing a kit of commercially available transaminases ( $\omega$ -TAs) and isopropylamine as amino donor in aqueous medium at mild conditions. Thus, using a first set of racemic acyclic  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto esters, several (*S*)- and (*R*)-selective enzymes could provide the corresponding final derivatives with excellent conversions and enantioselectivities, although usually with modest diastereoselectivities. (*S*)-Selective TAs generally afforded the *syn*-(2*R*,3*S*) compounds in excess but some biocatalysts such as TA-

P1-G06 and ATA-103 formed preferentially the *anti*-(2*S*,3*S*) isomer. In the case of the (*R*)-specific family of transaminases, a similar picture was observed, usually obtaining the *syn*-(2*S*,3*R*) amino esters with low inductions. With some substrates, ATA-301 showed a good preference to form the opposite *anti*-(2*R*,3*R*) isomer. For some TAs, a remarkable effect on their diastereoselectivity was found when the substituent at  $\alpha$ -position was modified. Using a bulky group such as benzyl, the diastereopreference of the biocatalyst could be reversed. As an extension, more constrained cyclic  $\beta$ -keto esters were employed as amino

acceptors. Gratifyingly, although lower conversions were generally achieved, higher inductions could also be observed. Thus, ethyl *anti*-(2*S*,3*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylate could be synthesized with excellent enantio- and diastereoselectivities through the corresponding dynamic transamination of the racemic cyclic  $\beta$ -keto ester precursor.

**Keywords:** dynamic kinetic resolutions • biocatalysis • transaminases •  $\beta$ -amino esters • organic synthesis

### Introduction

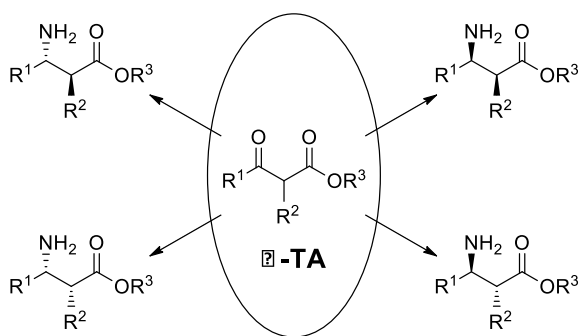
During the last years, the development of enzymatic strategies that enable access to 100% theoretical yield of stereoisomerically enriched compounds starting from easily available racemic or prochiral derivatives, has attracted many efforts due to the simpler isolation and purification techniques required in order to obtain higher yields of the desired target, and therefore diminishing costs while enhancing the atom economy of the process.<sup>[1]</sup> In this sense, recent advances achieved in, *e.g.* dynamic systems to get access to enantio- or diastereomerically pure compounds have been described. Thus, performing a kinetic resolution on a substrate which simultaneously can undergo racemization has led to efficient

dynamic kinetic resolutions (DKRs).<sup>[2]</sup> While this methodology has been extensively employed with hydrolases (usually in combination with a metal-based racemization)<sup>[3]</sup> and oxidoreductases (often combined with a racemization in basic conditions),<sup>[4]</sup> for other enzyme classes it has been scarcely exploited.

$\omega$ -Transaminases ( $\omega$ -TAs, EC 2.6.1.x) are probably one of the most promising biocatalysts applied to the synthesis of chiral amines starting from the racemic derivatives, through kinetic resolutions, or from the prochiral ketones, through asymmetric aminations, in aqueous solution at mild reaction conditions and with excellent stereoselectivities.<sup>[5]</sup> Although the increasing relevance of these biocatalysts is undoubtedly, it is remarkable that only one example described by Kroutil and co-workers can be recognized as a dynamic kinetic resolution.<sup>[6]</sup> In this contribution, the authors proposed the DKR of an  $\alpha$ -chiral aldehyde through spontaneous racemization combined with the use of an  $\omega$ -TA to afford, after ring closure, 4-phenylpyrrolidin-2-one with 92% isolated yield and 68% *ee*.

[a] A. Cuetos, Dr. I. Lavandera, Prof. V. Gotor  
Departamento de Química Orgánica e Inorgánica  
Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, University of Oviedo  
C/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo (Spain)  
Fax: (+) 34 985 103448  
E-mail: [lavanderaivan@uniovi.es](mailto:lavanderaivan@uniovi.es) or [vgs@uniovi.es](mailto:vgs@uniovi.es)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chemeurj.org/> or from the author.



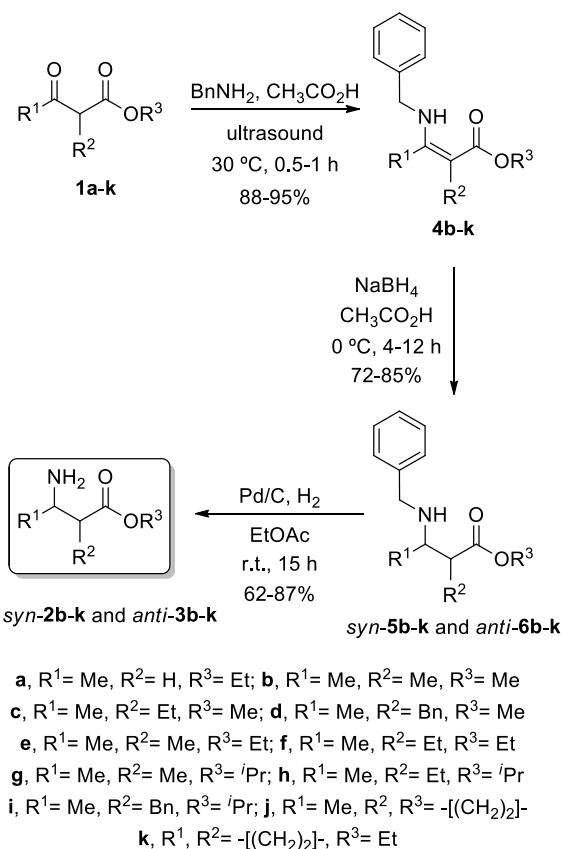
Scheme 1. General overview for the synthesis of enantioenriched  $\alpha$ -alkylated  $\beta$ -amino esters through  $\omega$ -TA-catalyzed dynamic amination.

Due to our previous experience with the synthesis of several  $\alpha$ -alkylated  $\beta$ -keto esters,<sup>[4b,e]</sup> and since these substrates can racemize at neutral pH due to the high acidity of the proton at  $\alpha$  position, it was decided to study the DKR of these compounds through  $\omega$ -TA-catalyzed amination to obtain the corresponding  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -amino esters (Scheme 1). These compounds have a great relevance since they are present in nature in biologically active peptides,<sup>[7]</sup> and also these units are potentially valuable for the preparation of peptidomimetics,<sup>[8]</sup> and can be used as intermediates for the production of high-added value substituted  $\beta$ -lactams<sup>[9]</sup> and  $\beta$ -amino acids.<sup>[10]</sup> Furthermore, the selective synthesis of these unprotected synthons appears challenging, and apart from the diastereoselective  $\alpha$ -alkylation of  $\beta$ -amino esters,<sup>[11]</sup> the stereoselective reduction of  $\beta$ -enamino esters with sodium triacetoxyborohydride,<sup>[12]</sup> the penicillin G acylase-catalyzed kinetic resolution of racemates,<sup>[13]</sup> or multi-step procedures involving the Mannich reaction,<sup>[14]</sup> 1,3-dipolar cycloadditions,<sup>[15]</sup> or the Michael addition plus alkylation,<sup>[16]</sup> no general strategy comprising the direct asymmetric reductive amination of the  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto ester precursors has been described until now.<sup>[17]</sup>

## Results and Discussion

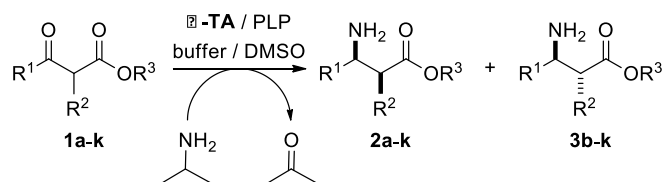
Thus, as a first part of this project, it was planned the synthesis of racemic  $\beta$ -keto esters **1b-k** and the corresponding mixture of *syn* and *anti* diastereoisomers of the  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -amino esters **2b-k** and **3b-k** (Scheme 2), to optimize the analytical methods to measure the enzymatic conversions and the enantio- and diastereoselectivities. Some of the  $\beta$ -keto esters **1b-k** were commercially available while other were achieved through treatment of the  $\beta$ -keto ester precursors with the corresponding alkyl halide in basic medium as previously described.<sup>[4b,e]</sup> In a subsequent step adapting a protocol described by Brandt and co-workers,<sup>[18]</sup> ultrasonication of these derivatives under the presence of benzylamine in acetic acid at 30 °C afforded smoothly the (*Z*)-*N*-benzylated enamine esters **4b-k** in excellent yields. Then, the corresponding *N*-protected  $\beta$ -amino esters *syn*-**5b-k** and *anti*-**6b-k** were obtained as diastereoisomeric mixtures by reduction of the C=C double bond with NaBH(OAc)<sub>3</sub> at 0 °C after few hours in high yields. As previously described, under these conditions the *syn* isomers were preferentially formed.<sup>[12,19]</sup> In a last step, deprotection of these compounds under the typical hydrogenation conditions afforded the  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -amino esters *syn*-**2b-k** and *anti*-**3b-k** in high yields. In this manner, a series of alkyl derivatives were synthesized changing the  $\alpha$ -alkyl chain ( $R^2$ = Me, Et, Bn) and the ester alkyl moiety ( $R^3$ = Me, Et, *i*Pr), in order to have a nice

overview of the effect of these substituents in the transaminase-catalyzed reactions. Furthermore, two cyclic compounds **1j** and **1k**, were also tried as substrates to study the effect of constrained systems in these dynamic processes.



Scheme 2. Synthesis of racemic aliphatic  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -amino ester derivatives through enamine formation-reduction protocol.

To perform these biocatalyzed transformations, a series of 24 commercially available transaminases, Codex<sup>®</sup> Transaminase Screening Kit, was purchased as most of them are able to work under the very convenient conditions using isopropylamine in molar excess as amino donor (Scheme 3).<sup>[20]</sup>



Scheme 3. Proposed synthesis of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -amino esters through transaminase-catalyzed reaction using isopropylamine as amino donor.

In a first set of experiments, in order to check the feasibility of this methodology, unsubstituted ethyl acetoacetate **1a** was studied as substrate for these TAs (Table 1 and Tables S1-S2 in the Supporting Information) using alanine or isopropylamine as amino donors. Better conversions were achieved in the second case utilizing an excess (1 M) of the amine in phosphate buffer 100 mM pH 7.5, and in the presence of PLP (1 mM) and DMSO (2.5% v v<sup>-1</sup>) for solubility reasons. Various (*S*)-selective and, more importantly, some (*R*)-

selective enzymes, were detected showing very high to excellent conversions and stereoselectivities. Especially the last ones are interesting since not many (*R*)-selective TAs are described in the literature.<sup>[21]</sup>

Table 1. Transamination of  $\beta$ -keto ester **1a** using isopropylamine as amino donor.<sup>[a]</sup>

Entry	Enzyme	<i>c</i> [%] <sup>[b]</sup>	<i>ee</i> <b>2a</b> [%] <sup>[c]</sup>
1	TA-P1-A06	>99	99 ( <i>S</i> )
2	TA-P1-F12	>99	>99 ( <i>S</i> )
3	TA-P1-G05	>99	>99 ( <i>S</i> )
4	TA-P1-G06	>99	99 ( <i>S</i> )
5	TA-P2-A07	99	92 ( <i>R</i> )

[a] For other enzymatic results and experimental conditions, see the Supporting Information. [b] Measured by GC. [c] Measured by chiral GC.

Afterwards, different reaction conditions were explored to optimize the transamination process using  $\alpha$ -ethylated keto ester **1c** as starting material (Scheme 3). After enzymatic screening, a few TAs were chosen as suitable catalysts since they afforded a diastereomeric mixture of  $\beta$ -amino esters **2c** and **3c** with high conversions, excellent *ee* and moderate to high *de*. Then, some parameters such as pH, temperature, biocatalyst loading and addition of basic resins were studied to improve the DKR conditions (see Tables S3-S4 in the SI). While increasing the pH up to 9 or adding a basic resin as Dowex MWX-1<sup>[47]</sup> to achieve a faster racemization process did not show any improvement in the previous results obtained at pH 7.5, decreasing the temperature until 4 °C or diminishing the TA quantity in the reaction just provided a lower amount of the  $\beta$ -amino esters while *de* was slightly enhanced. Therefore, 30 °C and pH 7.5 were selected as the best conditions to perform these transformations.

As a further step, the TA-catalyzed reactions with  $\alpha$ -alkylated  $\beta$ -keto esters **1b-i** were attempted to have a nice overview of the effect that could present: a) the alkyl group at  $\alpha$ -position, and b) the substitution in the ester moiety. The results are shown in Table 2 and Tables S5-S12 in the SI. In all cases, it was found that 12 TAs showed (*S*)-stereopreference while other 12 were (*R*)-selective. It was remarkable that with just few exceptions (ATA-007, ATA-009, and ATA-117), these biocatalysts afforded high conversions for these substrates and were highly specific for the amination of the carbonyl group, showing excellent selectivities at position 3, just obtaining in most cases 2 out of 4 diastereoisomers.

Regarding the (*S*)-selective family of transaminases, generally the *syn*-(2*R*,3*S*) isomers were provided in slight excess (up to 60/40) and very high conversions (around 90%). Among them, ATA-224, ATA-234, TA-P1-F12, and TA-P1-G05 were the most active. While less common, (*S*)-selective enzymes affording preferentially *anti*-(2*S*,3*S*) appeared as more diastereoselective. TA-P1-A06, TA-P1-G06 and ATA-103 were able to produce enantiopure (2*S*,3*S*)-**3b**, (2*S*,3*S*)-**3c**, (2*S*,3*S*)-**3f**, and (2*S*,3*S*)-**3i** with moderate to high ratios. Though in many cases there was not a crucial effect that could be ascribed to the alkyl substituents at  $\alpha$ -position and in the ester moiety, some remarkable exceptions were found.

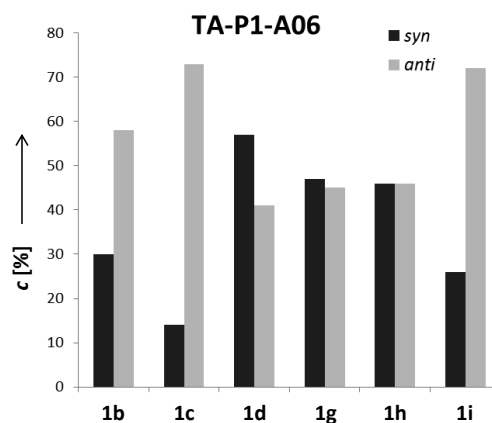


Figure 1. Effect of the alkyl group at  $\alpha$ -position in the transaminations catalyzed by TA-P1-A06. In all cases, *ee* of both diastereoisomers were higher than 99%.

For some TAs, e.g. TA-P1-A06 and ATA-103, it remained clear that the presence of a benzyl moiety at  $\alpha$ -position could largely influence the diastereoselectivity of the process (Figure 1). Thus, while the transamination with  $\alpha$ -methylated **1b** or  $\alpha$ -ethylated keto ester **1c** favored the formation of the *anti*-(2*S*,3*S*) isomers,  $\alpha$ -benzylated **1d** preferentially afforded *syn*-(2*R*,3*S*). On the other hand, for isopropyl esters an opposite effect was observed, getting mainly *anti*-(2*S*,3*S*)-**3i** ( $R^2$ = benzyl) whereas no selectivity was achieved for keto esters **1g** ( $R^2$ = methyl) and **1h** ( $R^2$ = ethyl). These results obviously pointed out to a different substrate disposition within the active centre site of the transaminases.

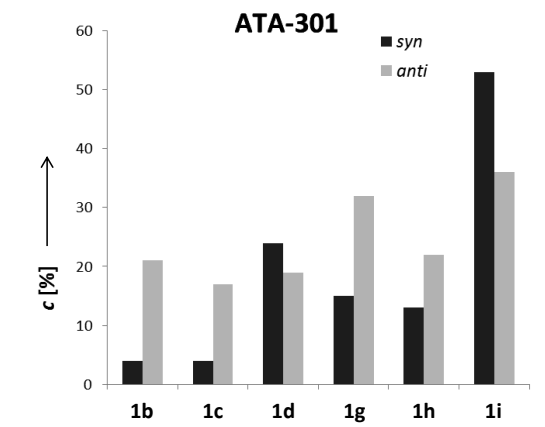


Figure 2. Effect of the alkyl group at  $\alpha$ -position in the ATA-301-catalyzed aminations. In all cases, *ee* of both diastereoisomers were higher than 98%.

(*R*)-Selective biocatalysts also showed a slight stereopreference for the formation of the enantiopure *syn*-(2*S*,3*R*) amino esters (usually up to 60/40) with excellent conversions (>90%), especially ATA-015, ATA-016, ATA-024, ATA-025, and ATA-033. Although showing lower conversions, TA-P2-A07 was the most selective enzyme for most of the keto esters. In contrast, ATA-301 presented an opposite diastereopreference for *anti*-(2*R*,3*R*), in some cases higher than 80/20. Again for this enzyme (Figure 2), a remarkable effect due to the substituent at  $\alpha$  position was observed, changing from *anti* to *syn* preference when a bulky benzyl group was present (**1d** and **1i**).

Table 2. Selected results from the transamination of racemic acyclic  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto esters **1b-i** using isopropylamine as amino donor.<sup>[a]</sup>

Entry	<b>1b-i</b>	(S)-Selective					(R)-Selective				
		Enzyme	<i>c</i> [%] <sup>[b]</sup>	Ratio 2/3	<i>ee</i> 2 [%] <sup>[c]</sup>	<i>ee</i> 3 [%] <sup>[c]</sup>	Enzyme	<i>c</i> [%] <sup>[b]</sup>	Ratio 2/3	<i>ee</i> 2 [%] <sup>[c]</sup>	<i>ee</i> 3 [%] <sup>[c]</sup>
1	<b>1b</b>	TA-P1-A06	88	34/66	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	ATA-301	25	17/83	n.d.	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
2		ATA-113	89	57/43	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	TA-P2-A07	61	58/42	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
3	<b>1c</b>	TA-P1-A06	87	16/84	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	ATA-301	21	20/80	n.d.	98 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
4		ATA-231	88	54/46	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	TA-P2-A07	47	62/38	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
5	<b>1d</b>	TA-P1-A06	98	58/42	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	ATA-024	>99	56/44	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
6	<b>1e</b>	--	--	--	--	--	ATA-301	39	36/64	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
7		TA-P1-G05	88	56/44	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	TA-P2-A07	79	55/45	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
8	<b>1f</b>	TA-P1-A06	93	29/71	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	ATA-301	41	32/68	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
9		ATA-224	93	55/45	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	TA-P2-A07	50	58/42	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
10	<b>1g</b>	--	--	--	--	--	ATA-301	47	32/68	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
11		TA-P1-G05	94	57/43	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	ATA-025	95	54/46	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
12	<b>1h</b>	--	--	--	--	--	ATA-301	35	38/62	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
13		ATA-103	88	54/46	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	TA-P2-A07	53	54/46	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )
14	<b>1i</b>	ATA-103	94	23/77	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	--	--	--	--	--
15		TA-P1-F12	98	58/42	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )	ATA-301	89	59/41	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )	>99 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )

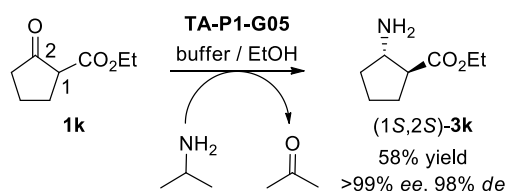
[a] For other enzymatic results and experimental conditions, see the Supporting Information. [b] Measured by GC. [c] Measured by chiral GC.

Due to the low induction usually achieved with this family of  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto esters, it was envisaged that the employment of more constrained derivatives could improve the diastereoselectivity of the process while maintaining the excellent *ee*. Therefore, two cyclic compounds (**1j** and **1k**) were tried as possible amino acceptors for these TAs (Table 3 and Tables S13-S14 in the SI). The first one presented the ketone moiety attached to a five-membered lactone, while the second one had the carbonyl group within the cyclic structure. For **1j** generally lower conversions (<40%) were observed, but several (*S*)-selective biocatalysts could afford preferentially the *anti*-(2*R*,1'*S*) isomer (entry 1), while (*R*)-TAs did not show good diastereoselectivities (entry 2). Better results were obtained for keto ester **1k** (entries 3 and 4), finding that ATA-113 and TA-P1-G05 were able to produce *anti*-(1*S*,2*S*)-**3k** with very high conversions, *ee* (>99%) and *de* (94-96%).

Table 3. Transamination of cyclic  $\beta$ -keto esters **1j-k** with isopropylamine as amino donor.<sup>[a]</sup>

Entry	<b>1j-k</b>	Enzyme	<i>c</i> [%] <sup>[b]</sup>	Ratio 2/3	<i>ee</i> 2 [%] <sup>[c]</sup>	<i>ee</i> 3 [%] <sup>[c]</sup>
1	<b>1j</b>	TA-P1-A06	38	18/82	>99 (2 <i>R</i> ,1' <i>S</i> ) <sup>[d]</sup>	>99 (2 <i>S</i> ,1' <i>S</i> ) <sup>[d]</sup>
2		ATA-033	28	44/56	>99 (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i> ) <sup>[d]</sup>	>99 (2 <i>R</i> ,1' <i>R</i> ) <sup>[d]</sup>
3	<b>1k</b>	ATA-113	99	3/97	n.d.	>99 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ) <sup>[e]</sup>
4		TA-P1-G05	85	2/98	n.d.	>99 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ) <sup>[e]</sup>

[a] For other enzymatic results and experimental conditions, see the Supporting Information. [b] Measured by GC. [c] Measured by chiral GC. [d] The carbonyl group is at 1'-position. [e] The carbonyl group is at 2-position.



Scheme 4. Synthesis of (1*S*,2*S*)-**3k** through a DKR process with a transaminase using isopropylamine as amino donor.

2-aminocyclopentanecarboxylate derivatives can be useful monomers to synthesize constrained peptides,<sup>[22]</sup> and since (1*S*,2*S*)-**3k** appeared as a challenging substrate to be obtained by other methods,<sup>[23]</sup> the selective transamination of **1k** in a bigger scale was attempted (Scheme 4). It was envisaged to exchange DMSO by other polar solvent with a lower boiling point to simplify the work-up process. Thus, reactions with TA-P1-G05 and ATA-113 were repeated but using EtOH as organic co-solvent, and while similar results were attained with the first biocatalyst, the second one was highly deactivated, so a 50 mg-scale reaction was achieved with TA-P1-G05 obtaining by simple acid-base extraction the chiral amino ester (1*S*,2*S*)-**3k** with a good yield and excellent *ee* and *de*.

## Conclusions

The use of hydrolases or oxidoreductases applied to dynamic processes is highly spread out and has become a robust tool for organic chemists to obtain enantio- or diastereomerically pure high added-value compounds, overcoming the 50% yield handicap of kinetic resolutions. Surprisingly, just one example making use of transaminases under DKR conditions describing the synthesis of one specific substrate, has been described in the literature.<sup>[6]</sup> Herein we show our first results about the application of a set of commercially available  $\omega$ -TAs to provide several  $\alpha$ -alkylated  $\beta$ -amino esters using a dynamic protocol. These highly interesting targets are difficult to synthesize by other methodologies and in most cases the synthetic routes involve several steps or the employment of harsh conditions. The synthesis proposed here just comprises the direct transamination utilizing isopropylamine as amino donor of a racemic  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -keto ester easily accessible. This derivative can racemize in the aqueous reaction medium at a pH close to neutral due to the high acidity of the  $\alpha$ -proton allowing, in the ideal case, the synthesis of one single diastereoisomer of the  $\beta$ -amino ester in one step.

Thus, a series of acyclic  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto esters were synthesized and used as substrates for these enzymes, finding that although excellent conversions and *ee* were achieved for many of them, diastereoselectivities remained modest with few exceptions. Both alkyl chains at  $\alpha$ -position and in the ester moiety were exchanged in order to observe a possible trend to further improve the results but, with some exceptions, there was not a remarkable change in the selectivity that could be ascribed to this effect. As an additional extension, the application of two constrained cyclic derivatives was performed to study their effect in the transamination reactions. Gratifyingly, racemic ethyl 2-oxocyclopentanecarboxylate showed excellent *ee* and *de* under our dynamic conditions, so the corresponding amino ester *anti*-(1*S*,2*S*)-**3k** could be synthesized at higher scale. With these preliminary results in hand, the application of these biocatalysts over new constrained substrates will be done, and due to the development of highly efficient tools in the Molecular Biology field,<sup>[21b,24]</sup> the design of novel transaminases

that could provide specifically each diastereoisomer in enantiomerically pure form seems highly feasible in a near future.

## Experimental Section

### General

$\beta$ -Keto esters **1a**, **1c**, **1e**, **1f**, **1j** and **1k** and  $\beta$ -amino ester **2a** were purchased from commercial sources. Codex<sup>®</sup> Transaminase Screening Kit (ATASK-000250), PLP, lactate dehydrogenase and glucose dehydrogenase were purchased from Codexis. All other reagents and solvents were of the highest quality available. Methyl ( $\pm$ )-2-methyl-3-oxobutanoate **1b** was obtained by esterification of **1e** employing MeOH under reflux and catalytic HCl (77% yield). Flash chromatography was performed using silica gel 60 (230-400 mesh). Ultrasound reactions were performed using a J.P. Selecta ultrasonic bath (150 W). IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 1720-X infrared Fourier transform spectrophotometer on NaCl pellets. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR, and DEPT were obtained using a Bruker DPX-300 (<sup>1</sup>H, 300.13 MHz and <sup>13</sup>C, 75.5 MHz) spectrometer for routine experiments. The chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm and the coupling constants (*J*) in Hertz (Hz). ESI<sup>+</sup> mode was used to record mass spectra (MS) and ESI-TOF for HRMS. Gas chromatography (GC) analyses were performed on a Hewlett Packard 6890 Series II chromatograph. HPLC analyses were performed with Hewlett Packard 1100 LC liquid chromatograph. Optical rotations were measured using a Perkin-Elmer 241 polarimeter and are quoted in units of 10<sup>-1</sup> deg cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

### General procedure for the synthesis of (*Z*)- $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -*N*-benzylated enamino esters **4b-k**<sup>[18]</sup>

A mixture of ( $\pm$ )- $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -keto esters **1b-k** (3 mmol), benzylamine (4.5 mmol, 1.5 equiv.) and acetic acid (0.6 mmol, 0.2 equiv.) was placed in an ultrasound bath [150 W, (the temperature never exceeding 30 °C)] for 0.5-1 hour. At the end of the reaction, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) was added, and the formed solution was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and concentrated in vacuo to give the pure product. Compounds (*Z*)-**4c**,<sup>[25]</sup> (*Z*)-**4f**,<sup>[26]</sup> (*Z*)-**4j**<sup>[27]</sup> and (*Z*)-**4k**<sup>[28]</sup> exhibited physical and spectral properties in accordance with those reported.

### General procedure for the synthesis of ( $\pm$ )- $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -*N*-benzylamino esters *syn*-**5b-k** and *anti*-**6b-k**<sup>[12,19]</sup>

A solution of NaBH(OAc)<sub>2</sub> was prepared by adding NaBH<sub>4</sub> (0.34 g, 9.0 mmol) to glacial acetic acid (5 mL) while keeping the temperature between 10 and 20 °C. After the H<sub>2</sub> evolution ceased (1 h), the solution was cooled to 0 °C. Then, **4b-k** (3.0 mmol) was added in one portion and the reaction was stirred for 4-12 h at 0 °C. Acetic acid was evaporated under vacuo at 50 °C and the residue was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with a saturated aqueous solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The organic layers were combined and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was concentrated under vacuo and the residue subjected to column chromatography (hexanes/ethyl acetate 4:1) furnishing a diastereomeric mixture of **5b-k** and **6b-k** (see SI for ratios). Compounds **5b-6b**<sup>[29]</sup> and **5k-6k**<sup>[19]</sup> exhibited physical and spectral properties in accordance with those reported.

### General procedure for the synthesis of ( $\pm$ )- $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -amino esters *syn*-**2b-k** and *anti*-**3b-k**

To a solution of the diastereomeric mixture of **5b-k** and **6b-k** (2 mmol) in deoxygenated EtOAc (20 mL), Pd/C on charcoal (10% w w<sup>-1</sup>, 20 mg) was carefully added and the reaction was stirred for 15 h and room temperature under H<sub>2</sub> pressure (balloon). Then the reaction was filtered over celite and washed with EtOAc. The solvent was concentrated under vacuo and the residue subjected to column chromatography (methanol/ethyl acetate 1:1) furnishing a diastereomeric mixture of **2b-k** and **3b-k**. Compounds **2b-3b**,<sup>[26]</sup> **2d-3d**,<sup>[11]</sup> **2j-3j**<sup>[12]</sup> and **2k-3k**<sup>[30]</sup> exhibited physical and spectral properties in accordance with those reported.

### Transaminase-catalyzed reaction using alanine as amino donor

In a 1.5 mL Eppendorf tube, transaminase (2 mg), L- or D-alanine (2.5 mg), PRM-102 (15 mg, containing the lactate dehydrogenase, NAD<sup>+</sup>, glucose and glucose dehydrogenase necessary to achieve this transformation),  $\beta$ -keto ester **1a** (25 mM), and DMSO (12.5  $\mu$ L) were added in phosphate buffer 100 mM pH 8 (500  $\mu$ L, 1 mM PLP). The reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h and stopped by addition of a saturated solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (400  $\mu$ L) and extraction with ethyl acetate (2  $\times$  500  $\mu$ L). The organic layers were separated by centrifugation (90 sec, 13000 rpm), combined and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Conversion and *ee* of amine **2a** were determined by GC. The acetylation (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetic anhydride) of the sample was necessary to measure the enantioselectivities.



### Transaminase-catalyzed reaction using isopropylamine as amino donor

In a 1.5 mL Eppendorf tube, transaminase (2 mg) and  $\beta$ -keto ester (**1a-k**, 25 mM) were added in phosphate buffer 100 mM pH 7.5 (500  $\mu$ L, 1 mM PLP, 1 M isopropylamine), and DMSO (12.5  $\mu$ L). The reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h and stopped by addition of a saturated solution of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (400  $\mu$ L). Then the mixture was extracted with ethyl acetate ( $2 \times 500 \mu\text{L}$ ), the organic layers separated by centrifugation (90 sec, 13000 rpm), combined and finally dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Conversion, *ee* and *de* of amines **2a-k** were determined by GC or HPLC. The acetylation ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetic anhydride) of the sample was necessary to measure the stereoselectivities.

### Transaminase-catalyzed synthesis of anti-(1S,2S)-3k

In a 15 mL Falcon tube, TA-P1-G05 (25 mg) and  $\beta$ -keto ester (**1k**, 50 mg, 25 mM) were added in phosphate buffer 100 mM pH 7.5 (5 mL, 1 mM PLP, 1 M isopropylamine), and EtOH (125  $\mu$ L, 2.5% v<sup>-1</sup>). The reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm for 24 h and then the reaction was acidified with HCl 1 M (5 mL) and extracted with EtOAc ( $2 \times 10$  mL). Then the aqueous phase was basified with a saturated solution of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  until pH 10-11 and then extracted with ethyl acetate ( $3 \times 10$  mL). The organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was evaporated under reduced pressure obtaining anti-(1S,2S)-3k (58% yield, >99% *ee*, 98% *de*) with excellent purity, so no further purification was necessary.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +69.0$  (c 1.0, EtOH); experimentally described:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +61.8$  (c 1.0, EtOH).<sup>[23]</sup>

### Acknowledgements

A.C. thanks the Principado de Asturias for his predoctoral fellowship Severo Ochoa. I. L. (Ramón y Cajal Program) thanks the Spanish MICINN for personal funding. Financial support from MICINN (Project MICINN-12-CTQ2011-24237) is gratefully acknowledged.

- [1] Recent revisions: a) E. García-Urdiales, I. Lavandera, V. Gotor, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 3<sup>rd</sup> Ed., (Eds: K. Drauz, H. Gröger, O. May), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 43-66; b) G. de Gonzalo, A. A. Orden, F. R. Bisogno, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2598-2612; c) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180; d) N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115-121; e) Y. Simeó, W. Kroutil, K. Faber, in *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, (Ed: R. N. Patel), CRC Press, Boca Raton, **2007**, pp. 27-51; f) C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789-1805.
- [2] Recent bibliography: a) I. Hussain, J. E. Bäckvall, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, (Eds: K. Drauz, H. Gröger, O. May), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1777-1806; b) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769-3802; c) H. Pellissier, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 659-676; d) Y.-W. Kim, J.-W. Park, M.-J. Kim, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 271-277; e) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015; f) M.-J. Kim, J. Park, Y. K. Choi, in *Multi-Step Enzyme Catalysis*, (Ed: E. García-Junceda), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 1-19; g) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, in *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, (Eds: V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 89-113; h) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1563-1601; i) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226-232.
- [3] Recent examples: a) M. Egi, K. Sugiyama, M. Saneto, R. Hanada, K. Kato, S. Akai, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 3742-3746; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3654-3658; b) C. Kim, J. Lee, J. Cho, Y. Oh, Y. K. Choi, E. Choi, J. Park, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2571-2578; c) M. C. Warner, A. Nagendiran, K. Bogár, J.-E. Bäckvall, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5094-5097; d) M. Päiviö, D. Mavrynsky, R. Leino, L. T. Kanerva, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 1452-1457.
- [4] Examples employing alcohol dehydrogenases: a) F. Xu, J. Y. L. Chung, J. C. Moore, Z. Liu, N. Yoshikawa, R. S. Hoerner, J. Lee, M. Royzen, E. Cleator, A. G. Gibson, R. Dunn, K. M. Maloney, M. Alam, A. Goodyear, J. Lynch, N. Yasuda, P. N. Devine, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1190-1193; b) A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1743-1749; c) D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 43-46; d) G. A. Applegate, R. W. Cheloha, D. L. Nelson, D. B. Berkowitz, *Chem. Commun.* **2011**, 2420-2422. Using Baeyer-Villiger monooxygenases: e) A. Rioz-Martínez, A. Cuetos, C. Rodríguez, G. de Gonzalo, I. Lavandera, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8537-8540; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8387-8390; f) C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1121-1125; g) A. Rioz-Martínez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2073-2076.
- [5] Recent revisions: a) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 3<sup>rd</sup> Ed., (Eds: K. Drauz, H. Gröger, O. May), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 779-820; b) M. S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163-1171; c) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993-1001; d) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324-332; e) H. C. Hailes, P. A. Dalby, G. J. Lye, F. Baganz, M. Micheletti, N. Szita, J. M. Ward, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1883-1893; f) D. Zhu, L. Hua, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1420-1431; g) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51.
- [6] D. Koszelewski, D. Clay, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *60*, 191-194.
- [7] a) B. B. Toure, D. G. Hall, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4439-4486; b) J. W. Blunt, B. R. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170-244; c) E. Juaristi, in *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids*, 2<sup>nd</sup> Ed., (Eds: E. Juaristi, V. A. Soloshonok), **2005**, pp. 1-17.
- [8] a) P. G. Vasudev, S. Chatterjee, N. Shamala, P. Balaram, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 657-687; b) D. Seebach, J. Gardiner, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1366-1375; c) M. A. Gelman, S. H. Gellman, in *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids*, 2<sup>nd</sup> Ed., (Eds: E. Juaristi, V. A. Soloshonok), **2005**, pp. 527-591.
- [9] a) P. A. Magriotis, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4507-4509; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4377-4379; b) W.-B. Wang, E. J. Roskamp, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9417-9420.
- [10] G. Cardillo, C. Tomasini, *Chem. Soc. Rev.* **1996**, *25*, 117-128.
- [11] A. J. McNeil, G. E. S. Toombes, S. M. Gruner, E. Lobkovsky, D. B. Collum, S. V. Chandramouli, B. J. Vanasse, T. A. Ayers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16559-16568.
- [12] C. Cimarelli, G. Palmieri, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5557-5563.
- [13] G. Cardillo, A. Tolomelli, C. Tomasini, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8651-8654.
- [14] a) T. Kano, Y. Yamaguchi, K. Maruoka, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6678-6687; b) M. Periasamy, S. Suresh, S. S. Ganesan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1323-1331; c) S. Kobayashi, J. Kobayashi, H. Ishiani, M. Ueno, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4185-4190.
- [15] J.-P. G. Seerden, M. M. M. Kuypers, H. W. Scheeren, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1441-1450.
- [16] a) S. G. Davies, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1129-1139; b) S. G. Davies, O. Ichihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1141-1147; c) S. G. Davies, O. Ichihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1153-1155.
- [17] However,  $\omega$ -TAs have proven to be excellent catalysts applied to the synthesis of enantiopure  $\alpha$ -unsubstituted  $\beta$ -amino acid derivatives through amination of the corresponding carbonylic precursors, see: J. Rudat, B. R. Brucher, C. Syldat, *AMB Express* **2012**, *2*, 11.
- [18] C. A. Brandt, A. C. M. P. da Silva, C. G. Pancote, C. L. Brito, M. A. B. da Silveira, *Synthesis* **2004**, 1557-1559.
- [19] C. Bartoli, C. Cimarelli, E. Marcantoni, G. Palmieri, M. Petrini, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5328-5335.
- [20] K. E. Cassimjee, C. Branney, V. Abedi, A. Wells, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5569-5571.
- [21] a) F. G. Mutti, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, J. H. Sattler, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3227-3233; b) M. Höhne, S. Schätzle, H. Jochens, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 807-813; c) C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309; d) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9477-9480; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337-9340; e) A. Iwasaki, Y. Yamada, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 1843-1846.
- [22] S. H. Choi, I. A. Guzei, L. C. Spencer, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2917-2924.
- [23] L. T. Kanerva, P. Csomós, O. Sundholm, G. Bernáth, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1705-1716.
- [24] D. Koszelewski, M. Görtzer, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 73-77.
- [25] K. Kusakabe, Y. Tada, Y. Iso, M. Sakagami, Y. Morioka, N. Chomei, S. Shinonome, K. Kawamoto, H. Takenaka, K. Yasui, H. Hamana, K. Hanasaki, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2045-2055.
- [26] A. A. Isse, A. De Giusti, A. Genmaro, L. Falcicola, P. R. Mussini, *Electrochim. Acta* **2005**, *23*, 4956-4964.

- 
- [27] B. Kesteleyn, E. R. Alonso, C. Stevens, Y. Dejaegher, M. Peristeropoulou, T. N. Van, O. Kulinkovich, N. De Kimpe, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4153-4166.
- [28] H. Hebbache, Z. Hank, S. Boutamine, M. Meklati, C. Bruneau, J.-L. Renaud, *C. R. Chim.* **2008**, *11*, 612-618.
- [29] N. Asao, T. Uyehara, Y. Yamamoto, *Tetrahedron* **1988**, *13*, 4173-4180.
- [30] P. S. Dragovich, D. E. Murphy, K. Dao, S. H. Kim, L.-S. Li, F. Ruebsam, Z. Sun, C. V. Tran, A. X. Xiang, Y. Zhou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2796-2803.
-



# Coupling biocatalysis and click chemistry: one-pot two-step convergent synthesis of enantioenriched 1,2,3-triazole-derived diols†

Aníbal Cuetos, Fabricio R. Bisogno,‡ Iván Lavandera\* and Vicente Gotor\*

Cite this: *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2625

Received 3rd December 2012,  
Accepted 7th February 2013

DOI: 10.1039/c3cc38674k

www.rsc.org/chemcomm

**A fully convergent one-pot two-step synthesis of different chiral 1,2,3-triazole-derived diols in high yields and excellent enantio- and diastereoselectivities has been achieved under very mild conditions in aqueous medium by combining a single alcohol dehydrogenase (ADH) with a Cu-catalysed 'click' reaction.**

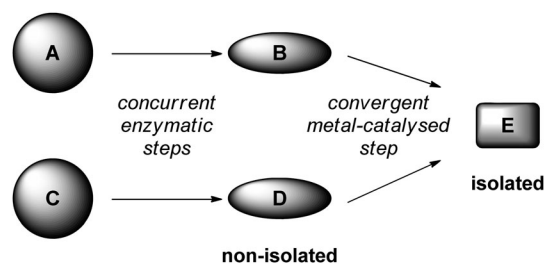
Nowadays, the selective synthesis of enantioenriched derivatives for fine chemicals must go in hand with the design of sustainable processes.<sup>1</sup> Hence, final targets must be obtained with excellent purities, but minimising the use of harmful solvents, reagents and also purification steps involved in a synthetic pathway.<sup>2</sup> In this sense, the employment of water as reaction medium,<sup>3</sup> recyclable catalysts<sup>4</sup> and the design of one-pot multi-step sequential or concurrent synthesis<sup>5</sup> are highly desired. In the last few years enzymes have been elegantly employed together with organo- or metal-catalyst(s), achieving (chemoenzymatic) one-pot multi-step synthesis of interesting compounds.<sup>6</sup> Besides lipase-based dynamic processes,<sup>7,8</sup> most of the examples deal with the concurrent use of oxidoreductases with organo-<sup>9</sup> or metal-<sup>10</sup> catalysts. For instance, alcohol dehydrogenases,<sup>11</sup> responsible for the stereoselective reduction of carbonylic compounds, have been successfully combined with proline-<sup>9a</sup> or Zn-catalysed<sup>10b</sup> aldol reactions to obtain enantioenriched 1,3-diols, and with Pd-based catalysts for Wacker-Tsuji,<sup>10a</sup> Heck,<sup>10c</sup> Suzuki,<sup>10d,fi</sup> or Suzuki-Miyaura<sup>10h</sup> reactions. In these examples, the non-enzymatic transformation occurred first to afford the non-isolated (di)ketone which further underwent ADH-catalysed reduction.

1,2,3-Triazoles are very important pharmacophores that can exert multiple biological activities,<sup>12</sup> e.g., hydroxylated derivatives have been described as potent  $\beta$ -adrenergic receptor blockers.<sup>13a</sup> Besides,

triazole-containing structures are versatile ligands in coordination chemistry,<sup>13b</sup> and some related complexes have displayed antitumor activities.<sup>13c</sup> In this sense, the copper(i)-catalysed version of the Huisgen cycloaddition in water between an alkyne and an azido compound to form them, is perhaps the most outstanding example of the so-called 'click' chemistry.<sup>14</sup> A Cu(i) salt must be added into the reaction medium, but in the last few years, the *in situ* formation of this species by reduction of Cu(II) salts with e.g. ascorbate has been mostly employed. Albeit more scarcely studied, comproportionation of a Cu(II) salt with Cu(0) is gaining more relevance due to availability and economic issues.<sup>15</sup> Noteworthy, there are few examples in which biocatalysis and click chemistry have been combined in one-pot procedures, although both protocols can be perfectly compatible. In this sense, the kinetic resolution of aromatic epoxides by halohydrin dehalogenase (Hhe)-catalysed azidolysis has been reported, affording the corresponding  $\beta$ -azido alcohols that subsequently reacted with alkynes to achieve chiral 1,2,3-triazole alcohols.<sup>16</sup> Yields of these processes could be increased by introducing the bioreduction of an  $\alpha$ -halo ketone as a first step.<sup>17</sup>

Herein, we envisaged a one-pot two-step fully convergent strategy in which, starting from two achiral compounds, a pair of suitable chiral precursors could be stereoselectively formed and then assembled by a 'click' reaction, giving rise to a single compound bearing two chiral centres (Scheme 1).

The synthesis of the enantioenriched 1,2,3-triazole-derived diols was performed by the concurrent stereoselective bioreduction of an  $\alpha$ -azido- and an alkynyl ketone, followed by cycloaddition catalysed



**Scheme 1** One-pot two-step fully convergent strategy combining stereoselective enzymatic and metal-catalysed transformations.

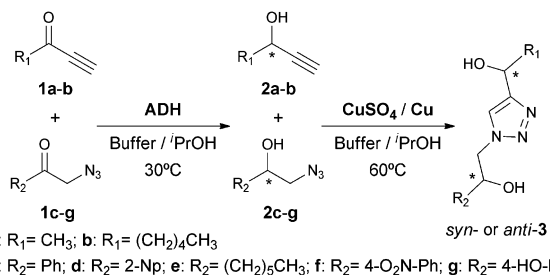
Dpto. de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo. c/Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain.

E-mail: lavanderaivan@uniovi.es, vgs@uniovi.es; Fax: +34 985 103448;

Tel: +34 985 103452

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental procedures, analytics and copies of <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra of the novel compounds. See DOI: 10.1039/c3cc38674k

‡ Current address: INFIQC-CONICET, Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, CP 5000, Córdoba, Argentina.



**Scheme 2** Chemoenzymatic protocol to synthesise enantioenriched 1,2,3-triazole-derived diols.

by Cu(I) *in situ* formed *via* comproportionation of Cu(II) and Cu(0) (Scheme 2).

Several practical issues were considered in advance: (a) both ketones should be quantitatively reduced so, after the cycloaddition step, only diols must be formed, avoiding hydroxy ketones or diketones that would make the purification more complex; (b) alkynyl ketones may decompose in aqueous media,<sup>18</sup> so the bioreduction step must also be quick and clean; (c) the selectivity of the ADH-catalysed process must be high to avoid the formation of diastereoisomers at the end of the sequence; (d) the cycloaddition step must take place in the presence of the enzyme and the hydroalcoholic medium without the loss of the performance; and (e) it would be highly desirable that the Cu(0)-precatalyst source could be easily recycled with no stirring impairment.

In a first set of experiments, we studied the influence of different alkyne ketones (**1a–b**) and  $\alpha$ -azido ketones (**1c–g**) bearing aliphatic or aromatic (phenyl or 2-naphthyl) groups with *e.g.* nitro or hydroxy moieties on ADH-catalysed reduction using Prelog ADHs over-expressed in *E. coli* (ADH-A from *Rhodococcus ruber*,<sup>19</sup> ADH-T from *Thermoanaerobium* sp.,<sup>20</sup> and TesADH from *Thermoanaerobacter ethanolicus*<sup>21</sup>) or commercially available anti-Prelog enzymes (LBADH from *Lactobacillus brevis*<sup>22</sup> or LKADH from *Lactobacillus kefir*<sup>23</sup>). In ADH-catalysed bioreductions, Tris-HCl buffer is usually a suitable medium, but it was observed that alkyne ketones were not stable, so we turned to phosphate buffer (50 mM) pH 7.5 at 30 °C and 250 rpm, in which these derivatives remained stable for longer periods. Under these conditions, the reduction of all ketones was tested using ADHs (Table 1), showing in some cases quantitative conversions (*c*) and excellent stereoselectivities (*ee*).

Especially ADH-A as a Prelog representative enzyme and LBADH as an anti-Prelog counterpart rendered quantitative conversions and excellent *ee* with several substrates. Furthermore, they were able to accept both alkyne ketones and  $\alpha$ -azido ketones, being excellent candidates to achieve the desired one-pot process. In a second stage, simultaneous bioreduction of a 1:1 mixture of alkyne-azido derivatives was tried to study if any interference could exist, either between reactants or with the ADH. Pleasingly, both substrates were perfectly reduced with the same values of stereoselectivity and no cross-inhibition was detected.

Later, the Cu-catalysed 'click' reaction was studied to find out suitable conditions. In this regard, the source of Cu(I) was firstly studied using racemic alcohols, *rac*-**2a** and *rac*-**2c**, as model substrates to afford a mixture of *syn*- and *anti*-**3ac** diols. CuSO<sub>4</sub>-ascorbic acid in a H<sub>2</sub>O:<sup>t</sup>BuOH 1:1 v/v<sup>-1</sup> mixture was tried at room temperature for 24 h, but the conversion was not complete. At this point,

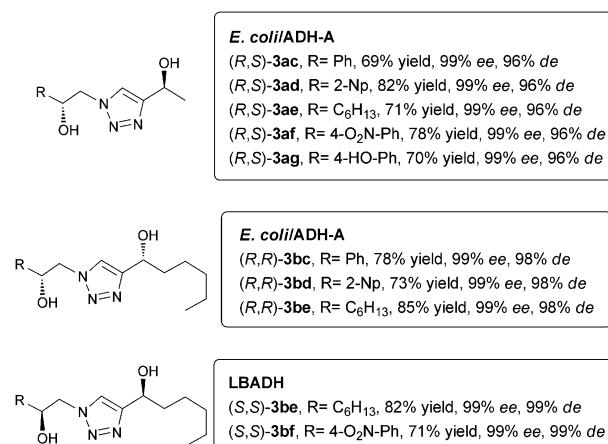
**Table 1** Stereoselectivities in selected bioreductions of alkyne ketones **1a–b** and  $\alpha$ -azido ketones **1c–g** employing ADHs (*t* = 24 h)<sup>a</sup>

Ketone <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> /ADH-A	<i>E. coli</i> /ADH-T	<i>E. coli</i> /TesADH	LBADH	LKADH
<b>1a</b>	96 ( <i>S</i> )	96 ( <i>S</i> )	76 ( <i>S</i> )	64 ( <i>R</i> )	—
<b>1b<sup>c</sup></b>	98 ( <i>R</i> )	90 ( <i>R</i> )	96 ( <i>R</i> )	>99 ( <i>S</i> )	99 ( <i>S</i> )
<b>1c<sup>e</sup></b>	>99 ( <i>R</i> )	>99 ( <i>R</i> )	—	>99 ( <i>S</i> )	98 ( <i>S</i> )
<b>1d<sup>e</sup></b>	>99 ( <i>R</i> )	—	—	—	—
<b>1e<sup>e</sup></b>	99 ( <i>R</i> )	99 ( <i>R</i> )	—	99 ( <i>S</i> )	99 ( <i>S</i> )
<b>1f<sup>e</sup></b>	>99 ( <i>R</i> )	>99 ( <i>R</i> )	—	>99 ( <i>S</i> )	—
<b>1g<sup>e</sup></b>	>99 ( <i>R</i> )	—	—	—	—

<sup>a</sup> For experimental details, see ESI. <sup>b</sup> In all cases where an *ee* value appears, the conversion was quantitative. For incomplete reactions, see *c* and *ee* in Tables S1 and S2 in ESI. <sup>c</sup> Change in Cahn-Ingold-Prelog (CIP) priority.

we envisaged a system that could be simple, economic and environmentally friendly to obtain Cu(I) *via* comproportionation using a Cu wire with a catalytic amount of CuSO<sub>4</sub>. Thus, a copper wire was rolled on a magnetic bar (see ESI<sup>†</sup>), allowing at the same time stirring, easy recovery and its reuse along several cycles. Different solvent mixtures were tried (H<sub>2</sub>O:<sup>t</sup>BuOH 1:1 v/v<sup>-1</sup>; H<sub>2</sub>O:<sup>i</sup>PrOH 1:1 v/v<sup>-1</sup>; H<sub>2</sub>O:<sup>i</sup>PrOH 95:5 v/v<sup>-1</sup>) at 60 °C for 24 h, obtaining in all cases the triazole diols with quantitative conversions, but since the enzymatic step took place with <sup>i</sup>PrOH (5% v/v<sup>-1</sup>),<sup>24</sup> we chose the last setting to perform the sequential chemoenzymatic transformation. Microwave heating was also tried, but due to the formation of by-products, *e.g.* 1,5-regioisomers,<sup>25</sup> this methodology was not further investigated. After four cycles, the Cu wire got passivated, but it could be recovered by simple washing with HCl 2 N for 5 min.

In the final stage, the one-pot fully convergent chemoenzymatic approach was achieved furnishing the 1,2,3-triazole-derived diols in good overall yields and excellent selectivities (Fig. 1). After performing the bioreduction in phosphate buffer at 30 °C with 2-propanol for 24 h, the copper wire and CuSO<sub>4</sub> were added into the reaction mixture, and it was heated up at 60 °C for 24 h. While with alkyne **1b** *syn*-**3** diols were obtained, in the case of substrate **1a**,



**Fig. 1** Examples of 1,2,3-triazole-derived diols synthesised using the chemoenzymatic approach. *ee* values correspond to the major diastereoisomer obtained. Isolated yields (69–85%) are relative to the diastereoisomeric mixture of the final diols.

since the enzyme recognised the ethynyl group as the 'big' moiety,<sup>26</sup> *anti*-3 diols were synthesised.

In the last years, the combination of bio- and metal-catalysis has emerged as a potent tool to achieve the synthesis of novel derivatives in a 'one-pot' fashion, thus avoiding the time-consuming and yield-lowering isolation of intermediates. In this sense, biocatalysed redox processes and copper(i)-catalysed [3+2] cycloadditions can be perfectly compatible in an environmentally benign medium like water. Herein a one-pot two-step fully convergent<sup>27</sup> synthesis of different chiral 1,2,3-triazole-derived diols in high yields and excellent enantio- and diastereoselectivities under very mild conditions has been developed. Hence, starting from two prochiral ketones and using a single ADH with <sup>1</sup>PrOH in a first step, and then applying a catalytic amount of CuSO<sub>4</sub> and a Cu-wrapped stirring bar, a triazole core bearing two chiral centres could be easily synthesised. Moreover, the Cu(0)-precatalyst could be recycled, easily removed, and remained active after several cycles. The possibility of the enzymatic recycling *via* immobilisation<sup>28</sup> could also afford a more efficient and cost-effective method. This system also has the advantage that by simple selection of the enzyme, the chirality of the final compounds can be finely tuned.

A.C. thanks the Principado de Asturias for his predoctoral fellowship Severo Ochoa. I.L. (Ramón y Cajal Program) thanks the Spanish MICINN for personal funding. Financial support from MICINN (Project MICINN-12-CTQ2011-24237) and BIO-TRAINS Marie Curie ITN, financed by the European Union through the Seventh Framework People Programme (Grant Agreement no. 238531) are gratefully acknowledged.

## Notes and references

- (a) R. Noyori, *Nat. Chem.*, 2009, **1**, 5; (b) M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kefeler, R. Stürmer and T. Zelinski, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 788.
- Recent bibliography: (a) R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1437; (b) P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1452.
- (a) M.-O. Simon and C.-J. Li, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1415; (b) R. N. Butler and A. G. Coyne, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 6302; (c) A. Chanda and V. V. Fokin, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 725.
- Recent reviews: (a) C. M. Monteiro, A. F. Trindade, P. M. P. Gois and C. A. M. Afonso, in *Catalytic Methods in Asymmetric Catalysis*, ed. M. Gruttadauria and F. Giacalone, John Wiley & Sons, Hoboken, 2011, p. 3; (b) M. Gruttadauria, F. Giacalone and R. Noto, in *Catalytic Methods in Asymmetric Catalysis*, ed. M. Gruttadauria and F. Giacalone, John Wiley & Sons, Hoboken, 2011, p. 83.
- See, for instance: (a) E. Ricca, B. Brucher and J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, **353**, 2239; (b) J. H. Schrittwieser, J. Sattler, V. Resch, F. G. Mutti and W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, **15**, 249; (c) F. R. Bisogno, I. Lavandera and V. Gotor, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2011, p. 1; (d) *Multi-step Enzyme Catalysis*, ed. E. Garcia-Junceda, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- A. C. Marr and S. Liu, *Trends Biotechnol.*, 2011, **29**, 199.
- (a) I. Hussain and J.-E. Bäckvall, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, ed. K. Drauz, H. Gröger and O. May, Wiley-VCH, Weinheim, 3rd edn, 2012, p. 1777; (b) H. Pellissier, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, **353**, 659; (c) Y.-W. Kim, J.-W. Park and M.-J. Kim, *ChemCatChem*, 2011, **3**, 271; (d) N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 115; (e) J. Steinreiber, K. Faber and H. Griengl, *Chem.-Eur. J.*, 2008, **14**, 8060.
- For other examples involving lipases and metal catalysts in 'one-pot' processes, see: (a) K. Tenbrink, M. Sefler, J. Schatz and H. Gröger, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, **353**, 2363; (b) A. Caiazzo, P. M. L. Garcia, R. Wever, J. C. M. van Hest, A. E. Rowan and J. N. H. Reek, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2926.
- (a) K. Baer, M. Kraußner, E. Burda, W. Hummel, A. Berkessel and H. Gröger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 9355; (b) R. Schoevaart and T. Kieboom, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 3399.
- (a) I. Schnapperelle, W. Hummel and H. Gröger, *Chem.-Eur. J.*, 2012, **18**, 1073; (b) S. Sonoike, T. Itakura, M. Kitamura and S. Aoki, *Chem.-Asian J.*, 2012, **7**, 64; (c) A. Boffi, S. Cacchi, P. Ceci, R. Cirilli, G. Fabrizi, A. Prastaro, S. Niembro, A. Shafir and A. Vallribera, *ChemCatChem*, 2011, **3**, 347; (d) E. Burda, W. Bauer, W. Hummel and H. Gröger, *ChemCatChem*, 2010, **2**, 67; (e) F. G. Mutti, A. Orthaber, J. H. Schrittwieser, J. G. de Vries, R. Pietschnig and W. Kroutil, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 8046; (f) V. Gauchot, W. Kroutil and A. R. Schmitzer, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 6748; (g) S. Cacchi, R. Cirilli, G. Fabrizi, S. Sgalla, A. Macone, A. Bonamore and A. Boffi, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, **61**, 184; (h) A. Prastaro, P. Ceci, E. Chiancone, A. Boffi, R. Cirilli, M. Colone, G. Fabrizi, A. Stringaro and S. Cacchi, *Green Chem.*, 2009, **11**, 1929; (i) E. Burda, W. Hummel and H. Gröger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 9551; (j) S. Sgalla, G. Fabrizi, R. Cirilli, A. Macone, A. Bonamore, A. Boffi and S. Cacchi, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 2791.
- Recent bibliography: (a) E. Garcia-Urdiales, I. Alfonso and V. Gotor, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, PR110; (b) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends and D. Holtmann, *Green Chem.*, 2011, **13**, 2285; (c) M. M. Musa and R. S. Phillips, *Catal. Sci. Technol.*, 2011, **1**, 1311; (d) M. Hall and A. S. Bommarius, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 4088; (e) G. W. Huisman, J. Liang and A. Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 122.
- (a) S. G. Agalave, S. R. Maujan and V. S. Pore, *Chem.-Asian J.*, 2011, **6**, 2696; (b) R. Kharb, P. C. Sharma and M. S. Yar, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2011, **26**, 1; (c) R. S. Bohacek, C. McMartin and W. C. Guida, *Med. Res. Rev.*, 1996, **16**, 3.
- (a) H. Ankaty, Y. Yang, D. Zhu, E. R. Biehl and L. Hua, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 6433; (b) W. Yan, X. Ye, N. G. Akhmedov, J. L. Petersen and X. Shi, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 2358; (c) I. Bratsos, D. Urancar, E. Zangrando, P. Genova-Kalou, J. Košmrj, E. Alessio and I. Turel, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 5188.
- (a) J. E. Hein and V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1302; (b) M. Meldal and C. W. Tornøe, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2952; (c) M. V. Gil, M. J. Arévalo and O. López, *Synthesis*, 2007, 1589; (d) J. E. Moses and A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 1249; (e) V. D. Bock, H. Hiemstra and J. H. Van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 51; (f) H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004.
- (a) S. K. Yousuf, S. C. Taneja and D. Mukherjee, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 3097; (b) J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, G. M. Reddy and S. R. Anjum, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 6029; (c) J. Broggi, H. Kumamoto, S. Berteina-Raboin, S. P. Nolan and L. A. Agrofoglio, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 1880; (d) Q. Wan, J. Chen, G. Chen and S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 8244; (e) N. Kaval, D. Ermolat'ev, P. Appukkuttan, W. Dehaen, C. O. Kappe and E. Van der Eycken, *J. Comb. Chem.*, 2005, **7**, 490; (f) P. Appukkuttan, W. Dehaen, V. V. Fokin and E. Van der Eycken, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 4223.
- L. S. Campbell-Verduyn, W. Szymański, C. P. Postema, R. A. Dierckx, P. H. Elsinga, D. B. Janssen and B. L. Feringa, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 898.
- W. Szymanski, C. P. Postema, C. Tarabiono, F. Berthiol, L. Campbell-Verduyn, S. de Wildeman, J. G. de Vries, B. L. Feringa and D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.*, 2010, **352**, 2111.
- (a) A. Jakoblinnert, R. Mladenov, A. Paul, F. Sibilla, U. Schwaneberg, M. B. Ansorge-Schumacher and P. Dominguez de María, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 12230; (b) C. Heiss and R. S. Phillips, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2000, 2821.
- W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitz, W. Kroutil and K. Faber, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 1014.
- J. Peters, T. Minuth and M.-R. Kula, *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, **15**, 950.
- C. Heiss, M. Laivenieks, J. G. Zeikus and R. S. Phillips, *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, **9**, 1659.
- M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey and M. Müller, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 4306.
- W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1990, **34**, 15.
- Except for LKADH, where glucose-GDH was used for cofactor recycling, 5% v/v <sup>1</sup>PrOH was utilised as a hydrogen donor.
- A. Barge, S. Tagliapietra, A. Binello and G. Cravotto, *Curr. Org. Chem.*, 2011, **15**, 189.
- M. Kurina-Sanz, F. R. Bisogno, I. Lavandera, A. A. Orden and V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.*, 2009, **351**, 1842.
- J. B. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 5439.
- (a) U. Hanefeld, L. Gardossi and E. Magner, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 453; (b) R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, **349**, 1289.









**CONCLUSIONES**



A lo largo de este segundo bloque se ha llevado a cabo la obtención de compuestos enantio- y diastereo-enriquecidos de alto valor añadido a través de resoluciones cinéticas dinámicas o tándem partiendo de sustratos fácilmente accesibles como son los  $\beta$ -cetoésteres sustituidos en posición  $\alpha$ , las  $\alpha$ -azido cetonas y las alquilcetonas.

En un primer lugar, utilizando una serie de alcohol deshidrogenasas tanto purificadas como sobreexpresadas en *E. coli*, se ha mostrado un amplio estudio aplicado a la preparación de  $\beta$ -hidroxiésteres sustituidos en posición  $\alpha$  siendo posible dirigir la biorreducción hacia la formación de uno u otro diastereoisómero de manera enantiopura en varios casos en función de la preferencia del enzima utilizado. Además se ha demostrado el concepto de *cuasi*-irreversibilidad que tiene lugar con este tipo de compuestos realizándose la biorreducción de una manera cuantitativa con tan sólo dos equivalentes del cosustrato necesario para regenerar el cofactor pirimidínico NAD(P)H.

También se ha realizado un estudio de la potencial aplicabilidad en procesos de resoluciones cinéticas dinámicas de las  $\omega$ -transaminasas con el fin de obtener los  $\beta$ -aminoésteres sustituidos en  $\alpha$  de manera enantio- y diastereomericamente enriquecida. Se ha mostrado, en la mayoría de los casos, la formación de los diastereoisómeros *syn* y *anti* de manera enantiopura y en diferentes relaciones, pudiéndose obtener uno u otro de forma mayoritaria en función del enzima utilizado. Se ha demostrado la importancia crucial de la estructura del  $\beta$ -cetoéster en la diastereoselectividad del proceso, viéndose drásticamente incrementada hacia la formación del isómero *anti* en algunos compuestos con una mayor rigidez en su esqueleto. Aunque aún en un estado preliminar, se ha mostrado que con estos biocatalizadores es posible una síntesis eficaz presentando el potencial de ser una metodología elegante aplicada a la obtención de derivados de  $\beta$ -aminoácidos sustituidos en posición  $\alpha$  a través de procesos dinámicos.

En el último capítulo se ha optimizado la biorreducción simultánea de dos sustratos (una  $\alpha$ -azido cetona y una  $\alpha,\beta$ -alquilcetona) con diferentes ADHs obteniendo en la mayoría de los casos y en función de la preferencia del enzima los alcoholes derivados de manera enantiopura. Además se optimizó la cicloadición [3+2] de estos

alcoholes catalizada por Cu(I) generado *in situ* a través de una reacción de comproporción entre cobre metálico y una disolución de CuSO<sub>4</sub>. De este modo, usando un precursor del catalizador simple y fácilmente reciclable, se obtuvieron diferentes derivados de 1,2,3-triazol con dos centros estereogénicos definidos con buenos rendimientos. Tras optimizar ambas reacciones por separado, se llevó a cabo la combinación de la biorreducción y la cicloadición [3+2] a través de una ruta tándem secuencial en dos pasos y en un mismo recipiente. Así, sin la necesidad de aislar los alcoholes intermedios, se obtuvieron los dioles derivados de 1,2,3-triazol de forma cuantitativa y de manera enantiopura, pudiéndose dirigir la síntesis hacia la formación de uno de los diastereoisómeros en función de la estereopreferencia del enzima utilizado.





## PARTE EXPERIMENTAL





### Enzimas, reactivos y disolventes

Las alcohol deshidrogenasas de *Lactobacillus brevis* (LBADH, 300 U/mL), *Candida parapsilosis* (CPADH, 30 U/mL), ADH-A de *Rhodococcus ruber* (18 U/mg), la lipasa de tipo B de *Candida antarctica*, la glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium* (GDH, 60 U/mg), y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (G6PDH, 166 U/mg) fueron obtenidas a través de Codexis Inc. La ADH de *Lactobacillus kefir* (LKADH, 0.42 U/mg) fue adquirida a Fluka. La fenilacetona monooxigenasa (PAMO) de *Thermobifida fusca* fue donada por el Prof. Marco W. Fraaije (Universidad de Groningen). La ADH-A, TesADH, ADH-T, SyADH y RasADH sobreexpresadas en células de *E. coli* BL21 fueron donadas por el Prof. Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz. Las células se crecieron en un medio LB con ampicilina como antibiótico (1 L, 100 mg/L) a 30°C y 150 rpm durante 24 h. A continuación se añadió ampicilina adicional [50 mg/L y ZnCl<sub>2</sub> (100 mg/L) en el caso de la ADH-A] e isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 450 mg/L) y se dejó agitando 24 h a 20°C. Las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en una disolución tampón de fosfato (pH 7.5, 50 mM), se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron. Las células obtenidas se guardaron a 4°C.

Todos los demás reactivos se adquirieron a Acros Organics, Aldrich, Fluka o Merck, sin ser necesarios tratamientos previos a su utilización.

Los disolventes empleados fueron sometidos previamente a un tratamiento de secado, almacenándose bajo atmósfera de nitrógeno. El TBME, el Et<sub>2</sub>O, el tolueno, y el THF fueron secados sobre sodio empleando como indicador benzofenona, mientras que el acetonitrilo, la DMF, el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y el MeOH fueron secados sobre hidruro cálcico.

Las reacciones ultrasonicadas se llevaron a cabo en un baño ultrasónico J. P. Selecta (150 W). Las reacciones catalizadas por microondas se llevaron a cabo en tubos de reacción sellados, en un horno de microondas DEM Discover S-Class con una potencia de 200 W y 250 psi.

## *Parte Experimental*

### *Técnicas de análisis*

#### *Cromatografía*

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub> (0.25 mm de espesor) comercializados por Merck, los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta. Como revelador se utilizó una disolución acuosa al 1% de KMnO<sub>4</sub>, 5% de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y un 5% de NaOH.

Para la cromatografía de columna se empleó gel de sílice 60 (230-240 Mesh) adquirida a Merck.

Los análisis mediante cromatografía de gases se realizaron utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890, una columna de relleno aquiral HP-1 (30 m × 0.32 mm × 0.25 m) y las columnas de relleno quiral CP-Chiralsil-DEX-CB (25 m × 0.25 mm × 0.25 μm, 12.2 psi N<sub>2</sub>) y Rt-β-dexe (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)

Los análisis mediante la técnica de HPLC se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 y las columnas de relleno quiral Chiralcel OD (25 × 0.46 cm), Chiralcel OD-H (25 × 0.46 cm), Chiralpak IC (25 cm × 4.0 mm), y Chiralcel OJ-H (25 cm × 4.6 mm). La detección se efectuó con un detector visible-ultravioleta a 210 y 215 nm. Como fase móvil se emplearon mezclas de hexano y 2-propanol.

#### *Espectroscopia infrarroja (IR)*

Se registraron los espectros en un espectrómetro Varian 1000 FT-IR empleando pastillas de NaCl para líquidos o de KBr para muestras sólidas. Las bandas de tensión se indican en valores de  $\nu$  máxima y se expresan en cm<sup>-1</sup>.

#### *Puntos de fusión*

Los puntos de fusión se han llevado a cabo con un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos y por tanto sus valores no están corregidos.

## *Parte Experimental*

### *Espectrometría de masas de baja resolución*

El cálculo de masas de baja resolución se ha realizado empleando un espectrómetro Finigan MAT 95 acoplado a un cromatógrafo HP1100 empleando las técnicas de ESI<sup>+</sup>, ESI<sup>-</sup> o EI<sup>+</sup>. Los valores se refieren a unidades de masa atómica (uma).

### *Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)*

El cálculo de las masas exactas de los compuestos orgánicos obtenidos se llevaron a cabo con un espectrómetro Bruker MicroTofQ empleando las técnicas de ESI<sup>+</sup>, ESI<sup>-</sup> o EI<sup>+</sup>. Los valores se refieren a unidades de masa atómica (uma).

### *Análisis elementales*

El cálculo del porcentaje elemental de C, N, H de los compuestos obtenidos se llevó a cabo en un analizador Elemental Vario Macro.

### *Análisis termogravimétricos*

Los análisis termogravimétricos fueron llevados a cabo en un instrumento Mettler Toledo TG 50 TA 4000. Las muestras de los polímeros fueron calentadas con una rampa de 10°C/min desde t.a. hasta 900°C bajo atmósfera de nitrógeno y aire. La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) se midió en un Mettler DSC Toledo con 822 barridos calorimétricos diferenciales.

### *Resonancia magnética nuclear (RMN)*

Los espectros de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, <sup>31</sup>P-RMN y secuencia de pulsos DEPT han sido realizados con espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para <sup>1</sup>H, 125.5 MHz para <sup>31</sup>P y 75.5 MHz para <sup>13</sup>C), Bruker DPX-300 (300.13 MHz para <sup>1</sup>H, 125.5 MHz para <sup>31</sup>P y 75.5 MHz para <sup>13</sup>C). Los desplazamientos químicos se dan en valores de  $\delta$  en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertzios (Hz).

### *Rotación óptica específica*

## *Parte Experimental*

Para la medida de las rotaciones específicas se ha utilizado un polarímetro Perkin-Elmer 241. Los valores se dan en unidades  $10^{-1} \text{ cm}^2 \times \text{grado} \times \text{g}^{-1}$ .



## REFERENCIAS





- <sup>1</sup> A. Mitchinson, J. Finkelstein, *Nature* **2008**, *455*, 303.
- <sup>2</sup> (a) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312; (b) J. M. Clark, *Nature Chem.* **2009**, *1*, 12-13.
- <sup>3</sup> K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6<sup>a</sup> Ed., Springer, Berlin, **2011**.
- <sup>4</sup> (a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1695-1733; (b) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (c) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523; (d) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 232-238; (e) R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 195-201; (f) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032-6040; (g) A. D. Copley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 265-272.
- <sup>5</sup> Revisión: P. Raspor, D. Goranovič, *Critical Rev. Biotechnol.* **2008**, *28*, 101-124.
- <sup>6</sup> G. S. C. Kirchoff, *Acad. Imp. Sci., St. Petersburg, Memoires* **1811**, *4*, 27.
- <sup>7</sup> W. Kühne, *Verhandl. Heidelb. Naturhistor. Vereins*, Carl Winter Verlag, Universitätsbuchhandlung Heidelberg, Heidelberg, **1876**.
- <sup>8</sup> E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- <sup>9</sup> A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.
- <sup>10</sup> U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194.
- <sup>11</sup> Algunas revisiones recientes: (a) T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 215-220; (b) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, *24*, 150-156; (c) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1017-1021; (d) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2191-2215; (e) S. Lutz, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 734-743; (f) C. Jäckl, D. Hilvert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 753-759.
- <sup>12</sup> (a) M. T. Reetz, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 119-190; (b) M. J. Dougherty, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 486-491.
- <sup>13</sup> M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548.
- <sup>14</sup> (a) M. Svedendahl, C. Branneby, L. Lindberg, P. Berglund, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 976-980; (b) K. Engström, J. Nyhlén, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7038-7042.
- <sup>15</sup> M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192-4196.

- <sup>16</sup> (a) B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187-193; (b) S. Sanchez, A. L. Demain, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 224-230; (c) R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724; (d) S. Panke, M. Held, M. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 272-279; (e) A. Zaks, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 130-136.
- <sup>17</sup> P. F. Mugford, U. Wagner, Y. Jiang, K. Faber, R. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8782-8793.
- <sup>18</sup> (a) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**; (b) *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Eds. W.-D. Fessner, T. Anthonsen, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; (c) *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- <sup>19</sup> E. Thall, *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, 481-484.
- <sup>20</sup> International Union of Biochemistry and Molecular Biology, *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, San Diego, **1992**. [www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme).
- <sup>21</sup> (a) D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111-4140; (b) M. Hall, A. S. Bommarius, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110; (c) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmey, B. Bühler, *Green Chem.* **2011**, *13*, 226-265; (d) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285-2313; (e) *Modern Biooxidation. Enzymes, Reactions and Applications*, Eds. R. D. Schmid, V. B. Urlacher, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- <sup>22</sup> Recopilaciones recientes: (a) F. Hollmann, K. Bühler, B. Bühler, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1325-1438; (b) M. M. Musa, R. S. Phillips, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1311-1323; (c) G. W. Huisman, J. Liang, A. Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 122-129; (d) S. Buchholz, H. Gröger, en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industry*, Ed. R. N. Patel, CRC Press, Boca Raton, **2007**, pp. 757-790; (e) S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260-1266; (f) J. C. Moore, D. J. Pollard, B. Kosjek, P. N. Devine, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1412-1419; (g) K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237-248; (h) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125-142; (i) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120-126.
- <sup>23</sup> *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Eds. P. A. Frey, A. D. Hegeman, Oxford University Press, Nueva York, **2007**.

- <sup>24</sup> (a) B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 55-62; (b) O. Danielsson, S. Atrian, T. Luque, L. Hjelmqvist, R. González-Duarte, H. Jörnvall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4980-4984.
- <sup>25</sup> N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813.
- <sup>26</sup> V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130.
- <sup>27</sup> El alcohol obtenido será de configuración *S* siempre que el grupo de mayor tamaño unido a la cetona presente también la prioridad siguiendo las reglas de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog (CIP).
- <sup>28</sup> T. Fukui, M. H. Zong, T. Kawamoto, A. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 209-213.
- <sup>29</sup> K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, *23*, 2402-2404.
- <sup>30</sup> A. Weckbecker, W. Hummel, *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 380-389.
- <sup>31</sup> D. Zhu, Y. Yang, S. Majkovicz, T. H.-Y. Pan, K. Kantardjieff, L. Hua, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 525-528.
- <sup>32</sup> M. M. Musa, N. Lott, M. Laivenieks, L. Watanabe, C. Vieille, R. S. Phillips, *ChemCatChem.* **2009**, *1*, 89-93.
- <sup>33</sup> M. Eckstein, M. V. Filho, A. Liese, U. Kragl, *Chem. Commun.* **2004**, 1084-1085.
- <sup>34</sup> T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, *Chem. Commun.* **2000**, 1367-1368.
- <sup>35</sup> P. Fernandes, J. M. S. Cabral, *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, Eds. G. Carrea, S. Riva, Wiley-VCH, **2008**, pp. 191-210.
- <sup>36</sup> G. de Gonzalo, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2163-2166.
- <sup>37</sup> A. Jakoblinnert, R. Mladenov, A. Paul, F. Sibilla, U. Schwaneberg, M. B. Ansorge-Schumacher, P. Domínguez de María, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12230-12232.
- <sup>38</sup> (a) V. B. Urlacher, R. D. Schmid, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 156-161; (b) J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, B. Witholt, *Trends. Biotechnol.* **2003**, *21*, 170-177; (c) S. G. Burton, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 543-549.
- <sup>39</sup> S. Fetzner, R. A. Steiner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 791-804.
- <sup>40</sup> (a) M. K. Julsing, S. Cornelissen, B. Bühler, A. Schmid, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 177-186; (b) J. R. Cashman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 599-604; (c) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, Ed. P. R. Ortiz de Montellano, Kluwer Academic/Plenum, Nueva York, **2005**.
- <sup>41</sup> W. J. H. van Berkel, N. M. Kamerbeek, M. W. Fraaije, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 670-689.

<sup>42</sup> (a) M. D. Mihovilovic, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1439-1485; (b) K. Balke, M. Kadow, H. Mallin, S. Sass, U. T. Bornscheuer, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6249-6265; (c) H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165-4222; (d) G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208-2231; (e) V. Alphand, R. Wohlgemuth, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1928-1965; (f) M. M. Kayser, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 947-974; (g) D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, en *Future Directions in Biocatalysis*, Ed. T. Matsuda, Elsevier, Dordrecht, **2007**, pp. 107-127; (h) M. D. Mihovilovic, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1265-1287; (i) N. M. Kamerbeek, D. B. Janssen, W. J. H. van Berkel, M. W. Fraaije, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 667-678.

<sup>43</sup> G. E. Turfitt, *Biochem. J.* **1948**, *42*, 376-383.

<sup>44</sup> H. E. Conrad, R. Dubus, M. J. Namtvedt, I. C. Gunsalus, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 495-503.

<sup>45</sup> Para algún ejemplo reciente de nuevas BVMOs, ver: (a) A. Riebel, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *88*, 20-25; (b) A. Willetts, I. Joint, J. A. Gilbert, W. Trimble, M. Muehling, *Microb. Biotechnol.* **2012**, *5*, 549-559; (c) A. Riebel, H. M. Dudek, G. de Gonzalo, P. Stepniak, L. Rychlewski, M. W. Fraaije, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 1479-1489; (d) C. N. Jensen, J. Cartwright, J. Ward, S. Hart, J. P. Turkenburg, S. T. Ali, M. J. Allen, G. Grogan, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 872-878; (e) C. Szolkowy, L. D. Eltis, N. C. Bruce, G. Grogan, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1208-1217; (f) D. V. Rial, P. Cernuchova, J. B. van Beilen, M. D. Mihovilovic, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *50*, 61-68; (g) A. Völker, A. Kirschner, U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *77*, 1251-1260.

<sup>46</sup> C. C. Ryerson, D. P. Ballou, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2644-2655.

<sup>47</sup> (a) N. M. Kamerbeek, A. J. J. Olsthoorn, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 419-426; (b) N. M. Kamerbeek, M. J. H. Moonen, J. G. M. van der Ven, W. J. H. van Berkel, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2547-2557.

<sup>48</sup> (a) S. Yamabe, S. Yamazaki, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3031-3041; (b) D. Sheng, D. P. Ballou, V. Massey, *Biochemistry* **2001**, *40*, 1156-1167.

<sup>49</sup> Revisiones recientes: (a) H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773-1789; (b) C. Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2525-2541; (c) A. Weckbecker, H. Gröger, W. Hummel, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2010**, *120*, 195-242.

<sup>50</sup> M. Kataoka, K. Kita, M. Wada, Y. Yashoara, J. Hasegawa, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 437-445.

- <sup>51</sup> C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890-4899.
- <sup>52</sup> (a) A. S. Bommarius, M. Schwarm, K. Drauz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 1-11; (b) A. S. Bommarius, K. Drauz, W. Hummel, M. R. Kula, C. Wandrey, *Biocatalysis* **1994**, *10*, 37-47.
- <sup>53</sup> H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* **1989**, *17*, 400-409.
- <sup>54</sup> H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *14*, 147-197.
- <sup>55</sup> B. R. Riebel, P. R. Gibbs, W. B. Wellborn, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 707-712.
- <sup>56</sup> J. Grunwald, B. Wirz, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6732-6734.
- <sup>57</sup> I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155-2158.
- <sup>58</sup> F. R. Bisogno, E. García-Urdiales, H. Valdés, I. Lavandera, W. Kroutil, D. Suárez, V. Gotor, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11012-11019.
- <sup>59</sup> 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.
- <sup>60</sup> N. Z. Burns, P. S. Baran, R. W. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2854-2867.
- <sup>61</sup> (a) R. A. Sheldon, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1233-1246; (b) B. M. Trost, *Science* **1991**, *254*, 1471-1477.
- <sup>62</sup> (a) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 762-782; (b) C. Kohlmann, W. Märkle, S. Lütz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *51*, 57-72; (c) F. Hollmann, K. Hofstetter, A. Schmid, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 163-171.
- <sup>63</sup> F. Hildebrand, S. Lütz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4998-5001.
- <sup>64</sup> (a) S. Gargiulo, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 338-342; (b) A. Taglieber, F. Schulz, F. Hollmann, M. Rusek, M. T. Reetz, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 565-572.
- <sup>65</sup> M. Höhne, U. T. Bornscheuer, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 779-820.
- <sup>66</sup> J. Moore, R. Langley, *Biochemistry for Dummies*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2008**.
- <sup>67</sup> D. M. Needham, *Biochem. J.* **1930**, *24*, 208-227.
- <sup>68</sup> Revisiones recientes: (a) M. S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163-1171; (b) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993-1001; (c) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324-332; (d) H. C. Hailes, P. A. Dalby, G. J. Lye, F. Baganz, M. Micheletti, N. Szita, J. M. Ward, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1883-1893; (e) D. Zhu, L. Hua, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1420-1431; (f) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51.

- <sup>69</sup> J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206-211.
- <sup>70</sup> (a) H. Mizuguchi, H. Hayashi, K. Okada, I. Miyahara, K. Hirotsu, H. Kagamiyama, *Biochemistry* **2001**, *40*, 353-360; (b) J. M. Goldberg, J. F. Kirsch, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5280-5291.
- <sup>71</sup> (a) K. C. Raj, L. A. Talarico, L. O. Ingram, J. A. Maupin-Furlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2869-2876; (b) G. Goetz, P. Iwan, B. Hauer, M. Breuer, M. Pohl, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *74*, 317-325.
- <sup>72</sup> M. Höhne, S. Köhl, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 363-365.
- <sup>73</sup> D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337-9340.
- <sup>74</sup> G. Matcham, M. Bhatia, W. Lang, C. Lewis, R. Nelson, A. Wang, W. Wu, *Chimia* **1999**, *53*, 584-589.
- <sup>75</sup> M. D. Truppo, J. D. Rozzell, N. J. Turner, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 234-237.
- <sup>76</sup> (a) R. C. Simon, F. Zepeck, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2859-2865; (b) R. C. Simon, B. Grischek, F. Zepeck, A. Steinreiber, F. Belaj, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6713-6716.
- <sup>77</sup> C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309.
- <sup>78</sup> U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- <sup>79</sup> R. Verger, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32-38.
- <sup>80</sup> (a) M. Paravidino, P. Boehm, H. Gröger, U. Hanefeld, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 251-362; (b) U. T. Bornscheuer, en *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, Vol. 5, Ed. M. C. Flickinger, John Wiley & Sons, Hoboken, **2010**, pp. 3165-3180; (c) V. Gotor-Fernández, F. Rebolledo, V. Gotor, en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, Ed. R. N. Patel, CRC Press, Boca Raton, **2007**, pp. 203-248; (d) V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120.
- <sup>81</sup> (a) V. Gotor-Fernández, V. Gotor, en *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 171-192; (b) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197.
- <sup>82</sup> A. Ghanem, H. Y. Aboul-Eneim, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3331-3351.

- <sup>83</sup> (a) Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *Chirality* **2008**, *20*, 724-735; (b) M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serrequei, A. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186; (c) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.
- <sup>84</sup> V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.
- <sup>85</sup> (a) T. Schulz, J. Pleiss, R. D. Schmid, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1053-1062; (b) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6266-6273; (c) K. K. Kim, H. K. Song, D. H. Shin, K. Y. Hwang, S. W. Suh, *Structure* **1997**, *5*, 173-185.
- <sup>86</sup> Ejemplos recientes: (a) Q. Wu, S. Pankaj, M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1872-1881; (b) P.-O. Syren, P. Hendil-Forsell, L. Aumailley, W. Besenmatter, F. Gounine, A. Svendsen, M. Martinelle, K. Hult, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 645-648.
- <sup>87</sup> A. J. J. Straathof, en *Industrial Biotransformations*, Eds. A. Liese, C. Seebach, C. Wandrey, 2ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, pp. 515-520.
- <sup>88</sup> (a) D. N. Tran, K. J. Balkus, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956-968; (b) J. M. Guisán, L. Betancor, G. Fernández-Lorente, en *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, Vol. 5, Ed. M. C. Flickinger, John Wiley & Sons, Hoboken, **2010**, pp. 2917-2933; (c) U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453-468; (d) R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307.
- <sup>89</sup> C. Garcia-Galan, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885-2904.
- <sup>90</sup> L. Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- <sup>91</sup> C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451-1463.
- <sup>92</sup> A. Basso, B. A. Maltman, S. L. Flitsch, G. Margetts, I. Brazendale, C. Ebert, P. Linda, S. Verdellia, L. Gardossi, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 971-976.
- <sup>93</sup> (a) D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1013-1030; (b) A. C. Pierre, *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 145-170.
- <sup>94</sup> (a) S. A. Meeuwissen, A. Rioz-Martínez, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, V. Gotor, J. C. M. van Hest, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 18923-18926; (b) M. Nallani, H.-P. M. de Hoog, J. J. L. M. Cornelissen, A. R. A. Palmans, J. C. M. van Hest, R. J. M. Nolte, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3723-3728; (c) D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, *297*, 967-973.
- <sup>95</sup> J. M. S. Cabral, J. F. Kennedy, en *Protein Immobilization: Fundamentals and Applications*, Ed. R. F. Taylor, Marcel Dekker, Nueva York, **1991**.
- <sup>96</sup> A. Basso, P. Braiuca, S. Cantone, C. Ebert, P. Linda, P. Spizzo, P. Caimi, U. Hanefeld, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 877-886.

- <sup>97</sup> L. Cao, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361-1364.
- <sup>98</sup> (a) S. Van Pelt, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 397-404; (b) S. Dalal, M. Kapoor, M. N. Gupta, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *44*, 128-132.
- <sup>99</sup> E. García-Urdiales, I. Lavandera, V. Gotor, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 43-66.
- <sup>100</sup> (a) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180; (b) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354.
- <sup>101</sup> C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789-1805.
- <sup>102</sup> H. B. Kagan, J. C. Fiaud, *Top. Stereochem.* **1988**, *18*, 249-330.
- <sup>103</sup> Revisiones recientes: (a) H. Pellisier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769-3802; (b) H. Pellisier, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 659-676; (c) N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115-121; (d) M.-J. Kim, J. Park, Y. K. Choi, en *Multi-Step Enzyme Catalysis*, Ed. E. García-Junceda, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 1-19; (e) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, en *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 89-113.
- <sup>104</sup> Y. Shvo, D. Czarkie, Y. Rahamim, D. F. Chodosh, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7400-7402.
- <sup>105</sup> B. Schnell, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 653-666.
- <sup>106</sup> C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1121-1125.
- <sup>107</sup> I. Hussain, J. E. Bäckvall, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1777-1806.
- <sup>108</sup> J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930-5931.
- <sup>109</sup> Revisiones recientes: (a) E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2239-2262; (b) J. H. Schrittwieser, J. Sattler, V. Resch, F. G. Mutti, W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 249-256; (c) F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor, en *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2011**, pp. 1-20; (d) *Multi-step Enzyme Catalysis*, Ed. E. García-Junceda, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**; (e) J.-C. Wasilke, S. J. Obrey, R. T. Baker, G. C. Bazán, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1001-1020.
- <sup>110</sup> Dícese de dos o más procesos catalíticos que tienen lugar al mismo tiempo o en paralelo (del inglés, “*concurrent catalysis*”, y este del latín *concurrrens-concurrent* del verbo *concurrere*: coincidir).
- <sup>111</sup> C. Khosla, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2577-2590.



- <sup>112</sup> D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 4<sup>a</sup> Ed., W.H. Freeman, Nueva York, **2004**.
- <sup>113</sup> (a) E. J. Corey, S. C. Virgil, D. R. Liu, S. Sarshar, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1524-1525; (b) E. J. Corey, S. C. Virgil, S. Sarshar, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8171-8172; (c) E. J. Corey, S. C. Virgil, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4025-4026.
- <sup>114</sup> (a) C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Synlett* **2010**, 991-998; (b) C. V. Voss, C. C. Gruber, K. Faber, T. Knaus, P. Macheroux, W. Kroutil, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969-13972.
- <sup>115</sup> S. E. Denmark, A. Thorarensen, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 137-166.
- <sup>116</sup> T. Hudlicky, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3-30.
- <sup>117</sup> K. Baer, M. Kraußer, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *49*, 9355-9359.
- <sup>118</sup> J. Liebig, F. Wöhler, *Ann. Chem.* **1834**, *11*, 139.
- <sup>119</sup> H. Rose, *Ann. Chem.* **1834**, *11*, 131.
- <sup>120</sup> H. N. Stokes, *Am. Chem. J.* **1897**, *19*, 782-796.
- <sup>121</sup> H. Staudinger, *Chem. Ber.* **1920**, *53*, 1073-1085.
- <sup>122</sup> K. H. Meyer, W. Lotmar, G. W. Pankow, *Helv. Chim. Acta* **1936**, *19*, 930-948.
- <sup>123</sup> (a) H. R. Allcock, R. L. Kugel, K. J. Valan, *Inorg. Chem.* **1966**, *5*, 1709-1715; (b) H. R. Allcock, R. L. Kugel, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4216-4217.
- <sup>124</sup> H. R. Allcock, R. J. Best, *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 447-455.
- <sup>125</sup> (a) *Synthesis and Applications of Poly(organophosphazenes)*, Eds. M. Gleria, R. De Jaeger, Nova Sci., Nueva York, **2004**; (b) H. R. Allcock, *Chemistry and Applications of Polyphosphazenes*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2003**.
- <sup>126</sup> (a) G. Odian, *Principles of Polymerization*, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-Interscience, Nueva York, **1991**; (b) H. R. Allcock, F. W. Lampe, *Contemporary Polymer Chemistry*, 2<sup>a</sup> Ed., Prentice-Hall, Nueva Jersey, **1990**.
- <sup>127</sup> (a) I. Teasdale, O. Brüggemann, *Polymers* **2013**, *5*, 161-187; (b) *Polyphosphazenes for Biomedical Applications*, Ed. A. K. Andrianov, John Wiley & Sons, Hoboken, **2009**.
- <sup>128</sup> H. R. Allcock, S. Kwon, *Macromolecules* **1986**, *19*, 1502-1508.
- <sup>129</sup> T. Matsuki, N. Saiki, *Patente japonesa*, 9 pp., JP 01030650, CAN 112:32652, **1989**.
- <sup>130</sup> H. R. Allcock, S. R. Pucher, K. B. Visscher, *Biomater.* **1994**, *15*, 502-506.
- <sup>131</sup> H. R. Allcock, C. J. Nelson, W. D. Coggio, *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 516-524.
- <sup>132</sup> H. R. Allcock, W. C. Hymer, P. E. Austin, *Macromolecules* **1983**, *16*, 1401-1406.

- <sup>133</sup> S.-G. Wang, X. Jiang, P.-G. Chen, A.-G. Yu, X.-J. Huang. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 14136-14148.
- <sup>134</sup> Revisiones recientes: (a) S. Cantone, P. Spizzo, D. Fattor, V. Ferrario, C. Ebert, L. Gardossi, *Chim. Oggi* **2012**, *30*, 10-14; (b) M. Marciello, M. Filice, J. M. Palomo, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1531-1543.
- <sup>135</sup> S. Soni, J. D. Desai, S. Devi, *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *82*, 1299-1305.
- <sup>136</sup> F. Hildebrand, S. Lütz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 3219-3225.
- <sup>137</sup> J. M. Bolivar, L. Wilson, S. A. Ferrarotti, J. M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, C. Mateo, *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 85-94.
- <sup>138</sup> J. Rocha-Martin, D. E. Vega, Z. Cabrera, J. M. Bolivar, R. Fernandez-Lafuente, J. Berenguer, J. M. Guisan, *Process Biochem.* **2009**, *44*, 1004-1012.
- <sup>139</sup> J. Rocha-Martín, D. Vega, J. M. Bolivar, A. Hidalgo, J. Berenguer, J. M. Guisán, F. López-Gallego, *Bioresour. Technol.* **2012**, *103*, 343-350.
- <sup>140</sup> G. A. Petkova, K. Zárumba, V. Král, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 792-801.
- <sup>141</sup> J. M. Bolivar, J. Rocha-Martín, C. Mateo, J. M. Guisan, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 679-686.
- <sup>142</sup> O. Abril, C. C. Ryerson, C. Walsh, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* **1989**, *17*, 41-52.
- <sup>143</sup> F. Zambianchi, P. Pasta, G. Carrea, S. Colonna, N. Gaggero, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 489-496.
- <sup>144</sup> M. Hucík, M. Bučko, P. Gemeiner, V. Štefuca, A. Vikartovská, M. D. Mihovilović, F. Rudroff, N. Iqbal, D. Chorvát Jr., I. Lacík, *Biotechnol Lett*, **2010**, *32*, 675-680.
- <sup>145</sup> W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014-1017.
- <sup>146</sup> M. Karabec, A. Łyskowski, K. C. Tauber, G. Steinkellner, W. Kroutil, G. Grogan, K. Gruber, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6314-6316.
- <sup>147</sup> (a) F. G. Mutti, A. Orthaber, J. H. Schrittwieser, J. G. de Vries, R. Pietschnig, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8046-8048; (b) M. Kurina-Sanz, F. R. Bisogno, I. Lavandera, A. A. Orden, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1842-1848; (c) K. Edegger, W. Stampfer, B. Seisser, K. Faber, S. F. Mayer, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1904-1909; (d) W. Stampfer, B. Kosjek, K. Faber, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 402-406.
- <sup>148</sup> K. Goldberg, A. Krueger, T. Meinhardt, W. Kroutil, B. Mautner, A. Liese, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1171-1173.
- <sup>149</sup> S. Lutz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2743-2748.

- <sup>150</sup> H. P. Heldt-Hansen, M. Ishii, S. A. Patkar, T. T. Hansen, P. Eigtved, *ACS Symposium Series* **1989**, 389, 158-172.
- <sup>151</sup> (a) J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T. A. Jones, *J. Mol. Biol.* **1994**, 235, 790-792; (b) J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* **1994**, 2, 293-308.
- <sup>152</sup> A fecha de 3 de mayo de 2013, en la base de datos Scifinder (<https://scifinder.cas.org/>) aparecen 1.887 referencias que hacen mención a la lipasa de tipo B de la *Candida antarctica*.
- <sup>153</sup> Algunas revisiones y ejemplos recientes: (a) M. D. Truppo, G. Hughes, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, 15, 1033-1035; (b) M. L. E. Gutarra, C. Mateo, D. M. G. Freire, F. A. G. Torres, A. M. Castro, J. M. Guisan, J. M. Palomo, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, 1, 260-266; (c) P. Saunders, J. Brask, en *Biocatalysis in Polymer Chemistry*, Ed. K. Loos, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, pp. 65-82; (d) S. J. Pierre, J. C. Thies, A. Dureault, N. R. Cameron, J. C. M. van Hest, N. Carette, T. Michon, R. Weberskirch, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 1822-1826.
- <sup>154</sup> M. W. Fraaije, J. Wu, D. P. H. M. Heuts, E. W. van Hellemond, J. H. Lutje Spelberg, D. B. Janssen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 66, 393-400.
- <sup>155</sup> E. Malito, A. Alfieri, M. W. Fraaije, A. Mattevi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 13157-13162.
- <sup>156</sup> F. Zambianchi, M. W. Fraaije, G. Carrea, G. de Gonzalo, C. Rodríguez, V. Gotor, G. Ottolina, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1327-1331.
- <sup>157</sup> G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, G. Ottolina, M. W. Fraaije, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3077-3083.
- <sup>158</sup> P. B. Brondani, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, L. H. Andrade, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2169-2173.
- <sup>159</sup> (a) C. Rodríguez, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 1338-1344; (b) C. Rodríguez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 1168-1173.
- <sup>160</sup> (a) F. Secundo, S. Fiala, M. W. Fraaije, G. de Gonzalo, M. Meli, F. Zambianchi, G. Ottolina, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108, 491-499; (b) A. Rioz-Martínez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2526-2532; (c) C. Rodríguez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 197-203; (d) F. Schulz, F. Leca, F. Hollmann, M. T. Reetz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2005**, 1, 10.
- <sup>161</sup> (a) H. L. van Beek, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3288-3290; (b) M. T. Reetz, S. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15424-15432; (c) D. E. Torres Pazmiño, R. Snajdrova, D. V. Rial, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1361-1368.

- <sup>162</sup> (a) D. E. Torres Pazmiño, A. Riebel, J. de Lange, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2595-2598; (b) D. E. Torres Pazmiño, R. Snajdrova, B.-J. Baas, M. Ghobrial, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2275-2278.
- <sup>163</sup> P. Rowland, A. K. Basak, S. Gover, H. R. Levy, M. J. Adams, *Structure* **1994**, *2*, 1073-1087.
- <sup>164</sup> R. D. DeMoss, I. C. Gunsalus, R. C. Bard, *J. Bacteriol.* **1953**, *66*, 10-16.
- <sup>165</sup> S. Cumana, J. Simons, A. Liese, L. Hilterhaus, I. Smirnova, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *85-86*, 220-228.
- <sup>166</sup> (a) G. F. Liou, C. Khosla, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 279-284; (b) M. Chartrain, P. M. Salmon, D. K. Robinson, B. C. Buckland, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 209-214; (c) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380-416.
- <sup>167</sup> D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, D. J. Rozzell, I. Smonou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418-2426.
- <sup>168</sup> D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *1*, 43-46.
- <sup>169</sup> R. Noyori, T. Ikeda, T. Ohkuma, M. Widhalm, M. Kitamura, H. Takaya, S. Akutagawa, N. Sayo, T. Saito, T. Taketomi, H. Kumobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9134-9135.
- <sup>170</sup> Bibliografía reciente: (a) T. Maeda, K. Makino, M. Iwasaki, Y. Hamada, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11954-11962; (b) Y. Hamada, Y. Koseki, T. Fujii, T. Maeda, T. Hibino, K. Makino, *Chem. Commun.* **2008**, 6206-6208.
- <sup>171</sup> Ejemplos recientes: (a) B. Seashore-Ludlow, F. Saint-Dizier, P. Somfai, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6334-6337; (b) B. Seashore-Ludlow, P. Villo, C. Hacker, P. Somfai, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5274-5277; (c) D. Cartigny, K. Puntener, T. Ayad, M. Scalone, V. Ratovelomanana-Vidal, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3788-3791.
- <sup>172</sup> (a) P. G. Vasudev, S. Chatterjee, N. Shamala, P. Balaram, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 657-687; (b) B. B. Toure, D. G. Hall, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4439-4486; (c) J. W. Blunt, B. R. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170-244; (d) D. Seebach, J. Gardiner, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1366-1375; (e) E. Juaristi, en *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids*, 2<sup>a</sup> Ed., Eds. E. Juaristi, V. A. Soloshonok, **2005**, pp. 1-17.
- <sup>173</sup> M. C. Wani, M. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
- <sup>174</sup> A. J. McNeil, G. E. S. Toombes, S. M. Gruner, E. Lobkovsky, D. B. Collum, S. V. Chandramouli, B. J. Vanasse, T. A. Ayers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16559-16568.
- <sup>175</sup> C. Cimarelli, G. Palmieri, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5557-5563.

- <sup>176</sup> G. Cardillo, A. Tolomelli, C. Tomasini, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8651-8654.
- <sup>177</sup> (a) T. Kano, Y. Yamaguchi, K. Maruoka, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6678-6687; (b) M. Periasamy, S. Suresh, S. S. Ganesan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1323-1331; (c) S. Kobayashi, J. Kobayashi, H. Ishiani, M. Ueno, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4185-4190.
- <sup>178</sup> J.-P. G. Seerden, M. M. M. Kuypers, H. W. Scheeren, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1441-1450.
- <sup>179</sup> (a) S. G. Davies, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1129-1139; (b) S. G. Davies, O. Ichihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1141-1147; (c) S. G. Davies, O. Ichihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1153-1155.
- <sup>180</sup> (a) S. G. Agalave, S. R. Maujan, V. S. Pore, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2696-2718; (b) R. Kharb, P. C. Sharma, M. S. Yar, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 1-21; (c) R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 3-50.
- <sup>181</sup> (a) W. Yan, X. Ye, N. G. Akhmedov, J. L. Petersen, X. Shi, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2358-2361; (b) H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128-1137.
- <sup>182</sup> H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- <sup>183</sup> R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *10*, 565-598.
- <sup>184</sup> (a) J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302-1315; (b) M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015; (c) M. V. Gil, M. J. Arévalo, O. López, *Synthesis* **2007**, 1589-1620; (d) J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262; (e) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- <sup>185</sup> V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- <sup>186</sup> F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
- <sup>187</sup> B. S. Deol, D. D. Ridley, G. W. Simpson, *Aust. J. Chem.* **1976**, *29*, 2459-2467.
- <sup>188</sup> (a) R. Bhuniya, T. Mahapatra, S. Nanda, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 1597-1602; (b) P. Rodríguez, B. Reyes, M. Barton, C. Coronel, P. Menéndez, D. González, S. Rodríguez, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *71*, 90-94; (c) S. P. Ravía, I. Carrera, G. A. Seoane, S. Vero, D. Gaménara, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1393-1397; (d) H. Stecher, K. Faber, *Synthesis* **1997**, 1-16; (e) K. Ishihara, K. Iwai, H. Yamaguchi, N. Nakajima, K. Nakamura, T. Ohshima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 1896-1898; (f) K. Nakamura, T. Miyai, K. Fukushima, Y. Kawai, B. R. Babu, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 1713-1715; (g) K. Nakamura, T. Miyai, K. Nozaki, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3155-3156; (h) G. Fráter, *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 2825-2828.

- <sup>189</sup> (a) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799-4801; (b) I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12827-12832; (c) P. Bingfeng, G. Jianxing, L. Zuyi, O. P. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 853-855.
- <sup>190</sup> G. A. Applegate, R. W. Cheloha, D. L. Nelson, D. B. Berkowitz, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2420-2422.
- <sup>191</sup> S. Sonoike, T. Itakura, M. Kitamura, S. Aoki, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 64-74.
- <sup>192</sup> I. Schanapperelle, W. Hummel, H. Gröger, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1073-1076.
- <sup>193</sup> (a) A. Boffi, S. Cacchi, P. Ceci, R. Cirilli, G. Fabrizi, A. Prastaro, S. Niembro, A. Shafir, A. Vallribera, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 347-353; (b) S. Sgalla, G. Fabrizi, R. Cirilli, A. Macone, A. Bonamore, A. Boffi, S. Cacchi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2791-2796.
- <sup>194</sup> E. Burda, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9551-9554.
- <sup>195</sup> A. Prastaro, P. Ceci, E. Chiancone, A. Boffi, R. Cirilli, M. Colone, G. Fabrizi, A. Stringaro, S. Cacchi, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1929-1932.
- <sup>196</sup> H. Ankati, Y. Yang, D. Zhu, E. R. Biehl, L. Hua, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6433-6436.
- <sup>197</sup> W. Szymanski, C. P. Postema, C. Tarabiono, F. Berthiol, L. Campbell-Verduyn, S. de Wildeman, J. G. de Vries, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 2111-2115.
- <sup>198</sup> D. Koszelewski, D. Clay, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *60*, 191-194.
- <sup>199</sup> (a) J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. G. Gilman, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10<sup>a</sup> Ed., McGraw-Hill, **2001**; (b) P. L. McGeer, E. G. McGeer, en *Basis Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspect*, 4<sup>a</sup> Ed., Eds. G. J. Siegel, B. Agranoff, R. W. Albers, P. Molinoff, Raven, **1989**.

