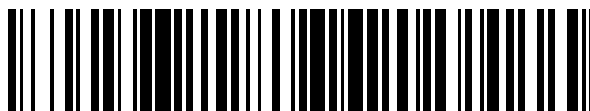


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 902**

51 Int. Cl.:

C07C 209/28 (2006.01)

C07C 231/02 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2015 PCT/EP2015/056776**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15144902**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2015 E 15712386 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3122715**

54 Título: **Síntesis eficiente de aminas y amidas a partir de alcoholes y aldehídos usando catálisis en cascada**

30 Prioridad:

27.03.2014 US 201461971106 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.01.2020

73 Titular/es:

**ORGANOFUEL SWEDEN AB (100.0%)
c/o BIZMAKER, Storgatan 73F
852 30 Sundsvall, SE**

72 Inventor/es:

**CÓRDOVA, ARMANDO;
BERGLUND, PER;
ANDERSON, MATTIAS y
AFEWERKI, SAMSON**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 738 902 T3

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

DESCRIPCIÓN

Síntesis eficiente de aminas y amidas a partir de alcoholes y aldehídos usando catálisis en cascada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de manera general a metodología ecológica para la conversión de alcoholes y aldehídos en aminas y amidas usando un sistema de cascada enzimática integrado con catálisis con metales y organocatálisis. Más específicamente, la presente invención se refiere a la síntesis de capsaicinoides partiendo de alcohol de vainillina y usando una combinación de un sistema de cascada enzimática y catalizadores.

Antecedentes

Las aminas y amidas son compuestos útiles y altamente valiosos para la producción de productos farmacéuticos y productos químicos refinados. En este contexto, la capsaicina (7a) es un compuesto acre que se encuentra en *Capsicum* spp, y es responsable del sabor enchiloso y picante de los frutos de pimiento rojo de estas plantas.¹ También pueden encontrarse varios análogos de capsaicina 7 (o capsaicinoides) en *Capsicum* spp, pero la capsaicina es una de las que se producen de manera más habitual y también la primera en aislarse y haberse determinado su estructura.¹⁻⁴ Las aplicaciones de los capsaicinoides incluyen comidas picantes, armas de defensa personal (tales como aerosol de pimienta) y analgésicos tales como Zostrix y Axsain. También se ha mostrado que los capsaicinoides tienen una variedad de otros efectos fisiológicos, por ejemplo la activación tanto de pérdida de calor como de producción de calor⁵, aumento de secreción de catecolaminas suprarrenales^{6,7} y supresión de acumulación de grasa corporal^{7,8}. Los capsaicinoides también muestran propiedades supresoras de cáncer (véase 9-11 para revisiones sobre el tema).

Pueden aislarse capsaicinoides (7) a partir de fuentes naturales (por ejemplo frutos de pimiento de *Capsicum* spp), pero esto da predominantemente capsaicina (7a) y dihidrocapsaicina dado que muchos de los otros capsaicinoides sólo están presentes en cantidades traza.^{3,4} La síntesis química es por tanto útil para obtener los capsaicinoides menos habituales tales como nonivamida (7b), y para producir capsaicinoides no naturales.¹² Pueden prepararse capsaicinoides a partir de vainillina (2) reduciendo en primer lugar oxima de vainillina utilizando una mezcla de un exceso de metal (Zn) y formiato de amonio en MeOH bajo reflujo para obtener vainillilamina (4).¹³ A continuación, puede hacerse reaccionar 4 adicionalmente con cloruros de acilo (6) para formar los productos finales (7).^{12,14-16} Alternativamente, puede conseguirse la formación de enlaces de amida mediante una transformación catalizada por enzima entre 4 y diferentes derivados de ácidos grasos.¹⁷⁻²⁰

La lignina derivada de madera es una fuente natural para la producción de alcohol de vainillina (1) y vainillina (2),²¹ y por tanto es una posible materia prima para la síntesis de capsaicinoides (7). La lignina es especialmente interesante dado que es renovable, está disponible en grandes cantidades en la naturaleza y actualmente sólo se usa para un número limitado de aplicaciones.^{21,22} También puede sintetizarse vainillina a partir de guaiacol haciéndolo reaccionar con ácido glioxílico mediante sustitución aromática electrófila. El ácido vainillilmandélico resultante se convierte a continuación mediante ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilglioxílico en vainillina (2) mediante descarboxilación oxidativa.²³

Sin embargo hay una necesidad de un método respetuoso con el medio ambiente para la producción de capsaicinoides. Más específicamente, hay una necesidad de un enfoque enzimático para preparar la amina intermedia, tal como vainillilamina (4a), con el fin de eliminar la necesidad de usar metal para la etapa de aminación reductora, es decir la etapa de convertir un aldehído en su amina correspondiente como en la conversión de vainillina en vainillilamina. Además, hay una necesidad de métodos más eficientes de convertir vainillilamina y sus derivados en capsaicinoides en los que los rendimientos de dichos capsaicinoides sean mayores que los rendimientos descritos en la técnica anterior. Además, también hay una necesidad de producir capsaicinoides en una sola etapa sin la necesidad de purificar productos intermedios de reacción.

Objetivo de la invención

Un objetivo de la invención es usar diversos compuestos renovables como materiales de partida para la síntesis de aminas y amidas.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un método de síntesis de aminas y amidas que sea ventajoso desde un punto de vista medioambiental y de la salud.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un procedimiento más sostenible para la producción de amidas.

Un objetivo adicional de la invención es realizar la síntesis en una sola etapa.

Un objetivo adicional de la invención es eliminar la necesidad de aislamiento de productos intermedios.

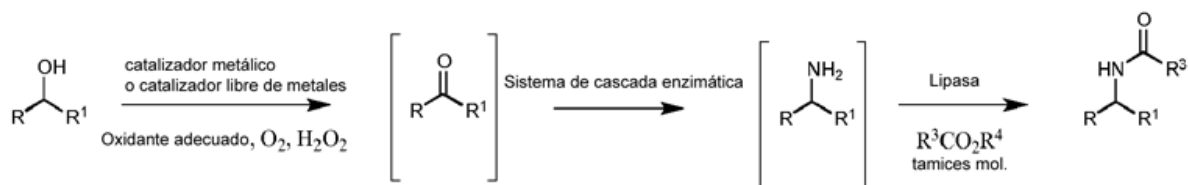
Un objetivo adicional de la invención es reducir la cantidad de residuos formados en la síntesis.

Un objetivo adicional de la invención es usar un enfoque enzimático para preparar la vainillilamina intermedia (4a) con el fin de eliminar la necesidad de usar metal para la etapa de aminación reductora.

Sumario de invención

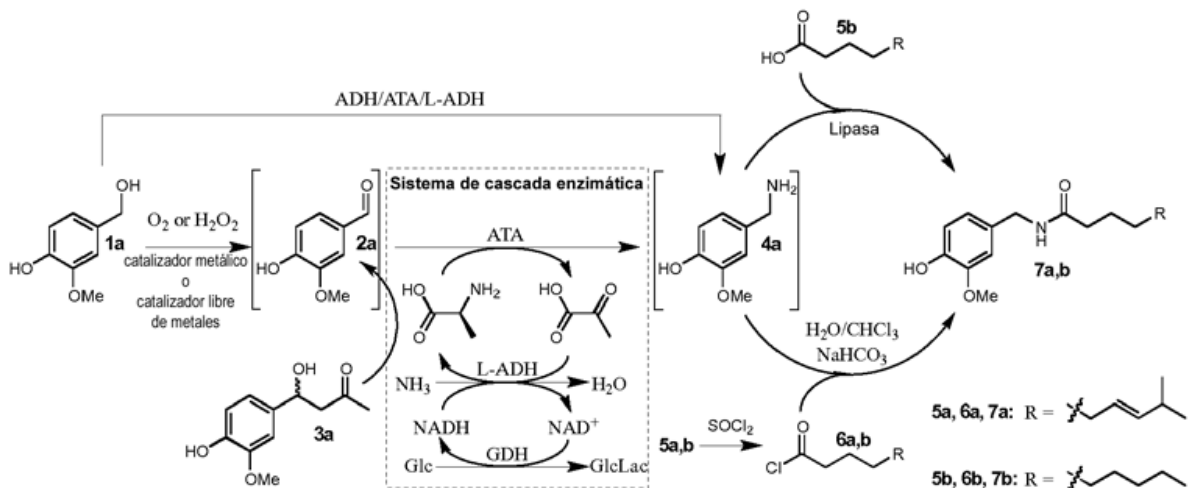
Los objetivos de la invención se consiguen usando una secuencia de transmisión en cascada de múltiples catálisis que implica un sistema de cascada enzimática que cuando se integra con otros sistemas catalíticos, tales como catalizadores metálicos heterogéneos y catalizadores orgánicos, convierte un alcohol en una amina y amida en secuencia o en una sola etapa, respectivamente. Realizaciones de la presente invención se ilustran en el esquema 1, en el que (i) R se selecciona preferiblemente de grupo alifático, arilo, 4-hidroxi-3-metoxi-C₆H₃, y 4-hidroxi-3-etoxi-C₆H₃, (ii) R¹ se selecciona preferiblemente de H, metilo y etilo, y (iii) R³ se selecciona preferiblemente de alquilo y arilo.

Tal como se indica en el esquema 1, realizaciones se refieren a un método para la conversión de un alcohol que comprende las etapas de (a) convertir dicho alcohol en un aldehído o una cetona, (b) convertir dicho aldehído o cetona en una amina, en el que la conversión de dicho aldehído o cetona en amina está catalizada por un sistema de cascada enzimática, y (c) convertir dicha amina en dicha amida.



Esquema 1 - conversión de un alcohol

Realizaciones adicionales se refieren a la síntesis de capsaicinoides y derivados similares mediante la conversión de alcohol de vainillina y sus derivados usando una combinación de sistemas de múltiples catálisis tal como se ilustra en el esquema 2.



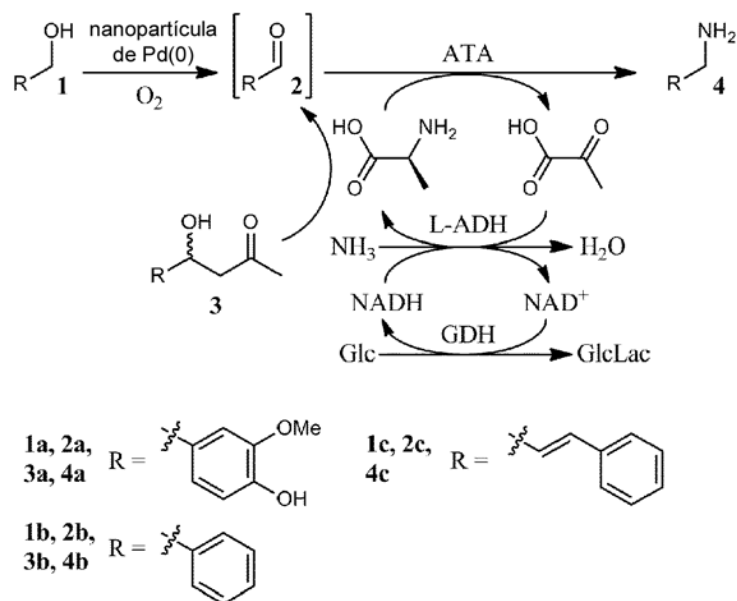
Esquema 2 - Conversión de alcohol de vainillina

Realizaciones adicionales se refieren a la síntesis de capsaicinoides y derivados similares partiendo de vainillina y sus derivados usando un sistema de cascada enzimática y un organocatalizador tal como se ilustra en el esquema 2.

Realizaciones adicionales se refieren a la síntesis de capsaicina, nonivamida y fenilcapsaicina, así como derivados de las mismas.

Realizaciones adicionales se refieren a un método para la conversión de un alcohol que comprende las etapas de (a) convertir dicho alcohol en un aldehído, (b) convertir dicho aldehído en una amina, en el que la conversión de dicho aldehído en amina está catalizada por un sistema de cascada enzimática, y (c) convertir dicha amina en dicha

amida, en el que dichas etapas a-c se llevan a cabo usando alcoholes, aldehídos, aminas y reactivos dados a conocer en el esquema 3.



Esquema 3 - conversión de alcoholes en aminas y amidas

Realizaciones adicionales se refieren a la conversión de alcoholes en aminas y amidas en condiciones respetuosas con el medio ambiente.

Por tanto, en diferentes aspectos de realizaciones los objetivos se logran mediante:

- Sintetizar aminas y amidas a partir de alcoholes usando secuencias de transmisión en cascada de múltiples catálisis.

- Sintetizar aminas y amidas a partir de aldehídos usando secuencias de transmisión en cascada de múltiples catálisis.

- Realizar la síntesis total de capsaicinoides partiendo de vainillina y sus derivados usando secuencias de transmisión en cascada de múltiples catálisis.

- Realizar la síntesis total de capsaicinoides partiendo de alcohol de vainillina y sus derivados usando secuencias de transmisión en cascada de múltiples catálisis.

Descripción detallada

Las realizaciones descritas se refieren a un método respetuoso con el medio ambiente para la conversión de un alcohol en el que el método comprende las etapas de convertir un alcohol en un aldehído o una cetona, convertir el aldehído o la cetona en una amina, y luego convertir la amina en una amida. La conversión del aldehído en una amina está catalizada por un sistema de cascada enzimática.

Un alcohol que se usa para preparar el aldehído puede seleccionarse de un alcohol primario. La oxidación del alcohol primario da como resultado un aldehído que comprende un grupo R en el que R se elige de alquilo, arilo, cinamilo y grupo heterocíclico. La conversión del aldehído en una amina mediante el sistema de cascada enzimática da como resultado una amina que comprende un grupo R en el que R se elige de alquilo, arilo, cinamilo y grupo heterocíclico. La amina que se somete a un agente acilante produce una amida que tiene un grupo R en el que R se elige de alquilo, arilo, cinamilo y grupo heterocíclico, así como un grupo acilo (COR³) en el que R³ se elige de alquilo y arilo.

Puede usarse un alcohol secundario para preparar la cetona. La oxidación del alcohol secundario da como resultado un grupo ceto de cetona que comprende un grupo R en el que R se elige de alquilo y arilo, así como un grupo R¹ en el que R¹ se elige de metilo y etilo. La conversión de la cetona en una amina mediante el sistema de cascada enzimática da como resultado una amina que comprende un grupo R en el que R se elige de alquilo y arilo, así como

un grupo R^1 en el que R^1 se elige de metilo y etilo. La amina que se somete a un agente acilante produce una amida que tiene (i) un grupo R en el que R se elige de alquilo y arilo, (ii) un grupo R^1 en el que R^1 se elige de metilo y etilo, y (iii) acilo (COR^3) en el que R^3 se elige de alquilo y arilo.

El alcohol se convierte en el aldehído mediante un catalizador adecuado dependiendo de la naturaleza de la molécula reactiva. El catalizador se selecciona de un catalizador metálico (soportado) heterogéneo, catalizador metálico homogéneo (tal como complejo organometálico homogéneo), un catalizador libre de metales (mediador) o una enzima oxidante (tal como enzima oxidante EC 1:10:3:2). Un oxidante adecuado, dependiendo de la naturaleza de la molécula reactiva, se selecciona de oxígeno, aire, peróxido de hidrógeno y NaOCl.

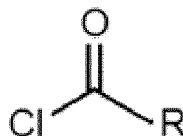
Un alcohol que se usa para preparar el aldehído puede seleccionarse de un aldol. La degradación del aldol da como resultado un aldehído que comprende un grupo R en el que R se elige de alquilo, arilo, cinamilo y grupo heterocíclico. La conversión del aldehído en una amina mediante el sistema de cascada enzimática da como resultado una amina que comprende un grupo R en el que R se elige de alquilo, arilo, cinamilo y grupo heterocíclico. La amina que se somete a un agente acilante produce una amida que tiene un grupo R en el que R se elige de alquilo, arilo, cinamilo y grupo heterocíclico, así como a un grupo acilo (COR^3) en el que R^3 se elige de alquilo y arilo.

El sistema de cascada enzimática que convierte el aldehído en su amina correspondiente comprende amina transaminasa (ATA) que puede combinarse con un catalizador orgánico tal como un donador de amina seleccionado de alanina, IPA (isopropilamina) y metilbencilamina. El donador de amina preferido es L-alanina y la ATA preferida es EC 2.6.1.18. De manera interesante, la inclusión de NH_3 (por ejemplo en forma de cloruro de amonio) como fuente de N terminal, L-alanina deshidrogenasa y NADH en el sistema de cascada enzimática aumenta el rendimiento de la amida. Además, el rendimiento de la amida puede aumentarse adicionalmente incluyendo también D-glucosa y glucosa deshidrogenasa en el sistema de cascada enzimática. Por tanto, una conversión óptima implica el uso de un sistema de cascada enzimática que comprende ATA, L-alanina, NH_3 , L-alanina deshidrogenasa, NADH, D-glucosa, glucosa deshidrogenasa.

La conversión de la amina en su amida correspondiente se logra mediante acilación de la amina con un agente acilante (es decir agente de amidación) seleccionado de ácidos, dímeros de alquil-ceteno, cloruros de ácido y anhídridos. Además, también pueden usarse métodos catalíticos que implican por ejemplo organocatalizadores y lipasas.

El método descrito anteriormente para la producción de una amida puede usarse para la producción de capsaicinoides y sus derivados tal como se indica en el esquema 2 (mostrado anteriormente) que ilustra el uso de una secuencia de transmisión en cascada de múltiples catálisis (es decir un sistema de múltiples catálisis). Tal como se ilustra, se prepara vainillina (2a) o bien a partir de alcohol de vainillina (1a) o bien del aldol de fórmula 3. En la etapa siguiente se convierte la vainillina en su amina correspondiente, vainillilamina (4a), mediante el sistema de cascada enzimática. Los capsaicinoides de fórmulas 7a y 7b pueden prepararse mediante dos vías diferentes. La primera vía implica la reacción de vainillilamina con el compuesto de fórmula 5a o 5b mientras la segunda vía implica en vez de eso la reacción de vainillilamina con el compuesto de fórmula 6a o 6b. En realizaciones preferidas adicionales, pueden usarse derivados de 1a, 2a y/o 3a para producir fenilcapsaicina así como capsaicinoides naturales y no naturales.

En realizaciones preferidas los agentes acilantes 5a, 5b, 6a y 6d pueden reemplazarse por ácido 7-fenil-hept-6-inoico y compuestos de la fórmula



en la que el grupo R se selecciona de (i) alquilo, (ii) arilo y (iii) grupo heterocíclico.

Las realizaciones preferidas de la presente invención utilizan un compuesto renovable tal como lignina como fuente de alcohol de vainillina. Además, las realizaciones preferidas de la invención se realizan en una sola etapa sin ninguna purificación de productos intermedios. El uso de compuestos renovables, un sistema de cascada enzimática de catálisis sin metales y síntesis de una sola etapa hace que la presente invención sea sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

En realizaciones preferidas de la invención, pueden usarse alcoholes bencílicos, alcoholes cinamílicos y alcoholes hidroxi, metoxi y etoxibencílicos como compuestos de partida. Realizaciones específicas implican el uso de alcoholes con fórmula $RCHOHR_1$ en la que R se selecciona de grupo alifático, arilo, 4-hidroxi-3-metoxi- C_6H_3 , y 4-hidroxi-3-etoxi- C_6H_3 , y en la que R_1 se selecciona de H, metilo y etilo. Además, realizaciones preferidas pueden implicar el uso de aldehídos y cetonas como compuestos de partida en los que benzaldehídos y arilmetil cetonas son

algunos ejemplos. Los alcoholes, aldehídos y cetonas de partida pueden obtenerse a partir de fuentes basadas en petróleo o renovables.

En la presente invención alquilo es una cadena de carbono lineal o ramificada de entre 1 y 30 átomos de carbono (C_{1-30}) de longitud, en el que dicha cadena de carbono puede estar opcionalmente insaturada, incluyendo por tanto alquenos y alquinos. Dicho grupo alquilo C_{1-30} puede estar opcionalmente sustituido con desde 1-3 sustituyentes, en el que dichos sustituyentes se seleccionan de alcoxilo (C_{1-30} lineal o ramificado), halógeno, hidroxilo, nitro, ciano y fenilo (en el que dicho fenilo está opcionalmente sustituido con desde 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alcoxilo (C_{1-30} lineal o ramificado), halógeno, hidroxilo, ciano y nitro).

En la presente invención arilo es un grupo aromático que puede estar opcionalmente sustituido con desde 1-3 sustituyentes, en el que dichos sustituyentes se seleccionan de alquilo, alcoxilo (C_{1-30} lineal o ramificado), halógeno, hidroxilo, nitro, ciano y fenilo (en el que dicho fenilo está opcionalmente sustituido con desde 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, (C_{1-30} lineal o ramificada), halógeno, hidroxilo, ciano y nitro).

En la presente invención cinamilo es un grupo cinamilo que puede estar opcionalmente sustituido con desde 1-3 sustituyentes, en el que dichos sustituyentes se seleccionan de alquilo, alcoxilo (C_{1-30} lineal o ramificado), halógeno, hidroxilo, nitro, ciano y fenilo (en el que dicho fenilo está opcionalmente sustituido con desde 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, halógeno, hidroxilo, ciano y nitro).

En la presente invención grupo heterocíclico es un grupo heterocíclico que puede estar opcionalmente sustituido con desde 1-3 sustituyentes, en el que dichos sustituyentes se seleccionan de alquilo, alcoxilo (C_{1-30} lineal o ramificado), halógeno, hidroxilo, nitro, ciano y fenilo (en el que dicho fenilo está opcionalmente sustituido con desde 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, alcoxilo (C_{1-30} lineal o ramificado), halógeno, hidroxilo, ciano y nitro).

Sección experimental

O bien se adquirieron productos químicos y disolventes con calidad puriss p. A. de proveedores comerciales o bien se purificaron mediante técnicas convencionales. Se usaron reactivos comerciales tal como se adquirieron sin ninguna purificación adicional.

Se produjo amina transaminasa (ATA) de *Chromobacterium violaceum* mediante fermentación. Se adquirieron L-alanina deshidrogenasa (L-ADH, de *Bacillus cereus*, ≥ 350 U/ml, número de producto 79848) y glucosa deshidrogenasa (GDH, de *Pseudomonas sp.*, ≥ 200 U/mg, número de producto 19359) de Sigma-Aldrich.

Se usaron placas de gel de sílice de lámina de aluminio (Fluka 60 F254) para cromatografía en capa fina (CCF), y se visualizaron los compuestos mediante irradiación con luz UV (254 nm) o mediante tratamiento con una disolución de ácido fosfomolibdico (25 g), $Ce(SO_4)_2 \cdot H_2O$ (10 g), H_2SO_4 conc. (60 ml) y H_2O (940 ml), seguido por calentamiento. Se llevó a cabo la purificación del producto mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando gel de sílice (Fluka 60, tamaño de partícula de 0,040-0,063 mm).

Se realizó análisis por HPLC con un sistema de HPLC serie 1100 (Agilent) usando una columna Crownpak CR(+) (Daicel) y un detector UV (254 nm). Se usó una fase móvil ácida con pH 1,6 ($HClO_4$) y metanol al 10% v/v. Se determinaron las conversiones midiendo el producto formado y comparándolo con una curva patrón, usando ácido benzoico como patrón interno.

Se registraron los espectros de infrarrojos (IR) en un espectrómetro Thermo Fisher Nicolet 6700 FT-IR, $\lambda_{máx.}$ en cm^{-1} . Las bandas se caracterizan como anchas (a), fuertes (f), medias (m) o débiles (d). Se registraron los espectros de 1H -RMN en un espectrómetro Bruker Avance (500 MHz o 400 MHz). Se notifican los desplazamientos químicos en ppm con respecto a tetrametilsilano con la resonancia de disolvente resultante de la incorporación de deuterio incompleta como patrón interno ($CDCl_3$: δ 7,26 ppm). Los datos se notifican de la siguiente manera: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, q = cuartete, a = ancho, m = multiplete), y constantes de acoplamiento (Hz), integración. Se registraron los espectros ^{13}C -RMN en un espectrómetro Bruker Avance (125,8 MHz o 100 MHz) con desacoplamiento protónico completo. Se notifican los desplazamientos químicos en ppm con respecto a tetrametilsilano con la resonancia de disolvente como patrón interno ($CDCl_3$: δ 77,16 ppm). Se realizó espectrometría de masas de alta resolución en un dispositivo Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF CL/EM (modo positivo).

ATA: Clonación, expresión y purificación

Se insertó el gen de la amina transaminasa (ATA) de *Chromobacterium violaceum* en plásmido pET28a(+) y se transformó en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) tal como se describió anteriormente por Cassimjee *et al.*²⁴ Se cultivaron células que contenían el plásmido de transaminasa durante la noche en 20 ml de medio de Luria-Bertoni

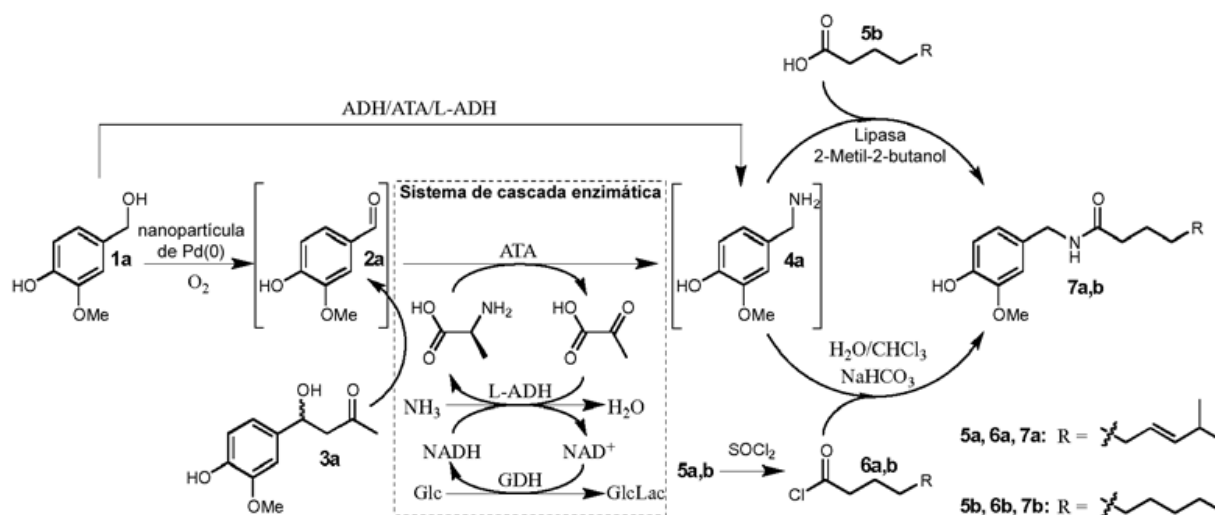
(LB) (10 g/l de triptona, 5 g/l de NaCl, 5 g/l de extracto de levadura) con 50 mg/l de kanamicina a 37°C y 220 rpm. Se realizó la expresión de proteínas mezclando seis de estos cultivos durante la noche con 1080 ml de medio LB y 50 mg/l de kanamicina en un matraz con deflectores, a 25°C y 120 rpm. Se indujo el cultivo mediante adición de IPTG 0,4 mM y se incubó durante 24 h. Después se recogieron las células y se separaron del medio mediante centrifugación. Se volvieron a suspender las células en tampón de unión IMAC que consistía en Na_2HPO_4 20 mM y NaCl 500 mM, pH 7,4, y se alteraron mediante sonicación. Se retiraron residuos celulares mediante centrifugación y se filtró la disolución de enzima en bruto (0,45 μm) y se purificó con un sistema ÄKTA FPLC usando una columna HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare). Se usó tampón de unión para lavar la columna y después se eluyó la enzima con un tampón de elución IMAC que consistía en Na_2HPO_4 20 mM, imidazol 500 mM y NaCl 500 mM, pH 7,4. Se incubó la disolución de enzima con piridoxal-5'-fosfato (PLP) 1 mM durante 20 minutos con mezclado suave. Después se cambió el tampón a HEPES 50 mM pH 8,2 usando una columna de desalinización PD10 (GE Healthcare). Se almacenó la enzima durante la noche antes de usarse para reacciones. Se almacenó la enzima en oscuridad y a 4°C.

Determinación de la concentración de ATA

Se determinó la concentración de ATA midiendo la absorbancia a 395 nm, con un coeficiente de extinción de $8,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, tal como se describió por Cassimjee *et al.*²⁴

Preparación de vainillilamina a partir de vainillina

Se realizaron todas las reacciones a 37°C y en oscuridad en tubos Eppendorf (1 ml de volumen total). Se determinaron las conversiones mediante análisis por HPLC.



Esquema 4. Resumen esquemático de la síntesis total de capsaicina y nonivamida

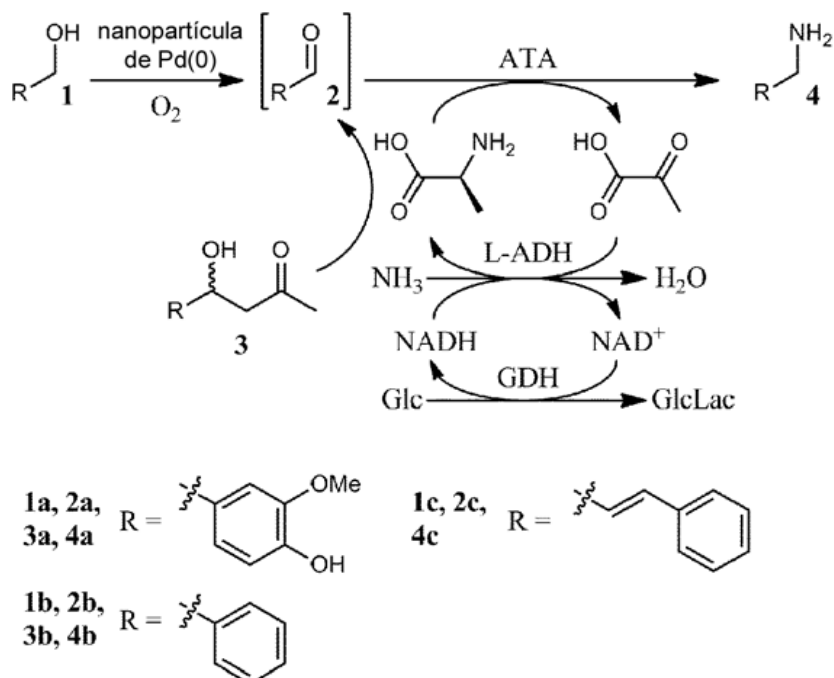
En los primeros experimentos, se mezclaron L-alanina 250 mM y vainillina 5 mM (2a) en tampón HEPES 50 mM pH 8,2, junto con 0,2 mg/ml de ATA. Después de 23 h, el 25% de la vainillina se había convertido en vainillilamina (4a). Se repitió el mismo experimento con la adición de la L-alanina deshidrogenasa. Dado que no se utilizó ningún sistema de regeneración de NADH para este experimento, se utilizó un exceso (2 eq) de NADH. La composición de la reacción fue L-alanina 250 mM, vainillina 5 mM, cloruro de amonio 100 mM y NADH 10 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8,2, junto con 0,2 mg/ml de ATA y 7 U/ml de L-alanina deshidrogenasa. Esto dio como resultado una conversión del 70% después de 23 h. Después se repitió el experimento con la adición de glucosa deshidrogenasa para regenerar el NADH. Con la presencia del sistema de regeneración, se cambió la concentración de NADH en la reacción desde cantidad en exceso hasta una catalítica. La composición de la reacción fue L-alanina 250 mM, vainillina 5 mM, cloruro de amonio 100 mM, D-glucosa 100 mM y NADH 1 mM en tampón HEPES 50 mM pH 8,2, junto con 0,2 mg/ml de ATA, 7 U/ml de L-alanina deshidrogenasa y 10 U/ml de glucosa deshidrogenasa. En 23 h, este sistema dio como resultado una conversión de >99%.

La concentración de partida de vainillina (2a) en la reacción pudo aumentarse de manera satisfactoria hasta 50 mM mientras se mantenía una alta conversión. En primer lugar se disolvió la vainillina en DMSO y luego se mezcló con D-glucosa, cloruro de amonio y L-alanina en tampón HEPES 50 mM. Se ajustó el pH a 8,2 (NaOH 1 M) y se mezcló la disolución con NADH y las enzimas en un tubo Eppendorf para dar las concentraciones finales de L-alanina 250 mM, vainillina 50 mM, cloruro de amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM, NADH 1 mM y DMSO al 10% v/v, junto

con 0,9 mg/ml de ATA, 7 U/ml de L-alanina deshidrogenasa y 10 U/ml de glucosa deshidrogenasa. Esto dio como resultado una conversión del 95% después de 17 h.

Preparación de otras aminas

5



Esquema 3

Se convirtieron de manera satisfactoria otros dos aldehídos, benzaldehído (2b) y cinamaldehído (2c), en las aminas correspondientes, 4b y 4c respectivamente, usando el mismo procedimiento. Las composiciones de la reacción fueron L-alanina 250 mM, aldehído 5 mM (2b o 2c), cloruro de amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM y NADH 1 mM v/v en tampón HEPES (45 mM, pH 8,2 a 37°C), con DMSO al 10% v/v, junto con 1 mg/ml de ATA, 7 U/ml de L-ADH y 10 U/ml de GDH. En 23 h, se obtuvo 4b con una conversión del 89%, mientras que se obtuvo 4c con una conversión del 76%.

Procedimiento general para síntesis de capsaicina y nonivamida a partir de vainillilamina.

Etapas 1: Se sometió a reflujo una disolución del ácido 5a o 5b (19,0 mmol, 1,0 equiv.) y cloruro de tionilo (9,04 g, 76,0 mmol, 4,0 equiv.) durante 4 h. Se retiró el exceso de cloruro de tionilo mediante evaporador rotatorio y se retiraron los residuos a alto vacío para producir el cloruro de acilo 6a o 6b como producto de color amarillo claro.²⁵ Se usó el material en la etapa siguiente sin purificación adicional.

Etapas 2: A un vial (8 ml) que contenía vainillilamina (4) (81,1 mg, 0,53 mmol, 1,00 equiv.) y NaHCO₃ (145,6 mg, 1,73 mmol, 3,27 equiv.), se le añadió H₂O (1,5 ml) y se agitó durante 30 minutos a t.a., seguido por adición de CHCl₃ (2 ml) y se continuó agitando la reacción a t.a. durante 15 minutos. A continuación, se añadió gota a gota una disolución de 6a o 6b (0,61 mmol, 1,16 equiv.) en CHCl₃ (0,5 ml) y se agitó la reacción a t.a. durante 30 minutos adicionales. Después se calentó la reacción hasta 40°C y se agitó durante 30 minutos (monitoreado mediante CCF). Se separó la fase orgánica y se lavó la fase acuosa con CHCl₃ (3x15 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl ac. (2%) y luego salmuera seguido por secado sobre Na₂SO₄. Se purificó el material en bruto mediante cromatografía para proporcionar 7a (rendimiento aislado del 91%) y 7b (rendimiento aislado del 94%) como un aceite de color amarillo claro.²⁶

7a: IR (limpio) λ 3296 (a), 2922 (f), 2853 (m), 1730 (m), 1647 (m), 1515 (m), 1459 (m), 1376 (m), 1272 (m), 1214 (m), 1154 (m), 1123 (d), 1034 (m), 970 (d), 816 (d), 756 (f), 667 (m), 557 (d) cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 6,86 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,79-6,73 (m, 1H), 5,62 (s a, 2H), 5,41-5,27 (m, 1H), 4,36 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 2,36-2,13 (m, 4H), 1,98 (q, J = 8,3 Hz, 1H), 1,83-1,72 (m, 1H), 1,72-1,57 (m, 4H), 1,53-1,43 (m, 1H), 1,42-1,34 (m, 1H), 0,95 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): λ 172,9, 172,5, 146,8, 145,30, 145,27, 138,3, 130,6, 130,5, 126,6, 121,03, 120,97, 114-52, 114-49, 110,86, 110,81, 72,1, 63,3, 56,12, 56,09, 43,76, 43,69, 36,9, 36,7, 35,1, 32,4, 31,1, 30,5, 29,4, 25,4, 25,2, 22,8, 21,1, 15,1, 14,4; HRMS (ESI⁺) [M+Na]⁺ calculado para C₁₈H₂₇NO₃Na⁺: 306,2064, hallado: 306,2059;

5 7b: IR (limpio) λ 3293 (a), 2926 (m), 2855 (m), 1641 (m), 1514 (m), 1462 (m), 1432 (m), 1376 (d), 1272 (m), 1214 (m), 1154 (m), 1123 (d), 1036 (m), 909 (m), 853 (d), 749 (f), 666 (m), 556 (d), 464 (d) cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 6,85 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,75 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 5,73 (s a, 2H), 4,34 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,19 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 1,68-1,59 (m, 2H), 1,38-1,18 (m, 10H), 0,87 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

10 ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 173,1, 146,9, 145-30, 130,5, 120,9, 114,5, 110,8, 56,1, 43,7, 37,0,31,9, 29,5, 29,3, 25,9, 22,8,14,2; HRMS (ESI⁺) [M+Na]⁺ calculado para C₁₇H₂₇NO₃Na⁺: 316,1883, hallado: 316,1879;

Síntesis total de nonivamida en una sola etapa

15 Etapa 1: Se usó vainillina 50 mM (2a) en una escala de 13,06 ml, lo que daría 100 mg de vainillilamina (4a) si la conversión fuera del 100%. En primer lugar se disolvió vainillina en DMSO y luego se mezcló con D-glucosa, cloruro de amonio y L-alanina en tampón HEPES 50 mM. Se ajustó el pH a 8,2 (NaOH 1 M) y se mezcló la disolución con NADH y las enzimas en un tubo falcon de 50 ml para dar las concentraciones finales de L-alanina 250 mM, vainillina 50 mM, cloruro de amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM, NADH 1 mM y DMSO al 10% v/v, junto con 1,6 mg/ml de
20 ATA, 7 U/ml de L-alanina deshidrogenasa y 10 U/ml de glucosa deshidrogenasa. Se realizó la reacción a 37°C y en oscuridad sin agitación. Después de 19 h la conversión había alcanzado >99% tal como se determinó mediante análisis por HPLC. Se almacenó la disolución a -80°C (volumen total de 13,01 ml después de la retirada de la muestra para HPLC) hasta que se realizó la segunda etapa.

25 Etapa 2a: A un matraz que contenía la mezcla de reacción en bruto de la etapa de reacción por cascada enzimática anterior (volumen de 13,01 ml, que contenía vainillilamina (99,6 mg, 0,65 mmol, 1,00 equiv.)), se le añadió NaHCO₃ (178,9 mg, 2,13 mmol, 3,27 equiv.) y se agitó durante 30 minutos a t.a., seguido por adición de CHCl₃ (20 ml) y se continuó agitando la reacción a t.a. durante 15 minutos. A continuación, se añadió gota a gota una disolución de 6b (132,1 mg, 0,75 mmol, 1,16 equiv.) en CHCl₃ (5,0 ml) y se agitó la reacción a t.a. durante 30 minutos adicionales.
30 Después se calentó la reacción hasta 40°C y se agitó durante 30 minutos (monitoreado mediante CCF). Se separó la fase orgánica y se lavó la fase acuosa con CHCl₃ (3x50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl ac. (2%) y luego salmuera seguido por secado sobre Na₂SO₄. Se purificó el material en bruto mediante cromatografía para proporcionar nonivamida (7b) (rendimiento aislado del 92%) como un aceite de color amarillo claro.

35 Etapa 2b: Se disolvió la mezcla de reacción en bruto secada de la etapa anterior (que contenía vainillilamina 94 mg, 0,62 mmol, 1,00 equiv.) en 2-metil-2-butanol (31 ml, 20 mM). A la reacción se le añadieron Ms 4 Å (2 g), compuesto 5b (98,7 mg, 0,62 mmol, 1,00 equiv.) y lipasa (1,9 g, 20 mg/ml). Se agitó la reacción a 45°C durante 48 h. Después se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se filtró. Se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el
40 material en bruto mediante cromatografía para proporcionar nonivamida (7b) (rendimiento aislado del 52%) como un aceite de color amarillo claro.

Procedimiento para síntesis de vainillilamina a partir de alcohol de vainillina

45 Etapa 1: Se cargó un vial de microondas secado en horno con alcohol de vainillina (1a) (46,3 mg, 0,3 mmol, 1,0 equiv.) y nanocatalizador de Pd(0) (Pd(0)-AmP-MFC, 20,1 mg, 0,015 mmol, al 8% en peso)²⁷ o (Pd(0)-CPG, 500 Å, 90,0 mg, 0,015 mmol, 166 μmol/g, al 2% en peso) seguido por adición de tolueno (0,6 ml). A continuación, se selló la mezcla y se conectó un globo lleno con O₂ al vial y se agitó la reacción a 70°C. Después de 3 h (cuando se usó Pd(0)-AmP-MFC) o 2 h (cuando se usó Pd(0)-CPG, 500 Å) la conversión había alcanzado >99% en vainillina
50 (2a).

Vainillina: IR (limpio) λ 3335 (a), 3016 (d), 2838 (d), 1668 (m), 1583 (m), 1509 (m), 1461 (d), 1432 (d), 1400 (d), 1265 (f), 1207 (d), 1150 (f), 1118 (m), 1027 (m), 957 (d), 866 (d), 820 (d), 779 (d), 750 (m), 728 (f), 666 (d), 628 (d), 588 (d), 551 (d) cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 9,82 (s, 1H), 7,43-7,40 (m, 2H), 7,03 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,35 (s a, 1H), 3,95 (s, 3H). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): λ 191,1, 151,9, 147,3, 130,0, 127,7, 114,5, 108,9, 56,2; HRMS (ESI⁺) [M+H]⁺ calculado para C₈H₉O₃: 153,0546, hallado: 153,0544.

Etapa 2: Se transfirieron unas pocas gotas de la mezcla en bruto de la etapa anterior, que aún contenía nanopartículas de Pd, a un tubo Eppendorf y se mezclaron con 200 μl de agua destilada. Para determinar la
60 concentración de vainillina en esta disolución se tomó una muestra, se retiraron las nanopartículas de Pd en la muestra mediante centrifugación (4000 rpm durante 15 min) y se realizó análisis por HPLC. Se disolvieron D-glucosa, cloruro de amonio y L-alanina en tampón HEPES 50 mM, se ajustó el pH a 8,2 (NaOH 1 M) y se mezcló la disolución con NADH y las enzimas y se añadió directamente al tubo que contenía la disolución de vainillina en bruto (100 μl). El volumen de reacción final fue de 1 ml con concentraciones de L-alanina 250 mM, vainillina 1,5064 mM a
65 partir de la disolución en bruto, cloruro de amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM, NADH 1 mM, junto con 1 mg/ml de

ATA, 7 U/ml de L-alanina deshidrogenasa y 10 U/ml de glucosa deshidrogenasa. La reacción se realizó a 37°C y en oscuridad sin agitación. Antes del análisis por HPLC, se retiró cualquier nanopartícula de Pd en la muestra mediante centrifugación (4000 rpm durante 15 min). Después de 44 h se había completado la reacción y se obtuvo vainillilamina (4a) con una conversión del 87% tal como se determinó mediante análisis por HPLC. Esto da una conversión global de alcohol de vainillina (1a) en vainillilamina (4a) del 87%.

Procedimiento para reacción aldólica entre vainillina y acetona

A un vial (8 ml) que contenía vainillina (2a) (114,1 mg, 0,75 mmol, 1,00 equiv.) y acetona (7,5 ml) se le añadió prolina (DL-prolina o L-prolina) (26,0 mg, 0,23 mmol, al 30% en mol) bajo N₂. Se agitó la reacción a t.a. durante 24 h, y luego se extinguió mediante adición de NH₄Cl ac. sat. (3,0 ml). Se extrajo la mezcla de reacción con acetato de etilo (3x20 ml) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄. Se purificó el material en bruto mediante cromatografía para proporcionar 3 (rendimiento aislado del 74%) como aceite amarillo.²⁸

2: IR (limpio) λ 3392 (a), 2924 (m), 1703 (m), 1604 (d), 1515 (m), 1455 (d), 1431 (d), 1363 (d), 1269 (m), 1213 (m), 1153 (m), 1123 (m), 1032 (m), 858 (d), 819 (d), 749 (f), 666 (d), 638 (d), 540 (d) cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 6,93 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,80 (dd, *J* = 8,1, 1,9 Hz, 1H), 5,60 (s a, 1H), 5,09 (dt, *J* = 9,2, 3,0 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,23 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 2,88 (dd, *J* = 17,6, 9,3 Hz, 1H), 2,80 (dd, *J* = 17,6, 3,3 Hz, 1H), 2,20 (s, 3H). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 209,4, 146,8, 145,3, 135,0, 118,7, 114,4, 108,4, 69,9, 56,1, 52,2, 30,9; HRMS (ESI⁺) [M+Na]⁺ calculado para C₁₁H₁₄O₄Na⁺: 233,0784, hallado: 233,0784.

Reacciones retroaldólicas catalizadas por alanina

Se preparó vainillina (2a) a partir del modelo de lignina 3 mediante una reacción retroaldólica catalizada por alanina. Dado que este sistema iba a utilizarse con el sistema de cascada enzimática en una sola etapa para la síntesis de vainillilamina (4a), las condiciones usadas para los experimentos iniciales sobre la reacción retroaldólica fueron las mismas que las condiciones usadas para la síntesis de vainillilamina anterior. Se usó HPLC para el análisis.

Se disolvió el compuesto 3 en DMSO y se mezcló con L-alanina en tampón HEPES pH 8,2, dando un volumen final de 1 ml y concentraciones de 2,5 mM de compuesto 3, L-alanina 250 mM, HEPES 45 mM y DMSO al 10% v/v. La reacción se realizó a 37°C durante 70 h, después de lo cual se había consumido la totalidad de 3. En este momento, el 38% del material de partida se había convertido en vainillina, y el resto en productos secundarios tales como el producto de deshidratación de 3 (conversión no determinada). Una reacción de control sin alanina pero por lo demás de composición idéntica dio vainillina con una conversión del 5,3% con algo de 3 aún en la reacción después de 70 h. Esto muestra que hay alguna actividad retroaldólica espontánea, pero que es mucho más lenta que la reacción catalizada por alanina. Una tercera reacción con la misma composición incluyendo alanina pero con pH 7 dio vainillina con una conversión del 19% después de 70 h, con algo de 3 aún en la reacción. Estos resultados se resumen en la tabla 1.

L-alanina es un catalizador quiral y el compuesto 3 utilizado es racémico. Se llevaron a cabo experimentos para investigar el uso de DL-alanina como catalizador para 3 racémico, y el uso de L-alanina como un catalizador para (S)-3. También se realizó para comparación una reacción de control con L-alanina como catalizador para 3 racémico. Se ejecutaron todas las reacciones como anteriormente en 1 ml de volumen con HEPES 45 mM pH 8,2, DMSO al 10% v/v y 2,5 mM de compuesto 3. Se usó L-alanina 250 mM o DL-alanina 500 mM como catalizador. Después de 116 h a temperatura ambiente, se obtuvo vainillina con una conversión del 24% en la reacción de control, del 30% con el catalizador racémico y del 19% con (S)-3 como sustrato. Estos resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Resumen de las reacciones retroaldólicas catalizadas por alanina realizadas.

Sustrato (2,5 mM)	Catalizador	pH	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Conversión en vainillina (%)
3 racémico	L-alanina 250 mM	8,2	37	70	38
3 racémico	Ninguno	8,2	37	70	5,3
3 racémico	L-alanina 250 mM	7	37	70	19
3 racémico	L-alanina 250 mM	8,2	t.a.	116	24
3 racémico	DL-alanina 500 mM	8,2	t.a.	116	30
(S)-3	L-alanina 250 mM	8,2	t.a.	116	19

Procedimiento para la síntesis de vainillilamina mediante una reacción retroaldólica seguida por transaminación en una sola etapa

Se disolvieron D-glucosa, cloruro de amonio y L-alanina en tampón HEPES 50 mM y se ajustó el pH a 8,2 (NaOH 1 M). Se disolvió el modelo de lignina 3 en DMSO y luego se añadió a la disolución junto con NADH y las enzimas para dar el volumen final de 1 ml y concentraciones de L-alanina 250 mM, 2,5 mM de compuesto 3, cloruro de

amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM, NADH 1 mM y DMSO al 10% v/v, junto con 1 mg/ml de ATA, 7 U/ml de L-alanina deshidrogenasa y 10 U/ml de glucosa deshidrogenasa. Se realizó la reacción a 37°C y en oscuridad sin agitación. Esto dio como resultado una conversión en vainillilamina (4a) del 25% después de 92 h tal como se determinó mediante análisis por HPLC.

Se repitió la misma reacción pero usando HEPES 100 mM en vez de 50 mM (volumen final de 1 ml y concentraciones de L-alanina 250 mM, 2,5 mM de compuesto 3, cloruro de amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM, NADH 1 mM y DMSO al 10% v/v, junto con 0,9 mg/ml de ATA, 7 U/ml de L-alanina deshidrogenasa y 10 U/ml de glucosa deshidrogenasa). Se realizó la reacción en 37°C y en oscuridad sin agitación. Esto dio como resultado una conversión en vainillilamina (4a) del 40% después de 90 h tal como se determinó mediante análisis por HPLC.

Se investigó el efecto de la concentración de tampón más alta sobre el sistema anteriormente descrito para la síntesis de vainillilamina (4a) a partir de vainillina (2a). De la misma manera que antes, se disolvió vainillina en DMSO y luego se mezcló con D-glucosa, cloruro de amonio y L-alanina en tampón HEPES 100 mM. Se ajustó el pH a 8,2 (NaOH 1 M) y se mezcló la disolución con NADH y las enzimas en un tubo Eppendorf para dar el volumen final de 1 ml y concentraciones de L-alanina 250 mM, vainillina 50 mM, cloruro de amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM, NADH 1 mM y DMSO al 10% v/v, junto con 0,9 mg/ml de ATA, 7 U/ml de L-alanina deshidrogenasa y 10 U/ml de glucosa deshidrogenasa. La reacción se realizó a 37°C y en oscuridad sin agitación. Esto dio como resultado que la reacción terminó después de 18 h, con una conversión de vainillina en vainillilamina de tan sólo el 77%. Dado que se obtuvieron conversiones del 95% (pequeña escala) y >99% (aumento a escala) con el mismo sistema con una concentración de tampón menor, se decidió no trabajar adicionalmente con la concentración de tampón 100 mM.

Síntesis de ácido 7-fenilhept-6-inóico²⁹

A un matraz secado en horno se le añadieron Pd(PPh₃)₄ (173,3 mg, 0,15 mmol, al 3% en mol) y CuI (19,0 mg, 0,1 mmol, al 2% en mol) y se purgó el matraz bajo N₂ durante 5 minutos, seguido por adición de ácido hept-6-inóico (630,8 mg, 5 mmol, 1,0 equiv.), 1-yodobenceno (1,22 g, 6 mmol, 1,2 equiv.) y trietilamina (20 ml). Se calentó la reacción hasta 50°C y se agitó durante 16 h. Después se concentró el material en bruto y se añadieron acetato de etilo (100 ml) y HCl ac. (1 M, 20 ml) y se extrajo. Se extrajo de nuevo la fase acuosa con acetato de etilo (100 ml) y se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ y se concentraron. Se purificó el material en bruto mediante cromatografía para proporcionar ácido 7-fenilhept-6-inóico (rendimiento aislado del 82%) como un sólido marrón.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 10,75 (s a, 1H), 7,43-7,36 (m, 2H), 7,32-7,22 (m, 3H), 2,45 (t, J = 7,1 Hz, 4H), 1,88-1,78 (m, 2H), 1,72-1,63 (m, 2H).

Síntesis de fenilcapsaicina

A un vial secado en horno que contenía Ms 4 Å (100 mg), se le añadieron 2-metil-2-butanol (5 ml), ácido 7-fenilhept-6-inóico (20,2 mg, 0,1 mmol, 1,0 equiv.), 4a (15,2 mg, 0,1 mmol, 1,0 equiv.), y Novozyme (100 mg). Se agitó la reacción a 45°C durante 48 h. Después se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se filtró. Se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el material en bruto mediante cromatografía para proporcionar fenilcapsaicina (rendimiento aislado del 95%) como un aceite de color amarillo claro.

IR (limpio) λ 3053 (d), 2937 (d), 1645 (m), 1600 (d), 1513 (m), 1461 (d), 1431 (m), 1373 (m), 1264 (m), 1236 (d), 1154 (m), 1123 (m), 1034 (m), 854 (d), 818 (d), 732 (f), 693 (m), 542 (d), 465 (d) cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,39-7,33 (m, 2H), 7,29-7,24 (m, 3H), 6,85 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,75 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 5,67 (s a, 1H), 5,60 (s, 1H), 4,36 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,44 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,27 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 1,88-1,80 (m, 2H), 1,69-1,61 (m, 2H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 172,5, 146,8, 145,3, 131,7, 130,5, 128,4, 127,8, 123,9, 121,0, 114,5, 110,8, 89,8, 81,2, 56,1, 43,7, 36,4, 28,4, 25,2, 19,4; HRMS (ESI⁺) [M+Na]⁺ calculado para C₂₁H₂₃NO₃Na⁺: 360,1572, hallado: 360,1570;

Cascadas de oxidación-aminación diferentes

Método 1 (método de DABCO-CuCl-TEMPO)

Se agitó un vial de microondas que contenía una disolución de CuCl (0,495 mg, 0,05 mmol, al 5% en mol) y DABCO (0,56 mg, 0,05 mmol, al 5% en mol) en tolueno (0,25 ml) a TA durante 10 min. Después, se añadió TEMPO (0,78 mg, 0,015 mmol, al 5% en mol) a la mezcla de reacción y se agitó durante 5 min. Luego, se añadió alcohol (0,1 mmol) y se conectó un globo que contenía gas oxígeno al vial. Se calentó la mezcla hasta 100°C y se agitó durante 2 horas a esta temperatura.

Método 2 (método de CuCl-bipiridil-TEMPO)

Se agitó un vial de microondas que contenía una disolución de CuCl (0,495 mg, 0,05 mmol, al 5% en mol) y bipyridilo (0,8 mg, 0,05 mmol, al 5% en mol) en tolueno (0,25 ml) a TA durante 10 min. Después, se añadió TEMPO (0,78 mg, 0,015 mmol, al 5% en mol) a la mezcla de reacción y se agitó durante 5 min. Luego, se añadió alcohol (0,1 mmol) y se conectó un globo que contenía gas oxígeno al vial. Se calentó la mezcla hasta 100°C y se agitó durante 16 horas a esta temperatura.

Método 3 (método de nanocatalizador de paladio)

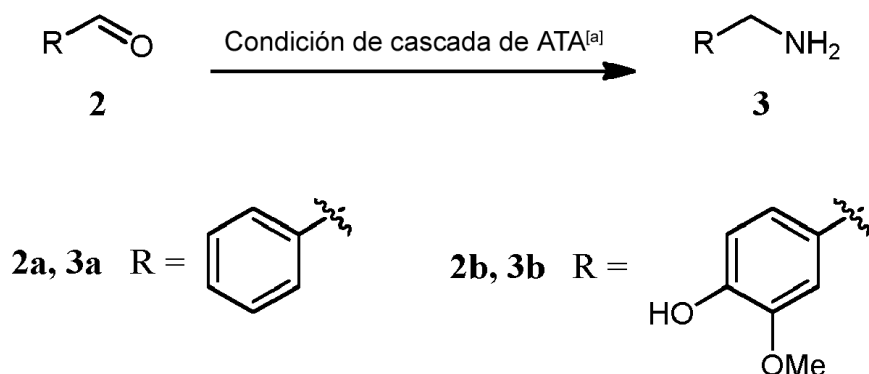
Se añadió alcohol (0,1 mmol) a un vial de microondas que contenía nanocatalizador de Pd(0) (Pd(0)-AmP-MFC, 6,7 mg, 0,05 mmol, al 8% en peso, al 5% en mol) en tolueno (0,35 ml) y se conectó un globo que contenía gas oxígeno al vial. Se calentó la mezcla hasta 70°C y se agitó durante 16 horas a esta temperatura.

Método 4 (oxidación libre de metales)

Se añadió una disolución de KBr (1,2 mg, 0,01 mmol, al 10% en mol) en agua (1 ml) a un vial de microondas que contenía una disolución de alcohol (0,1 mmol, 1,0 equiv.) y TEMPO (1,6 mg, 0,01 mmol, al 10% en mol) en CH₂Cl₂ (4 ml) y se agitó a 0°C. Luego, se añadió gota a gota una disolución de NaOCl (5,3 g, 10 mmol, 100 equiv.) con pH 9 a la mezcla de reacción. Después, se añadió NaOH (2 M, 3 ml) y se conectó un globo que contenía gas oxígeno al vial. Se agitó la mezcla a 0°C durante 3 h.

Después de realizar los métodos 1-4, se añadió DMSO al vial. Se disolvieron L-alanina, cloruro de amonio y D-glucosa en tampón HEPES 50 mM, se ajustó el pH a 8,2 a 37°C y se añadió la disolución al vial de reacción. A continuación, se disolvieron NADH, GDH, L-ADH y ATA en tampón HEPES (50 mM, pH 8,2 a 37°C) y se añadieron al vial de reacción para dar las concentraciones finales de L-alanina 250 mM, cloruro de amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM, NADH 1 mM, 7 U/ml de L-ADH, 10 U/ml de GDH y 2 mg/ml de ATA. La concentración del material de partida de aldehído, las cantidades de DMSO y tolueno en la reacción y el volumen total fueron diferentes para cada reacción realizada, y se resumen en la tabla X. Se mantuvieron las reacciones a 37°C y en oscuridad sin agitación. Después de 24 h, se determinó la conversión mediante HPLC (tabla 2).

Tabla 2



Entrada	Aldehído	Catalizador de oxidación ^[b]	Disolución de tampón (ml)	DMSO (ml)	Tolueno (ml)	Producto
1	2a, 0,1 mmol, 20 mM	CuCl, bipyridilo, TEMPO	4,7	0,30	0,20	3a, c = 33%
2	2a, 0,1 mmol, 14 mM	Pd (0) -MCF	6,7	0,37	0,33	3a, c = 46%
3	2b, 0,1 mmol, 20 mM	CuCl, bipyridilo, TEMPO	4,7	0,30	0,20	3b, c = 32%
4	2b, 0,1 mmol, 12 mM	Pd (0) -MCF	7,8	0,50	0,33	3b, c = 20%

^[a] ATA, L-ADH, GDH, L-alanina, cloruro de amonio, D-glucosa, NADH, HEPES, DMSO, H₂O.

^[b] Estos compuestos se dejaron en el vial de la etapa de oxidación anterior.

Influencia del tolueno

Se investigó la influencia del tolueno sobre las prestaciones del sistema de cascada ATA/L-ADH/GDH. Se ejecutaron reacciones en las que se convirtió benzaldehído en bencilamina mediante el sistema de cascada con diferentes cantidades de tolueno. En primer lugar se disolvió benzaldehído en mezclas de tolueno y DMSO (tabla Y) y se añadieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se disolvieron L-alanina, cloruro de amonio y D-glucosa en tampón HEPES 50 mM, se ajustó el pH a 8,2 a 37°C y se añadió la disolución a los tubos de reacción. A continuación, se disolvieron

NADH, GDH, L-ADH y ATA en tampón HEPES (50 mM, pH 8,2 a 37°C) y se añadieron a los tubos de reacción para dar concentraciones finales de benzaldehído 20 mM, L-alanina 250 mM, cloruro de amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM, NADH 1 mM, 7 U/ml de L-ADH, 10 U/ml de GDH y 1 mg/ml de ATA. El volumen total de cada reacción fue de 1 ml, en el que el 10% v/v era la mezcla de DMSO/tolueno. Se mantuvieron las reacciones a 37°C y en oscuridad sin agitación. Se determinaron las conversiones mediante HPLC después de 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Todas las reacciones habían terminado después de 4 horas, y los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3

Entrada	Tolueno (% v / v) ^[a]	Conversión (%) ^[b]
1	0	90
2	0,5	88
3	1	78
4	2	72
5	5	72

^[a] % v/v del volumen de reacción total.

^[b] Determinado mediante HPLC después de 4 h.

Influencia de Pd(0)-MCF

Se investigó la influencia de Pd(0)-MCF sobre las prestaciones del sistema de cascada ATA/L-ADH/GDH. Se ejecutaron reacciones en las que se convirtió benzaldehído en bencilamina mediante el sistema de cascada con diferentes cantidades de Pd(0)-MCF. En primer lugar se añadieron las nanopartículas de paladio a tubos Eppendorf de 1,5 ml (tabla Z). Se disolvió benzaldehído en DMSO y se añadió a los tubos. Se disolvieron L-alanina, cloruro de amonio y D-glucosa en tampón HEPES 50 mM, se ajustó el pH a 8,2 a 37°C y se añadió la disolución a los tubos de reacción. A continuación, se disolvieron NADH, GDH, L-ADH y ATA en tampón HEPES (50 mM, pH 8,2 a 37°C) y se añadieron a los tubos de reacción para dar concentraciones finales de benzaldehído 5 mM, L-alanina 250 mM, cloruro de amonio 150 mM, D-glucosa 150 mM, NADH 1 mM, 7 U/ml de L-ADH, 10 U/ml de GDH y 1 mg/ml de ATA. El volumen total de cada reacción fue de 1 ml con DMSO al 10% v/v. Se mantuvieron las reacciones a 37°C y en oscuridad sin agitación. Se determinaron las conversiones mediante HPLC después de 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Todas las reacciones habían terminado después de 4 horas, y los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4

Entrada	Pd (0)-MCF (mg/ml)	Conversión (%) ^[a]
1	0	88
2	0	83
3	0,1	85
4	0,6	83
5	1,1	78
6	2	79

^[a] Determinado mediante HPLC después de 4 h.

Referencias

1. E. K. Nelson, J. Am. Chem. Soc., 1919, 41, 1115-1121.
2. D. J. Bennett y G. W. Kirby, J. Chem. Soc. C, 1968, 442-446.
3. K. Iwai, T. Suzuki y H. Fujiwake, Agric. Biol. Chem., 1979, 43, 2493-2498.
4. T. Kawada, T. Watanabe, K. Katsura, H. Takami y K. Iwai, J. Chromatogr., 1985, 329, 99-105.
5. A. Kobayashi, T. Osaka, Y. Namba, S. Inoue, T. H. Lee y S. Kimura, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 1998, 275, R92-R98
6. T. Watanabe, T. Kawada, T. Kato, T. Harada y K. Iwai, Life Sciences, 1994, 54, 369-374.
7. K. Kim, T. Kawada, K. Ishihara, K. Inoue y T. Fushiki, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1997, 61, 1718-1723.
8. T. Kawada, K. Hagihara y K. Iwai, J. Nutr., 1986, 116, 1272-1278
9. K. Bley, G. Boorman, B. Mohammad, D. McKenzie y S. Babbar, Toxicol. Pathol., 2012, 40, 847-873
10. Y. Surh, J. Natl. Cancer Inst., 2002, 94, 1263-1265.

11. A. Oyagbemi, A. Saba, O. Azeez, *Indian J. Cancer*, 2010, 47,53-58
12. E. K. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1919, 41, 2121-2130.
13. K. Abiraj y D. C. Gowda, *J. Chem. Res. (S)*, 2003, 6, 332-334
14. P. M. Gannett, D. L. Nagel, P. J. Reilly, T. Lawson, J. Sharpe y B. Toth, *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 1064-1071.
15. H. Kaga, M. Miura y K. Orito, *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 3477-3478.
16. B. Wang, F. Yang, Y. Shan, W. Qiu y J. Tang, *Tetrahedron*, 2009, 65, 5409-5412.
17. K. Kobata, K. Yoshikawa, M. Kohashi y T. Watanabe, *Tetrahedron lett.*, 1996, 37, 2789-2790.
18. K. Kobata, M. Toyoshima, M. Kawamura y T. Watanabe, *Biotechnol. Lett.*, 1998, 20, 781-783.
19. M. Koreishi, D. Zhang, H. Imanaka, K. Imamura, S. Adachi, R. Matsuno y K. Nakanishi, *J. Agric. Food. Chem.*, 2006, 54, 72-78.
20. E. Castillo, A. Torres-Gavilán, P. Severiano, N. Arturo y A. López-Munguía, *Food Chem.*, 2007, 100, 1202-1208.
21. Vannillin is produced from wood in 1,500 tonnes every year by Borregaard. Life-Cycle Assessment proves that wood derived vanillin has a 90% smaller CO₂-footprint as compared to mineral oil-based vanillin. (<http://sustainableifra.wordpress.com/2012/06/11/vanillin-extracted-from-wood-at-borregaard/>)
22. S. R. Collinson y W. Thielemans, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, 254, 1854-1870.
23. Esposito, Lawrence J.; K. Formanek, G. Kientz, F. Mauger, V. Maureaux, G. Robert, y F. Truchet (1997). "Vanillin". *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4ª edición 24. Nueva York: John Wiley & Sons. págs. 812-825.
24. K. E. Cassimjee, M. S. Humble, V. Miceli, C. G. Colomina y P. Berglund, *ACS Catal.*, 2011, 1, 1051-1055.
25. J. Zhao, T. D. Gover, S. Muralidharan, D. A. Auston, D. Weinreich y J. P. Y. Kao, *Biochemistry*. 2006, 45, 4915-4926
26. B. Wang, F. Yang, Y. Shan, W. Qiu, J. Tang, *Tetrahedron*, 2009, 65, 5409-5412
27. 27a) E. W. Ping, R. Wallace, J. Pierson, T. F. Fuller y C. W. Jones, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2010, 132, 174-180 27b) M. Shakeri, C. Tai, E. Göthelid, S. Oscarsson y J. Bäckvall, *Chem. Eur. J.*, 2011, 17, 13269-13273. 27c) E. V. Johnston, O. Verho, M. D. Kärkäs, M. Shakeri, C. Tai, P. Palmgren, K. Eriksson, S. Oscarsson y J. Bäckvall, *Chem. Eur. J.*, 2012, 18, 12202-12206 27d) L. Deiana, S. Afewerki, C. Palo-Nieto, O. Verho, E. V. Johnston y A. Córdova, *Sci. Rep.*, 2012, 2, 851.; DOI: 10-1038/srep00851
28. M. Edin, J. Bäckvall y A. Córdova, *Tetrahedron Lett.*, 2004, 45, 7697-7701
29. T. Patil, N.; Huo, Z.; B. Bajracharya, G.; Yamamoto, Y., *J. Org. Chem.* 2006, 71, 3612

REIVINDICACIONES

1. Método para la conversión de un alcohol que comprende las etapas de:

a. convertir dicho alcohol en un aldehído o una cetona,
 b. convertir dicho aldehído o cetona en una amina, en el que la conversión de dicho aldehído o cetona en amina está catalizada por un sistema de cascada enzimática, y
 c. convertir dicha amina en dicha amida,

en el que dicho sistema de cascada enzimática comprende amina transaminasa (ATA), en el que dicho sistema de cascada enzimática comprende preferiblemente ATA y un donador de amina.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sistema de cascada enzimática comprende ATA, L-alanina como donador de amina, NH_3 , L-alanina deshidrogenasa y NADH, y en el que dicho sistema de cascada enzimática comprende más preferiblemente ATA, L-alanina, NH_3 , L-alanina deshidrogenasa, NADH, D-glucosa y glucosa deshidrogenasa.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende las etapas de:

a. convertir dicho alcohol en un aldehído o una cetona en presencia de: i. un oxidante seleccionado de H_2O_2 , O_2 , aire y NaOCl , y ii. un sistema de catalizador, que se selecciona de:

- un catalizador metálico soportado heterogéneo, preferiblemente seleccionado de nanocatalizadores de $\text{Pd}(0)$,
- un complejo organometálico, preferiblemente derivado de Pd, Cu, Pt, Fe e Ir, más preferiblemente seleccionado del método de DABCO-CuCl-TEMPO y el método de CuCl-bipiridil-TEMPO,
- un catalizador libre de metales (mediador), preferiblemente seleccionado de TEMPO ((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxilo) o derivado del mismo, y
- una enzima oxidante, preferiblemente enzima oxidante EC 1:10:3:2,

b. convertir dicho aldehído en una amina, en el que la conversión de dicho aldehído en amina está catalizada por dicho sistema de cascada enzimática,

c. convertir dicha amina en dicha amida mediante acilación de la amina, opcionalmente con un agente acilante.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de

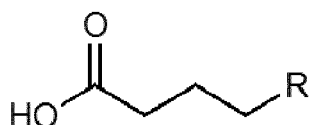
a. proporcionar alcohol de vainillina y convertir dicho alcohol en vainillina,
 b. convertir dicha vainillina en una vainillilamina, en el que la conversión de vainillina en vainillilamina está catalizada por dicho sistema de cascada enzimática, y
 c. convertir vainillilamina en capsaicina, nonivamida o fenilcapsaicina, y derivados de las mismas.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de

a. proporcionar alcohol de vainillina y convertir dicho alcohol en vainillina en presencia de nanopartículas de $\text{Pd}(0)$, más preferiblemente en presencia de nanopartículas de $\text{Pd}(0)$ y O_2 ,
 b. convertir dicha vainillina en vainillilamina, en el que la conversión de vainillina en vainillilamina está catalizada por dicho sistema de cascada enzimática que comprende ATA, D-glucosa, glucosa deshidrogenasa, L-alanina, NH_3 , L-alanina deshidrogenasa y NADH,
 c. convertir vainillilamina en:

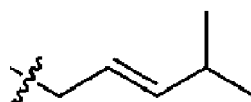
- capsaicina y nonivamida en presencia de:

i. compuestos de fórmula 5a o 5b, en el que



es un compuesto de fórmula 5, y

en la que el grupo R se selecciona de



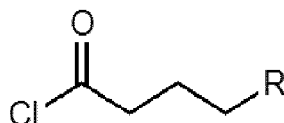
(compuestos de fórmula 5a) y



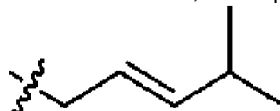
(compuestos de fórmula 5b),

respectivamente, y preferiblemente lipasa, o

ii. compuestos de fórmula 6a o 6b, en el que



es un compuesto de fórmula 6, en la que el grupo R se selecciona de



(compuestos de fórmula 6a) y



(compuestos de fórmula 6b), respectivamente,

y preferiblemente NaHCO_3 ,

- fenilcapsaicina en presencia de:

i. ácido 7-fenilhept-6-inoico, y preferiblemente lipasa.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de

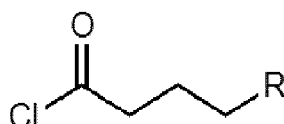
a. proporcionar alcohol de vainillina y convertir dicho alcohol en vainillina en presencia de nanopartículas de $\text{Pd}(0)$ y O_2 ,

b. convertir dicha vainillina en vainillilamina, en el que la conversión de vainillina en vainillilamina está catalizada por dicho sistema de cascada enzimática que comprende ATA, D-glucosa, glucosa deshidrogenasa, L-alanina, NH_3 , L-alanina deshidrogenasa y NADH,

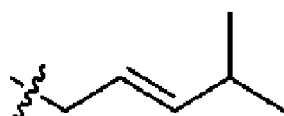
c. convertir vainillilamina en:

- capsaicina o nonivamida en presencia de:

i. compuestos de fórmula 6a o 6b, en el que



es un compuesto de fórmula 6, en la que el grupo R se selecciona de



(compuestos de fórmula 6a) y



(compuestos de fórmula 6b), respectivamente, y preferiblemente NaHCO_3 ,

- fenilcapsaicina en presencia de:

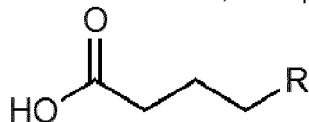
i. ácido 7-fenilhept-6-inóico, y preferiblemente lipasa.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de

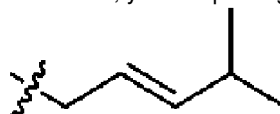
a. proporcionar alcohol de vainillina y convertir dicho alcohol en vainillilamina a través de vainillina como producto intermedio, en el que la conversión está catalizada por un sistema de cascada enzimática que comprende ATA, alcohol deshidrogenasa (ADH) y L-ADH, b. convertir vainillilamina en:

- capsaicina o nonivamida en presencia de:

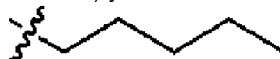
i. compuestos de fórmula 5a o 5b, en el que



es un compuesto de fórmula 5, y en la que el grupo R se selecciona de

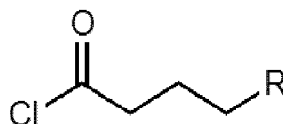


(compuestos de fórmula 5a) y

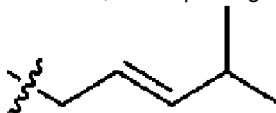


(compuestos de fórmula 5b), respectivamente, y preferiblemente lipasa, o

ii. compuestos de fórmula 6a o 6b, en el que



es un compuesto de fórmula 6, en la que el grupo R se selecciona de



(compuestos de fórmula 6a) y



(compuestos de fórmula 6b),

respectivamente, y preferiblemente NaHCO_3 ,

- fenilcapsaicina en presencia de:

i. ácido 7-fenilhept-6-inóico, y preferiblemente lipasa.

8. Método para la conversión de un alcohol que comprende las etapas de:

- a. convertir dicho alcohol en un aldehído o una cetona,
- b. convertir dicho aldehído o cetona en una amina, en el que la conversión de dicho aldehído o cetona en amina está catalizada por un sistema de cascada enzimática, y

en el que dicho sistema de cascada enzimática comprende amina transaminasa (ATA), en el que dicho sistema de cascada enzimática comprende preferiblemente ATA y un donador de amina.

9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho sistema de cascada enzimática comprende ATA, L-alanina como donador de amina, NH_3 , L-alanina deshidrogenasa y NADH, y en el que dicho sistema de cascada enzimática comprende más preferiblemente ATA, L-alanina, NH_3 , L-alanina deshidrogenasa, NADH, D-glucosa, glucosa deshidrogenasa.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 anteriores, que comprende las etapas de:

a) convertir dicho alcohol en un aldehído o una cetona en presencia de:

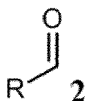
- i. un oxidante seleccionado de H_2O_2 , O_2 , aire y NaOCl , y
- ii. un sistema de catalizador que se selecciona de:

- un catalizador metálico soportado heterogéneo, preferiblemente seleccionado de nanocatalizadores de $\text{Pd}(0)$,
- un complejo organometálico, preferiblemente derivado de Pd, Cu, Pt, Fe e Ir, más preferiblemente seleccionado del método de DABCO-CuCl-TEMPO y el método de CuCl-bipiridil-TEMPO,
- un catalizador libre de metales (mediador), preferiblemente seleccionado de TEMPO ((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxilo) o derivado del mismo, y
- una enzima oxidante, preferiblemente enzima oxidante EC 1:10:3:2,

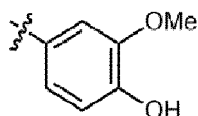
b) convertir dicho aldehído en una amina, en el que la conversión de dicho aldehído en amina está catalizada por dicho sistema de cascada enzimática.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 anteriores, que comprende las etapas de

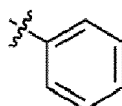
a. proporcionar un aldehído según la fórmula 2a, 2b o 2c en el que



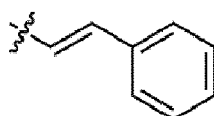
es un compuesto de fórmula 2, en la que R se selecciona de:



(compuesto de fórmula 2a),

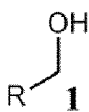


(compuesto de fórmula 2b) y

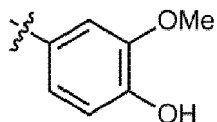


(compuesto de fórmula 2c), mediante:

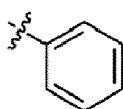
- i. proporcionar un alcohol según la fórmula 1a, 1b o 1c, en el que



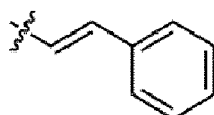
es un compuesto de fórmula 1, en la que R se selecciona de:



(compuesto de fórmula 1a),

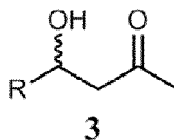


(compuesto de fórmula 1b) y

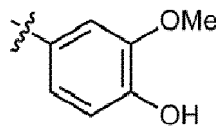


(compuesto de fórmula 1c),
y convertir dicho alcohol en un aldehído correspondiente de fórmula 2a, 2b o 2c,
respectivamente, o

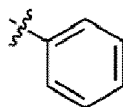
ii. proporcionar un aldol según la fórmula 3a, 3b o 3c, en el que



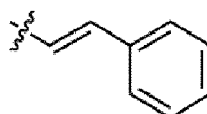
es un compuesto de fórmula 3, en la que R se selecciona de



(compuesto de fórmula 3a),



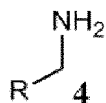
(compuesto de fórmula 3b) y



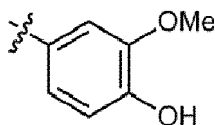
(compuesto de fórmula 3c),

y convertir dicho aldol en un aldehído correspondiente de fórmula, 2a, 2b o 2c, respectivamente, o

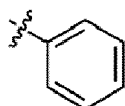
b. convertir dicho aldehído según la fórmula 2a, 2b o 2c en una amina correspondiente según la fórmula 4a, 4b, o 4c, en el que



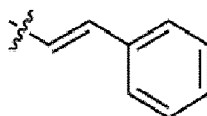
es un compuesto de fórmula 4, en la que R se selecciona de:



(compuesto de fórmula 4a),



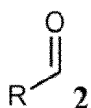
(compuesto de fórmula 4b) y



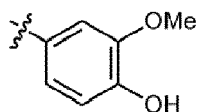
(compuesto de fórmula 4c), respectivamente, en el que la conversión de aldehído en amina está catalizada por dicho sistema de cascada enzimática.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-11 anteriores, que comprende las etapas de

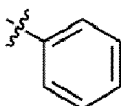
a. proporcionar un aldehído según la fórmula 2a, 2b o 2c en el que



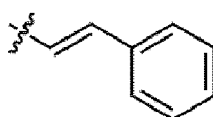
es un compuesto de fórmula 2, en la que R se selecciona de:



(compuesto de fórmula 2a),

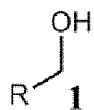


(compuesto de fórmula 2b) y



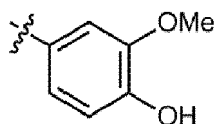
(compuesto de fórmula 2c), mediante:

i. proporcionar alcohol según la fórmula 1a, 1b o 1c, en el que



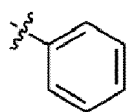
5

es un compuesto de fórmula 1, en la que R se selecciona de:



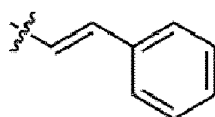
10

(compuesto de fórmula 1a),



15

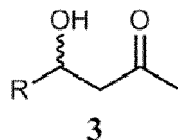
(compuesto de fórmula 1b) y



20

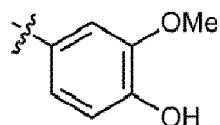
(compuesto de fórmula 1c), y convertir dicho alcohol en un aldehído correspondiente de fórmula, 2a, 2b o 2c, respectivamente, en el que esta conversión se lleva a cabo en presencia de nanopartículas de Pd(0), más preferiblemente en presencia de nanopartículas de Pd(0) y O₂, o

ii. proporcionar un aldol según la fórmula 3a, 3b o 3c, en el que



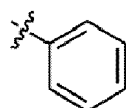
25

es un compuesto de fórmula 3, en la que R se selecciona de



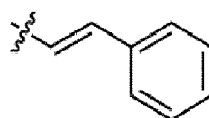
30

(compuesto de fórmula 3a),



35

(compuesto de fórmula 3b) y

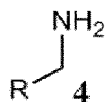


40

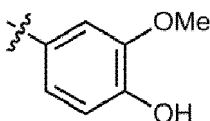
(compuesto de fórmula 3c),

y convertir dicho aldol en un aldehído correspondiente de fórmula, 2a, 2b o 2c, respectivamente, en el que esta conversión se lleva a cabo en presencia de L-alanina, más preferiblemente en presencia de sistema de cascada enzimática, o

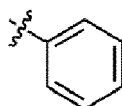
- 5 b. convertir dicho aldehído según la fórmula 2a, 2b o 2c en una amina correspondiente según la fórmula 4a, 4b, o 4c, en el que



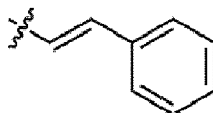
- 10 es un compuesto de fórmula 4, en la que R se selecciona de:



- 15 (compuesto de fórmula 4a),



- 20 (compuesto de fórmula 4b) y



- 25 (compuesto de fórmula 4c),
respectivamente, en el que esta conversión de aldehído en amina está catalizada por dicho sistema de cascada enzimática.

- 30 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-12 anteriores, que comprende las etapas de
a. proporcionar alcohol de vainillina y convertir dicho alcohol en vainillina, b. convertir dicha vainillina en una vainillilamina, en el que la conversión de vainillina en vainillilamina está catalizada por dicho sistema de cascada enzimática.

- 35 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-13 anteriores, que comprende las etapas de
a. proporcionar alcohol de vainillina y convertir dicho alcohol en vainillina en presencia de nanopartículas de Pd(0), más preferiblemente en presencia de nanopartículas de Pd(0) y O₂,
40 b. convertir dicha vainillina en vainillilamina, en el que la conversión de vainillina en vainillilamina está catalizada por dicho sistema de cascada enzimática que comprende ATA, D-glucosa, glucosa deshidrogenasa, L-alanina, NH₃, L-alanina deshidrogenasa y NADH.

- 45 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-14 anteriores, que comprende las etapas de
a. proporcionar alcohol de vainillina y convertir dicho alcohol en vainillilamina a través de vainillina como producto intermedio, en el que la conversión está catalizada por un sistema de cascada enzimática que comprende ATA, alcohol deshidrogenasa (ADH) y L-ADH.