

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

**DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE
MESO-1,2-DIAMINAS**

DANIEL MÉNDEZ SÁNCHEZ

Julio 2012
Trabajo Fin de Máster

DANIEL MÉNDEZ SÁNCHEZ, estudiante del Máster Universitario “Química y desarrollo sostenible”, organizado por el Centro Internacional de Postgrado de la Universidad de Oviedo

PRESENTA

El trabajo titulado “**Desimetrización enzimática de *meso*-1,2-diaminas**”, que ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo bajo la tutela del Profesor Titular Miguel Ferrero Fuertes, y la supervisión del Catedrático Vicente Miguel Gotor Santamaría y del Profesor Titular Vicente Gotor Fernández, todos ellos miembros del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo, los cuales autorizan su presentación para que sea calificado como Proyecto Fin de Máster.

Oviedo, 15 de Julio 2012

Firmado por:

Vicente Miguel Gotor Santamaría

Vicente Gotor Fernández

Daniel Méndez Sánchez

Miguel Ferrero Fuertes

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[α]	Rotación óptica específica
[E]₀	Concentración inicial de enzima
[S]	Concentración de sustrato
AcOEt	Acetato de etilo
AK	Lipasa AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
APCI⁺	Ionización química a presión atmosférica en modo positivo
Ar	Arilo
Asp	Aspártico
Bu	Butilo
°C	Grados Celsius
c	Cuatriplete
c	Conversión
CAL-A	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo A
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B
CCL	Lipasa de <i>Candida cylindracea</i>
CLEA	Agregados enzimáticos entrecruzados (Cross-linked enzyme aggregates)
CLEC	Agregados enzimáticos cristalinos (Cross-linked enzyme crystals)
cm⁻¹	Número(s) de onda
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
d	Doblete
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)piridina
DEPT	Aumento de distorsión por transferencia de polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
<i>E</i>	Enantioselectividad o razón enantiomérica
E-factor	Factor medioambiental (Environmental factor)
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
<i>ee_p</i>	Exceso enantiomérico del producto

<i>ee_s</i>	Exceso enantiomérico del sustrato
EM	Espectros de masas
equiv	Equivalente(s)
ESI⁺	Ionización por electrospray en modo positivo
Et	Etilo
Et₃N	Trietilamina
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hz	Hertzios
D.I.	Diámetro interno
IR	Espectroscopía de infrarrojo
IT	Intermedio tetraédrico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>k_{cat}</i>	Constante catalítica
<i>k_{cat}/K_M</i>	Constante de especificidad
K_M	Constante de Michaelis
m	Multiplete
M	Molar
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeNO₂	Nitrometano
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligramo(s)
min	Minuto(s)

mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mmol	Milimol(es)
m/z	Relación masa/carga
nm	Nanómetro(s)
Nu	Nucleófilo
Pf	Punto de fusión
Ph	Fenilo
PPL	Lipasa de páncreas porcino
ppm	Partes por millón
PSL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PSL-C	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada en un soporte cerámico
PSL-IM	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada en un soporte de diatomitas
Rend. o rdto	Rendimiento
R_f	Factor de retención
RM	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
r.d.	Relación diastereomérica
s	Singulete
sa	Singulete ancho
Ser	Serina
t	Triplete
t	Tiempo
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente

t_R	Tiempo de retención
U	Unidad de actividad enzimática
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
v	Velocidad
V₀	Velocidad inicial
V_{rel}	Velocidad relativa
δ	Desplazamiento químico
v	Frecuencia

ÍNDICE

ÍNDICE	1
INTRODUCCIÓN	5
1.1. BIOCATÁLISIS: GENERALIDADES	8
1.2. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	10
1.3. ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS	12
1.4. QUÍMICA SOSTENIBLE	13
1.5. BIOCATALIZADORES: ASPECTOS CINÉTICOS Y SELECTIVIDAD	14
1.5.1. MEDIDA DE LA RAZÓN ENANTIOMÉRICA EN LOS PROCESOS DE DESIMETRIZACIÓN	16
1.6. HIDROLASAS	17
1.6.1. LIPASAS	17
1.6.1.1. Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo A (CAL-A)	18
1.6.1.2. Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B (CAL-B)	19
1.6.1.3. Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> (PSL)	20
1.6.2. ASPECTOS MECANÍSTICOS	21
1.7. DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE DIAMINAS	22
OBJETIVOS	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. SINTESIS QUÍMICA DE LAS MESO-1,2-DIAMINAS 3a-h	34
4.2. SINTESIS QUÍMICA DE LOS MONOCARBAMATOS RACÉMICOS 5a-h	35

4.3. DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE MESO-1,2-DIAMINAS.....	36
4.3.1. DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE MESO-1,2-DIFENILETANO-1,2-DIAMINA (3a).....	37
4.3.2. DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE MESO-1,2-DIARILETANO-1,2-DIAMINAS 3b-h	39
4.4. ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LOS MONOCARBAMATOS OBTENIDOS	43
CONCLUSIONES	45
PARTE EXPERIMENTAL.....	49
6.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES.....	51
6.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS	52
6.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS.....	53
6.3.1. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LAS DIFERENTES MESO-DIAMINAS.....	53
6.3.2. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LOS CORRESPONDIENTES MONOCARBAMATOS RACÉMICOS 5a-h.....	54
6.3.3. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS MESO-1,2-DIAMINAS CON CAL-A	54
6.3.4. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS MESO DIAMINAS 3d,e CON CAL-B	55
6.4. DATOS EXPERIMENTALES: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	55
PARTE ESPECTRAL.....	69
REFERENCIAS.....	119

1. INTRODUCCIÓN

Las biotransformaciones son procesos sintéticos catalizados por muy diversas clases de enzimas, y cuya utilización ha experimentado un notable auge en las últimas tres décadas, en especial desde el descubrimiento de que algunas enzimas pueden actuar con un alto grado de selectividad, no solo en medio acuoso sino también en disolventes orgánicos o neotéricos. Es por ello que en este trabajo Fin de Máster nos hemos propuesto emplear una familia de enzimas bien conocidas como son las hidrolasas, para aplicarlas en procesos de desimetrización enzimática de *meso*-1,2-diaminas, transformaciones difíciles de hacer a través de procesos no enzimáticos y cuya versión biocatalítica no ha sido explorada hasta la fecha.

Así, se ha elaborado inicialmente esta introducción donde se quiere presentar al lector, de una manera muy resumida, el estado actual del campo de la Biocatálisis. Para ello se mostrará una perspectiva histórica sobre su génesis, aplicaciones y posibilidades que hoy en día ofrece, agrupando estas dentro del campo de la Química Sostenible. Nos centraremos en las hidrolasas y más concretamente en las lipasas, biocatalizadores utilizados en este trabajo de investigación, presentando sus modos de actuación, así como las características principales de las tres enzimas que mejores resultados han presentado hasta la fecha en la resolución o desimetrización de compuestos nitrogenados, como son la lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A), la de tipo B (CAL-B) y la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL). Seguidamente se comentará la importancia de las diaminas, sustratos objeto de estudio, de gran interés en química sintética y médica al ser fragmentos de estructuras más complejas como puedan ser complejos macrocíclicos, así como en catálisis asimétrica bien sea como ligandos o bien como precursores de diversos organocatalizadores.

Debido a la experiencia de nuestro grupo de investigación en la preparación estereoselectiva de compuestos nitrogenados, así como en el desarrollo de procesos de desimetrización de muy diversos compuestos proquirales, se presentarán finalmente los ejemplos de desimetrización enzimática de diaminas, de los cuales nuestro grupo es pionero, habiendo sido posible la modificación mono- y estereoselectiva de diaminas proquirales, y no conociéndose hasta la fecha ejemplos de desimetrización enzimática de *meso*-diaminas, por lo que consideramos que esta es una línea de trabajo destacada, novedosa y muy válida para mi formación científica en un laboratorio de investigación.

1.1. BIOCATÁLISIS: GENERALIDADES

Los principios de la Biocatálisis datan de la época del antiguo Egipto, tiempos en que algunos microorganismos se utilizaban para llevar a cabo la fermentación de azúcares en la producción de alcohol, procesos que con el paso de los años fueron extendidos a la elaboración de otros productos más elaborados como por ejemplo el pan o la cerveza.¹

En el último siglo los grandes avances desarrollados en áreas como la Química, Bioquímica, Bioinformática o la Biología Molecular, han permitido un desarrollo de la Biocatálisis sobre unas bases más científicas. Así, los biocatalizadores han experimentado una rápida y continua evolución en cuanto a robustez, eficiencia, estereocontrol y quimioselectividad, especialmente a partir de que en la década de los 60 se reveló por primera vez la estructura tridimensional de algunas enzimas. Aun así la Biocatálisis no adquirió una verdadera importancia sintética hasta que Zaks y Klivanov descubrieron en 1985, que algunas enzimas podían llevar a cabo transformaciones en medios anhidros, manteniendo prácticamente inalterada su actividad natural.²

Hoy en día podría establecerse una clasificación de los tres tipos de catalizadores usados principalmente en reacciones químicas: catalizadores metálicos, organocatalizadores y biocatalizadores. En este trabajo nos centraremos en el último tipo, por lo que para comprender su modo de actuación es necesario comentar brevemente aspectos fundamentales sobre sus propiedades y uso.

Se denomina biotransformación a toda reacción química en la que están involucrados organismos vivos, siendo la Biocatálisis la mediación de sistemas biológicos en reacciones químicas.³ Estos sistemas pueden ser empleados como células enteras o bien como enzimas aisladas tras una previa purificación, haciendo posible la conversión de un compuesto químico (sustrato) en otro (producto). La elección de una forma u otra de biocatalizador depende de varios factores, como son el tipo de reacción, la necesidad de utilizar cofactores y la escala a la que se pretende realizar el proceso.⁴

¹ C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605.

² (a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072-7076; (b) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.

³ T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.

⁴ C. D. Murphy, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1949-1957.

El uso de células enteras plantea una serie de ventajas e inconvenientes. En aquellas reacciones que necesitan cofactor el empleo de células enteras disminuye el coste económico del proceso, ya que en el interior de la célula están presentes los cofactores necesarios para el correcto funcionamiento del microorganismo. Otra ventaja importante resulta de la presencia de distintas enzimas dentro de una misma célula, lo que permite su empleo como catalizadores en secuencias en las que están involucrados varios pasos de reacción. Por otro lado, esta ventaja puede convertirse en un inconveniente si se tiene en cuenta que distintas enzimas en un mismo sistema, pueden presentar incompatibilidades, o bien generar mezclas de productos al catalizar procesos diferentes para un mismo sustrato, pudiendo incluso obtenerse productos tóxicos para la célula. Sin duda alguna la dificultad para el aislamiento de los productos finales, debido a la necesidad de llevar a cabo tediosas extracciones y otros procesos como los de centrifugación, hace que el trabajo con enzimas aisladas sea hoy en día preferido, a pesar de que los procesos de aislamiento y purificación del biocatalizador incrementan el coste económico del proceso. Algunas de las ventajas de este tipo de sistemas aislados radican en su mayor selectividad en la reacción, mayor tolerancia a la concentración (se necesita menor cantidad de disolvente) y mejor control de las condiciones de reacción.

En la actualidad, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular tiene clasificados unas 3700 enzimas, pero si las predicciones son correctas, el 90% de los enzimas existentes en la naturaleza está aún por descubrir. De los conocidos, sólo una pequeña proporción (~10%) son hoy en día comerciales. Ante tal cantidad de enzimas se hace necesario establecer una clasificación atendiendo al tipo de reacciones que catalizan (Tabla 1).⁵ Sin embargo, no siempre las enzimas actúan dentro de unos parámetros fijos de reacción, y así en los últimos años se ha descubierto que algunos biocatalizadores pueden acelerar reacciones distintas a las que realizan en la naturaleza, por ejemplo las lipasas, además de la hidrólisis de ésteres, pueden facilitar la formación de enlaces carbono-carbono, carbono-heteroátomo, e incluso reacciones de oxidación, fenómeno que se conoce por promiscuidad catalítica de una enzima.⁶

⁵ K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6ª Ed.; Springer, Berlín (Alemania), 2011.

⁶ (a) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1988; (b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523.

Tabla 1. Clasificación de las enzimas de acuerdo a las reacciones que catalizan

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

A pesar del conocimiento histórico existente de las oxidorreductasas, y del desarrollo de procesos catalizados por liasas y más recientemente con aminotransferasas, alrededor del 60% de las biotransformaciones publicadas hasta la fecha han sido catalizadas por hidrolasas. Estas enzimas mantienen una gran actividad en disolventes orgánicos y son capaces de aceptar una gran variedad de sustratos, propiedad que les hace muy útiles en la resolución cinética de compuestos racémicos, así como en la desimetrización de compuestos proquirales y formas *meso* para la producción de compuestos enantioméricamente puros.⁷

1.2. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización de enzimas supone una estrategia rápida y generalmente sencilla para proporcionar estabilidad a los biocatalizadores, además de aumentar la selectividad del proceso biocatalítico.⁸ Por otra parte, existe la posibilidad de co-inmovilizar dos o más enzimas, permitiendo la catálisis de múltiples biotransformaciones, bien sea de manera independiente o en procesos en cascada. Los soportes sobre los que se inmovilizan los enzimas pueden ser tanto biológicos (polímeros naturales), como sintéticos (orgánicos e inorgánicos), y las principales técnicas empleadas para llevar a cabo dicha inmovilización se pueden agrupar en dos clases, según la enzima se una a un soporte (*coupling*), o bien quede enjaulada en él (*entrapment*). A continuación se enumeran los métodos de inmovilización más empleados en la actualidad:

⁷ A. G. Hassan Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331-3351.

⁸ J. M. Palomo, *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 1-14.

- A) **Inmovilización por adsorción:** Es un método de inmovilización no covalente en el cual la enzima se adsorbe en un soporte insoluble en agua. Las fuerzas de unión entre ambos componentes (fuerzas de dispersión de London, interacciones dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno) suelen ser débiles, lo que tiene la desventaja de que el enzima se libera del soporte muy fácilmente.
- B) **Captura en polímeros y en matrices sol-gel:** Ambos procedimientos consisten en enjaular la enzima en una matriz, de tal modo que se permita la difusión de moléculas de sustrato y producto.
- C) **Inmovilización covalente:** Es una unión mucho más fuerte que las anteriores, ya que se establecen enlaces covalentes entre la enzima y el soporte. Tiene la desventaja de que en el proceso de acoplamiento se suelen producir pérdidas de actividad, que pueden llegar incluso al 50% en determinados casos.
- D) **Entrecruzamiento (cross-linking):** Se forman enlaces covalentes entre distintos grupos, y con ellos el entrecruzamiento de las moléculas de enzima. Cuando en este proceso de entrecruzamiento se utiliza la enzima pura, en forma microcristalina, los agregados enzimáticos se conocen por su abreviatura de origen CLEC (*cross-linked enzyme crystals*). El mayor problema de esta técnica es su elevado coste económico, así que una alternativa a este método y que lo abarata sensiblemente, consiste en realizar el entrecruzamiento con la proteína precipitada a partir de su disolución acuosa. Entonces los complejos enzimáticos se denominan CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*), tipo de inmovilización muy comúnmente empleado para la inmovilización de muy diversas clases de enzimas pero especialmente hidrolasas.

Estas estrategias de inmovilización posibilitan la reutilización de los catalizadores, además de mejorar la selectividad de los procesos, suavizar las condiciones de reacción, reducir los costes de los procesos y aumentar el amplio abanico de reacciones en las que pueden emplearse las enzimas, gracias a su mayor estabilidad frente a la desnaturalización por calentamiento, la presencia de disolventes orgánicos o bien por fenómenos de autoproteólisis.

En particular, el método de inmovilización de enzimas mediante agregados de enzimas por entrecruzamiento (“Cross-linked enzyme aggregates”, CLEAs) ha cobrado

especial importancia en los últimos años.⁹ Frente a otros métodos de inmovilización, éste presenta una serie de ventajas, por ejemplo, sencillez en el procedimiento de preparación, alta actividad enzimática del catalizador, estabilidad elevada y bajos costes de producción, debido a que no se requiere purificación previa del enzima. Tampoco es necesario un soporte adicional que encarece por lo general el proceso, además de provocar la dilución de la actividad enzimática.

1.3. ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

La posibilidad de usar algunas enzimas en disolventes orgánicos, en concreto las inmovilizadas, permitió su rápida expansión a la catálisis de procesos químicos, tanto a nivel de laboratorio, como a nivel industrial, superando la limitación que presentaban muchos sustratos por su escasa solubilidad e inestabilidad en medio acuoso, así como suprimir los procesos de eliminación del agua generalmente tediosos y costosos. Por eso, la posibilidad de usar enzimas en medios orgánicos trajo consigo una serie de ventajas:

- Los sustratos orgánicos se disuelven mucho mejor y se eliminan de esta manera los problemas de difusión y la inhibición por el sustrato y/o el producto.
- Los disolventes orgánicos tienen un menor punto de ebullición lo que facilita la recuperación de los productos.
- Al evitar el agua, se evitan por tanto reacciones laterales indeseadas de hidrólisis o ácido-base, además también se tiene constancia de que muchas enzimas son más estables en ausencia de ésta.
- Se facilita el aislamiento y purificación de los productos finales de la reacción, evitando por ejemplo los procesos de extracción líquido-líquido cuando el biocatalizador está inmovilizado.

Estas nuevas propiedades que se enumeran aquí junto con las que ya se conocían previamente, hacen de las enzimas unos biocatalizadores muy interesantes en síntesis orgánica. Además como se explicará en el siguiente apartado, el uso de biocatalizadores supone un gran avance en la reducción de residuos, ya que se trata de sustancias

⁹ (a) G. Zheng, H. Yu, C. Li, J. Pan, J. Xu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *70*, 138-143; (b) R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 213-223.

biodegradables presentando a la Biocatálisis como una herramienta sostenible para el medio ambiente.¹⁰

1.4. QUÍMICA SOSTENIBLE

Se define como “Química Verde” o Química Sostenible al desarrollo de productos o procesos en los que se reduce o se elimina el uso de sustancias nocivas.¹¹ En este sentido, la Biocatálisis supone una solución práctica ya que por una parte las enzimas catalizan procesos orgánicos respetuosos con el medio ambiente, generalmente bajo condiciones suaves de reacción (pH, presión o temperatura), y son biodegradables. Por otro lado es bien conocida su elevada eficiencia catalítica, acelerando los procesos varios órdenes de magnitud en comparación con las reacciones realizadas en ausencia de enzima (reacciones control o blancos de reacción). Por último, los métodos químicos convencionales necesitan muchas veces alargar las secuencias sintéticas a través de pasos de protección y desprotección de determinados grupos funcionales, aumentando así los residuos generados, tanto en volumen como en peligrosidad, y disminuyendo la efectividad de la síntesis. Esta limitación ha sido en muchos casos superada empleando biocatalizadores, los cuales pueden actuar con altos niveles de regio-, quimio- y estereoselectividad, y además generalmente con una elevada eficiencia atómica.¹²

Atendiendo a las razones expuestas previamente podemos afirmar que el uso de enzimas como catalizadores cumple con los 12 principios de la Química Sostenible, los cuales han sido recogidos de forma nemotécnica e intencionada en el término inglés PRODUCTIVELY (de manera productiva):¹³

- 1.- **P**revent wastes (minimizar residuos).
- 2.- **R**enewable materials (utilizar materiales renovables).
- 3.- **O**mit derivatization steps (evitar pasos de protección y desprotección).
- 4.- **D**egradable chemical products (emplear productos químicos degradables).
- 5.- **U**se safe synthetic methods (minimizar la peligrosidad de las síntesis).

¹⁰ R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437-1451.

¹¹ P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452-1461.

¹² G. Zheng, J. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *22*, 784-792.

¹³ (a) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *130*, 3007-3047; (b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.

- 6.- Catalytic reagents (utilizar catalizadores).
- 7.- Temperature, pressure ambient (condiciones suaves de reacción).
- 8.- In-process monitoring (análisis en tiempo real).
- 9.- Very few auxiliary substances (minimizar el uso de auxiliares).
- 10.- E-factor, maximise feed in product [desarrollo de procesos eficaces, E-factor = Residuos (kg) / Producto (kg)].
- 11.- Low toxicity of chemical products (sintetizar productos de baja toxicidad).
12. Yes, it is safe (química segura).

Para conseguir dicha productividad y debido a la importancia que presenta la quiralidad en la química médica, la pureza enantiomérica de los productos finales es un objetivo para un gran número de los procesos industriales. Las biotransformaciones ofrecen nuevas posibilidades para preparar moléculas quirales, existiendo además la posibilidad de combinar bio- y quimiocatálisis en procesos “one-pot”, como ocurre en las resoluciones cinéticas dinámicas, las cuales permiten acceder a partir de una mezcla racémica a rendimientos teóricos del 100% de un enantiómero,¹⁴ eliminando así la limitación inherente a los procesos de resoluciones cinéticas clásicas, donde solo un 50% de cada enantiómero es accesible.¹⁵

1.5. BIOCATALIZADORES: ASPECTOS CINÉTICOS Y SELECTIVIDAD

La cinética enzimática es el estudio del comportamiento de las enzimas en su unión a sustratos, transformándolos en productos. Se han descrito los mecanismos de actuación de muchas enzimas, basados en los resultados de estudios cinéticos, químicos y estructurales, sin embargo, todavía son motivo de debate los mecanismos que utilizan algunas enzimas para producir aumentos tan espectaculares en las velocidades de reacción, estando en algunos casos en el intervalo de 10^8 a 10^{15} con respecto a la reacción no catalizada.

¹⁴ (a) A. Caiazzo, P. M. L. García, R. Wever, J. C. M. van Hest, A. E. Rowan, J. N. H. Reek, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2926-2932; (b) A. C. Marr, S. Liu, *Trends Biotechnol.* **2011**, 29, 199-204.

¹⁵ (a) J. H. Lee, K. Han, M-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015; (b) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2011**, 67, 3769-3802.

La mayoría de las reacciones enzimáticas se explican hoy en día por el modelo de Michaelis-Menten, el cual propone un mecanismo en dos etapas:

- En la primera el sustrato se une de forma reversible a la enzima, formando el complejo enzima-sustrato, también denominado complejo de Michaelis
- En una segunda etapa la enzima cataliza la reacción y libera el producto.

La ecuación cinética propuesta se muestra a continuación (Ecuación 1), en la que K_M es la constante de Michaelis y k_{cat} refleja la constante catalítica.

$$v = \frac{k_{cat} [E]_0 [S]}{[S] + K_M}$$

Ecuación 1

En una resolución cinética irreversible, la velocidad de reacción de cada enantiómero varía con el grado de conversión y el tiempo, y con ello el valor de sus excesos enantioméricos tanto para el sustrato (ee_s) como para el producto (ee_p). Por ello se hace necesario definir un nuevo término que relaciona las constantes de especificidad de ambos enantiómeros, ésta es la razón enantiomérica (E), propiedad intrínseca de la enzima que relaciona las velocidades de reacción de ambos enantiómeros con sus concentraciones (Ecuación 2).⁵ El valor de la razón enantiomérica en una resolución enzimática puede variar entre 1 (reacción no selectiva) y $+\infty$ (reacción completamente selectiva), considerándose valores de $E > 200$ como exitosos en un proceso enzimático.

$$E = \frac{(k_{cat} / K_M)_R}{(k_{cat} / K_M)_S}$$

Ecuación 2

Para calcular el valor de la razón enantiomérica se suele utilizar la Ecuación 3, que la relaciona con los excesos enantioméricos de sustrato y de producto, los cuales son generalmente fáciles de medir experimentalmente, empleando las técnicas de HPLC o cromatografía de gases usando columnas de relleno quiral. Por otra parte también se puede utilizar la medida de la E en función de la conversión y los excesos enantioméricos, pero es menos utilizada debido a que pueden existir reacciones laterales que falsearían los datos obtenidos mediante la Ecuación 3.

$$E = \frac{\ln [(1-c)(1-ee_s)]}{\ln [(1-c)(1+ee_s)]} \quad E = \frac{\ln [1-c(1+ee_p)]}{\ln [1-c(1-ee_p)]} \quad E = \frac{\ln \left[\frac{1-ee_s}{1+ee_s/ee_p} \right]}{\ln \left[\frac{1+ee_s}{1+ee_s/ee_p} \right]}$$

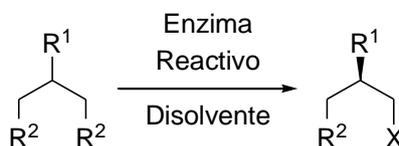
Ecuación 3

Por último la medida de los ee_s y ee_p permite obtener el valor de la conversión del proceso enzimático (c), siempre y cuando el producto de partida esté en forma racémica (Ecuación 4).

$$c = \frac{ee_s}{ee_p + ee_s}$$

Ecuación 4**1.5.1. MEDIDA DE LA RAZÓN ENANTIMÉRICA EN LOS PROCESOS DE DESIMETRIZACIÓN**

Hasta este momento se han considerado procesos de resolución cinética clásica o dinámica, donde se emplean compuestos racémicos como materiales de partida. Debido a que el objetivo de este trabajo de investigación es el desarrollo de procesos de desimetrización enzimática de *meso*-diaminas, nos detendremos en este momento en este tipo de procesos de desimetrización, los cuales son sólo aplicables a compuestos proquirales o formas *meso*, y no a mezclas racémicas. Todos ellos se basan en la realización de una modificación que elimina uno o más elementos de simetría del sustrato. Al realizar un proceso de desimetrización se puede llegar por tanto a rendimientos máximos del 100% (Esquema 1).



Esquema 1. Esquema general del proceso de desimetrización enzimática de compuestos proquirales o formas *meso*

Las desimetrizaciones enzimáticas hacen uso por tanto de su capacidad para discriminar entre los grupos o caras enantiotópicas de un sustrato proquiral o *meso*.¹⁶

¹⁶ E. Schoffers, A. Golbiowski, C. R. Johnson, *Tetrahedron* **1996**, 52, 3769-3826.

Centrándonos en las hidrolasas, este tipo de metodología ha sido aplicada con éxito a una gran variedad de sustratos, como pueden ser derivados carboxílicos (ácidos, ésteres y nitrilos), dioles y en menor medida con diaminas.¹⁷ Debido a que en este caso no se parte de mezclas racémicas, la ecuación de la razón enantiomérica viene dada única y exclusivamente por el valor del exceso enantiomérico de producto (ee_p), y la fórmula se muestra en la Ecuación 5. Sin embargo, en este tipo de procesos a menudo en lugar de usar el valor de E , se usa directamente el valor de ee_p como reflejo más simple de lo que ocurre en el proceso enzimático. Esto es posible gracias a que el ee_p permanece constante en el tiempo durante toda la reacción, siempre que la reacción sea irreversible.

$$E = \frac{1+ee_p}{1-ee_p}$$

Ecuación 5

1.6. HIDROLASAS

Son las enzimas más empleados hoy en día debido a su fácil manejo, bajo precio con respecto a otros catalizadores enzimáticos y a que no necesitan coenzima para su correcto funcionamiento. Si bien su función natural es la hidrólisis de ácidos grasos y lípidos, pueden catalizar muy diversas reacciones tanto, de hidrólisis como de síntesis, transformando sustratos de naturaleza muy variada, tanto en medios acuosos como anhidros.

1.6.1. LIPASAS

Dentro de la clase de las hidrolasas destacan las lipasas debido a su gran versatilidad sintética, siendo sin lugar a dudas la familia de enzimas más utilizada en síntesis orgánica. Su función natural es la de hidrolizar ésteres insolubles en agua como por ejemplo: mono-, di o triacilglicerol. Como otras hidrolasas, entre sus mayores ventajas se puede destacar que presentan una gran actividad en disolventes no acuosos, propiedad que las hace muy interesantes de cara a su uso en procesos industriales especialmente dentro del sector farmacéutico, alimentario o textil.

¹⁷ E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180 (*Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354).

Tradicionalmente las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A), la de tipo B (CAL-B), así como la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, han permitido desarrollar procesos asimétricos que involucran la modificación selectiva de compuestos nitrogenados, por ello parece conveniente llevar a cabo una breve descripción de su origen, estructura y propiedades a este punto.

En el caso de la CAL-A y la CAL-B, ambas enzimas fueron descubiertas en los años 60, por una expedición japonesa a la Antártida, la cual buscaba enzimas que pudieran actuar en condiciones extremas. Así, fueron aisladas de la levadura de *Candida antarctica* encontrada en los sedimentos del lago Vanda, las cuales fueron posteriormente purificadas, clonadas y caracterizadas para ser hoy en día comercializarlas por diversas casas comerciales.

1.6.1.1. Lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A)

Es una proteína monomérica de aproximadamente 431 aminoácidos cuyo pH óptimo es de 7, habiéndose descrito su estructura tridimensional mediante análisis de difracción de rayos X (Figura 1).¹⁸

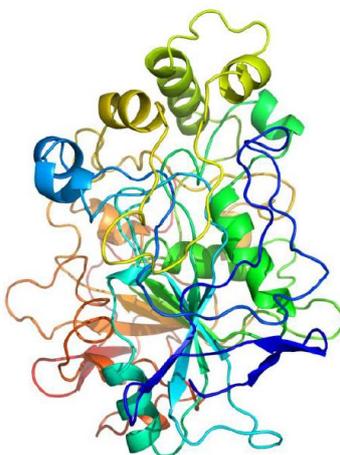


Figura 1. Estructura tridimensional de la lipasa de *Candida antarctica* de tipo A

Entre las propiedades de esta enzima, destaca la elevada estabilidad térmica, habiéndose descrito reacciones a temperaturas cercanas a los 90 °C y una elevada

¹⁸ D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, S. L. Mowbray, *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, 109-119.

afinidad por sustratos muy impedidos como pueden ser aminas secundarias o alcoholes terciarios.¹⁹

1.6.1.2. Lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B)

Es una proteína globular pequeña de aproximadamente 317 aminoácidos, que adopta una conformación tridimensional conocida como pliegue de la hidrolasa. La estructura de esta enzima, ha sido estudiada ampliamente mediante análisis de difracción de rayos X (Figura 2),²⁰ revelando que no presenta casi activación interfacial, posee baja actividad tanto hacia triglicéridos como a ácidos grasos de cadena larga y además presenta una menor estabilidad térmica, respecto a la CAL-A. Esta lipasa se puede obtener en forma de distintos preparados que sólo se diferencian entre si en la forma de inmovilizar la enzima.

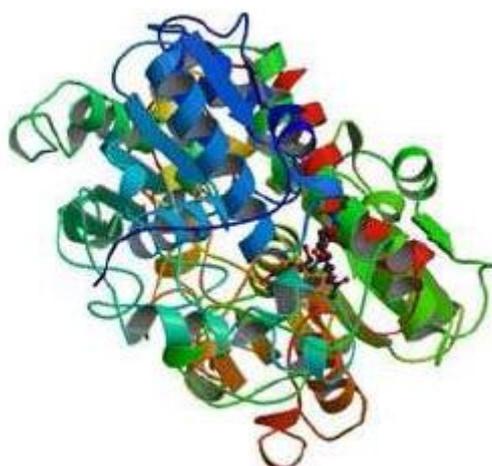


Figura 2. Estructura tridimensional de la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B

En este trabajo se utilizará la enzima comercializada por la empresa Novozymes, en su forma “Novozyme 435”, puesto que presenta unas limitaciones difusionales mínimas y al estar inmovilizada sobre una resina polimérica su recuperación es sencilla a través de un simple filtrado una vez terminada la reacción. Su aplicación a la preparación de derivados nitrogenados ha sido ampliamente estudiada, siendo considerado uno de los

¹⁹ P. Domínguez de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 36-46.

²⁰ (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; (c) J. Uppenberg, N. Öhmer, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T. A. Jones, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838-16851.

catalizadores más eficientes para la preparación de aminas, amidas y carbamatos en forma ópticamente activa.²¹

1.6.1.3. Lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL)

Es una hidrolasa serínica, cuya estructura tridimensional ha sido elucidada mediante análisis de difracción de rayos-X (Figura 3), presentando la típica estructura de pliegues α/β presente en otras hidrolasas. Esta formada por 320 aminoácidos y con un peso molecular de 34 kDa, al contrario que la CAL-B muestra una conformación abierta en ausencia de inhibidor.

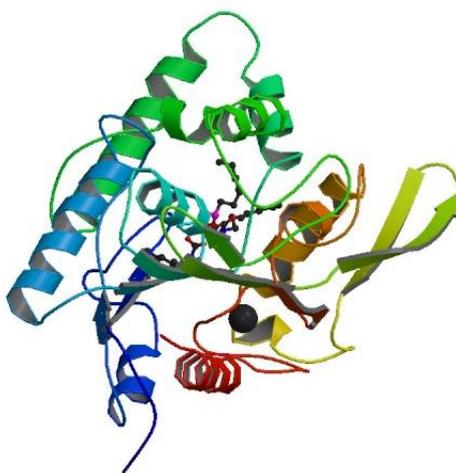


Figura 3. Estructura tridimensional de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*

Esta lipasa ha sido ampliamente utilizada en la resolución de alcoholes secundarios mediante procesos de acilación o hidrólisis,²² en la preparación de β -aminoácidos a través de procesos de aminólisis,²³ además de en la resolución y desimetrización de alcoholes primarios donde, ha mostrado una elevada selectividad comparándola con otras lipasas.

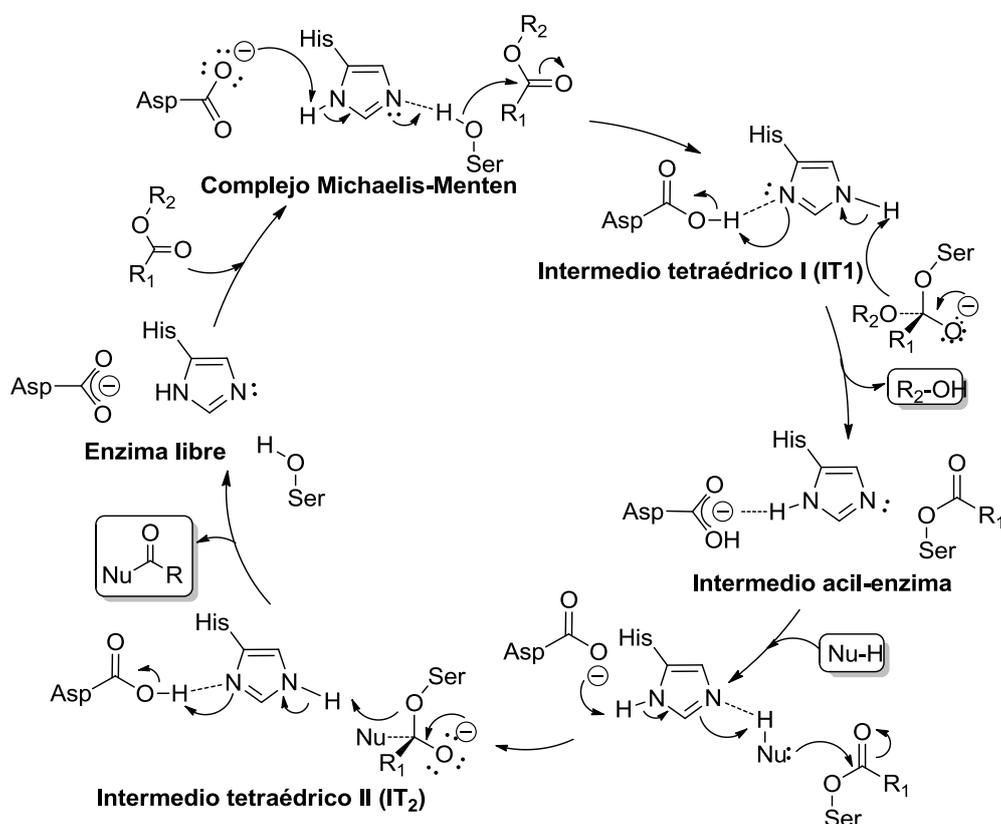
²¹ V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.

²² (a) M. Bucciarelli, P. Davoli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2489-2494; (b) A. Kamal, M. Sandbhor, K.V. Ramana, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 815-820. (c) A. Kirschner, P. Langer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2871-2874.

²³ A. Liljeblad, L. T. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854.

1.6.2. ASPECTOS MECANÍSTICOS

Las lipasas contienen en su centro activo un conjunto de tres α -aminoácidos denominado *triada catalítica*: ácido aspártico (Asp), histidina (His) y serina (Ser), los cuales determinan su modo de actuación mediante el mecanismo de las *serín-hidrolasas* que se detalla en el esquema 2. Los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de estos tres aminoácidos son claves en la transformación del sustrato a producto. Así, en un primer paso tiene lugar la formación del intermedio tetraédrico I (IT₁), para lo cual enzima y sustrato se asocian de forma covalente. El aspartato facilita la desprotonación de la serina a través de los protones de la histidina, produciéndose así el ataque del grupo hidroxilo de la serina al grupo carbonilo del sustrato.



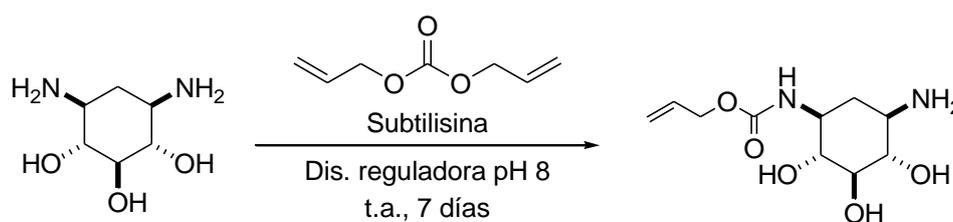
Esquema 2. Mecanismo de las serín-hidrolasas

En el paso siguiente, el protón del imidazol actúa como catalizador ácido facilitando la liberación del grupo saliente que se pierde como alcohol, el resultado es un intermedio covalente (acil-enzima). A continuación, tiene lugar el ataque del nucleófilo sobre el carbonilo del intermedio acil-enzima formándose el denominado IT₂. El ciclo se completa por descomposición de este último intermedio tetraédrico, liberándose el producto y regenerándose el catalizador, es decir, el enzima libre.

1.7. DESIMETRIZACIONES ENZIMÁTICA DE DIAMINAS

Esta familia de compuestos forma parte del esqueleto estructural de numerosos productos naturales y compuestos bioactivos,²⁴ además de servir como precursores sintéticos de un gran número de derivados nitrogenados con importantes aplicaciones en el campo de la química médica²⁵ o la química de materiales.²⁶ De forma relevante las diaminas ópticamente activas presentan un gran abanico de posibilidades en síntesis asimétrica especialmente, como auxiliares quirales y como ligandos.²⁷ Por otro lado, la presencia de dos grupos aminos en su estructura da lugar a múltiples posibilidades en cuanto a su funcionalización, ventaja que ha sido aprovechada para la preparación de estructuras macrocíclicas,²⁸ las cuales han sido empleadas con éxito en diversas aplicaciones como agentes de solvatación quirales o receptores aniónicos entre otras.²⁹

Si bien la resolución enzimática de aminas quirales ha sido ampliamente estudiada en la literatura,³⁰ los ejemplos existentes en la bibliografía sobre las desimetrizaciones de diaminas son muy escasos, limitándose única y exclusivamente a la preparación de carbamatos en forma ópticamente activa. Así, Wong y colaboradores describieron por primera vez la desimetrización de una diamina, usando una proteasa como es la subtilisina para catalizar de forma mono- y estereoselectiva la reacción de alcoxicarbonilación de la diamina con el carbonato de dialilo, empleando una disolución reguladora como medio de reacción (Esquema 3).³¹



²⁴ (a) G. F. Busscher, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 775; (b) S. R. S. S. Kotti, C. Timmons, G. Li, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 101-114.

²⁵ R. A. Casero Jr., P. M. Woster, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4551-4573.

²⁶ X. Huang, M. Roushan, T. J. Emge, W. Bi, S. Thiagarajan, J. Cheng, R. Yang, J. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7871-7874.

²⁷ (a) C. Anaya de Parodi, E. Juaristi, *Synlett* **2006**, 2699-2715; (b) J.-C. Kizirian, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 140-205; (c) F. Cardona, A. Goti, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 269-275; (d) J. González-Sabín, F. Rebolledo, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1916-1925; (e) D. S. Surry, S. L. Buchwald, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 13-31.

²⁸ I. Alfonso, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2008**, *5*, 33-46.

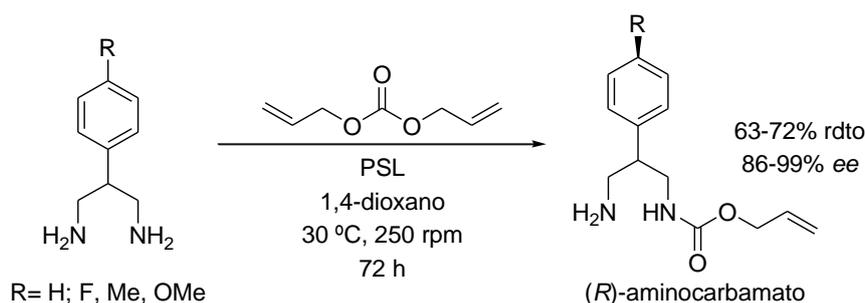
²⁹ I. Alfonso, *Curr. Org. Synth.* **2010**, *7*, 1-23.

³⁰ (a) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197; (b) V. Gotor-Fernández, F. Rebolledo, V. Gotor, "Preparation of Chiral Pharmaceuticals through Enzymatic Acylation of Alcohols and Amines" en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. Ed. R. M. Patel. Capítulo 7, 203-248. Taylor and Francis. New York (USA). **2007**.

³¹ B. Orsat, P. B. Alper, W. Moree, C. Mak, C. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 712-713.

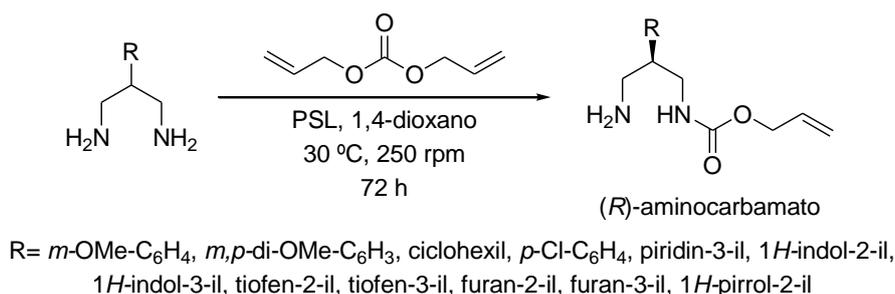
Esquema 3. Desimetrización de una diamina en medio acuoso empleando carbonato de dialilo y la subtilisina como enzima

Nuestro grupo de investigación ha trabajado activamente en este campo, habiendo descrito por primera vez la desimetrización de diaminas en un medio completamente anhidro, siendo la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL) un biocatalizador muy eficiente que permitió obtener, tras reacción con el carbonato de dialilo en 1,4-dioxano, una serie de monocarbamatos de alilo derivados de 2-aril-1,3-propanodiaminas con buenos rendimientos y excesos enantioméricos entre altos y excelentes (Esquema 4).³²



Esquema 4. Desimetrización de 1,3-propanodiaminas en medio orgánico usando PSL como biocatalizador y carbonato de dialilo como agente alcoxycarbonilante

Años más tarde se llevó a cabo la extensión exitosa de esta metodología a 2-aril-1,3-propanodiaminas con distintos patrones de sustitución en el anillo aromático, como mono-, di- o trisustituciones del grupo fenilo, además de sustituciones alifáticas de la posición 2 como el grupo bencilo o el ciclohexilo (Esquema 5),³³ siendo posible incluso la preparación de una triamina ópticamente activa y ortogonalmente protegida.³⁴



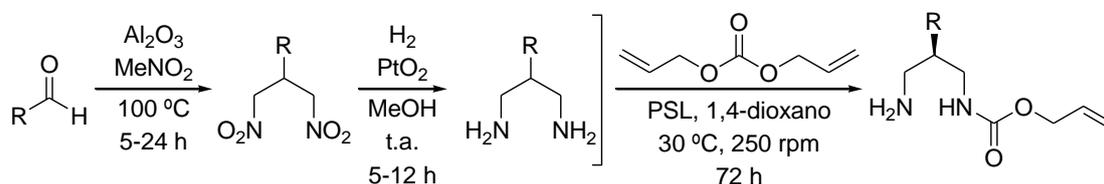
Esquema 5. Desimetrización enzimática de 2-aril- y 2-alkil-propano-1,3-diaminas a través de procesos de alcoxycarbonilación catalizados por la PSL

³² E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4203-4206.

³³ (a) E. García-Urdiales, N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2875-2883; (b) N. Ríos-Lombardía, E. Busto, E. García-Urdiales, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 22571-2574.

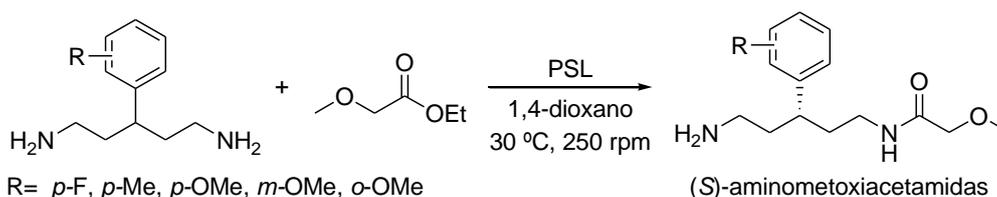
³⁴ E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8393-8401.

Finalmente en el campo de las 1,3-propanodiaminas, se describió una manera sencilla, directa y eficaz para la preparación de 2-heteroaril-1,3-propandiaminas a partir de los correspondientes aldehídos, en una ruta compuesta por dos pasos de reacción que involucra la formación de los correspondientes nitrocompuestos (Esquema 6).³⁵



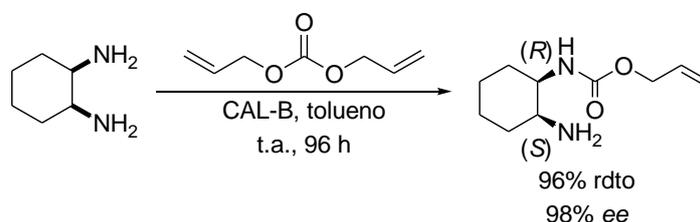
Esquema 6. Síntesis de 2-heteroaril-propano-1,3-diaminas y posterior desimetrización con PSL y carbonato de dialilo en 1,4-dioxano

Por último, se ha descrito recientemente la desimetrización enzimática de 3-aril-1,5-pentanodiaminas catalizada por la PSL-C, donde en este caso las mejores selectividades se encontraron para la formación de las correspondientes (*S*)-metoxiacetamidas en lugar de monocarbamatos de alilo, empleando para ello el metoxiacetato de etilo como agente acilante y el 1,4-dioxano como disolvente (Esquema 7).³⁶



Esquema 7. Desimetrización enzimática de 3-aril-1,5-pentanodiaminas mediante procesos de acilación con metoxiacetato de etilo y catalizados por la PSL-C

Recientemente Berkessel y colaboradores han descrito la desimetrización de *cis*-1,2-ciclohexanodiamina usando carbonato de dialilo como agente alcoxycarbonilante y CAL-B como biocatalizador en tolueno como disolvente (Esquema 8).³⁷



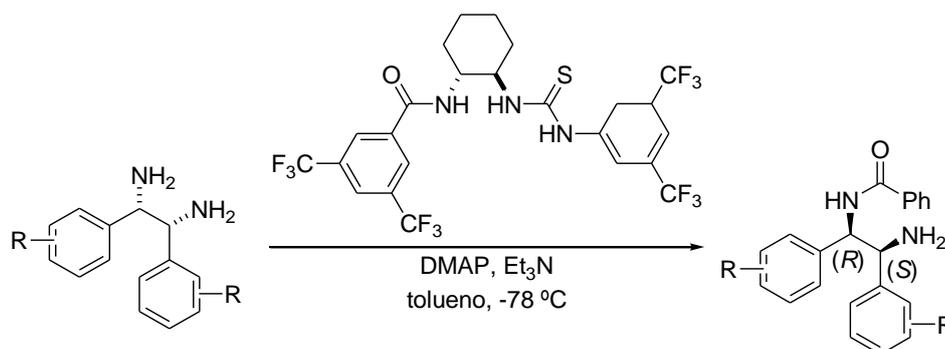
Esquema 8. Desimetrización de *cis*-1,2-ciclohexanodiamina catalizada por la CAL-B

³⁵ N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 484-493.

³⁶ N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5709-5718.

³⁷ A. Berkessel, M.-C. Ong, J.-M. Neudörfl, *ChemCatChem* **2010**, 2, 1215-1218.

La asimetrización de *meso*-diaminas ha sido mucho menos estudiada en comparación con la modificación selectiva de diaminas proquirales, limitándose a su acilación enantioselectiva con anhídrido benzoico y usando como catalizador un derivado de tipo tiourea de la 1,2-ciclohexanodiamina, y aislando las correspondientes monoamidas con elevados excesos enantioméricos y buenos rendimientos (Esquema 9).³⁸



Esquema 9. Desimetrización catalítica enantioselectiva de *meso*-diaminas empleando catalizadores quirales de tipo tiourea

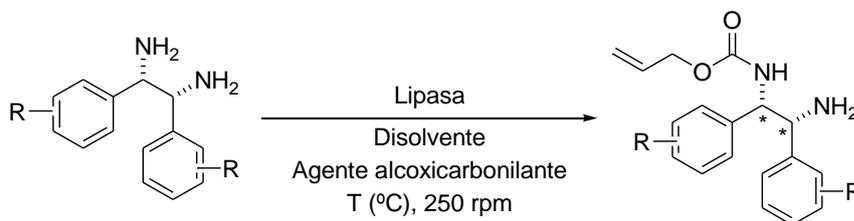
Por tanto en este trabajo de investigación, nos hemos planteado como reto el desarrollo de un proceso enzimático para la desimetrización enzimática de *meso*-1,2-diaminas, donde se intentará llevar a cabo una optimización de todos los parámetros que afectan a la catálisis enzimática.

³⁸ C. K. De, D. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14538-14541.

2. OBJETIVOS

En la introducción de este trabajo se ha puesto de manifiesto la creciente importancia de las biotransformaciones en aplicaciones sintéticas orgánicas, así como las interesantes aplicaciones que presentan las meso-diaminas en diversos ámbitos de la química como la catálisis y la química médica. Aprovechando la experiencia de nuestro grupo de investigación en el desarrollo de procesos enzimáticos enantioselectivos de desimetrización enzimática de diaminas, nos hemos propuesto como objetivos en este trabajo:

- Diseñar una estrategia sintética general y directa para la preparación de una serie de meso-1,2-diaminas.
- Sintetizar los correspondientes monocarbamatos racémicos, que serán los productos finales de las reacciones enzimáticas.
- Desarrollar métodos de HPLC empleando columnas de relleno quiral, tanto para el seguimiento de las biotransformaciones en tiempo real, como para poder medir los excesos enantioméricos de los monocarbamatos en caso de que los procesos ocurrieran de un modo asimétrico.
- Llevar a cabo la desimetrización enzimática de una serie de meso-1,2-diaminas, optimizando las condiciones de reacción en términos de enzima, agente de alcoxicarbonilación, disolvente y concentración de los reactivos, con el fin de acceder a una serie de monocarbamatos en forma enantioméricamente pura.



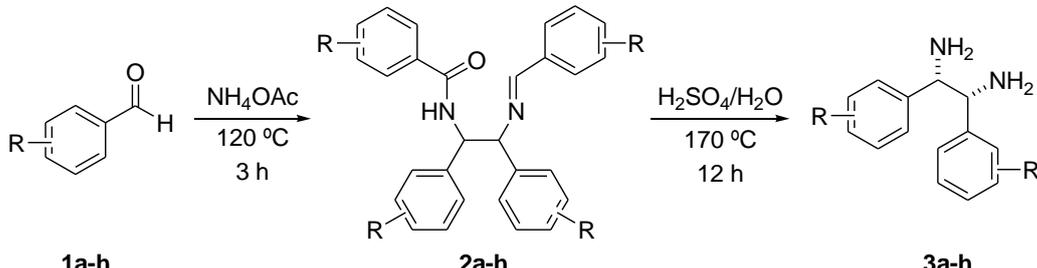
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la introducción de este trabajo ha quedado de manifiesto la importancia de la catálisis enzimática en síntesis orgánica, así como el creciente interés en la preparación de compuestos orgánicos nitrogenados en forma ópticamente activa, los cuales poseen gran importancia por ser estructuras recurrentes en muy diversos productos naturales, así como por presentar interesantes aplicaciones en química farmacéutica y en catálisis asimétrica. Por ello, en primer lugar se llevará a cabo el desarrollo de un proceso directo y general para la preparación de una serie de *meso*-1,2-diaminas, cuyos procesos de desimetrización catalizados con lipasa se estudiarán posteriormente en detalle.

4.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE LAS MESO-1,2-DIAMINAS 3a-h

Adaptando procesos descritos en la bibliografía, se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de síntesis de diferentes *meso*-1,2-diaminas,⁴⁰ por reacción entre distintos benzaldehídos **1a-h** y acetato amónico (NH₄OAc) a 120 °C, seguido por una posterior hidrólisis ácida a 170 °C del correspondiente intermedio **2a-h** formado (Tabla 2).

Tabla 2. Síntesis química de las *meso*-1,2-diaminas **3a-h** a partir de los correspondientes benzaldehídos **1a-h**

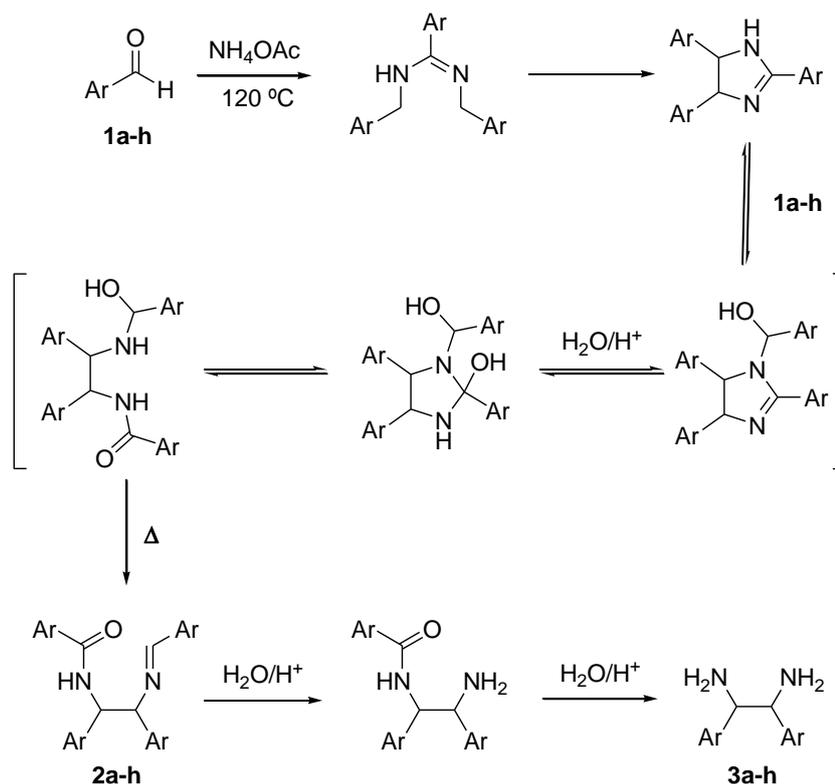


Entrada	Aldehído	R	Diamina 3a-h (%) ^a
1	1a	H	42
2	1b	4-F	90
3	1c	4-Cl	98
4	1d	4-Br	40
5	1e	4-Me	70
6	1f	3-Me	78
7	1g	3-Br	96
8	1h	2-Br	60

^a Rendimientos aislados de las diaminas **3a-h**

De esta manera ha sido posible la preparación de ocho *meso*-1,2-diaminas, las cuales se diferencian en la sustitución presente en el anillo aromático, siendo esta un átomo de halógeno (flour, cloro o bromo) o bien un grupo metilo. Los rendimientos van de moderados a excelentes (40-96%), teniendo además en cuenta que en el mecanismo que se detalla en el Esquema 10, por cada cuatro moléculas de aldehído consumidas solo dos se incorporan a la diamina final.

⁴⁰ (a) M. V. Proskurnina, N. A. Lozinskaya, S. E. Tkachenko, N. S. Zefirov, *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, 38, 1149-1153; (b) S. Chamoin, H.-J. Roth, J. Zimmermann, T. Zoller, PCT Int. Appl. 2008/065068, PCT/EP2007/062804.



Esquema 10. Mecanismo para la formación de las *meso*-diaminas **3a-h**

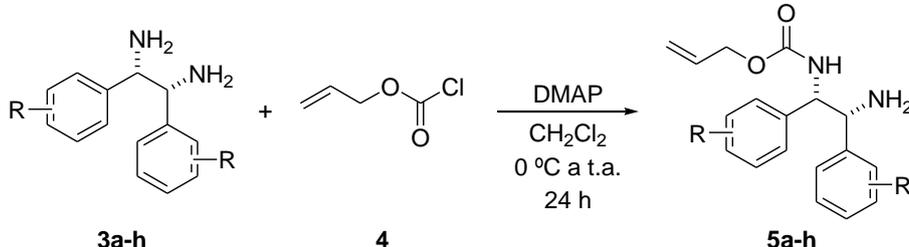
El mecanismo propuesto para esta reacción transcurre a través de la formación de un intermedio iminio, por condensación entre el acetato amónico y el correspondiente benzaldehído **1a-h**. Posteriormente se producen dos condensaciones más con sendas moléculas de aldehído, generándose un intermedio que da lugar a una ciclación favorecida a altas temperaturas, seguida por el ataque de otra molécula de aldehído, formándose el intermedio **2a-h** que en presencia de agua y medio ácido evoluciona hacia la aparición de la correspondiente *meso*-diamina **3a-h**.

4.2. SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS MONOCARBAMATOS RACÉMICOS **5a-h**

Con el fin de poder seguir el transcurso de las reacciones enzimáticas por la técnica analítica de HPLC, y empleando columnas de relleno quiral para medir los excesos enantioméricos de los productos finales, se llevó a cabo la síntesis de los monocarbamatos racémicos **5a-h**. Para lo cual, la correspondiente diamina **3a-h** se disolvió en diclorometano, y se hizo reaccionar inicialmente a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y posteriormente a temperatura ambiente, con la 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) y el cloroformiato de alilo (**4**), aislando los correspondientes monocarbamatos con

rendimientos entre bajos y altos (29-75%, Tabla 3). Cabe destacar que a excepción de las reacciones con las diaminas **3e** y **3g** (entradas 5 y 7), en que se observó algún producto de descomposición para **3e** y problemas de purificación en el caso de **3g**, todos los procesos condujeron a la formación del correspondiente monocarbamato **5a-h** como producto final, no detectando en ningún caso la formación de los correspondientes dicarbamatos por reacción de carbamoilación de ambos grupos amino de la molécula. Esto puede ser debido, a que los monocarbamatos, una vez formados, se estabilizan por puentes de hidrógeno entre su grupo amino libre y el carbonilo del carbamato formado.

Tabla 3. Síntesis química de los monocarbamatos **5a-h** por carbamoilación de las diaminas **3a-h** a temperatura ambiente con cloroformiato de alilo (**4**) y en presencia de DMAP



Diamina	R	Monocarbamato 5a-h (%) ^a
3a	H	75
3b	4-F	55
3c	4-Cl	54
3d	4-Br	59
3e	4-Me	29
3f	3-Me	46
3g	3-Br	30
3h	2-Br	61

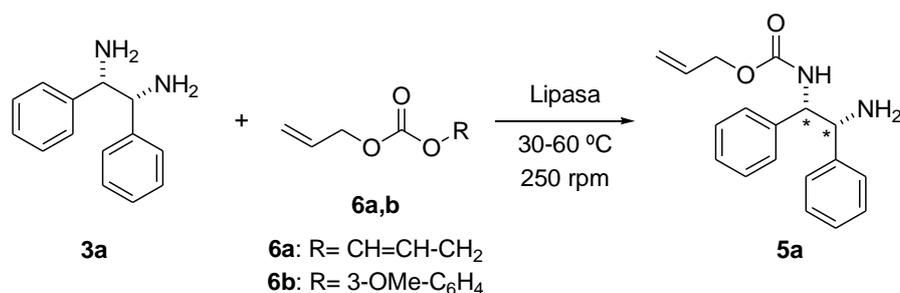
^a Rendimientos aislados de los monocarbamatos **5a-h** tras cromatografía de columna en gel de sílice

4.3. DESIMETRIZACION ENZIMÁTICA DE *MESO*-DIAMINAS

Una vez sintetizadas las diferentes *meso*-1,2-diaminas **3a-h**, se estudió su reacción de desimetrización enzimática para lo cual se eligió como sustrato modelo la *meso*-1,2-difeniletano-1,2-diamina (**3a**) debido a su accesibilidad comercial. Con este objetivo se emplearon diversas lipasas, carbonatos y disolventes en procesos de alcoxicarbonilación.

4.3.1. DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE MESO-1,2-DIFENILETANO-1,2-DIAMINA (3a)

Tomando como base los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación para la alcoxicarbonilación enzimática de la diamina proquiral 2-fenil-1,3-propanodiamina,³² es decir, un equivalente de carbonato de dialilo (**6a**) y 1,4-dioxano como disolvente para una concentración total de la diamina **3a** de 0.1 M (Esquema 11), no se observó la formación del carbamato **5a** con ninguna de las enzimas probadas: lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A), lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B), lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa de páncreas porcino (PPL), lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada en diatomita (PSL-IM) o bien en soporte cerámico (PSL-C I), lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* y la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RM).



Esquema 11. Esquema general de desimetrización enzimática de la diamina **3a** con carbonatos de alilo y diferentes lipasas

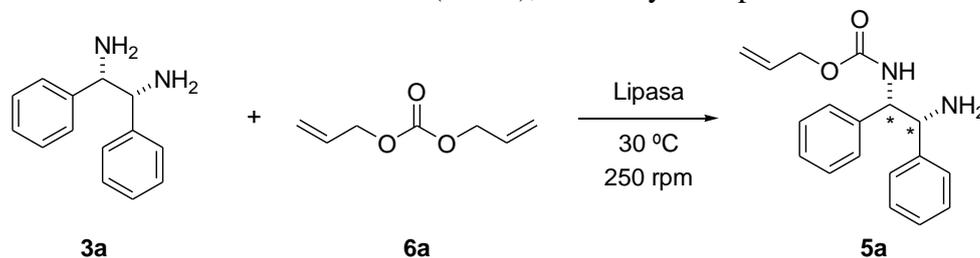
Visto la nula reactividad presentada por la diamina **5a** en la reacción de alcoxicarbonilación con distintas lipasas y el carbonato de dialilo (**6a**), se decidió emplear un carbonato más reactivo como es el carbonato mixto de alilo y 3-metoxifenilo (**6b**), el cual ha permitido alcanzar excelentes conversiones en el caso de la resolución cinética clásica de aminas secundarias cíclicas.⁴¹ Así, empleando un exceso del carbonato **6b** (2.5 equiv.), se estudió el comportamiento de las mismas lipasas probadas anteriormente, encontrando tras 38 h únicamente una pequeña conversión en el carbamato **5a** cuando se empleó la CAL-A, aislando éste con un 13% de rendimiento y un exceso enantiomérico del 52%.

A este punto y para aumentar la conversión de los procesos enzimáticos se decidió emplear el propio agente alcoxicarbonilante como disolvente de la reacción,

⁴¹ (a) G. F. Breen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1427-1430; (b) V. Gotor-Fernández, P. Fernández-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2558-2564.

para ello inicialmente se eligió el carbonato de dialilo (**6a**) por su accesibilidad comercial, y los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Reacción de desimetrización enzimática de la diamina **3a** empleando carbonato de dialilo como disolvente (0.1 M), a 30 °C y 250 rpm



Entrada	Enzima ^a	t (h)	c (%) ^b	ee (%) ^c
1	CAL-A	62	56	86
2	CAL-B	38	<3	>99
3	CRL	38	<3	10
4	PPL	38	----	----
5	PSL-C I	38	----	----
6	AK	38	----	----
7	RM	62	5	82

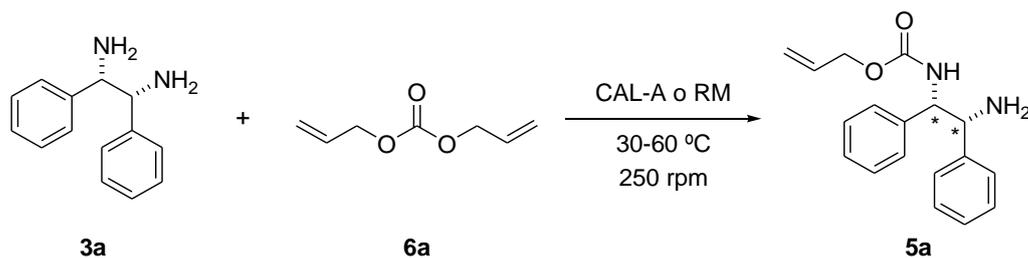
^a Relación en peso de enzima:diamina: 1:1.

^b Conversiones medidas por ¹H-RMN del crudo de reacción.

^c Excesos enantioméricos del monocarbamato **5a** medidos por HPLC.

En términos de reactividad, la única enzima que permitió alcanzar buenos resultados fue la CAL-A, formándose el monocarbamato **5a** con un 56% de conversión y un destacable 86% *ee* tras 62 h de reacción (entrada 1). En los demás casos sólo se observó un 5% de conversión para la lipasa RM (entrada 8), y trazas del monocarbamato para el caso de la CAL-B y la CRL (entradas 2 y 3), observándose para la primera de ellas únicamente un enantiómero del carbamato **5a**. Tomando los resultados alcanzados para la CAL-A, como punto de partida para una optimización de las condiciones de reacción de alcoxicarbonilación de la diamina **3a**, se decidió variar la temperatura y aumentar la cantidad de enzima con respecto al sustrato. Los resultados más significativos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Reacción de desimetrización enzimática de la diamina **3a** con el carbonato de dialilo como disolvente (0.1 M), distintas enzimas y diferentes temperaturas a 250 rpm



Entrada	Enzima	Relación enzima:diamina ^a	T (°C)	t (h)	c (%) ^b	ee (%) ^c
1	CAL-A	1:1	30	63	56	86
2	CAL-A	1:1	45	63	91	88
3	CAL-A	1:1	60	14	70	78
4	CAL-A	2:1	45	62	>97 (82)	88
5	RM	1:1	30	62	5	82
6	RM	1:1	60	38	11	51

^a Relación en peso de enzima:diamina.

^b Conversiones medidas por ¹H-RMN del crudo de la reacción enzimática. Rendimientos aislados del monocarbamato **5a** tras cromatografía de columna en gel de sílice.

^c Exceso enantiomérico del monocarbamato **5a** determinado por HPLC

En el caso de la CAL-A se observó que un aumento de la temperatura hasta 45 °C permite aumentar de manera significativa la conversión (56 a 91% tras 63 h), manteniéndose la selectividad de los procesos (88% *ee*, entrada 2), sin embargo a 60 °C se observa un descenso destacado de la pureza óptica del producto **5a** tras 14 h de reacción (78% *ee*, entrada 3). Un aumento de la cantidad de enzima permitió acceder al aminocarbamato **5a** como único producto de reacción y con un 88% *ee* (entrada 4). En el caso de la RM, un aumento drástico de la temperatura llevó a un descenso de la selectividad del proceso, aumentando hasta un 11% la conversión tras 38 h de reacción (entradas 5 y 6).

4.3.2. DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE *MESO*-1,2-DIARILETANO-1,2-DIAMINAS **3b-h**

A continuación, se decidió extender el estudio de desimetrización enzimática a otras *meso*-1,2-diaminas, tomando como partida las mejores condiciones de reacción

encontradas para la diamina **5a**, esto es una relación CAL-A: diamina de (2:1), carbonato de dialilo como disolvente y 45 °C, encontrándose en la Tabla 6 los resultados obtenidos. En todos los casos se observaron menores conversiones que en el caso de la diamina **3a**, detectando exclusivamente la formación del correspondiente monocarbamato como producto final de la reacción.

Tabla 6. Desimetrización enzimática de las diaminas **3a-h** con el carbonato de dialilo como disolvente (0.1 M), la CAL-A como biocatalizador a 45 °C y 250 rpm

	3a-h	6a			5a-h
Entrada	Diamina	R	t (h)	c (%)^a	ee (%)^b
1	3a	H	62	>97 (82)	88
2	3b	4-Me	62	44 (34)	80
3	3c	4-F	62	88 (70)	70
4	3d	4-Cl	62	58 (42)	8
5	3e	4-Br	62	56 (38)	<3
6	3f	3-Me	62	29 (16)	18
7	3g	3-Br	86	34 (31)	14
8	3h	2-Br	62	-----	----

^a Conversiones medidas por ¹H-RMN del crudo de reacción.

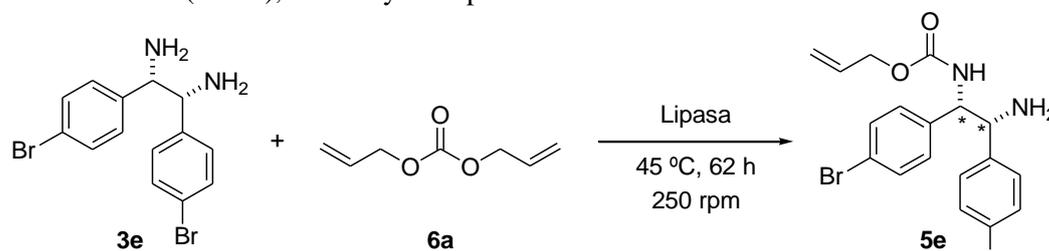
^b Excesos enantioméricos de los monocarbamatos **5a-h** determinados por HPLC.

Así, mientras que en el caso de los compuestos con sustituciones en posición 4 del anillo aromático (**3b-e**, entradas 2-5), las conversiones fueron entre moderadas y altas (44-88%), siendo esta especialmente elevada para el derivado fluorado, bajas conversiones se alcanzaron para los compuestos con sustituciones en la posición 3 (**3f,g** entradas 6 y 7), mientras que no se detectó reacción con el derivado con la sustitución bromo en la posición 2 (**3h**, entrada 8). Respecto a las selectividades alcanzadas, cabe destacar su variabilidad en función del sustrato de partida, así los mejores resultados se alcanzaron con los derivados de **3b** y **3c** (entradas 2 y 3), sustituidos en posición 4 de los anillos aromáticos con sustituyentes metilo o fluoro, cuyos monocarbamatos de alilo **5b-c** fueron aislados con excesos enantioméricos buenos entre el 70 y el 80%. Sin embargo, los procesos se mostraron mucho menos

selectivos cuando se llevaron a cabo con sustituyentes como bromo o cloro, o bien sustituidos en la posición 3 del anillo aromático (<20% *ee*, entradas 4-7).

Con el fin de encontrar mejores condiciones de reacción para las diaminas que presentan valores más bajos de conversión y de exceso enantiomérico, se decidió estudiar de nuevo el comportamiento de una serie de enzimas en las reacciones de alcoxicarbonilación. En concreto para el caso de la diamina con átomos de bromo en la posición 4 del anillo aromático (**3e**), y que había presentado una nula estereoselectividad en la reacción catalizada con la CAL-A (entrada 5 de la Tabla 6), se llevaron a cabo las reacciones en presencia de CRL, PPL, RM y CAL-B, recogiendo los datos en la Tabla 7. Así, se observaron buenas conversiones en el caso de la CAL-A (56%, entrada 1), bajas para el caso de la CAL-B (18%, entrada 5), mientras que para el resto de lipasas las conversiones fueron inferiores al 7% (entradas 2-4). Sin embargo, buenas selectividades fueron alcanzadas en el caso de la CAL-B (entrada 5), la cual permitió obtener el aminocarbamato de alilo **5e** con un 91% *ee*.

Tabla 7. Desimetrización enzimática de la diamina **3e** empleando el carbonato de dialilo como disolvente (0.1 M), a 45 °C y 250 rpm



Entrada	Enzima ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>ee</i> (%) ^c
1	CAL-A	56	<3
2	CRL	6	<3
3	PPL	3	<3
4	RM	5	50
5	CAL-B	18 (14%)	91

^a Relación enzima: diamina 1:1 en peso.

^b Conversiones medidas por ¹H-RMN del crudo de reacción.

^c Excesos enantioméricos medidos por HPLC

A la vista de las buenas selectividades mostradas por la CAL-B para este sustrato y con la idea de mejorar los excesos enantioméricos alcanzados en las reacciones

catalizadas por la CAL-A, se decidió realizar un nuevo test enzimático con todas las diaminas **3a-h** empleando una relación CAL-B: sustrato (1:1 en peso), carbonato de dialilo como disolvente y 45 °C de temperatura. Sin embargo, bajo estas condiciones, solo se observó reactividad con la diamina **3d**, con un átomo de cloro en las posición 4 de los anillos aromáticos, que permitió acceder al aminocarbamato **5d** con un 17% de conversión y un 88% *ee*.

A modo de resumen en la Figura 4, se han representado los mejores resultados obtenidos en la preparación de cada monocarbamato, en función del tiempo de reacción, el rendimiento y los excesos enantioméricos alcanzados.

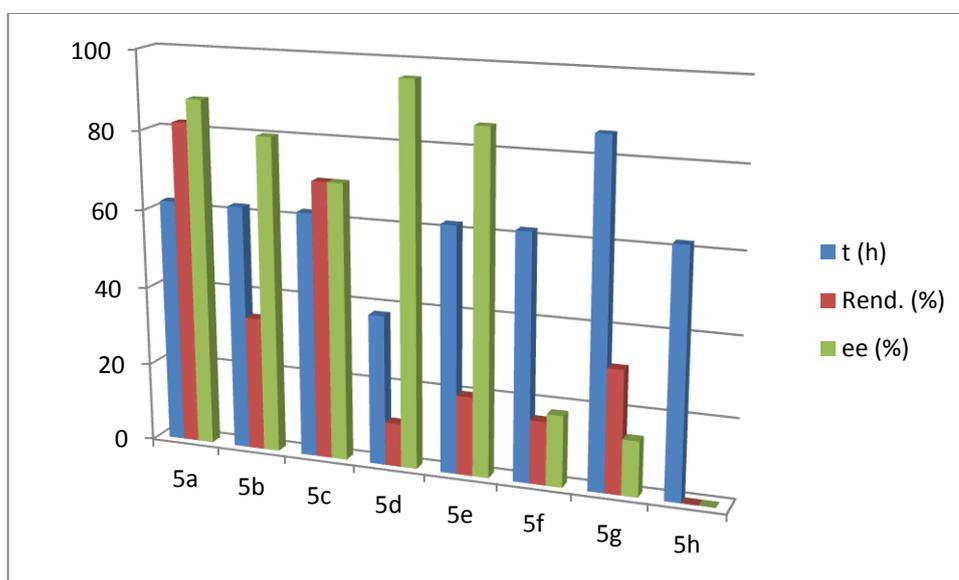


Figura 4. Resumen de los resultados obtenidos en las reacciones de desimetrización catalizadas con la CAL-A o la CAL-B en carbonato de dialilo como disolvente

Se observa con la CAL-A una mayor reactividad de las diaminas sustituidas en la posición 4 con restos poco voluminosos como fluoro o metilo, (aminocarbamatos **5a-c**), mientras los sustratos que tienen sustituyentes más voluminosos como átomos de cloro o de bromo presentan una menor reactividad (aminocarbamatos **5f-h**). Por otro lado los monocarbamatos que reaccionan preferentemente con la CAL-B (aminocarbamatos **5d,e**), si bien fueron obtenidos con bajas conversiones, sus excesos enantioméricos fueron elevados (88-91%). Por otro lado, la CAL-A permite acceder a aminocarbamatos con buenas selectividades, mejores para los anillos aromáticos con sustituyentes en *para*, en comparación con los que las tienen en posición *meta*, mientras que no reaccionan con aquellas con sustituyentes en posición

orto. Este hecho nos hace pensar que cuanto mas cerca esta el sustituyente de la posición por donde reacciona la molécula, menor es la selectividad mostrada.

4.4. ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LOS MONOCARBAMATOS OBTENIDOS

Todos los monocarbamatos **5a-g** obtenidos a través de procesos de desimetrización enzimática, no han sido descritos previamente en la bibliografía, por ello para poder determinar su configuración absoluta, nos centramos en la obtención de un derivado cristalino, y que a su vez presentará en sus estructura un átomo pesado, como es el caso del bromo en el compuesto **5e**, para determinar posteriormente su estructura por análisis de difracción de rayos X (Figura 5). Así, la recristalización de **5e**, obtenido con un 91% *ee* en la reacción enzimática, se llevo a cabo en MeCN, permitiendo aislar el aminocarbamato de configuración (*S,R*). Tentativamente, se asignó la configuración absoluta de los aminocarbamatos **5a-d,f-h** como (*S,R*) en base a su similitud estructural con el carbamato (*S,R*)-**5e**.

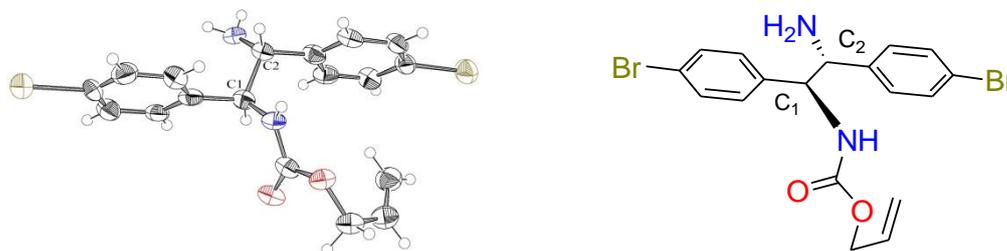


Figura 5. Estructura del aminocarbamato (*S,R*)-**5e** obtenido por desimetrización enzimática de la *meso*-1,2-diamina **3e** empleando carbonato de dialilo como disolvente y CAL-B como catalizador

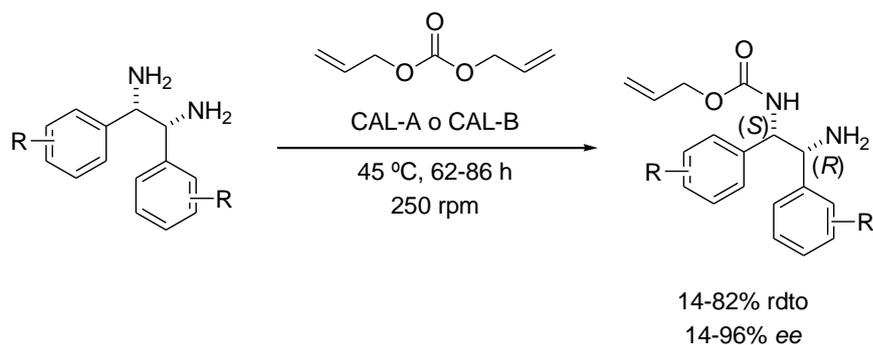
4. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se ha conseguido desarrollar una metodología de síntesis sencilla y general de una serie de meso-diaminas, las cuales difieren en el tipo de sustitución en el anillo aromático.

Una vez sintetizados los correspondientes monocarbamatos de alilo racémicos y desarrollados métodos de HPLC empleando columnas de relleno quiral, se han estudiado sus procesos de desimetrización enzimática catalizadas por diferentes lipasas y usando carbonatos de alilo como agentes de alcoxicarbonilación.

En todos los casos se ha observado una excelente selectividad en la formación de los correspondientes aminoarbamatos de alilo **5a-g**, sin haber observado en ningún caso otros productos de reacción.

Los mejores resultados han sido alcanzados con las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A o de tipo B, alcanzándose en algunos casos buenas conversiones y en general altos excesos enantioméricos cuando se llevaron a cabo las reacciones con carbonato de dialilo como disolvente y a 45 °C.



Los productos ópticamente activos están siendo actualmente aplicados como ligandos o precursores de los mismos en catálisis asimétrica.

5. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES

Los reactivos químicos fueron adquiridos de distintas casas comerciales como Sigma-Aldrich, Acros o Fluka, y fueron empleados sin purificación adicional, a excepción de los aldehídos utilizados en las síntesis de las correspondientes diaminas que fueron previamente destilados a presión reducida.

Los disolventes empleados en las reacciones de monocarbamatación tanto química como enzimática, diclorometano y 1,4-dioxano respectivamente, fueron previamente destilados bajo nitrógeno y secados con desecantes adecuados. En el caso del diclorometano se empleó hidruro cálcico, mientras que para el 1,4-dioxano se usó sodio y benzofenona como indicador.

La lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B, 7300 PLU/g) inmovilizada por adsorción sobre Lewatit E y la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RM IM, <15% en peso) fueron donadas por Novozymes. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre partículas de cerámica PSL-C-I (1638 U/g) fue adquirida a Sigma-Aldrich, mientras que la inmovilizada sobre diatomitas (PSL IM, 943 U/g) fue obtenida de Amano Europe Pharmaceutical Company. La lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A, 12 U/mg) fue suministrada por Codexis. La lipasa de *Candida rugosa* es comercializada por Sigma (CRL, 965 U/mg). La lipasa de páncreas porcino (PPL, 308 U/mg) y la AK de *Pseudomonas fluorescens* (AK, 22100 U/g) fueron adquiridas a Sigma.

6.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Cromatografía en gel de sílice

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0.25 mm de espesor), los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta, comercializados por Merck. Como revelador se utilizó una disolución acuosa formada por un 1% de KMnO₄ (2 g), un 5% de K₂CO₃ (10 g) y un 5% de NaOH (8 lentejas) en 200 mL de H₂O, siendo todas las proporciones en peso:volumen.

Las cromatografías de columna se llevaron a cabo utilizando gel de sílice ácida 60 (230-240 mesh) adquirida a Merck y gel de sílice neutra 60 (32-63mesh) adquirida a Eco Chrom.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 utilizando distintas columnas quirales como Chiralpak IC (25 × 4.6 mm D.I.) o Chiralcel OJ-H, (25 × 4.6 mm D.I.). La detección empleada fue visible-ultravioleta empleando unas longitudes de onda de 210 y 215 nm. Como fase móvil se han utilizado mezclas de hexano/isopropanol, detallándose en la caracterización de cada producto la proporción exacta para la separación de los enantiómeros de cada compuesto.

Espectroscopía infrarroja (IR)

Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro Varian 1000 FT-IR empleando placas de KBr para todos los compuestos salvo para el **5h** que se utilizaron pastillas de NaCl. Las bandas de tensión se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm⁻¹.

Espectrometría de masas

Los experimentos de baja resolución se realizaron empleando APCI⁺ (ionización química a presión atmosférica en modo positivo) y ESI⁺ (ionización por electrospray en

modo positivo) se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 acoplado a masas para obtener los espectros de masas (EM). Por otro lado, los experimentos de alta resolución fueron llevados a cabo mediante la técnica de ESI⁺ empleando un espectrómetro Micro Tof-Q. Los valores se refieren en ambos casos a unidades de masa atómica (uma).

Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Gallenkamp usando tubos capilares abiertos y, por tanto, sus valores no están corregidos.

Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y DEPT se realizaron en espectrómetros Bruker AV-300 (¹H, 300.13 MHz y ¹³C, 75.5 MHz) y Bruker DPX-300 (¹H, 300.13 MHz y ¹³C, 75.5 MHz). Los desplazamientos químicos se expresan en valores de delta (δ , ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

6.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

6.3.1. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LAS MESO-DIAMINAS 3a-h

Una suspensión del correspondiente aldehído previamente destilado **1a-h** (50 mmol) y acetato amónico (150 mmol) se calienta a 130 °C, y se agita durante 3 h. Transcurrido este periodo se procede a enfriar la mezcla a temperatura ambiente, obteniendo un producto gomoso que se lava con hexano. El crudo resultante se alcaliniza con una disolución acuosa de NaOH 4 N hasta pH básico (>10) y se extrae con Et₂O (4 x 20 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄, se filtran y finalmente se evapora el disolvente por destilación a presión reducida en el rotavapor. Sin previa purificación, el producto intermedio anterior **2a-h**, se suspende en una disolución acuosa de H₂SO₄ al 50% (40 mL), y la mezcla se calienta con agitación a 170 °C durante toda una noche. Pasado este tiempo, la reacción se enfría en un baño de hielo y bajo agitación se le añade lentamente H₂O (20 mL, para diluir la elevada concentración

de H₂SO₄). La disolución resultante se extrae con Et₂O (4 x 60 mL) y la capa acuosa es llevada a pH neutro con una disolución acuosa de NH₄OH concentrado. Finalmente se extrae la fase acuosa con Et₂O (4 x 60 mL), se combinan las fases orgánica, se secan con Na₂SO₄, se filtran y se evapora el disolvente por destilación a presión reducida, obteniéndose la correspondientes *meso*-diamina **3a-h** como sólidos (40-98% rendimiento, Tabla 2).

6.3.2. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LOS CORRESPONDIENTES MONOCARBAMATOS RACÉMICOS **5a-h**

A una disolución de la correspondiente *meso*-diamina **2a-h** (0.47 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (4.72 mL, 0.1 M) se le añade DMAP (0.52 mmol) bajo atmosfera de nitrógeno. A continuación, se añade cloroformiato de alilo (**4**, 0.52 mmol) y se agita la disolución a temperatura ambiente hasta completa desaparición del producto de partida, lo que se comprueba por análisis de TLC (60% MeOH/AcOEt). Después se destila el disolvente bajo presión reducida, obteniéndose un crudo que posteriormente es purificado por cromatografía de columna en gel de sílice (30-70% AcOEt/hexano), aislándose el correspondiente monocarbamato **5a-h** como un sólido blanco (30-75% rendimiento, Tabla 3).

6.3.3. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS *MESO*-DIAMINAS **3a-h** CON LA CAL-A

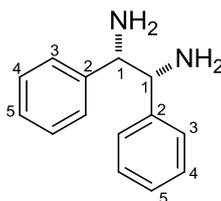
Una suspensión de la correspondiente diamina **3a-h** (0.20 mmol) y CAL-A (relación enzima:diamina 2:1 en peso) en carbonato de dialilo (2 mL, 0.1 M) y bajo atmosfera de nitrógeno, se agita orbitalmente a 45 °C y 250 rpm durante 62-86 horas. Transcurrido este tiempo se para la reacción por filtración de la enzima que se lava con MeOH (3 x 5 mL). El disolvente se destila bajo presión reducida y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (30-70% AcOEt/hexano), obteniéndose el correspondiente monocarbamato **5a-h** ópticamente activo (ver Tabla 6).

6.3.4. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA DESIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS MESO-DIAMINAS 3d,e CON LA CAL-B

Una suspensión de la correspondiente diamina **3d,e** (0.2 mmol) y CAL-B (relación enzima:diamina 1:1 en peso) en carbonato de dialilo (2 mL, 0.1 M) y bajo atmosfera de nitrógeno, se agita orbitalmente a 60 °C y 250 rpm durante 62 h. Transcurrido este tiempo se para la reacción por filtración de la enzima que se lava con MeOH (3 x 5 mL). El disolvente se destila bajo presión reducida y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (30-70% AcOEt/hexano), obteniéndose el correspondiente monocarbamato **5d,e** ópticamente activo.

6.4. DATOS EXPERIMENTALES: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

meso-1,2-difeniletano-1,2-diamina (**3a**)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₆N₂

Peso molecular: 212.13

R_f (60% MeOH/AcOEt): 0.45

Pf: 123 °C (sólido blanco)

IR (KBr): ν 3347, 3028, 1590, 756, 695 cm⁻¹

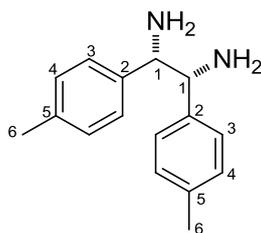
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.44 (4H, sa, 2NH₂), 4.04 (2H, d, 2H₁), 7.31-7.42 (10H, m, 4H₃+4H₄+2H₅)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 63.1 (2C₁), 127.9 (4C₄+2C₅), 128.8 (4C₃), 143.2 (2C₂)

EM (ESI⁺, m/z): 213 [(M+H)⁺, 100%], 214.1 [(M+2H)⁺, 20%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₄H₁₆N₂)⁺ [(M+H)⁺]: 213.1386; encontrado: 213.1381

meso-1,2-bis(4-metilfenil)etano-1,2-diamina (3b)



Fórmula empírica: C₁₆H₂₀N₂

Peso molecular: 240.16 g/mol

R_f (60% MeOH/AcOEt): 0.47

Pf: 77 °C (sólido blanco)

IR (KBr): ν 3370, 2920, 1606, 1266, 1020, 890, 735 cm⁻¹

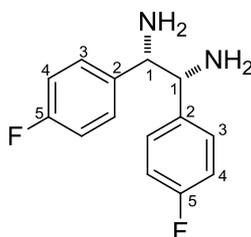
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.01 (4H, sa, 2NH₂), 2.76 (6H, s, 6H₆), 4.38 (2H, s, 2H₁), 7.57 (4H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, 4H₃), 7.69 (4H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, 4H₄)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.4 (2C₆), 62.0 (2C₁), 127.8 (4C₃), 129.4 (4C₄), 137.5 (2C₅), 140.3 (2C₂)

EM (ESI⁺, m/z): 241 [(M+H)⁺, 100%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₆H₂₀N₂)⁺ [(M+H)⁺]: 241.1699; encontrado: 241.1687

meso-1,2-bis(4-fluorofenil)etano-1,2-diamina (3c)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₄F₂N₂

Peso molecular: 248.11

R_f (60% MeOH/AcOEt): 0.41

Pf: 81°C (sólido marrón)

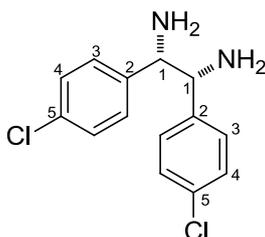
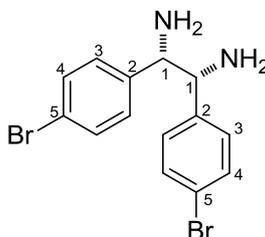
IR (KBr): ν 3219, 2914, 1602, 1219, 971, 750, 837 cm⁻¹

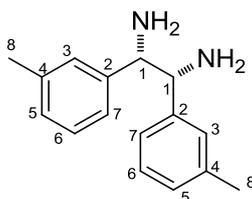
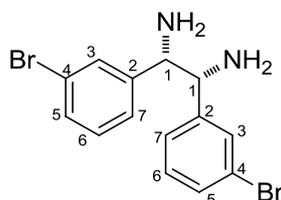
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.60 (sa, 2NH₂), 4.22 (2H, s, 2H₁), 7.02 (4H, d, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 4H₄), 7.30 (d, ³J_{HH} = 7.3 Hz, 4H₃)

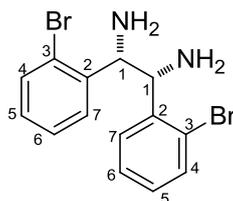
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 62.5 (2C₁), 115.5 (4C₄), 129.5 (4C₃), 138.7 (2C₂), 162.5 (d, ¹J_{CF} = 161 Hz, 2C₅)

EM (ESI⁺, m/z): 249 [(M+H)⁺, 100%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₄H₁₅F₂N₂)⁺ [(M+H)⁺]: 249.1198; encontrado: 249.1174

meso-1,2-bis(4-clorofenil)etano-1,2-diamina (3d)**Fórmula empírica:** C₁₄H₁₄Cl₂N₂**Peso molecular:** 280.05 g/mol**R_f** (60% MeOH/AcOEt): 0.47**Pf:** 127 °C (sólido amarillo)**IR** (KBr): ν 3380, 2950, 1202, 1600, 980, 820 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): 1.53 (4H, sa, 2NH₂), 4.00 (2H, s, 2H₁), 7.27-7.34 (8H, m, 4H₃+4H₄)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 62.0 (2C₁), 128.5 (4C₄), 128.9 (4C₃), 133.4 (2C₅), 140.9 (2C₂)**EM** (APCI⁺, m/z): 281 [(M+H)⁺, 100%]**HRMS** (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₄H₁₆N₂)⁺ [(M+H)⁺]: 281.0607; encontrado: 281.0592**meso-1,2-bis(4-bromofenil)etano-1,2-diamina (3e)****Fórmula empírica:** C₁₄H₁₄Br₂N₂**Peso molecular:** 367.95 g/mol**R_f** (60% MeOH/AcOEt): 0.64**Pf:** 123 °C (sólido blanco)**IR** (KBr): ν 3076, 2955, 1607, 1268, 852cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.42 (sa, 2NH₂), 3.98 (2H, s, 2H₁), 7.21 (4H,d, ³J_{HH}=7.3 Hz, 4H₃), 7.47 (4H, d, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 4H₄)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 62.4 (2C₁), 121.9 (2C₅), 129.7 (4C₃), 131.9 (4C₄), 141.9 (2C₂)**EM** (ESI⁺, m/z): 369 [(M+H)⁺, 100%]**HRMS** (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₄H₁₅Br₂N₂)⁺ [(M+H)⁺]: 368.9564; encontrado: 368.9602

meso-1,2-bis-(2-metilfenil)etano-1,2-diamina (3f)**Fórmula empírica:** C₁₆H₂₀N₂**Peso molecular:** 240.16 g/mol**R_f** (60% MeOH/AcOEt): 0.46**Pf:** 136 °C (sólido blanco)**IR** (KBr): ν 3052, 2855, 1603, 1265, 957, 789, 740 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.37 (4H, sa, 2NH₂), 2.39 (6H, s, 6H₈), 3.98 (2H, d, 2H₁), 7.14 (2H, s, 2H₄), 7.26-7.28 (6H, m, 2H₆+2H₇+2H₈)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 20.5 (2C₈), 62.0 (2C₁), 123.8 (2C₇), 127.4-127.5 (2C₃+2C₅+2C₆), 137.2 (2C₄), 142.0 (C₂)**EM** (ESI⁺, m/z): 241 [(M+H)⁺, 100%]**HRMS** (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₆H₂₁N₂)⁺ [(M+H)⁺]: 241.1699; encontrado: 241.1710**meso-1,2-bis(3-bromofenil)etano-1,2-diamina (3g)****Fórmula empírica:** C₁₄H₁₄Br₂N₂**Peso molecular:** 367.95 g/mol**R_f** (60% MeOH/AcOEt): 0.64**Pf:** 177 °C (sólido blanco)**IR** (KBr): ν 3055, 2986, 1600, 1265, 894, 790, 740 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.49 (4H, sa, 2NH₂), 3.99 (2H, s, 2H₁), 7.23-7.28 (4H, m, 2H₃+2H₇), 7.45 (2H, t, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 2H₆), 7.56 (2H, m, 2H₅)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 62.6 (2C₁), 123.0 (2C₄), 126.7 (2C₇), 130.3-130.9 (2C₅+2C₆), 131.2 (C₃), 145.3 (2C₂)**EM** (APCI⁺, m/z): 369 [(M+H)⁺, 100%]**HRMS** (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₄H₁₅Br₂N₂)⁺ [(M+H)⁺]: 368.9597; encontrado: 368.9630

meso-1,2-bis(2-bromofenil)etano-1,2-diamina (3h)**Fórmula empírica:** C₁₄H₁₄Br₂N₂**Peso molecular:** 367.95 g/mol**R_f** (60% MeOH/AcOEt): 0.65**Pf:** 149 °C (sólido blanco)**IR** (KBr): ν 3055, 2985, 1265, 740, cm⁻¹

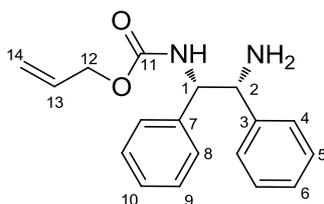
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.59 (4H, sa, 2NH₂), 4.72 (2H, d, 2H₁), 7.13 (2H, t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H₅), 7.31 (2H, t, ³J_{HH} = 7.3 Hz, 2H₆), 7.40 (2H, d, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2H₇), 7.51 (2H, d, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H₄)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 59.5 (2C₁), 125.1 (2C₃), 127.6 (2C₅), 128.4 (2C₇), 128.8 (2C₅), 132.7 (2C₄), 141.6 (2C₂)

EM (ESI⁺, m/z): 369.0 [(M+H)⁺, 100%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₄H₁₅ Br₂N₂)⁺ [(M+H)⁺]: 368.9597; encontrado: 368.9564

(S,R)-(+)-(2-amino-1,2-difeniletil)carbamato de alilo (5a)



Fórmula empírica: C₁₈H₂₁N₂O₂

Peso molecular: 296.20 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.40

Pf: 116 °C (sólido blanco)

IR (KBr): ν 2936, 2269, 1694, 1604, 1572, 1446, 1266, 1159, 1090, 1026, 917, 760 cm⁻¹

¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 4.31 (1H, d, ³J_{HH} = 8.7 Hz, H₂), 4.41-4.69 (2H, m, 2H₁₂), 5.02 (1H, sa, H₁), 5.13-5.31 (2H, m, 2H₁₄), 5.82-6.01 (1H, m, H₁₃), 7.38-7.65 (10H, m, 2H₄+2H₅+H₆+2H₈+2H₉+H₁₀)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 61.5 (C₂), 63.0 (C₁), 66.5 (C₁₂), 117.5 (C₁₄), 128.9-129.1 (2C₅+C₆+2C₉+C₁₀), 129.6 (2C₄), 129.9 (2C₈), 134.5 (C₁₃), 141.8 (C₃), 143.4 (C₇), 157.9 (C₁₁)

EM (APCI⁺, m/z): 297 [(M+H)⁺, 100%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₈H₂₁N₂O₂)⁺ [(M+H)⁺]: 297.1598; encontrado: 297.1584

Rotación óptica: (*R*)-5a [α]_D²⁰ = +1.0 (c = 1.0, EtOH) con 88% *ee*.

Separación analítica del carbamato racémico 5a (HPLC):

Columna: Chiralcel OJ-H

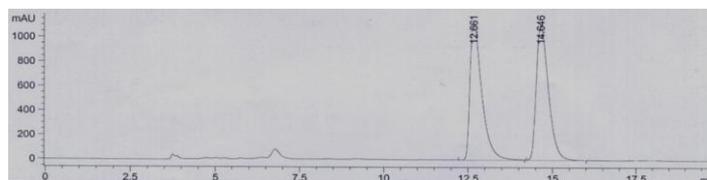
Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Temperatura: 40 °C

Tiempos de retención: *t_R* = (12.7 y 14.6) min

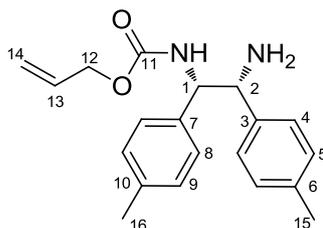
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-5a:



Compuesto (S,R)-5a con un 88% *ee*:



(*S,R*)-(+)-[2-amino-1,2-bis(*p*-metilfenil)etil]carbamato de alilo (5b**)**



Fórmula empírica: C₂₀H₂₅N₂O₂

Peso molecular: 324.18 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.43

Pf: 118 °C (sólido blanco)

IR (KBr): ν 2800, 2150, 1702, 1542, 1490, 1252, 1153, 1090, 920, 816, 737 cm⁻¹

¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 2.52 (6H, s, 3H₁₅+3H₁₆), 4.24 (1H, d, ³J_{HH}= 8.7 Hz, H₂), 4.47-4.57 (2H, m, 2H₁₂), 4.94 (1H, d, ³J_{HH}= 8.7 Hz, H₁), 5.18-5.32 (2H, m, 2H₁₄), 5.84-6.03 (1H, m, H₁₃), 7.27-7.41 (8H, m, 2H₄+2H₅+2H₈+2H₉)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 21.5 (C₁₅+C₁₆), 61.2 (C₂), 62.8 (C₁), 66.5 (C₁₂), 117.4 (C₁₄), 128.9-129.0 (2C₄+2C₈), 130.2-130.5 (2C₅+2C₉), 134.6 (C₁₃), 138.5-138.9 (C₆+C₁₀), 140.3 (C₃), 141.7 (C₇), 157.9 (C₁₁)

EM (APCI⁺, m/z): 325 [(M+H)⁺, 100%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₂₀H₂₅N₂O₂)⁺ [(M+H)⁺]: 325.1911; encontrado: 325.1910.

Rotación óptica: (*S,R*)-**5b** [α]_D²⁰ = +3.8 (c= 0.5, EtOH) con 80% *ee*

Separación analítica del carbamato racémico **5b (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

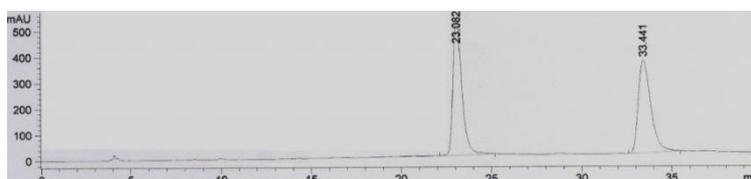
Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

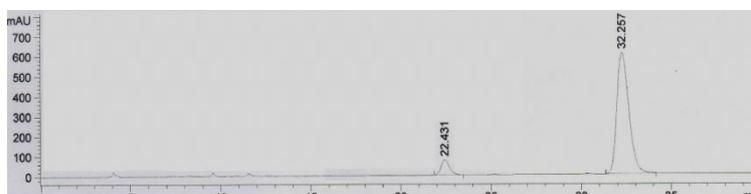
Temperatura: 40 °C

Tiempos de retención: t_R = (23.1 y **33.4**) min

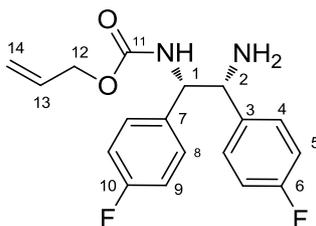
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (\pm)-5b**:**



Compuesto (*S,R*)-5b** con un 80% *ee*:**



(*S,R*)-(+)-[2-amino-1,2-bis(4-fluorofenil)etil]carbamato de alilo (5c)



Fórmula empírica: C₁₈H₁₉F₂N₂O₂

Peso molecular: 331.30 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.42

Pf: 124 °C (sólido blanco)

IR (KBr): ν 2936, 2269, 1695, 1603, 1573, 1513, 1268, 1230, 1158, 923, 841 cm⁻¹

¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 4.28 (1H, d, ³J_{HH}= 8.6 Hz, H₂), 4.44-4.61 (2H, m, 2H₁₂), 4.98 (1H, d, ³J_{HH}= 8.6 Hz, H₁), 5.19-5.33 (2H, m, 2H₁₄), 5.88-6.07 (1H, m, H₁₃), 7.15-7.38 (4H, m, 2H₄+2H₈), 7.49-7.64 (4H, m, 2H₅+2H₉)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 60.8 (C₂), 62.4 (C₁), 66.6 (C₁₂), 116.1-116.7 [(2C₅, d, ²J_{CF}= 22 Hz)+(2C₉, d, ²J_{CF}= 22 Hz)], 117.5 (C₁₄), 130.7-131.0 [(2C₄, d, ³J_{CF}= 8 Hz)+(2C₈, d, ³J_{CF}= 8 Hz)], 134.5 (C₁₃), 137.8 (C₃), 139.5 (C₇), 157.9 (C₁₁) 163.9-164.0 [(2C₆, d, ¹J_{CF}= 245 Hz)+(2C₁₀, d, ¹J_{CF}= 245 Hz)]

EM (APCI⁺, m/z): 332 [(M+H)⁺, 100%], 333 [(M+2H)⁺, 20%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₈H₁₉F₂N₂O₂)⁺ [(M+H)⁺]: 333.1409; encontrado: 333.1381

Rotación óptica: (*S,R*)-5c [α]_D²⁰ = +1.8 (c= 1.0, EtOH) con 70% *ee*

Separación analítica del carbamato racémico 5c (HPLC):

Columna: Chiralpak IC

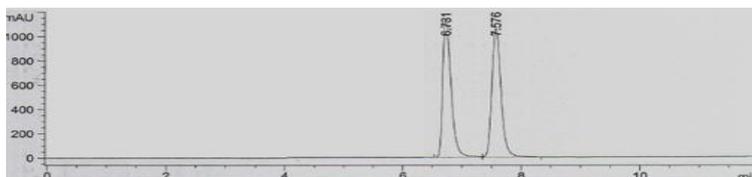
Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20

Flujo: 0.8 mL/min

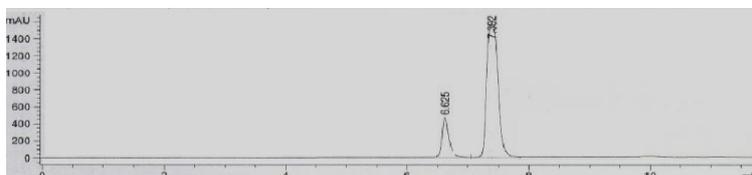
Temperatura: 40 °C

Tiempos de retención: *t_R* = (6.7 y 7.6) min

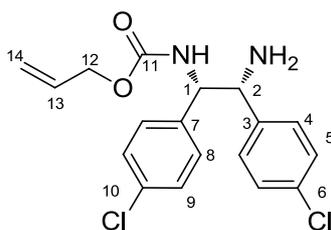
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-5c:



Compuesto (*S,R*)-5c con un 70% *ee*:



(*S,R*)-(+)-[2-amino-1,2-bis(4-clorofenil)etil]carbamato de alilo (5d)



Fórmula empírica: C₁₈H₁₉Cl₂N₂O₂

Peso molecular: 364.07 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.52

Pf: 124 °C (sólido blanco)

IR (KBr): ν 2900, 1694, 1536, 1491, 1410, 1250, 1090, 1012, 927, 832 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 4.30 (1H, d, ³J_{HH}= 8.6 Hz, H₂), 4.47-4.63 (2H, m, 2H₁₂), 4.97 (1H, d, ³J_{HH}= 8.6 Hz, H₁), 5.22-5.34 (2H, m, 2H₁₄), 5.87-6.03 (1H, m, H₁₃), 7.44-7.59 (8H, m, 2H₄+2H₅+2H₈+2H₉)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 60.7 (C₂), 62.3 (C₁), 66.6 (C₁₂), 117.6 (C₁₄), 129.7-129.9 (2C₄+2C₈), 130.6-130.7 (2C₅+2C₉), 134.5-134.8 (C₆+C₁₀+C₁₃), 140.4 (C₃), 142.3 (C₇) 157.9 (C₁₁)

EM (APCI⁺, m/z): 365 [(M+H)⁺, 100%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₈H₁₉Cl₂N₂O₂)⁺ [(M+H)⁺]: 365.0818; encontrada: 365.0812

Rotación óptica: (*S,R*)-5d [α]_D²⁰ = +1.0 (c= 0.5, EtOH) con 91% *ee*

Separación analítica del carbamato racémico 5d (HPLC):

Columna: Chiralcel OJ-H

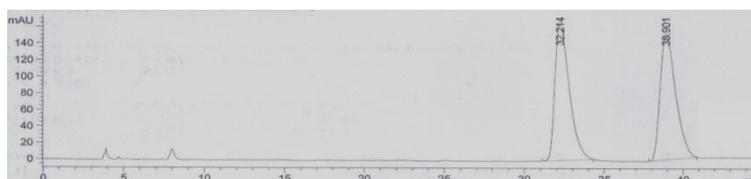
Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

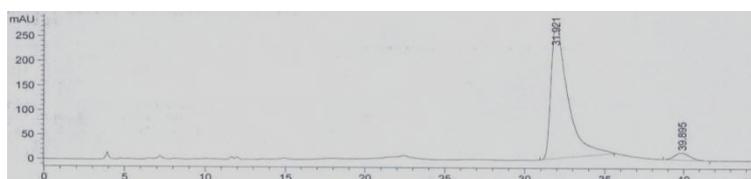
Temperatura: 40 °C

Tiempos de retención: *t_R* = (32.6 y 35.9) min

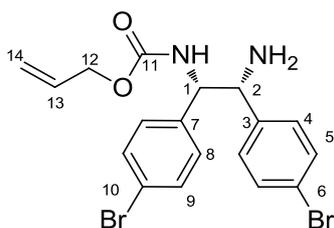
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-5d:



Compuesto (*S,R*)-5d con un 91% *ee*:



(S,R)-(+)-[2-amino-1,2-bis(4-bromofenil)etil]carbamato de alilo (5e)



Fórmula empírica: C₁₈H₁₉Br₂N₂O₂

Peso molecular: 451.97 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.41

Pf: 125 °C (sólido blanco)

IR (KBr): ν 2940, 2269, 1707, 1645, 1545, 1451, 1254, 1160, 1026, 1000, 932, 831, 795 cm⁻¹

¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 4.29 (1H, d, ³J_{HH}= 8.6 Hz, H₂), 4.46-4.66 (2H, m, 2H₁₂), 4.95 (1H, d, ³J_{HH}= 8.6 Hz, H₁), 5.19-5.36 (2H, m, 2H₁₄), 5.85-6.05 (1H, m, H₁₃), 7.35-7.56 (4H, m, 2H₄+2H₈), 7.59-7.77 (4H, m, 2H₅+2H₉)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 60.8 (C₂), 62.4 (C₁), 66.6 (C₁₂), 117.6 (C₁₄), 122.6-122.9 (C₆+C₁₀), 130.0-131.0 (2C₄+2C₈), 132.7-132.9 (2C₅+2C₉), 134.5 (C₁₃), 140.9 (C₃), 142.7 (C₇), 157.9 (C₁₁)

EM (APCI⁺, m/z): 455 [(M+H)⁺, 100%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₈H₁₉Br₂N₂O₂)⁺ [(M+H)⁺]: 452.9808; encontrado: 452.9822

Rotación óptica: (S,R)-5e [α]_D²⁰ = -2.9 (c= 0.5, EtOH) con 91% ee

Separación analítica del carbamato racémico 5e (HPLC):

Columna: Chiralpak IC

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Temperatura: 40 °C

Tiempos de retención: *t_R* (R) = (12.9 y 13.6)min

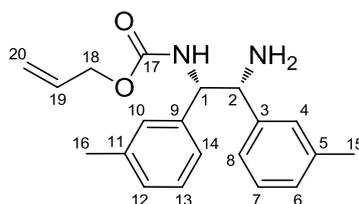
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-5e:



Compuesto (S,R)-5e con un 91% ee:



(*S,R*)-(+)-[2-amino-1,2-bis(3-metilfenil)etil]carbamato de alilo (**5f**)



Fórmula empírica: C₂₀H₂₅N₂O₂

Peso molecular: 324.18 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.53

Pf: 98 °C (sólido blanco)

IR (KBr): ν 2924, 2490, 1697, 1536, 1495, 1451, 1251, 1042, 995, 922, 785 cm⁻¹

¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 2.52 (6H, s, 3H₁₅+3H₁₆), 4.23 (1H, d, ³J_{HH}= 8.8 Hz, H₂), 4.42-4.61 (2H, m, 2H₁₈), 4.94 (1H, d, ³J_{HH}= 8.8 Hz, H₁), 5.16-5.32 (2H, m, 2H₂₀), 5.83-6.00 (1H, m, H₁₉), 7.21-7.47 (8H, m, H₄+H₆+H₇+H₈+H₁₀+H₁₂+H₁₃+H₁₄)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 21.8 (C₁₅+C₁₆), 61.4 (C₂), 63.0 (C₁), 66.5 (C₁₈), 117.4 (C₂₀), 126.1 (C₈+C₁₄), 129.5-129.8 (C₄+C₆+C₇+C₁₀+C₁₂+C₁₃), 134.6 (C₁₉), 139.2 (C₅), 139.6 (C₁₁) 141.8 (C₃), 143.3 (C₉) 157.9 (C₁₇)

EM (APCI⁺, m/z): 325 [(M+H)⁺, 100%];

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₂₀H₂₅N₂O₂)⁺ [(M+H)⁺]: 325.1911; encontrado: 325.1923

Rotación óptica: (*S,R*)-**5f** [α]_D²⁰ = +3.8 (c= 0.5, EtOH) con 18% *ee*

Separación analítica del carbamato racémico **5f (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

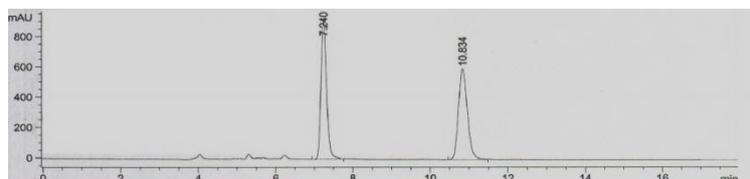
Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 70:30

Flujo: 0.8 mL/min

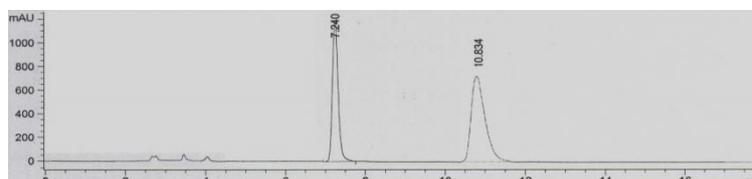
Temperatura: 40 °C

Tiempos de retención: *t_R*= (7.2 y **10.8**) min

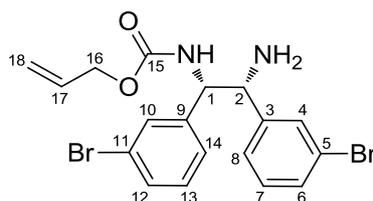
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (\pm)-5f**:**



Compuesto (*S,R*)-5f** con un 18% *ee*:**



(*S,R*)-(+)-[2-amino-1,2-bis(3-bromofenil)etil]carbamato de alilo (5g)



Fórmula empírica: C₁₈H₁₉Br₂N₂O₂

Peso molecular: 451.97 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.57

Pf: 190 °C (sólido blanco)

IR (KBr): ν 3047, 2487, 1682, 1604, 1554, 1454, 1251, 996, , 923, 788 cm⁻¹

¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 4.26 (1H, d, ³J_{HH}= 8.8 Hz, H₂), 4.44-4.64 (2H, m, 2H₁₆), 4.93 (1H, d, ³J_{HH}= 8.8 Hz, H₁), 5.19-5.37 (2H, m, 2H₁₈), 5.86-6.05 (1H, m, H₁₇), 7.37-7.85 (8H, m, H₄+H₆+H₇+H₈+H₁₀+H₁₂+H₁₃+H₁₄)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 60.9 (C₂), 62.5 (C₁), 66.7 (C₁₆), 117.7 (C₁₈), 123.6-123.8 (C₅+C₁₁), 127.7-127.9 (C₈+C₁₄), 131.4-132.2 (C₄+C₆+C₇+C₁₀+C₁₂+C₁₃), 134.4 (C₁₇), 142.3 (C₃), 146.1 (C₉), 157.8 (C₁₅)

EM (APCI⁺, m/z): 455 [(M+H)⁺, 100%]

HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₈H₁₉Br₂N₂O₂)⁺ [(M+H)⁺]: 452.9808; encontrado: 452.9819

Rotación óptica: (*S,R*)-5g [α]_D²⁰ = +1.2 (c= 0.5, EtOH) con 14% *ee*

Separación analítica del carbamato racémico 5g (HPLC):

Columna: Chiralcel OJ-H

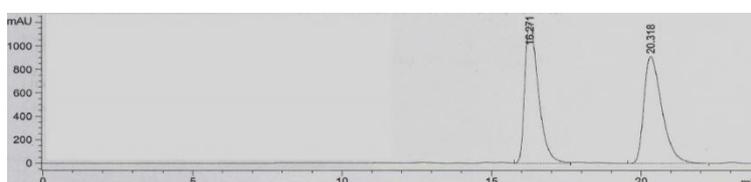
Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Temperatura: 40 °C

Tiempos de retención: *t_R*= (16.2 y 20.3) min

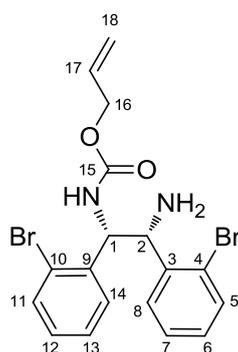
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-5g:



Compuesto (*S,R*)-5g con un 14% *ee*:



(*S,R*)-(+)-[2-amino-1,2-bis(2-bromofenil)etil]carbamato de alilo (**5h**)



Fórmula empírica: C₁₈H₁₉Br₂N₂O₂

Peso molecular: 451.97 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.56

Goma de color amarillo

IR (NaCl): ν 3005, 1703, 1504, 1468, 1454, 1241, 1023, 994, 931, 737 cm⁻¹

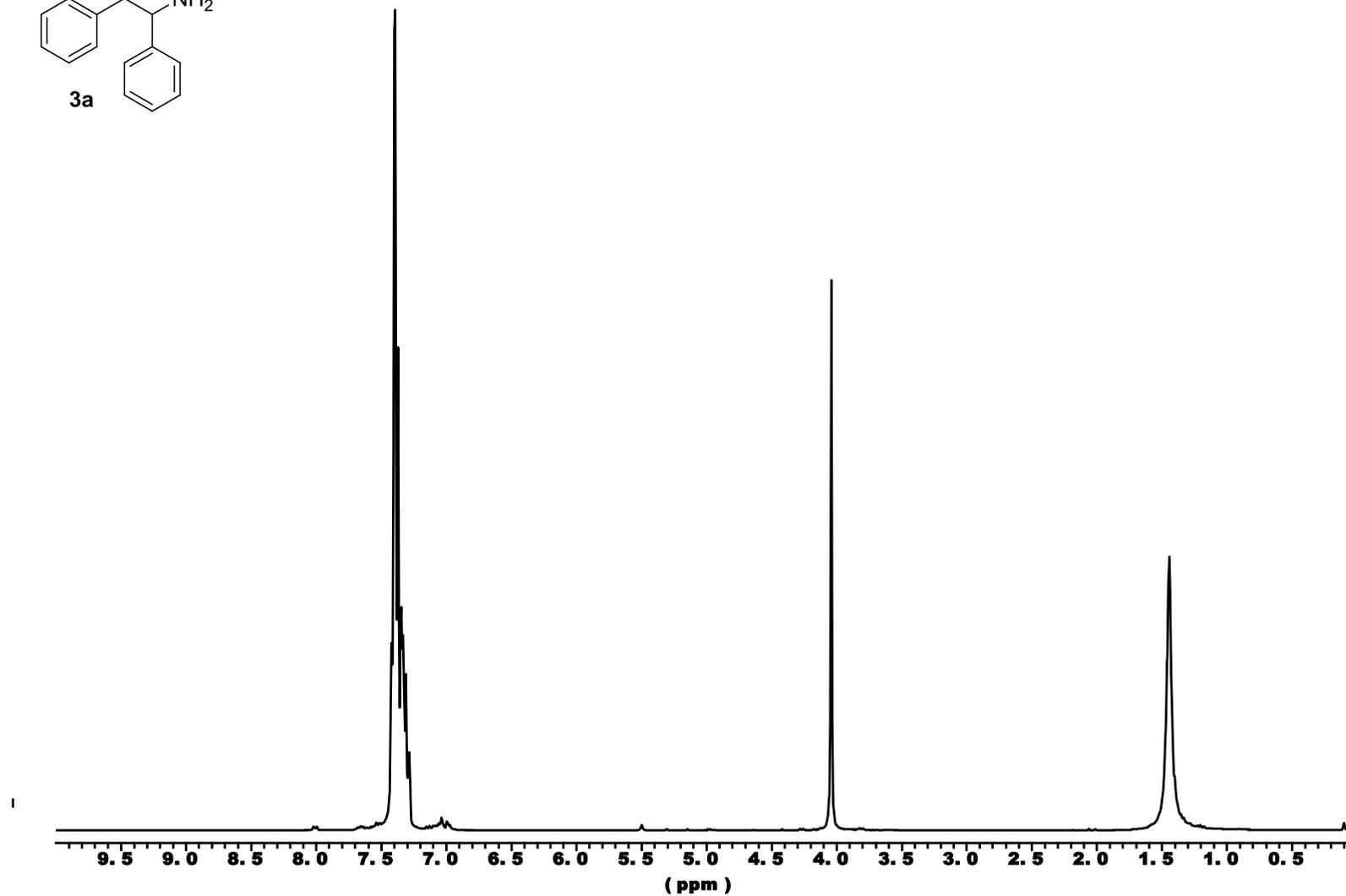
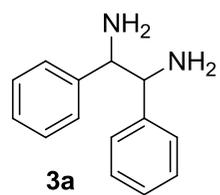
¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 4.54-4.69 (2H, m, 2H₁₆), 4.96 (1H, d, ³J_{HH}= 6.4 Hz, H₂), 5.23-5.43 (2H, m, 2H₁₈), 5.80 (1H, d, ³J_{HH}= 6.4 Hz, H₁), 5.92-6.11 (1H, m, H₁₇), 7.29-7.74 (8H, m, H₅+H₆+H₇+H₈+H₁₁+H₁₂+H₁₃+H₁₄)

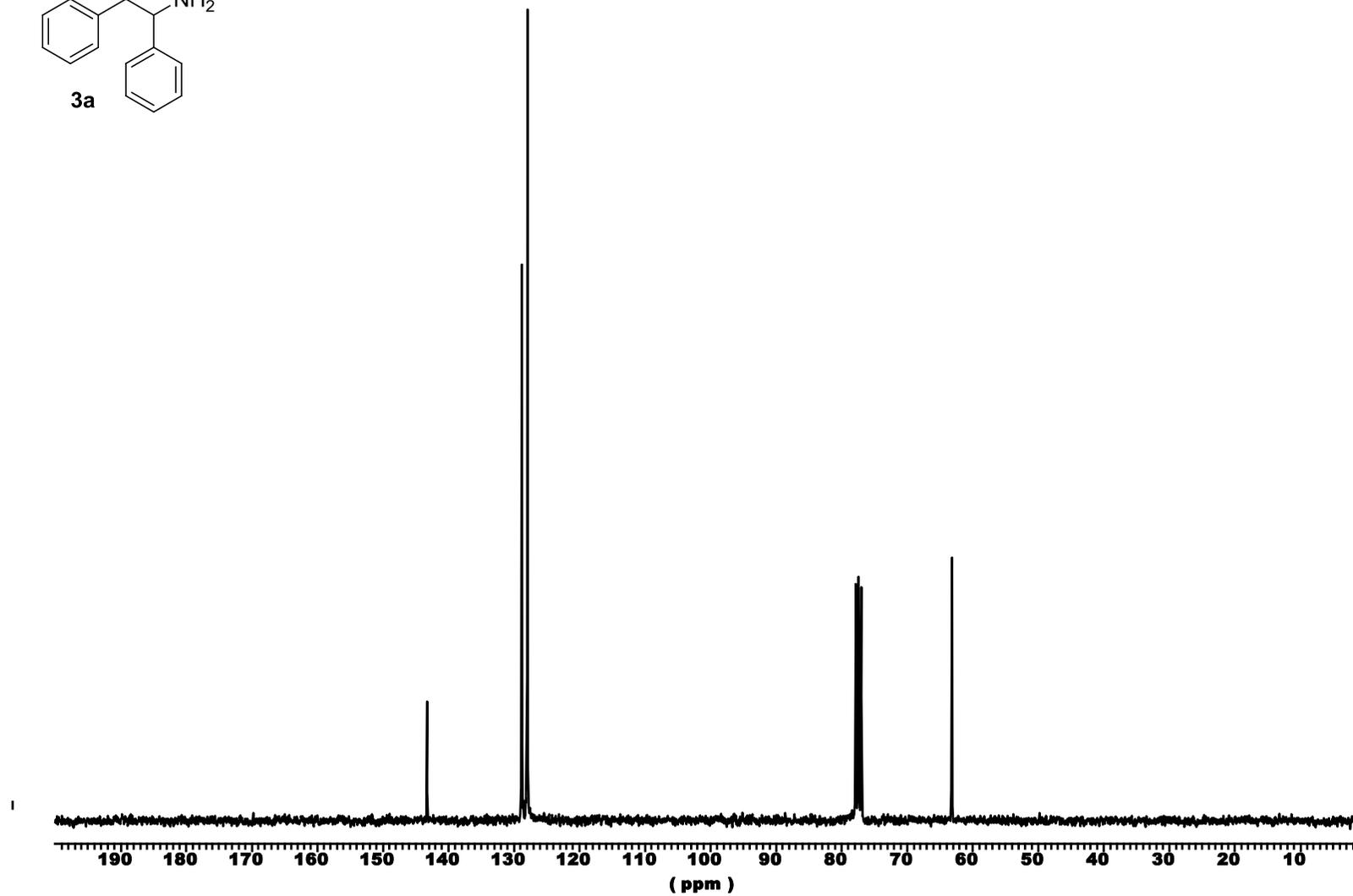
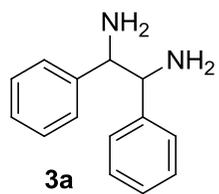
¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 59.3 (C₂), 59.5 (C₁), 66.8 (C₁₆), 117.9 (C₁₈), 126.2-126.4 (C₄+C₁₀), 129.0-129.1 (C₇+C₁₃), 130.0-130.6 (C₆+C₈+C₁₂+C₁₄), 134.1-134.2 (C₅+C₁₁), 134.5 (C₁₇) 139.9 (C₃), 141.8 (C₉), 157.9 (C₁₅)

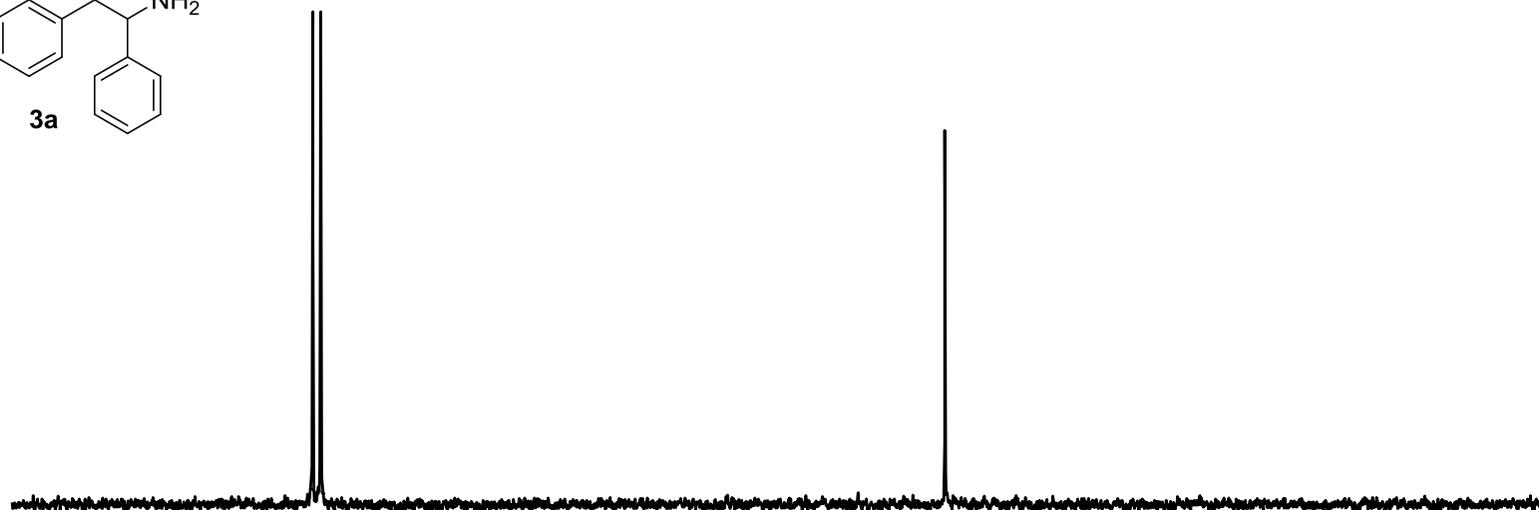
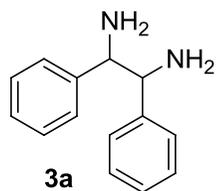
EM (APCI⁺, m/z): 455 [(M+H)⁺, 100%]

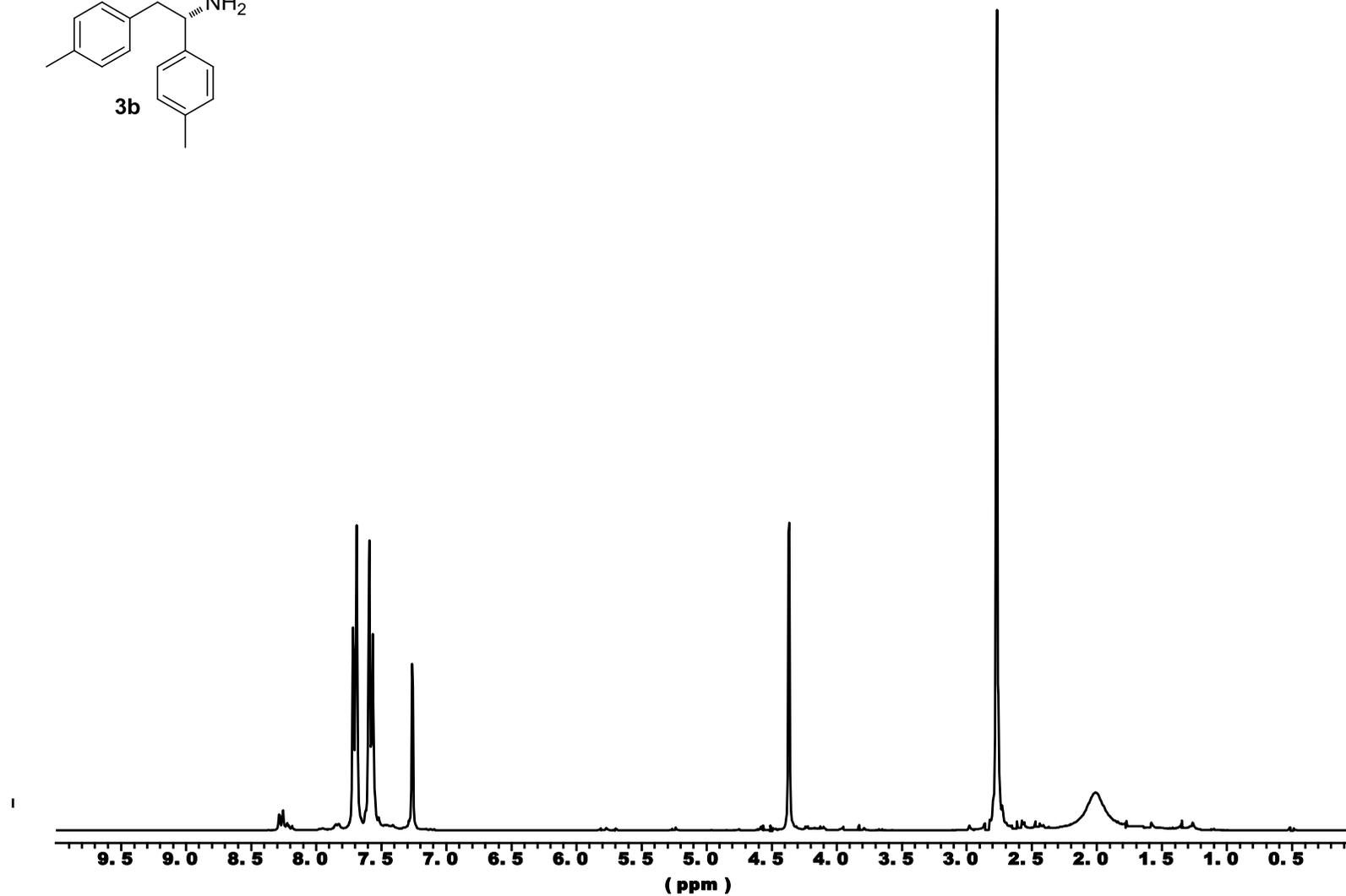
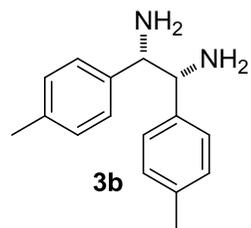
HRMS (ESI⁺, m/z) calcd para (C₁₈H₁₉Br₂N₂O₂)⁺ [(M+H)⁺]: 452.9808; encontrado: 452.9791

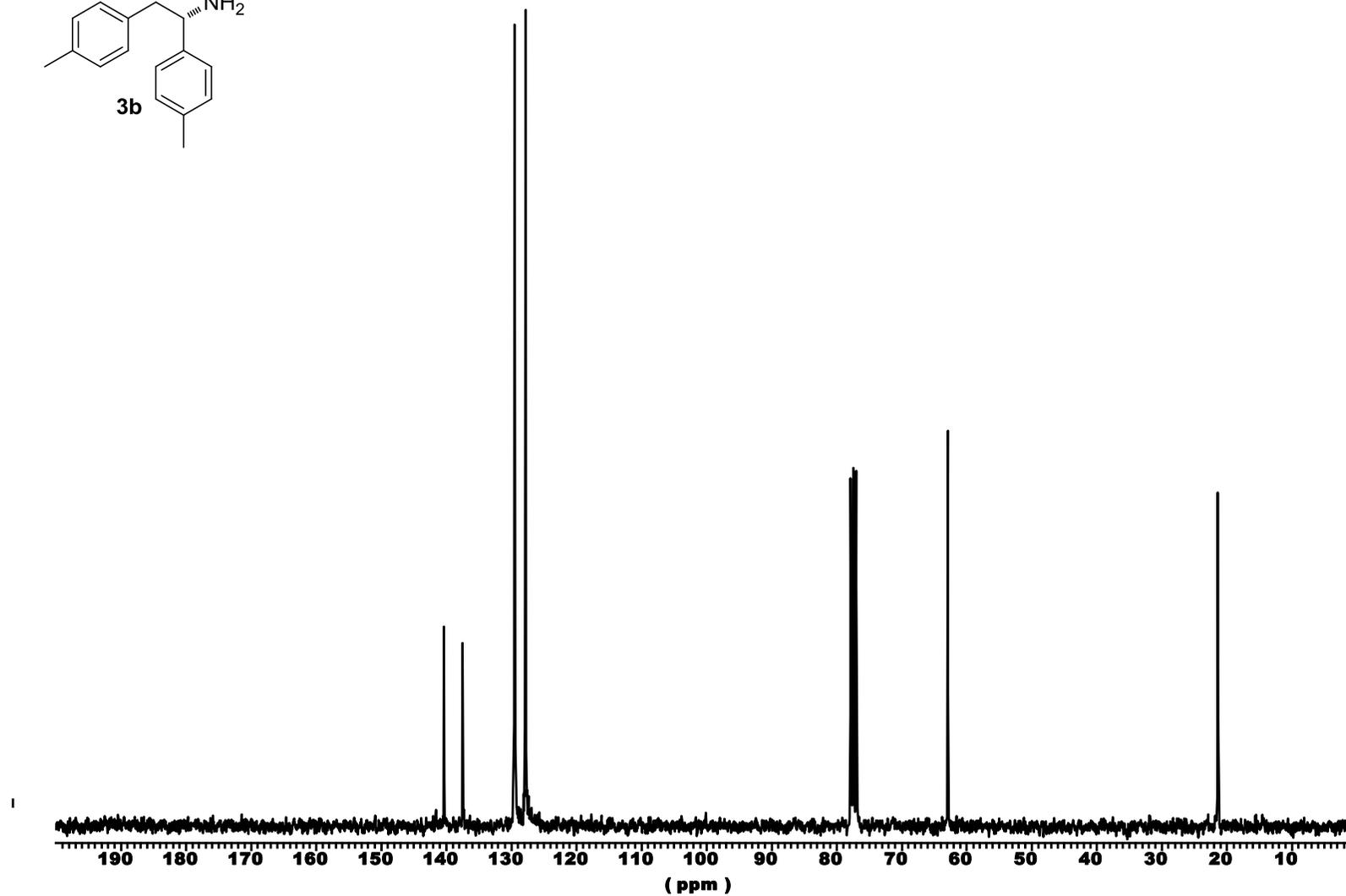
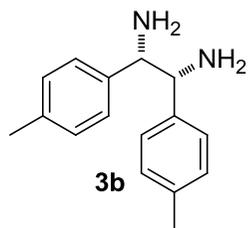
6. PARTE ESPECTRAL

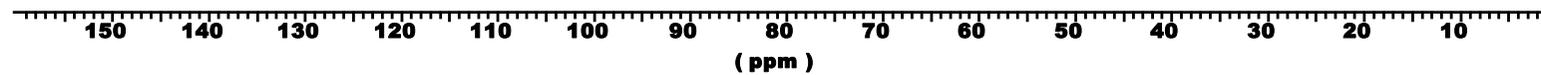
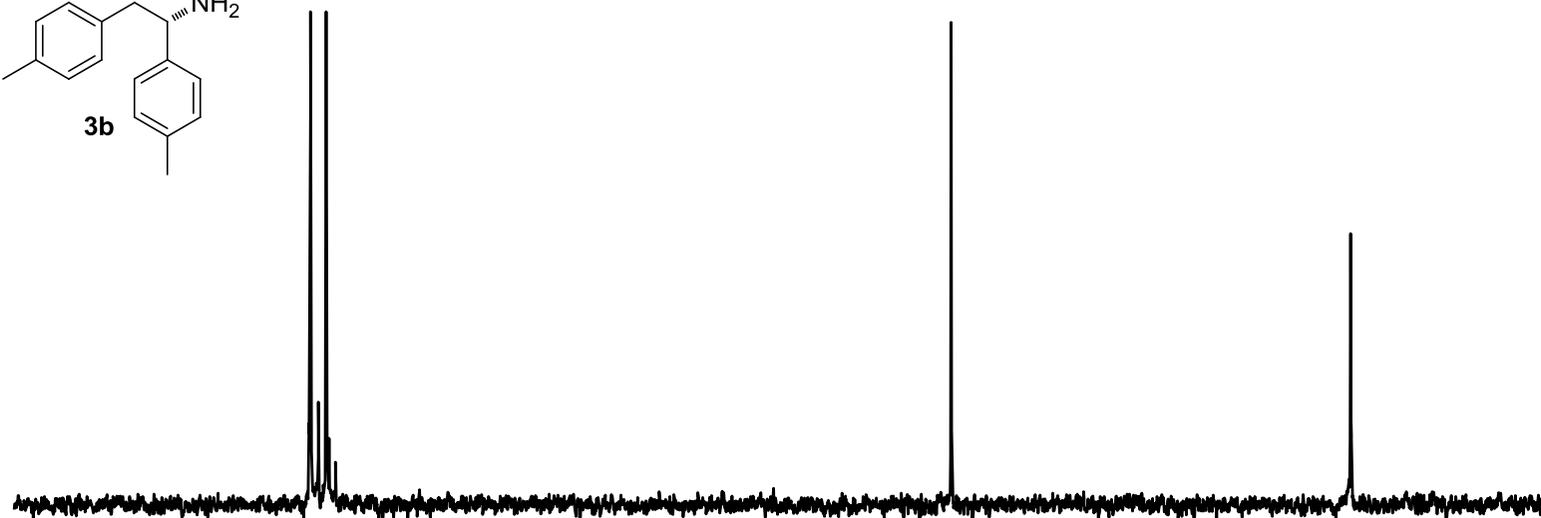
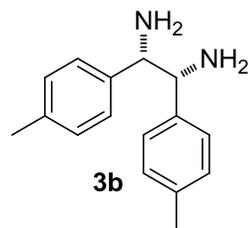


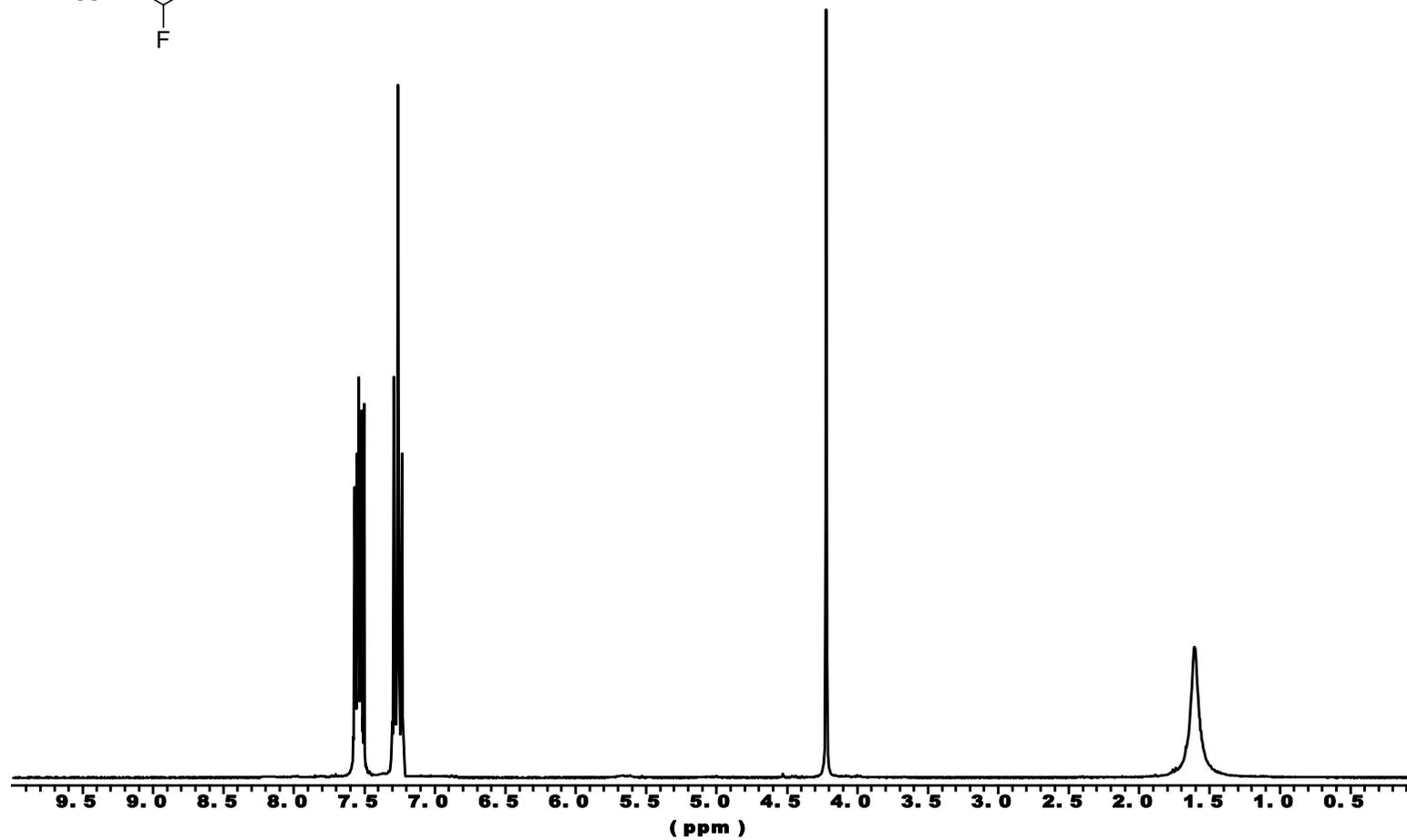
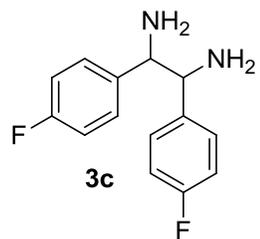


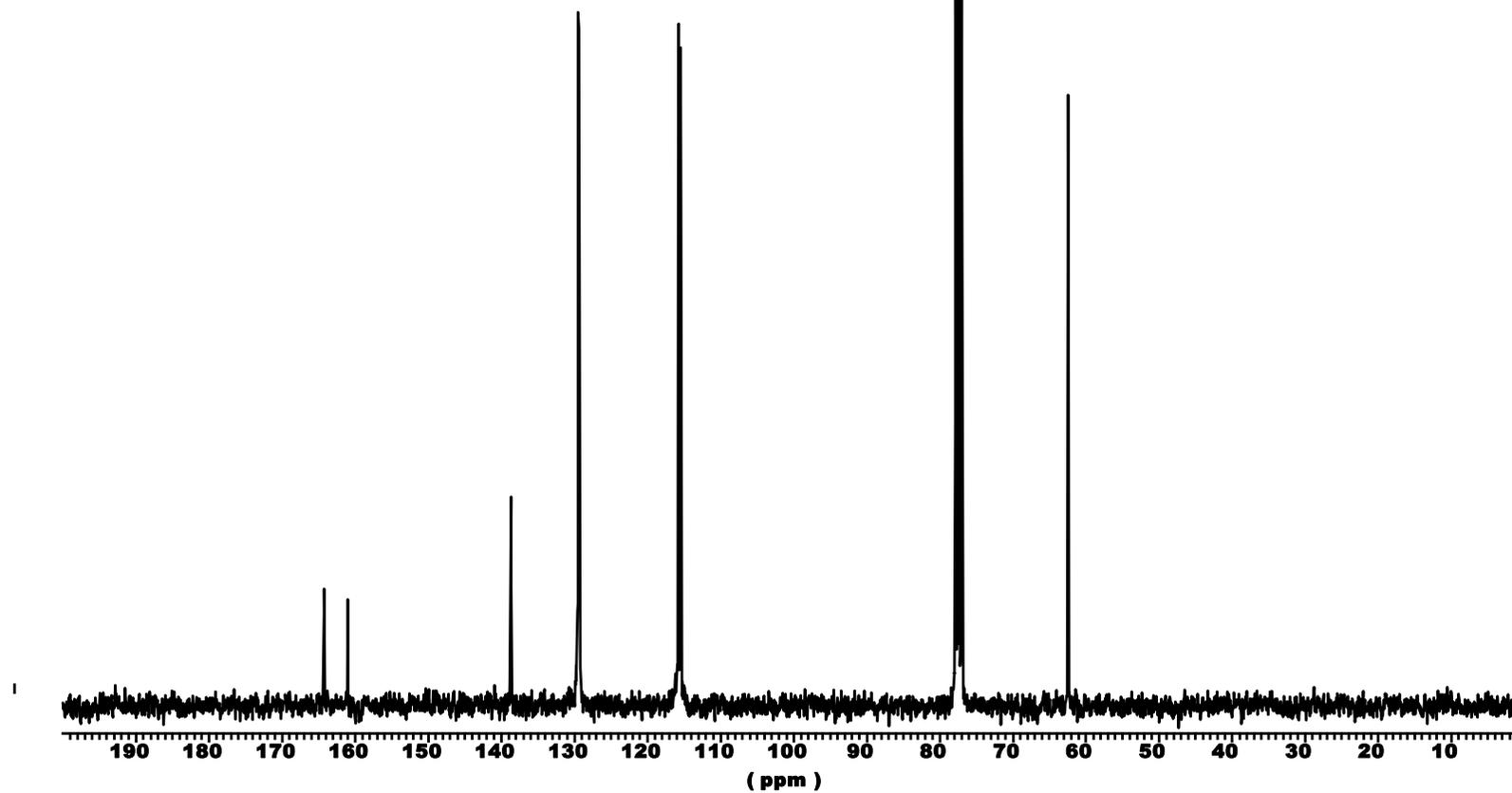
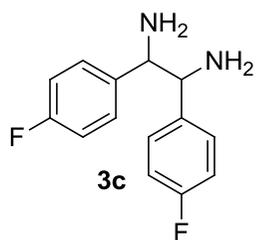


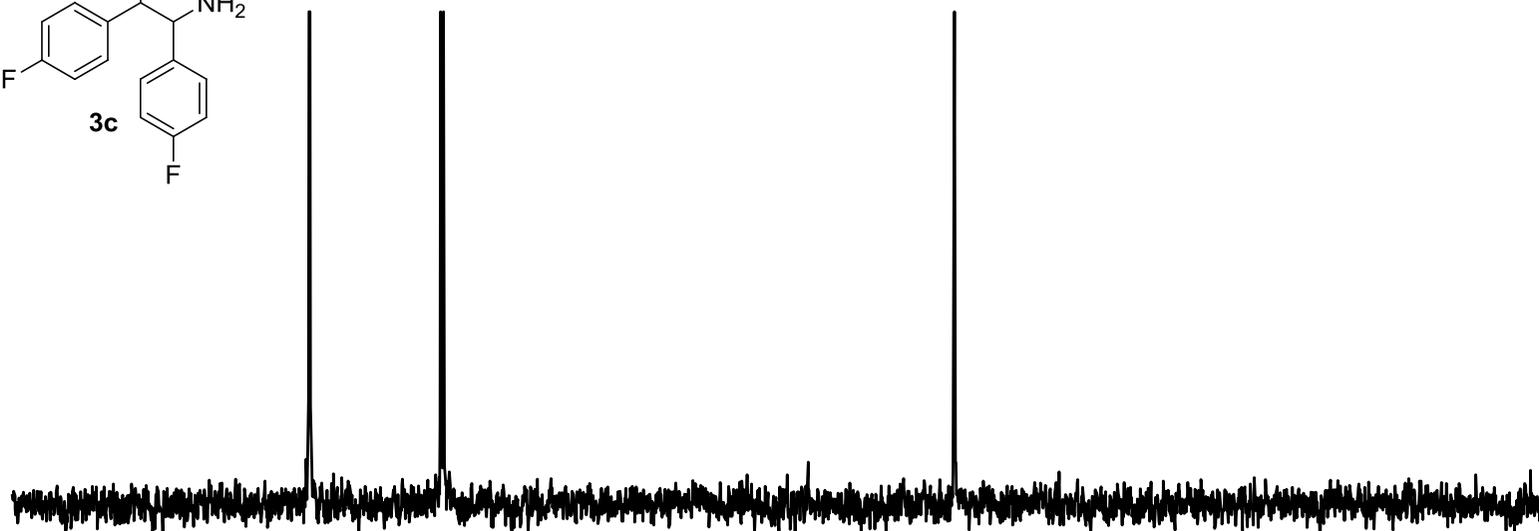
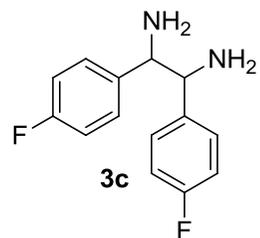


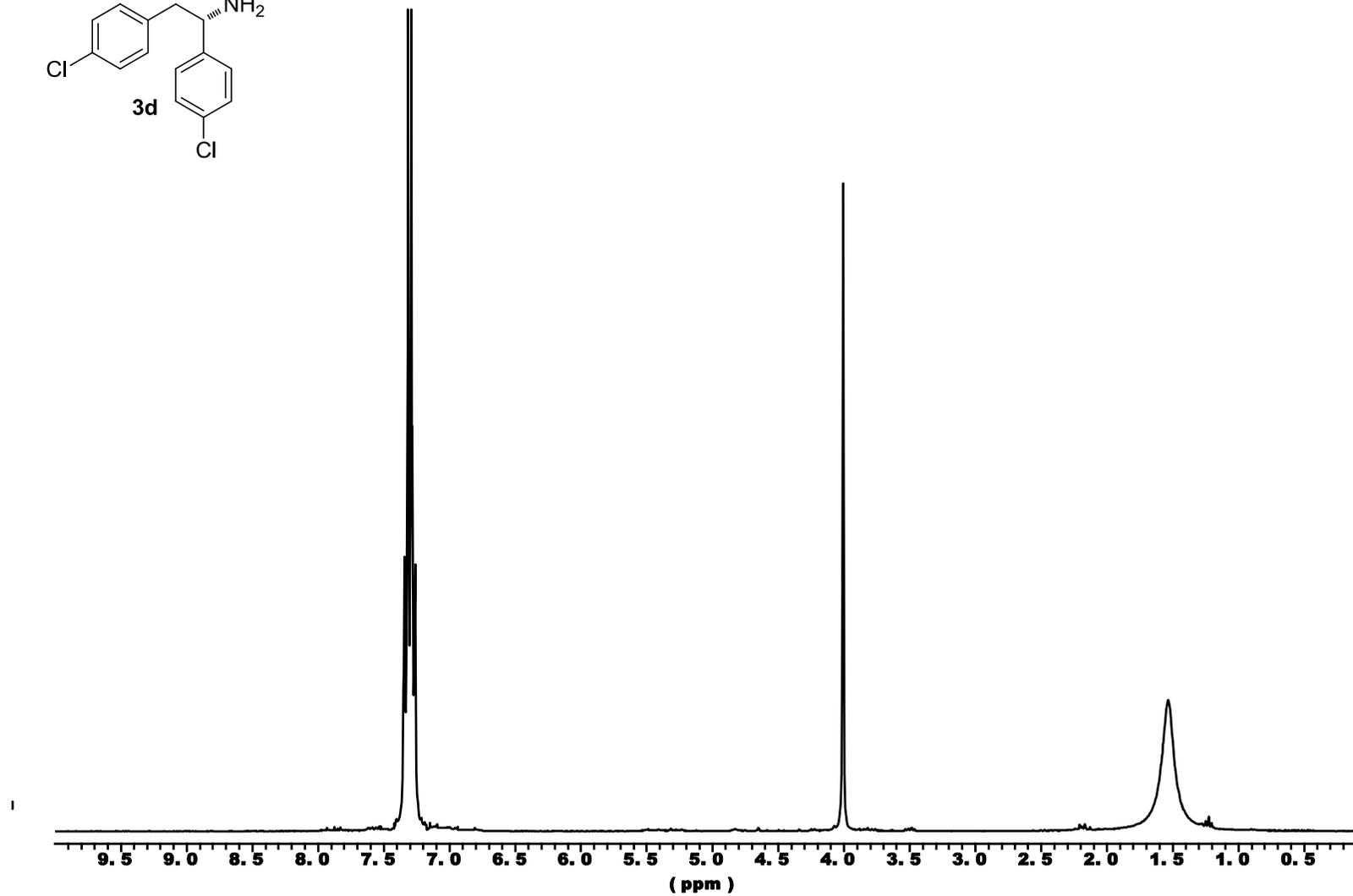
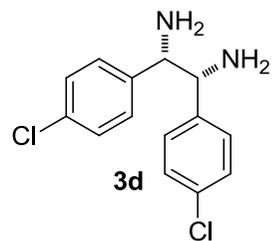


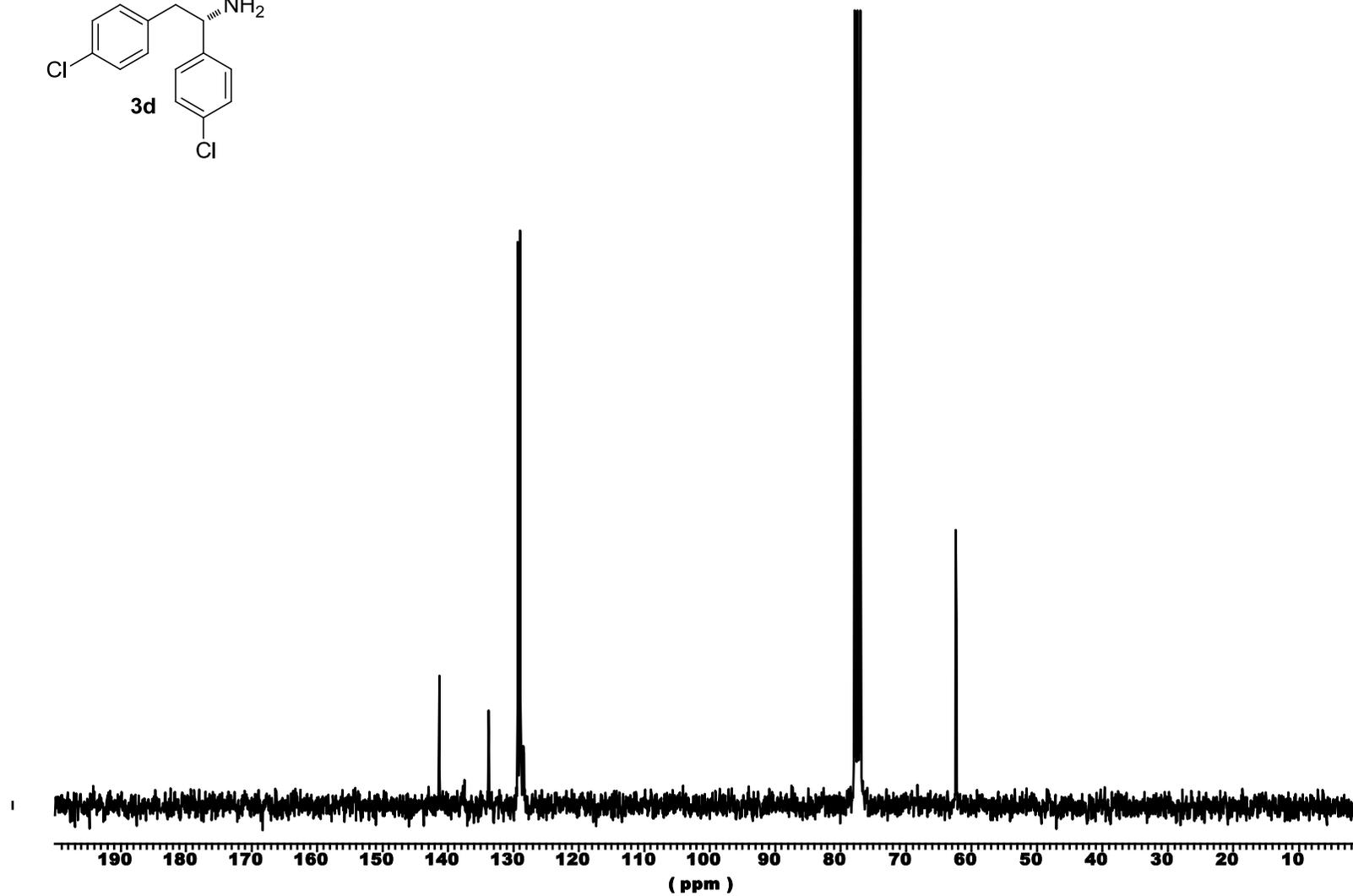
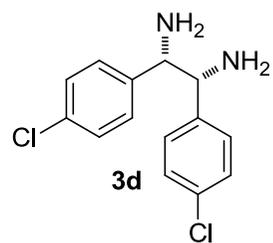


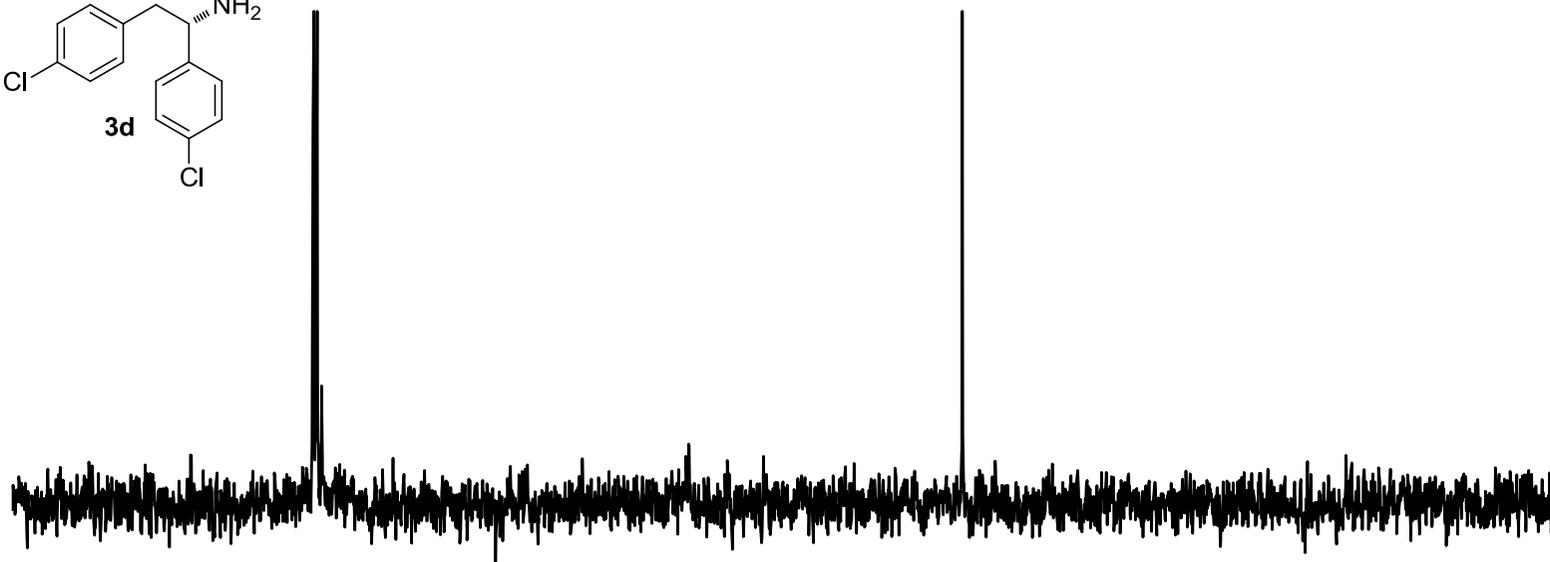
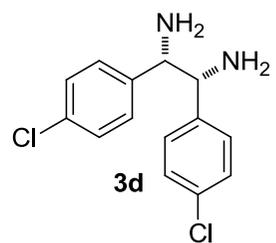


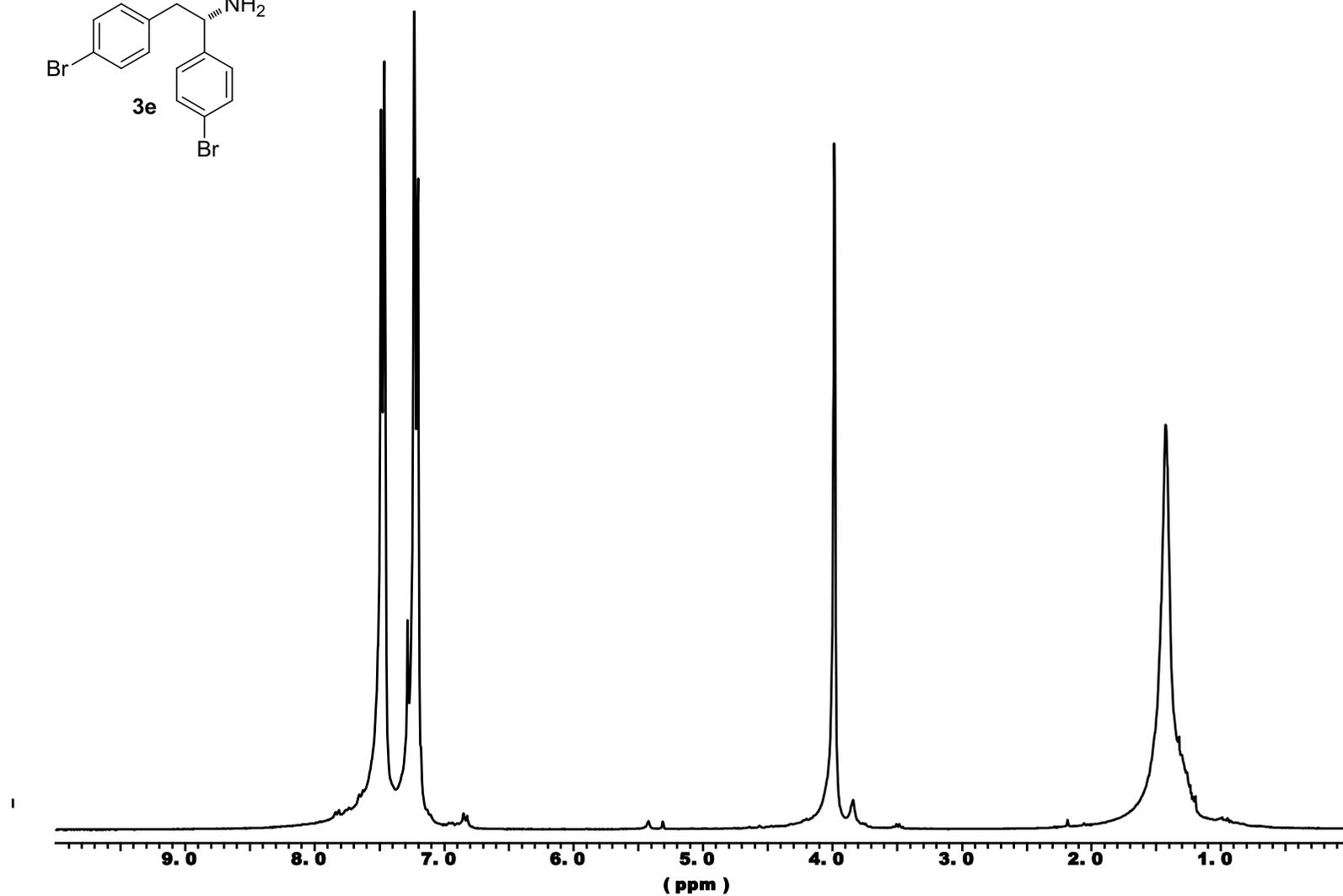
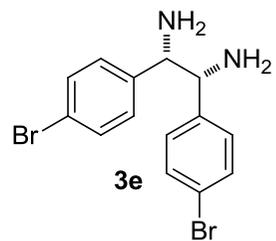


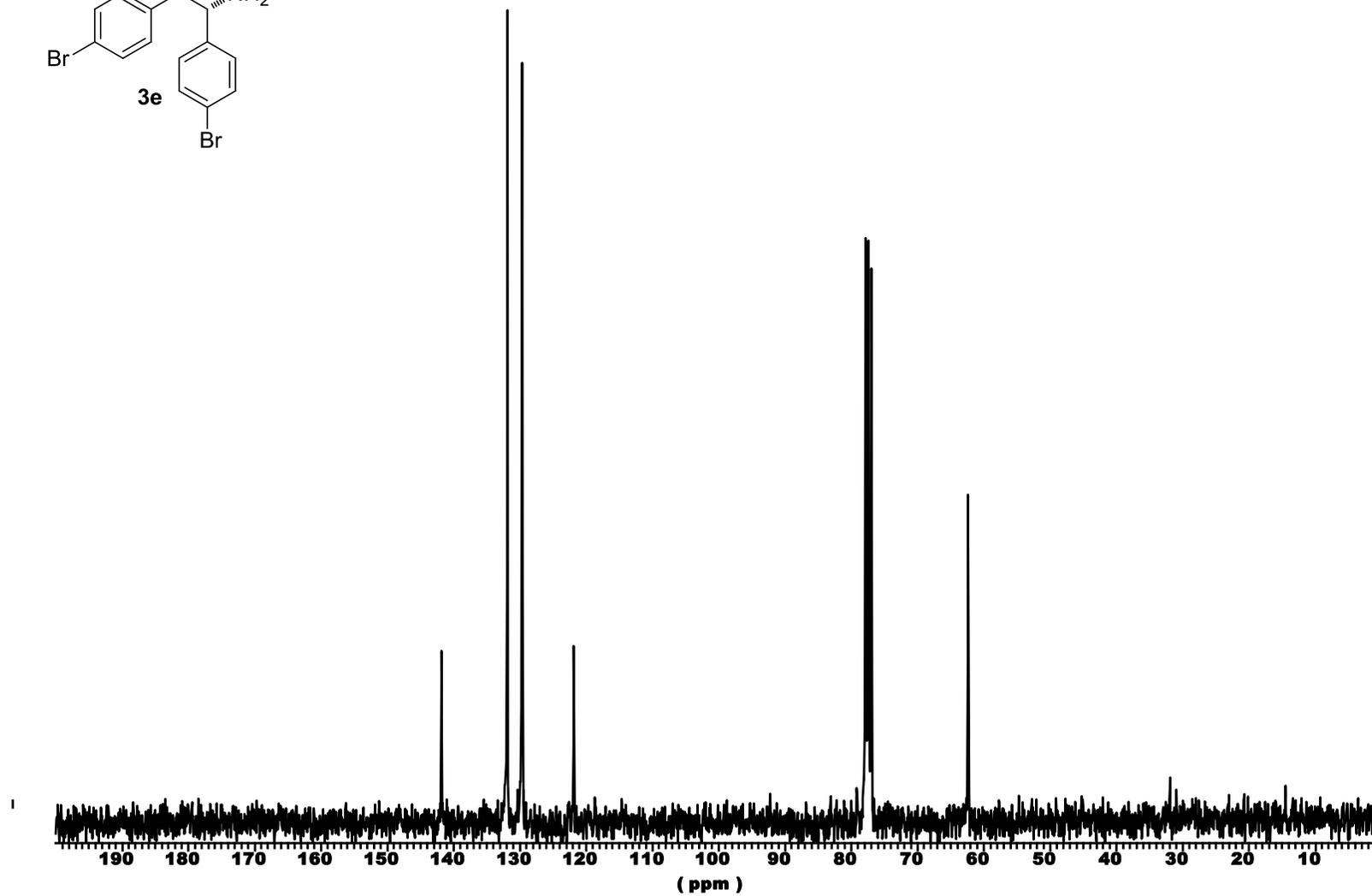
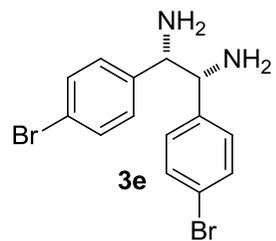


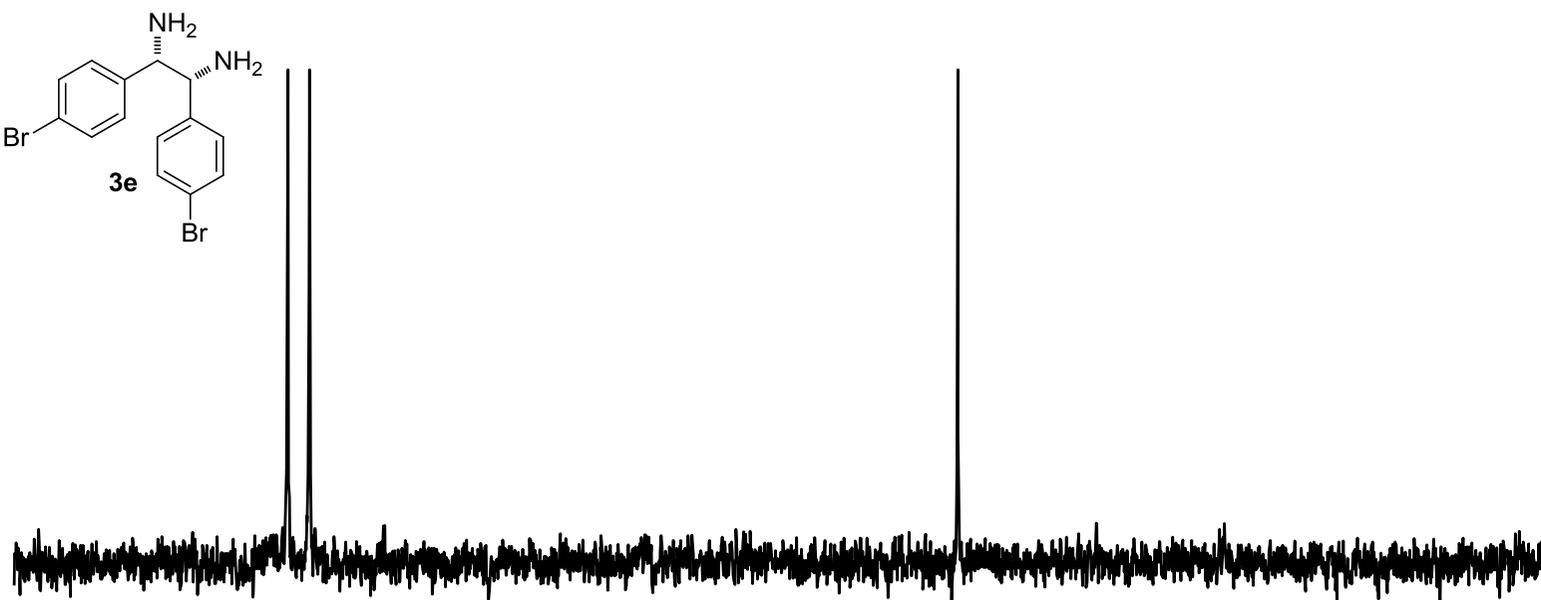
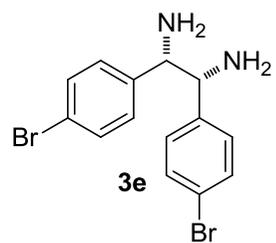


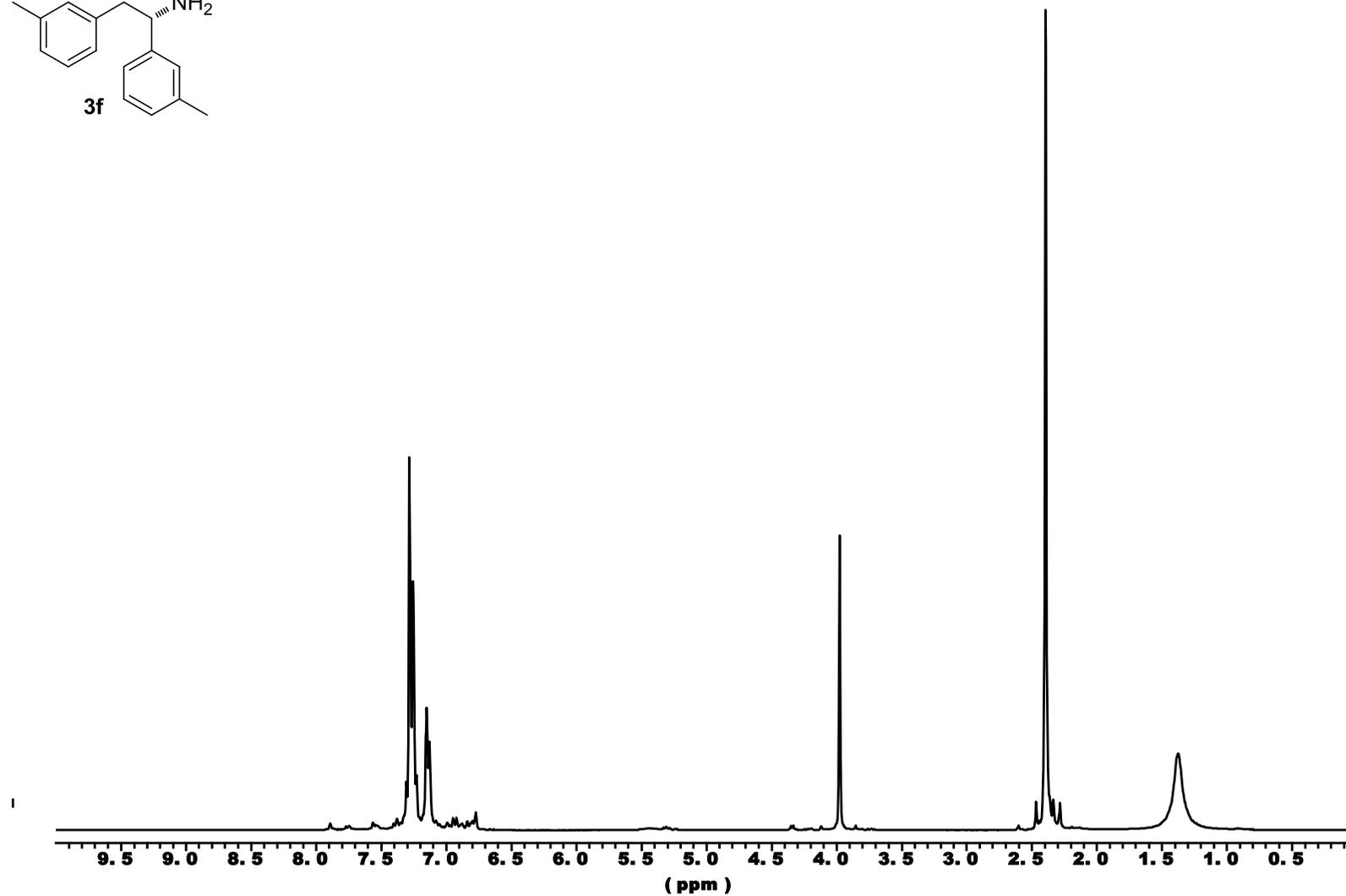
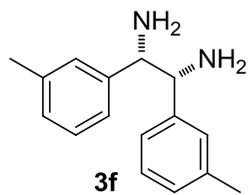


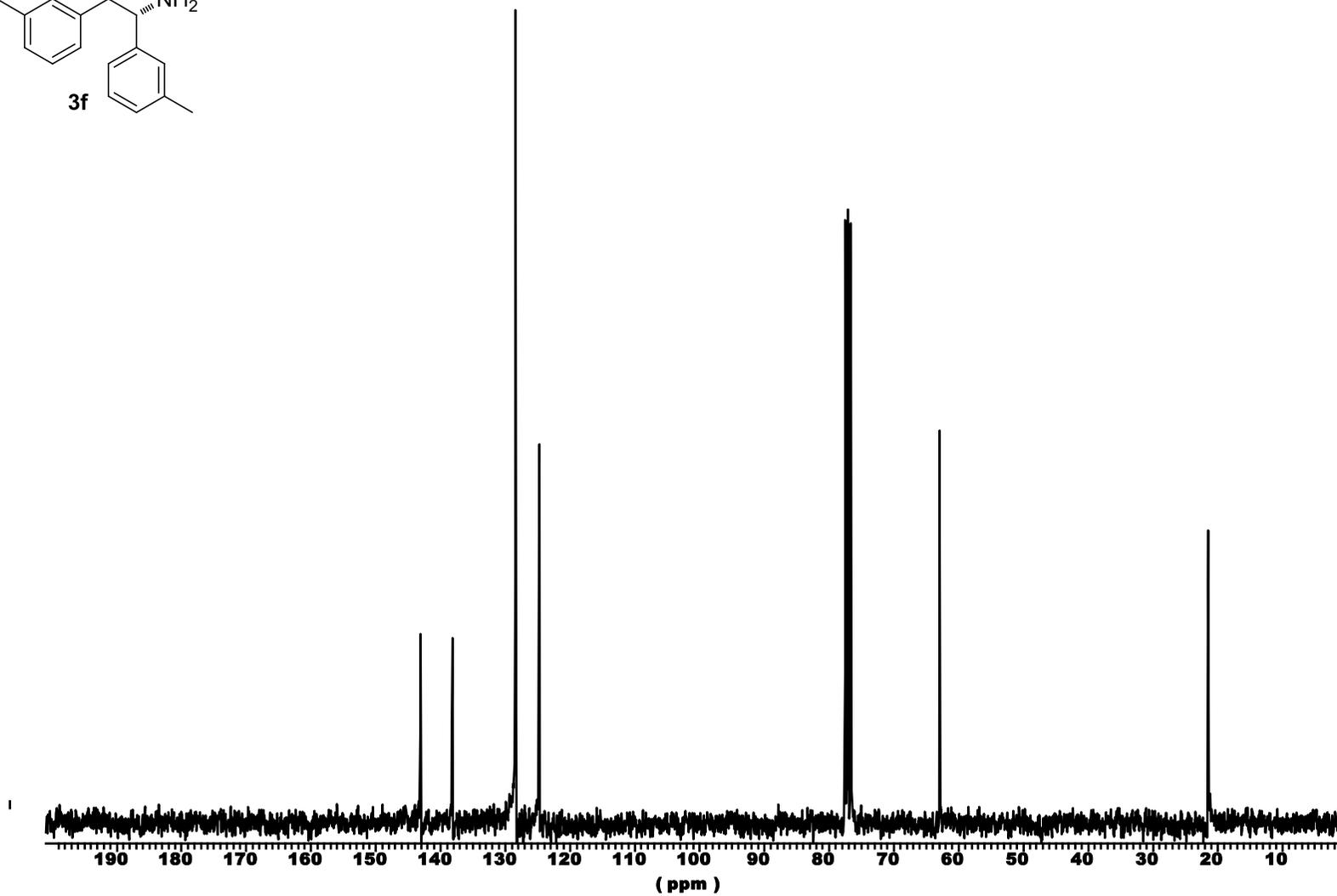
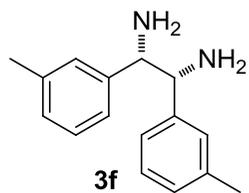


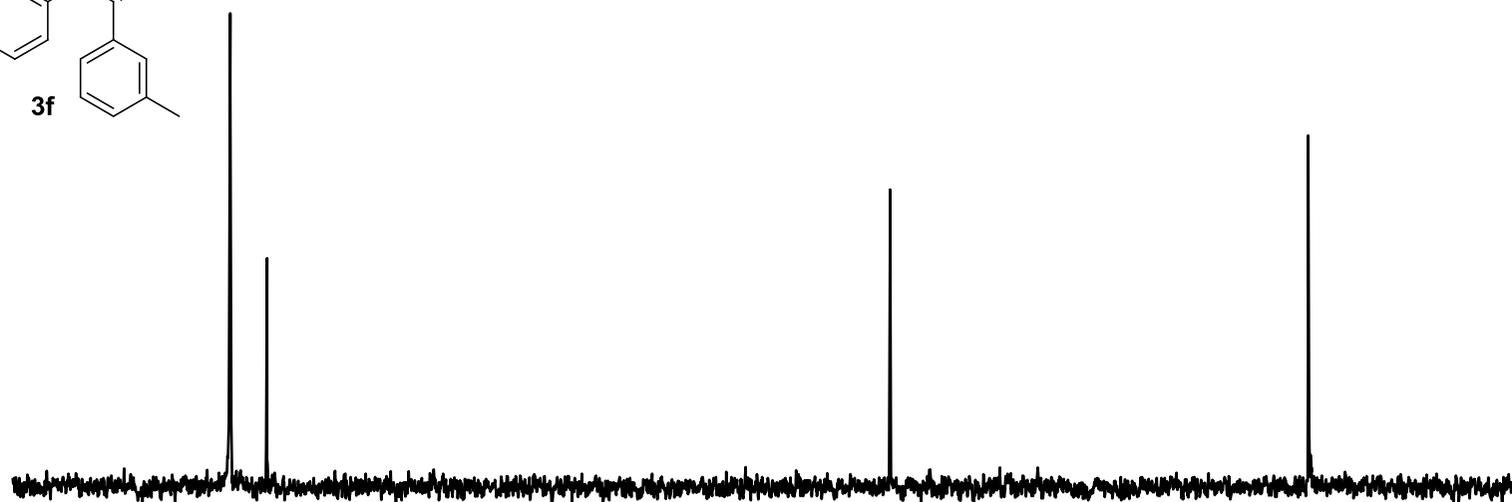
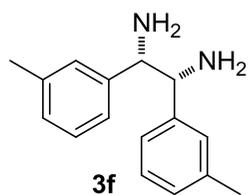


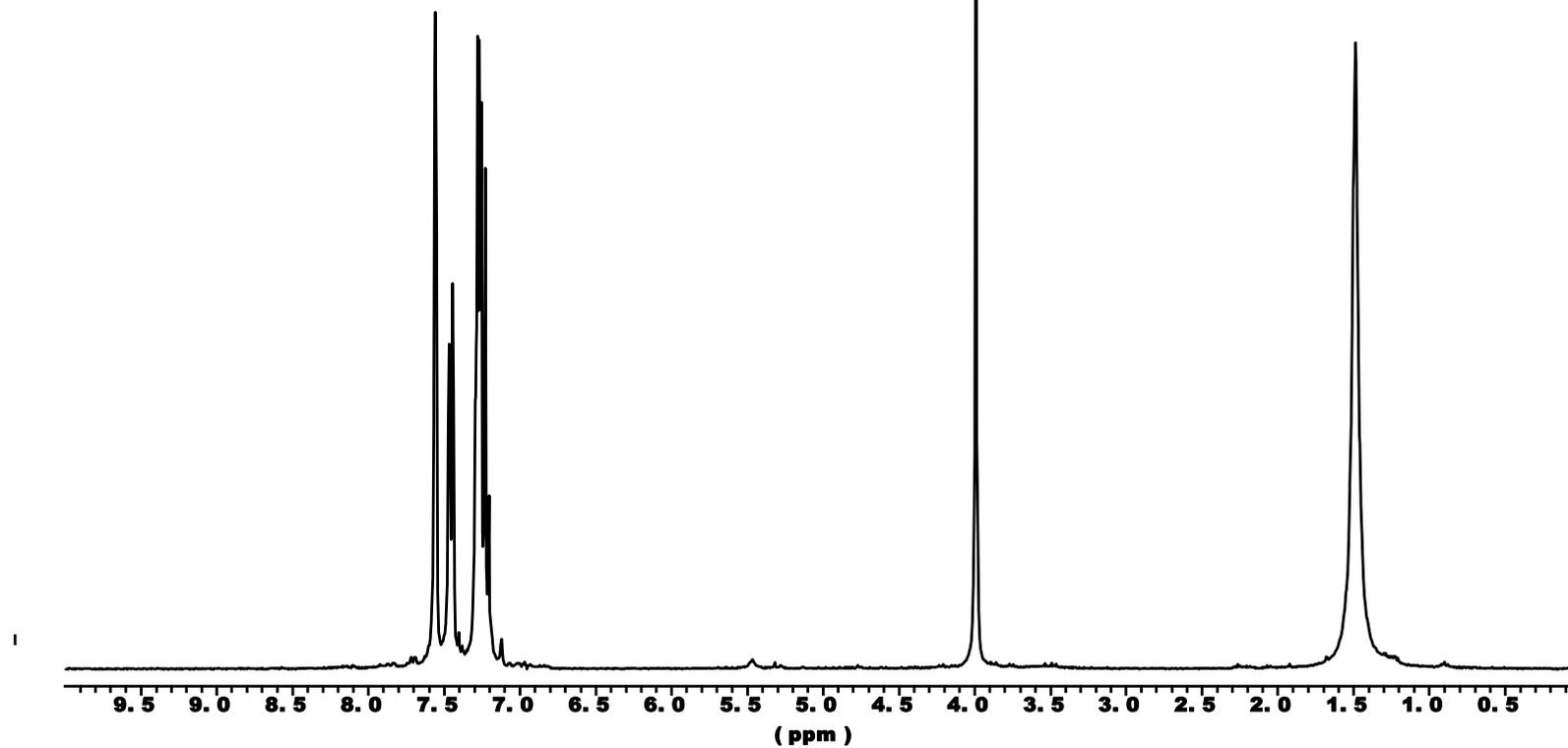
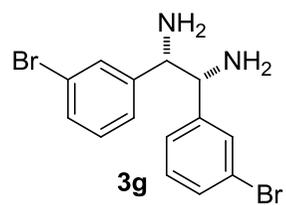


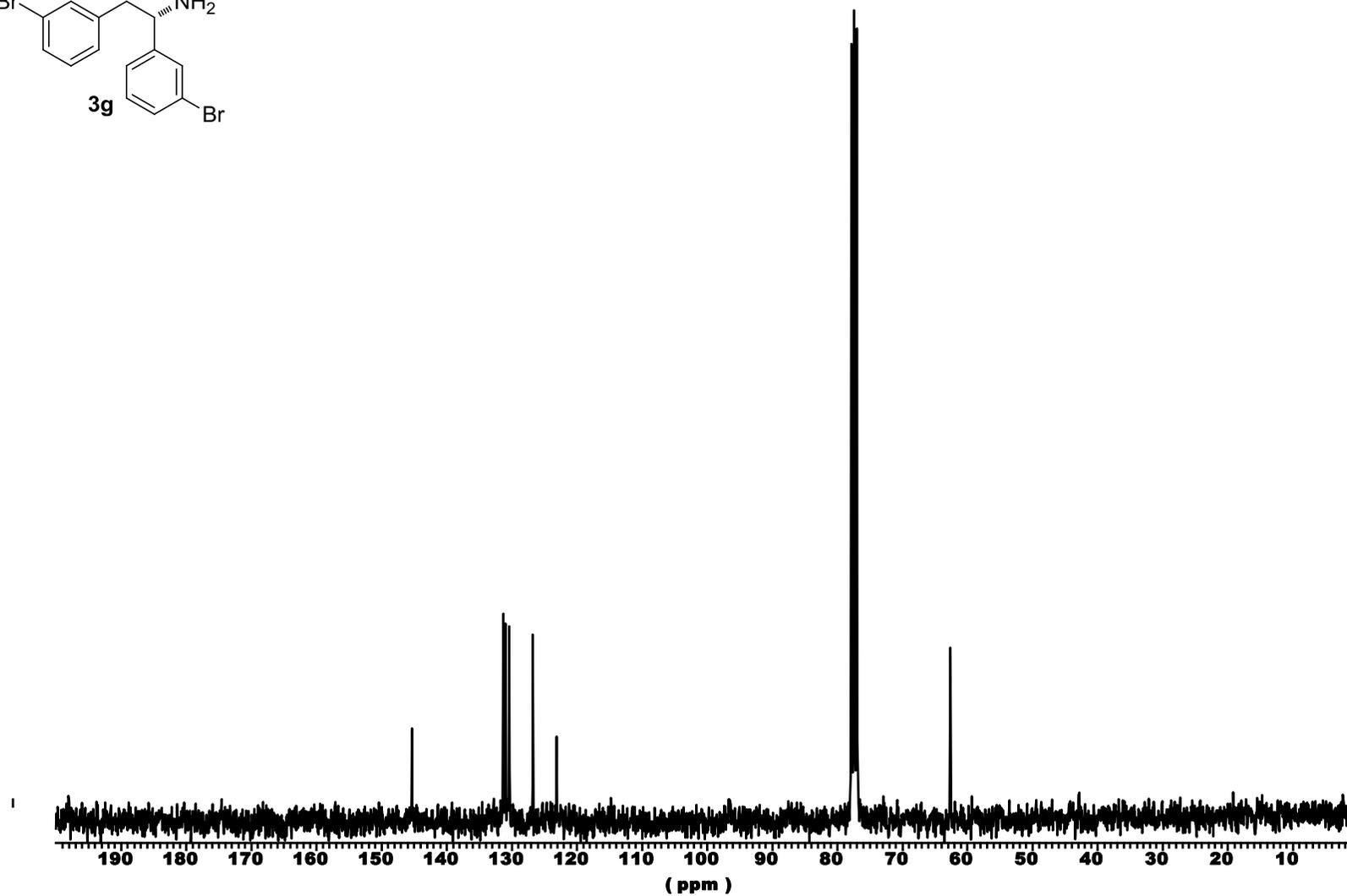
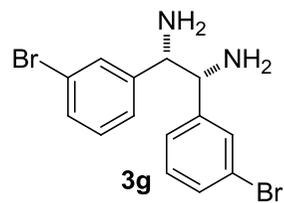


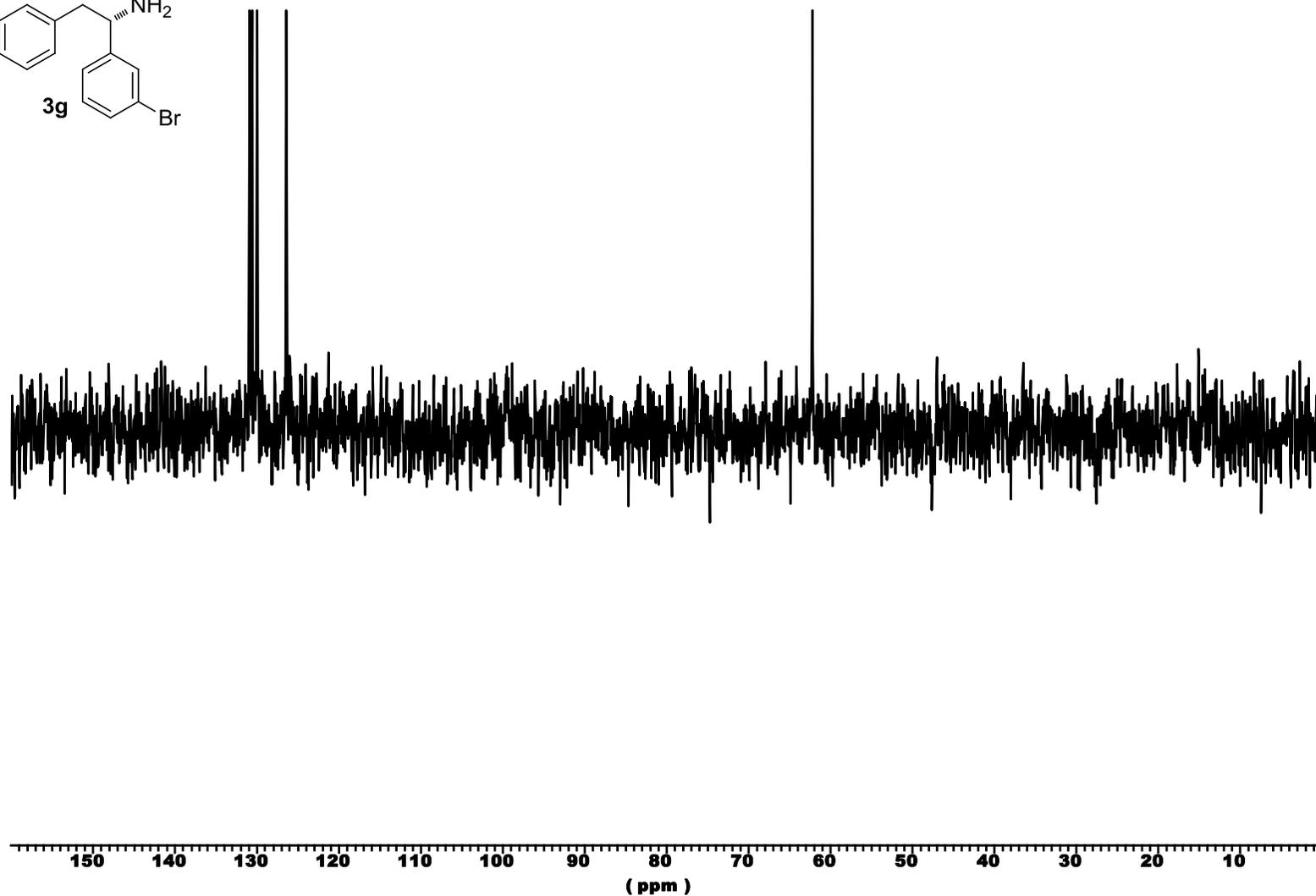
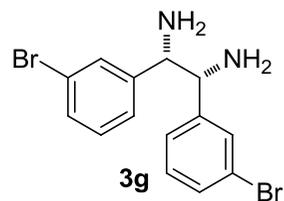


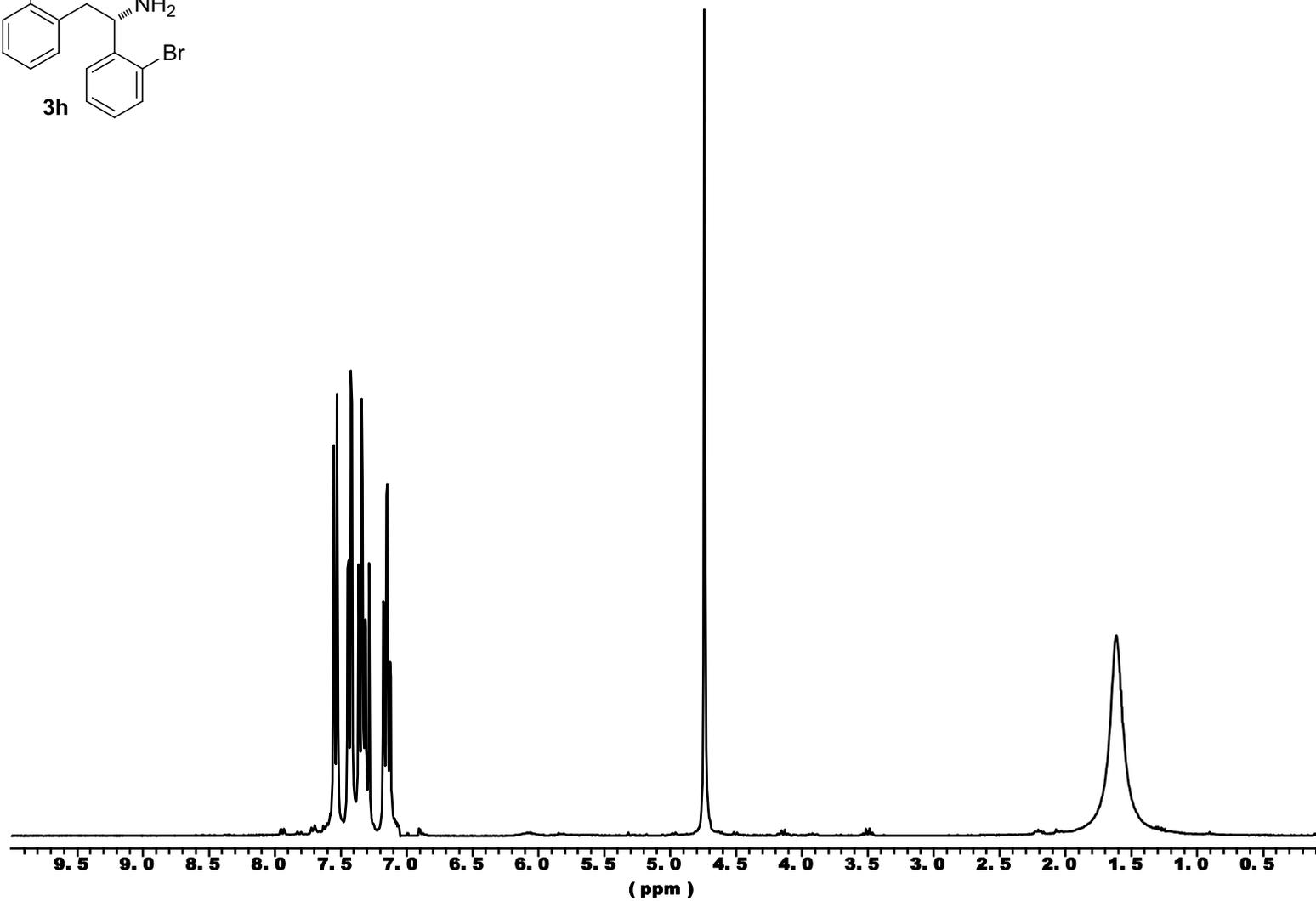
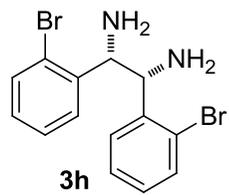


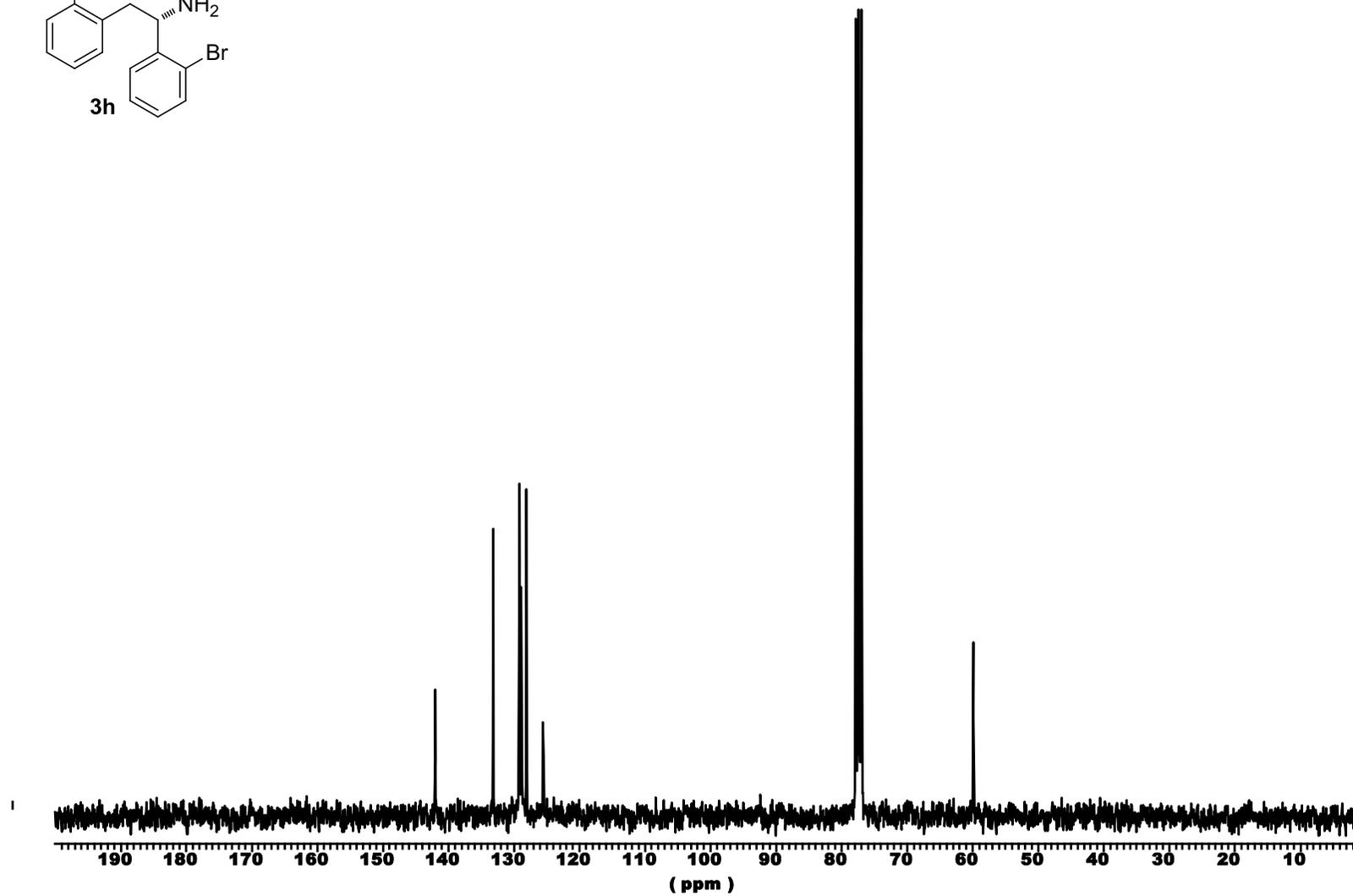
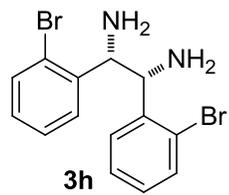


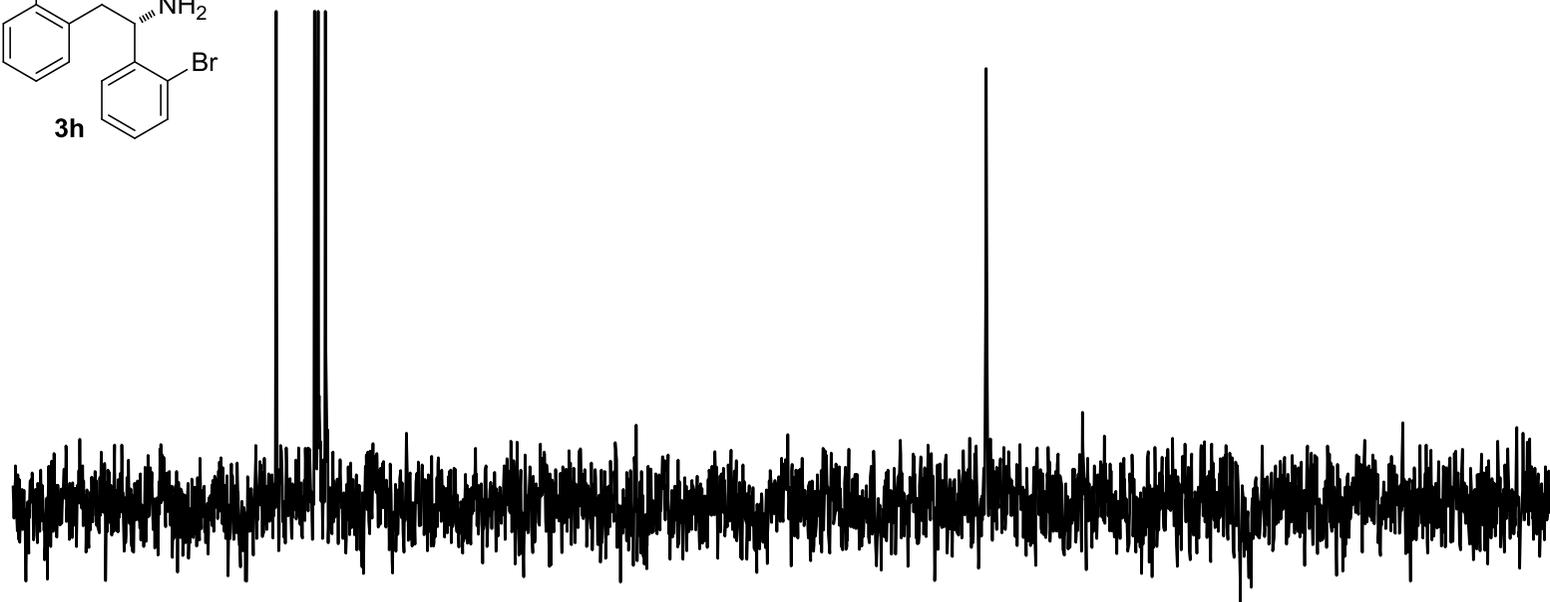
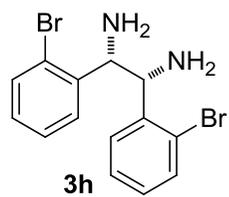


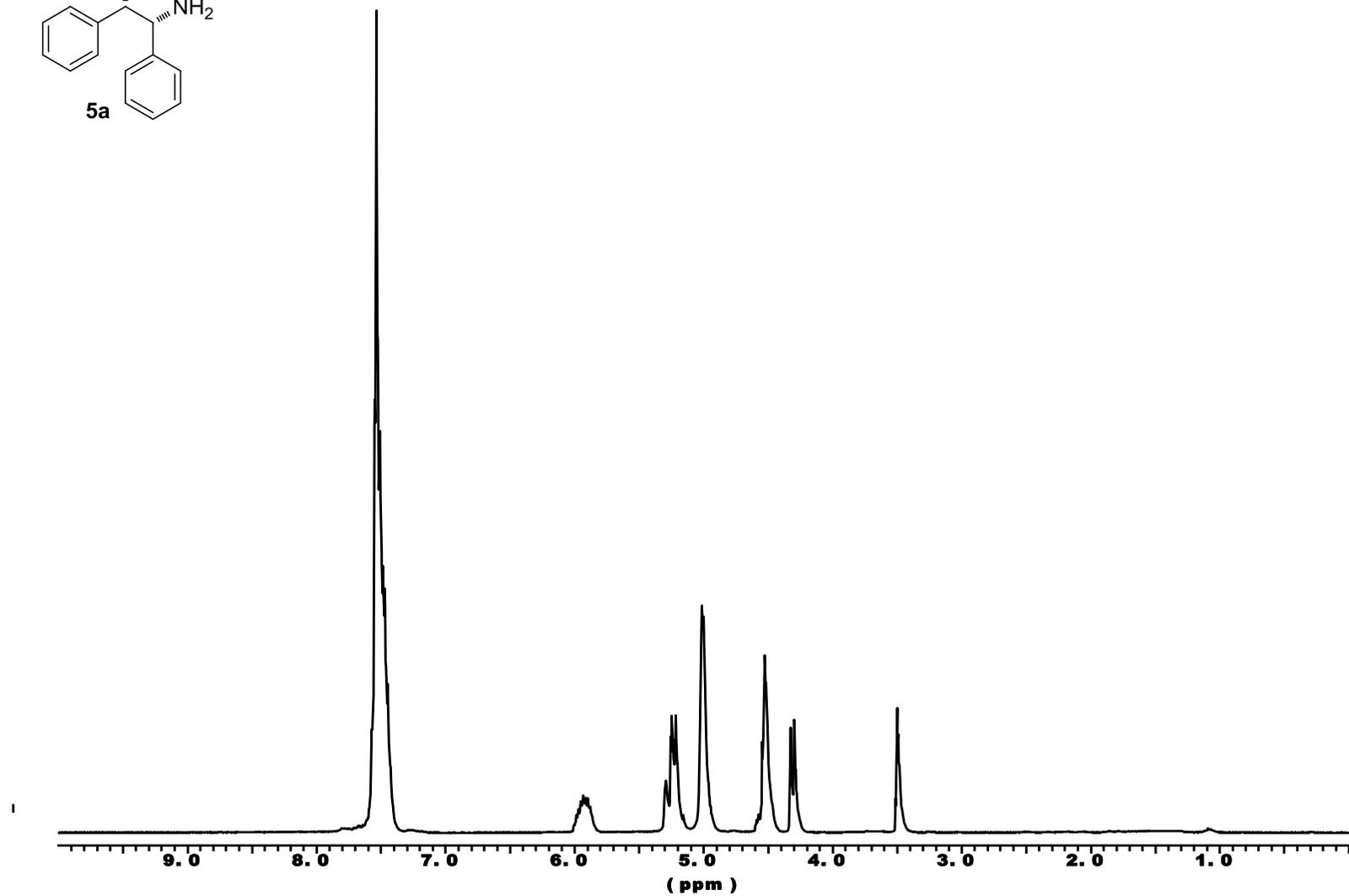
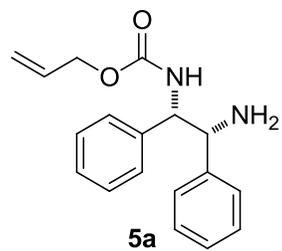


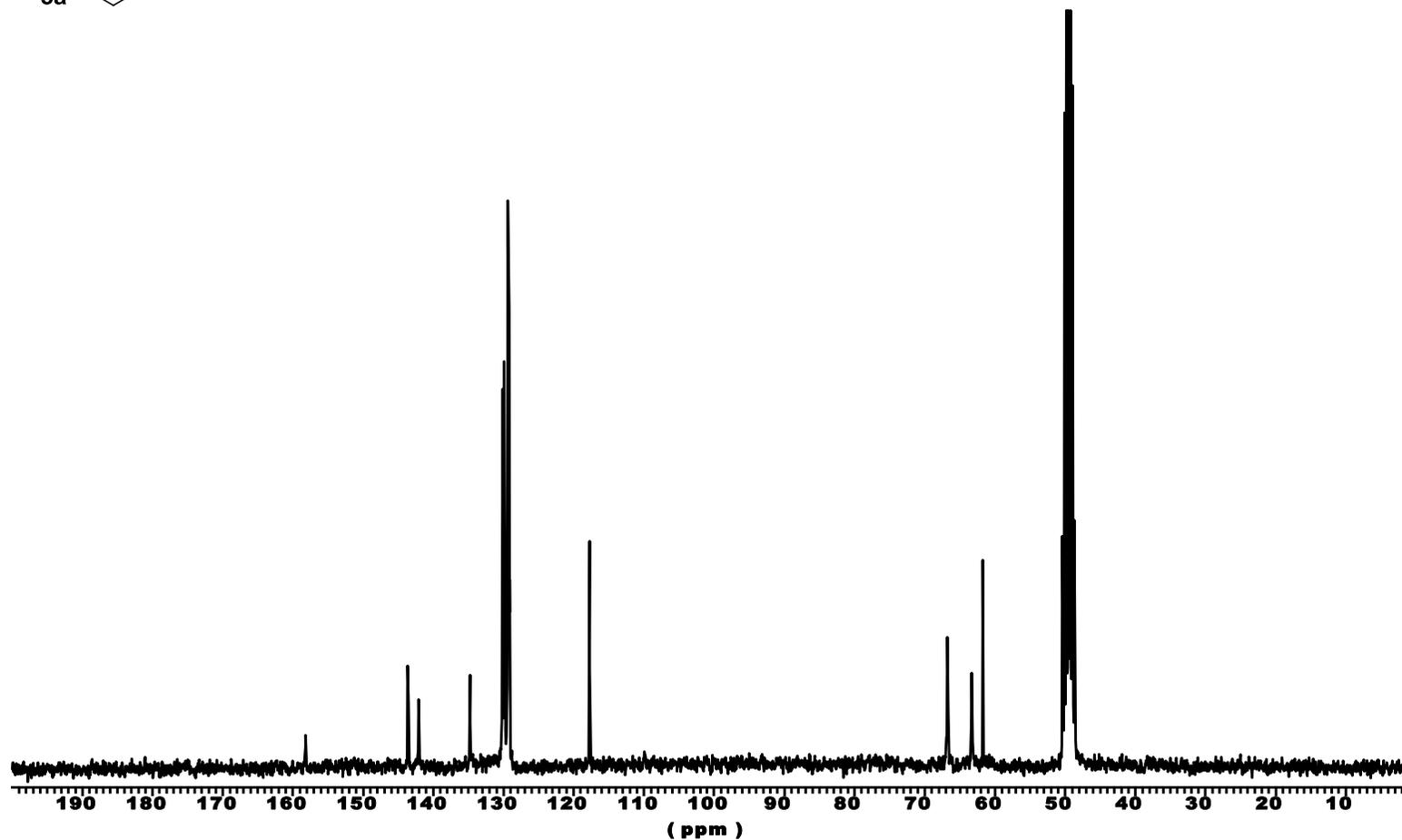
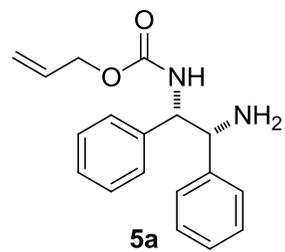


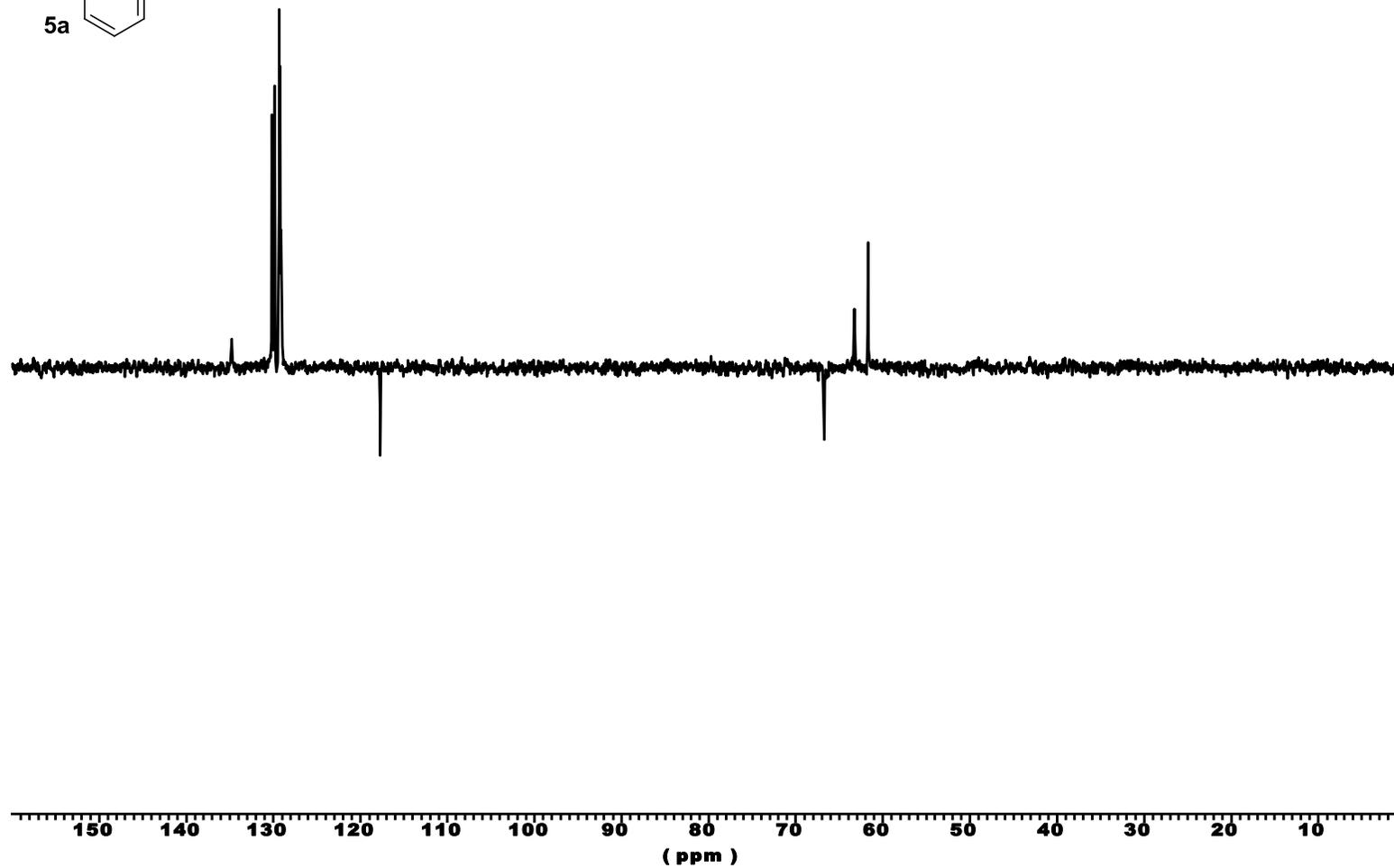
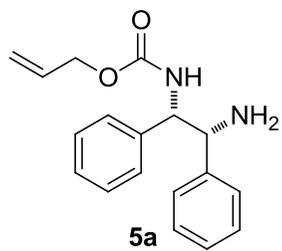


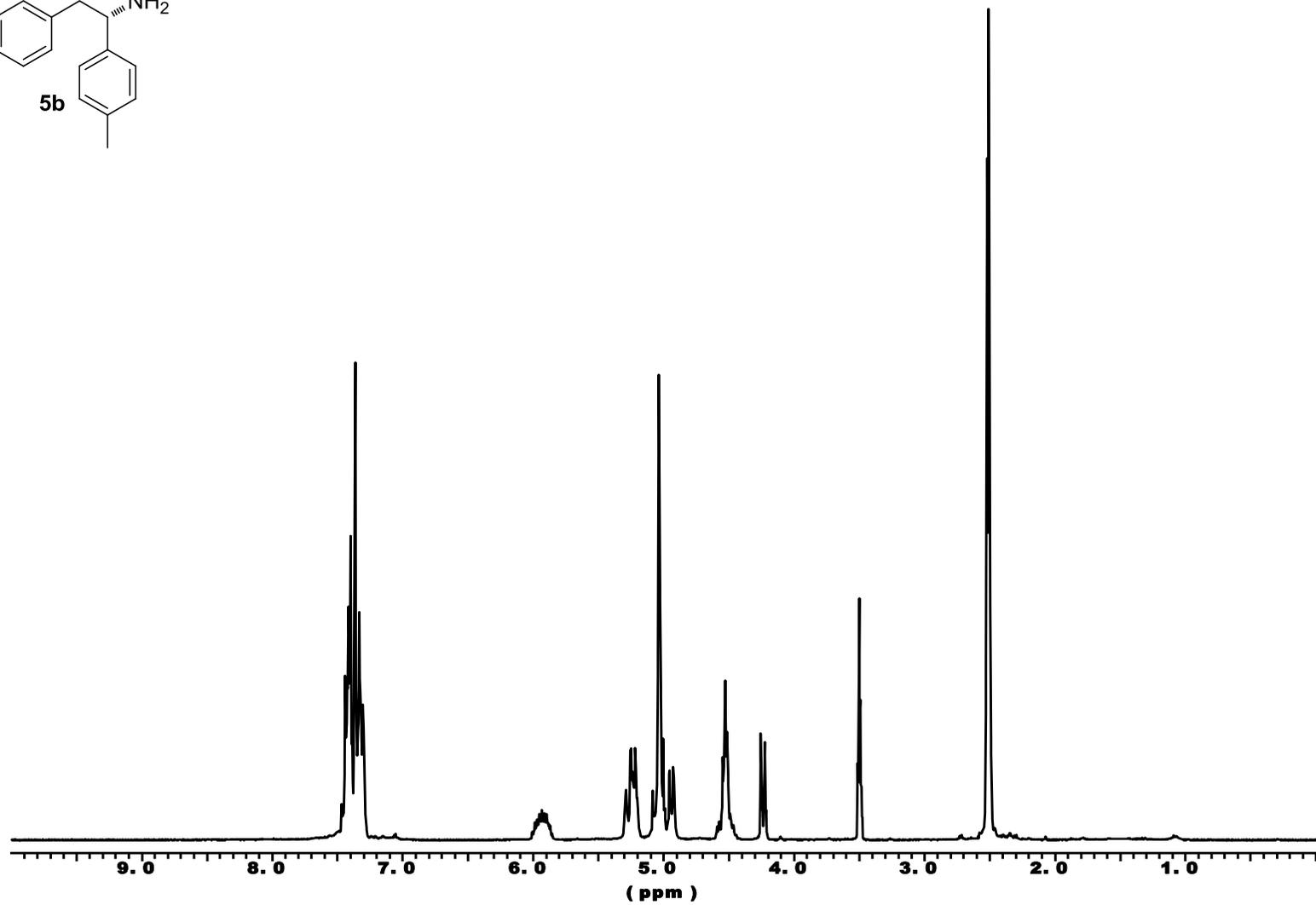
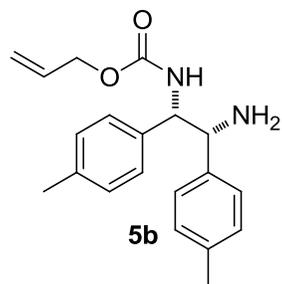


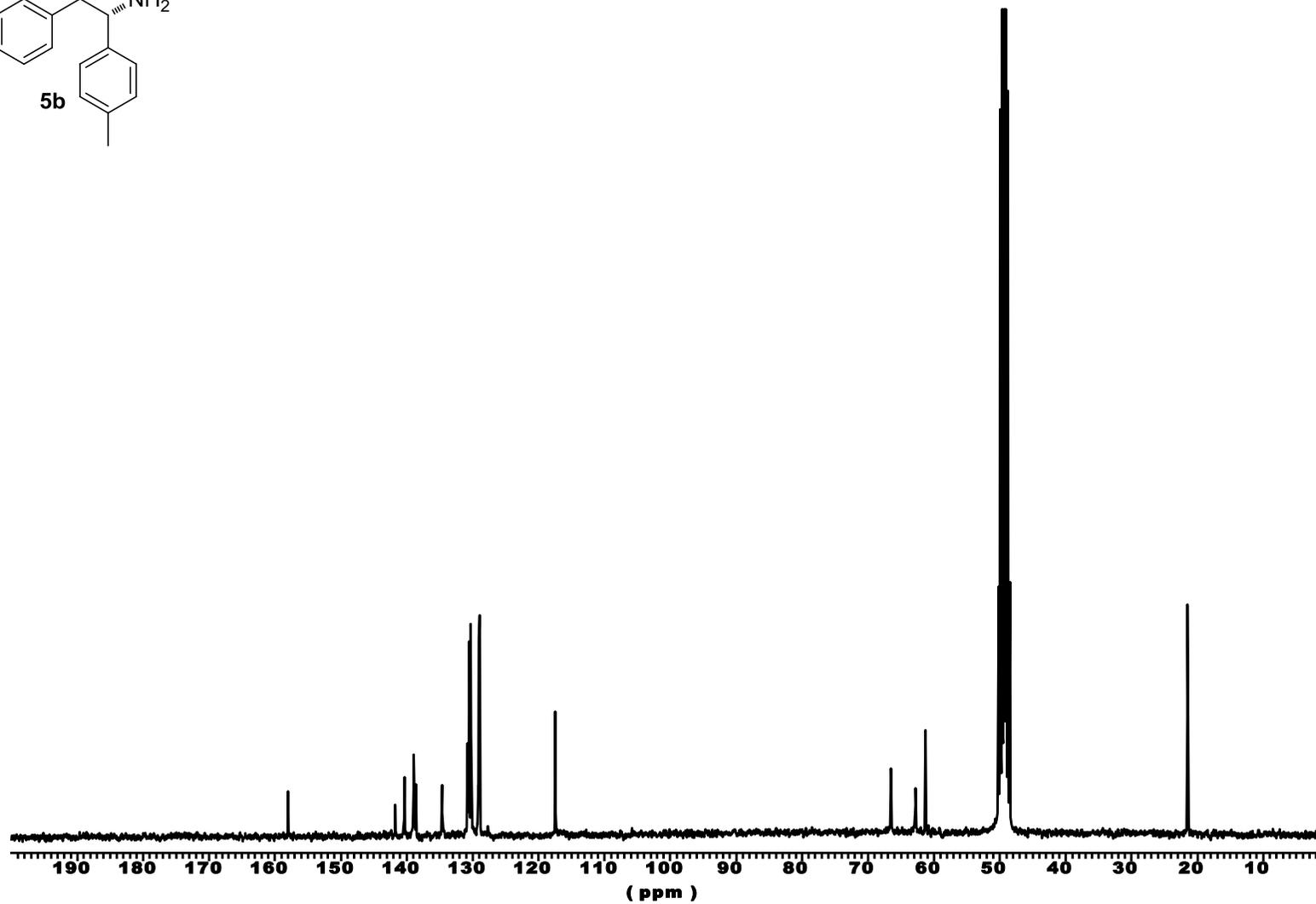
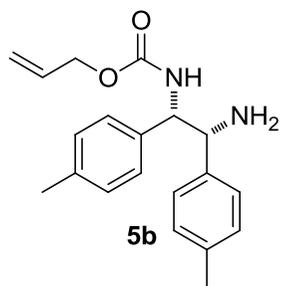


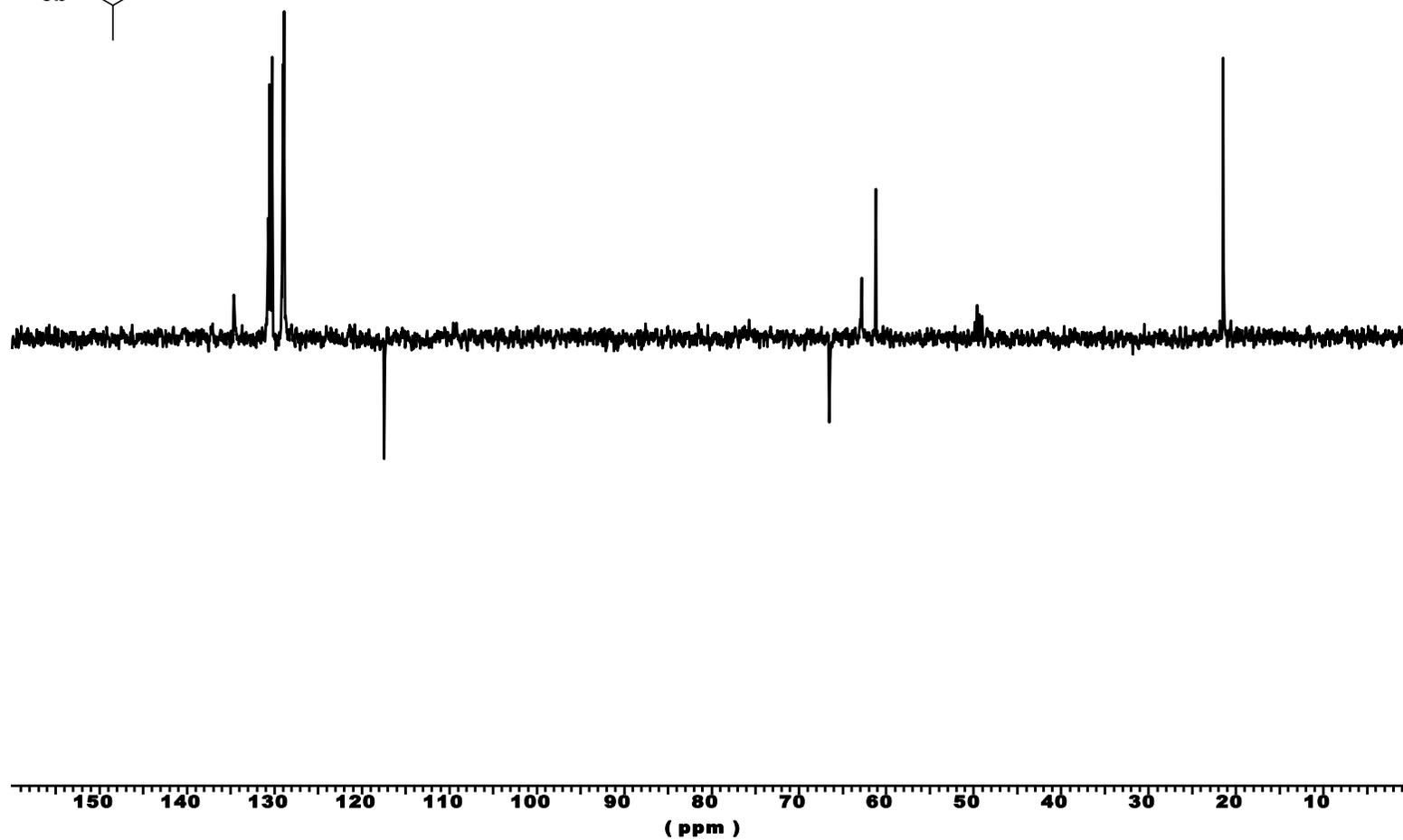
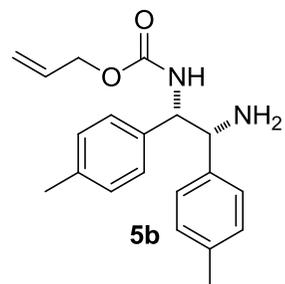


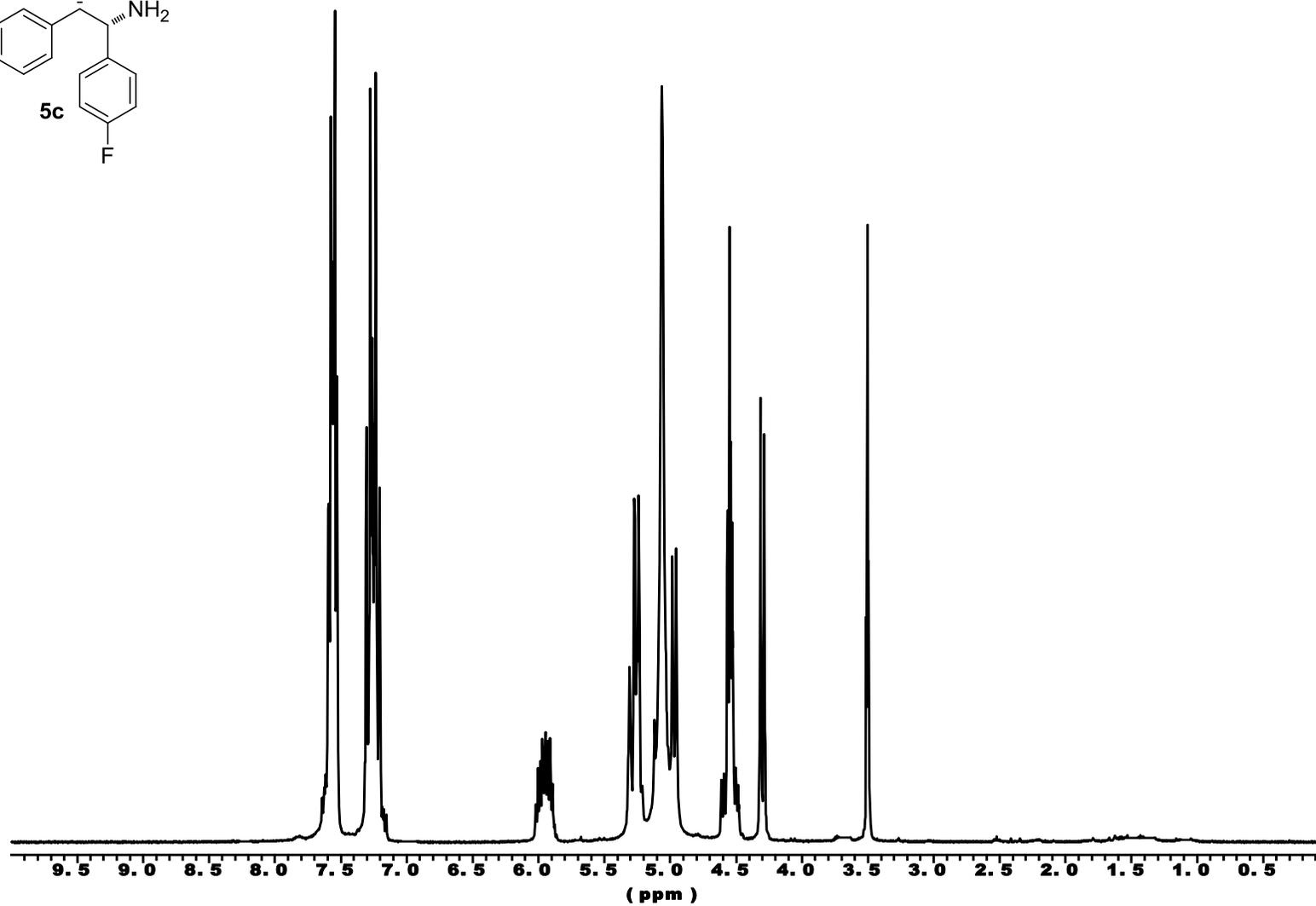
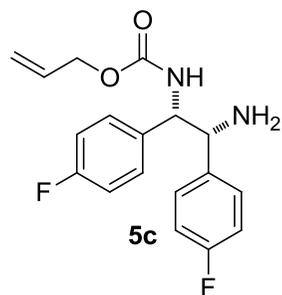


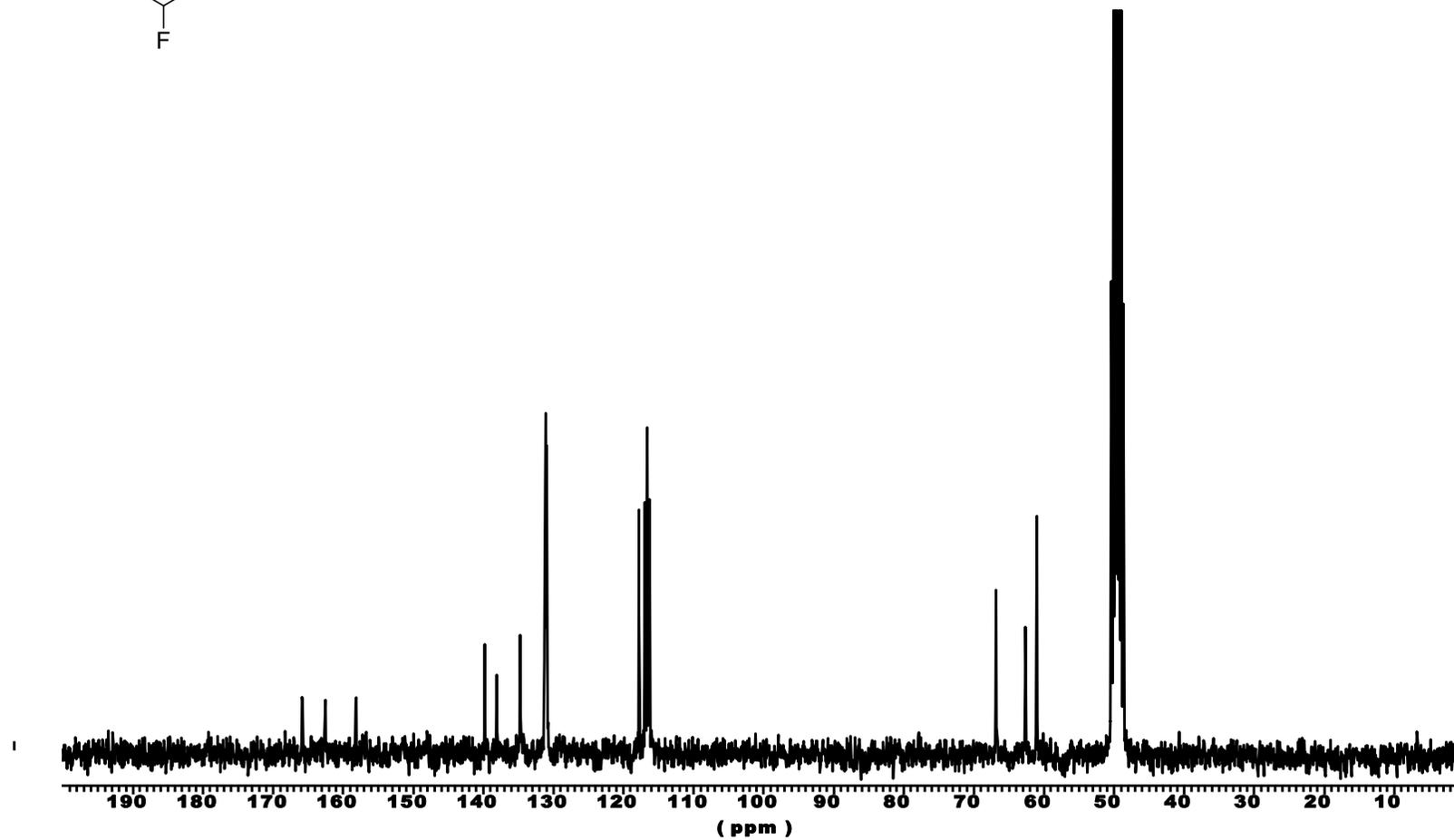
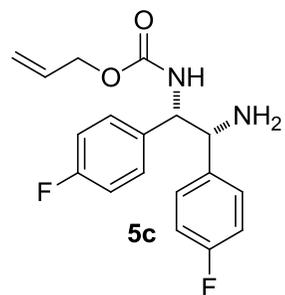


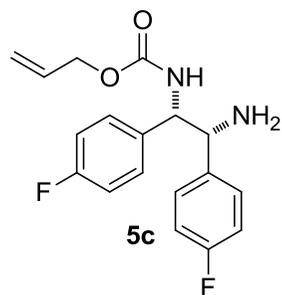


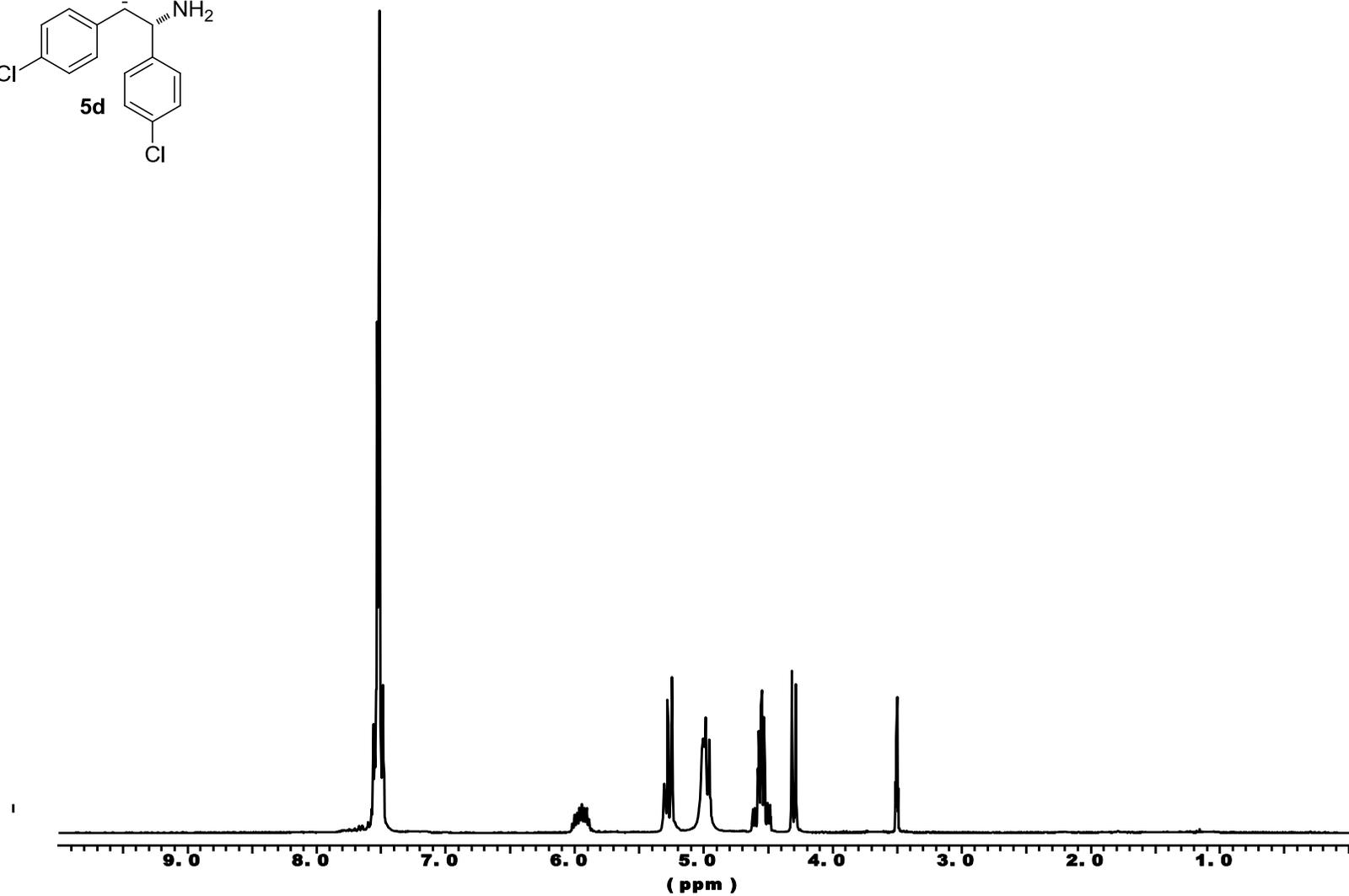
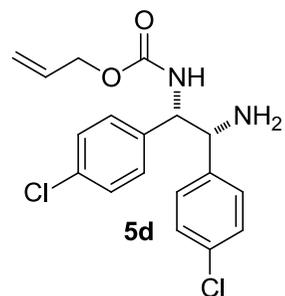


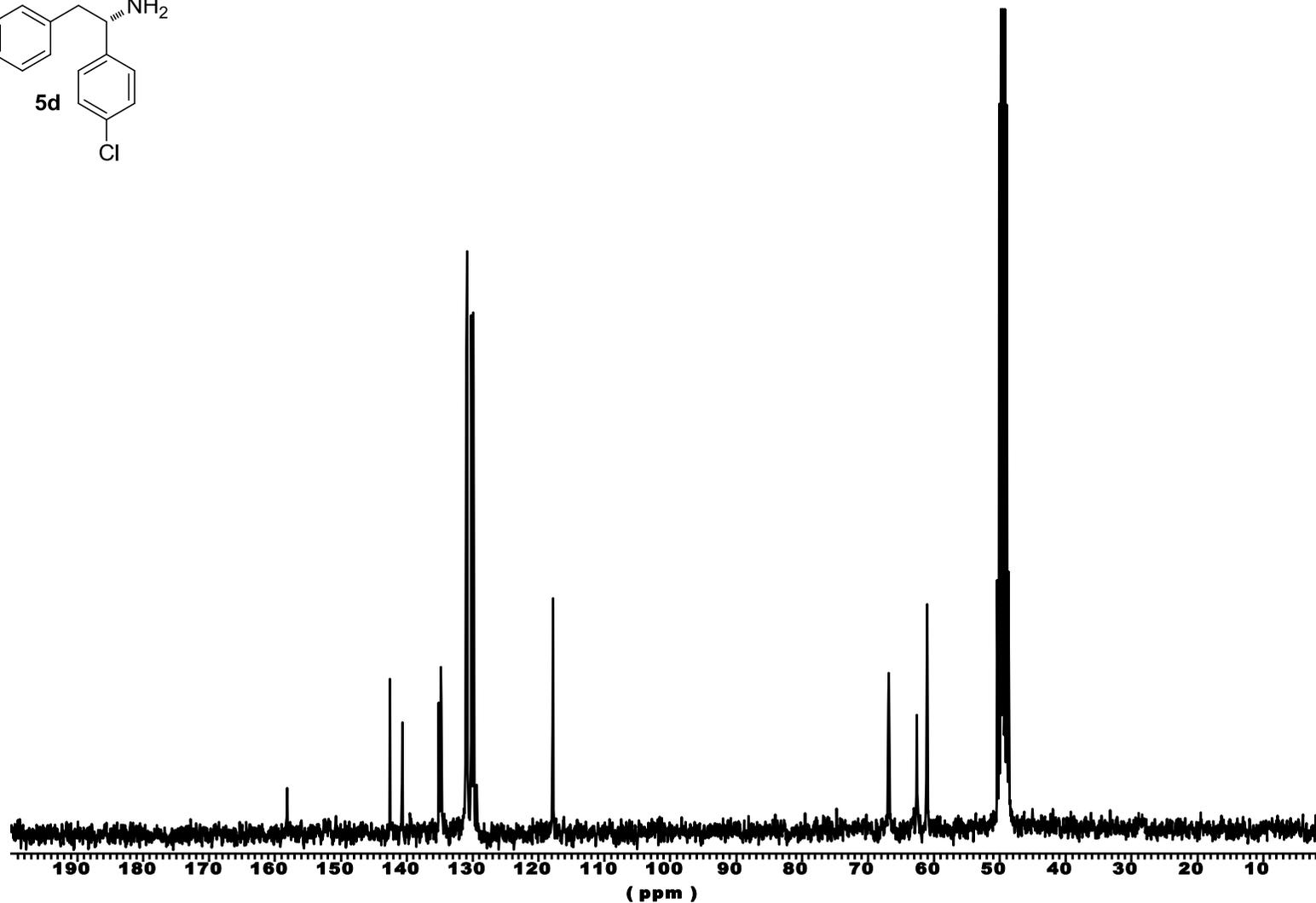
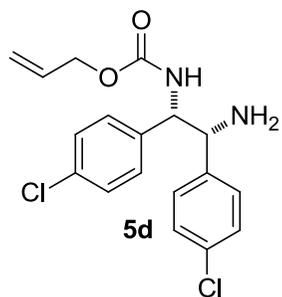


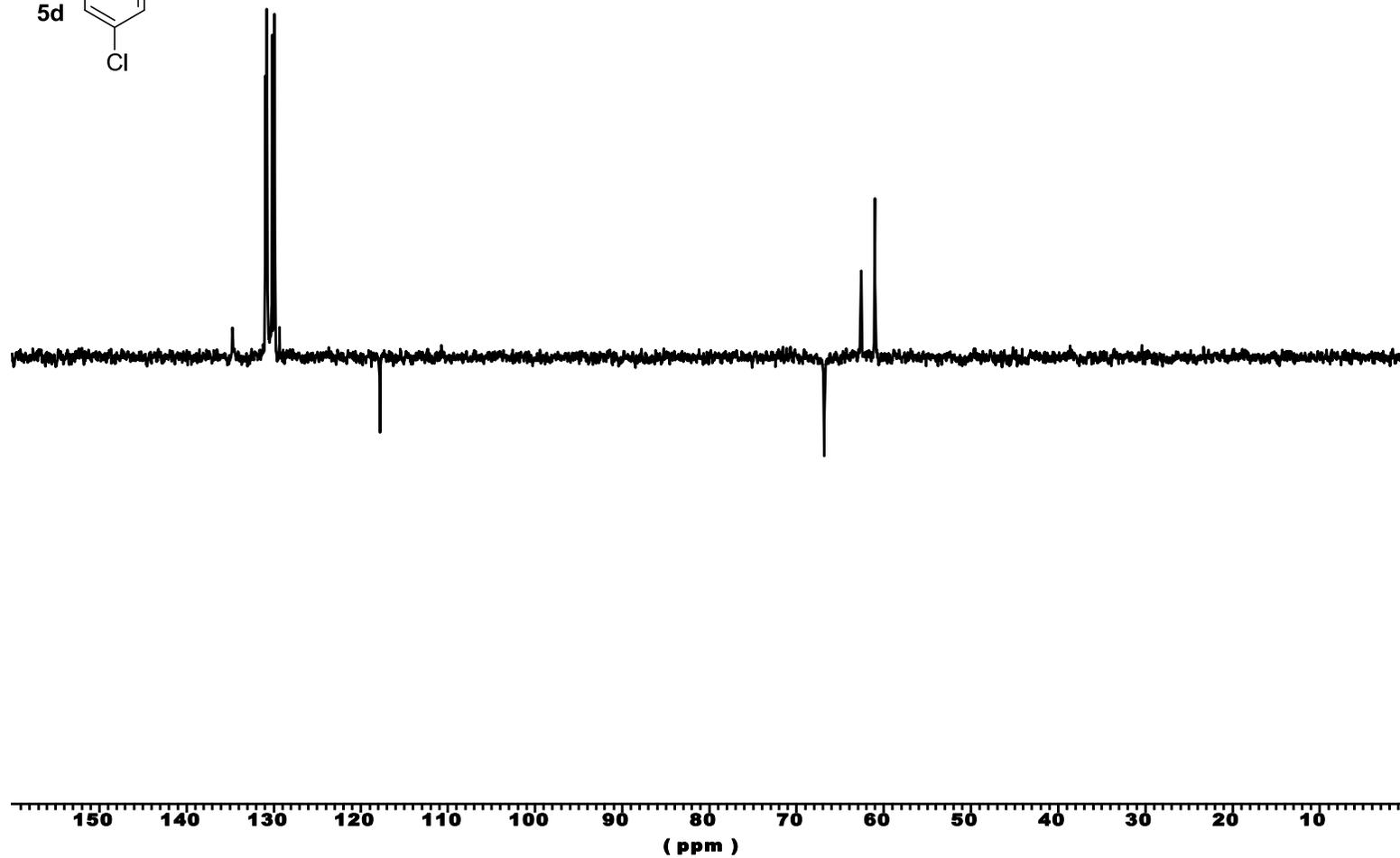
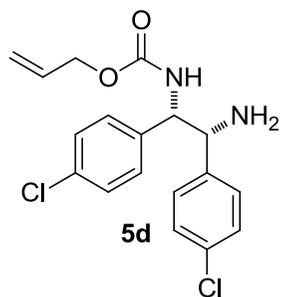


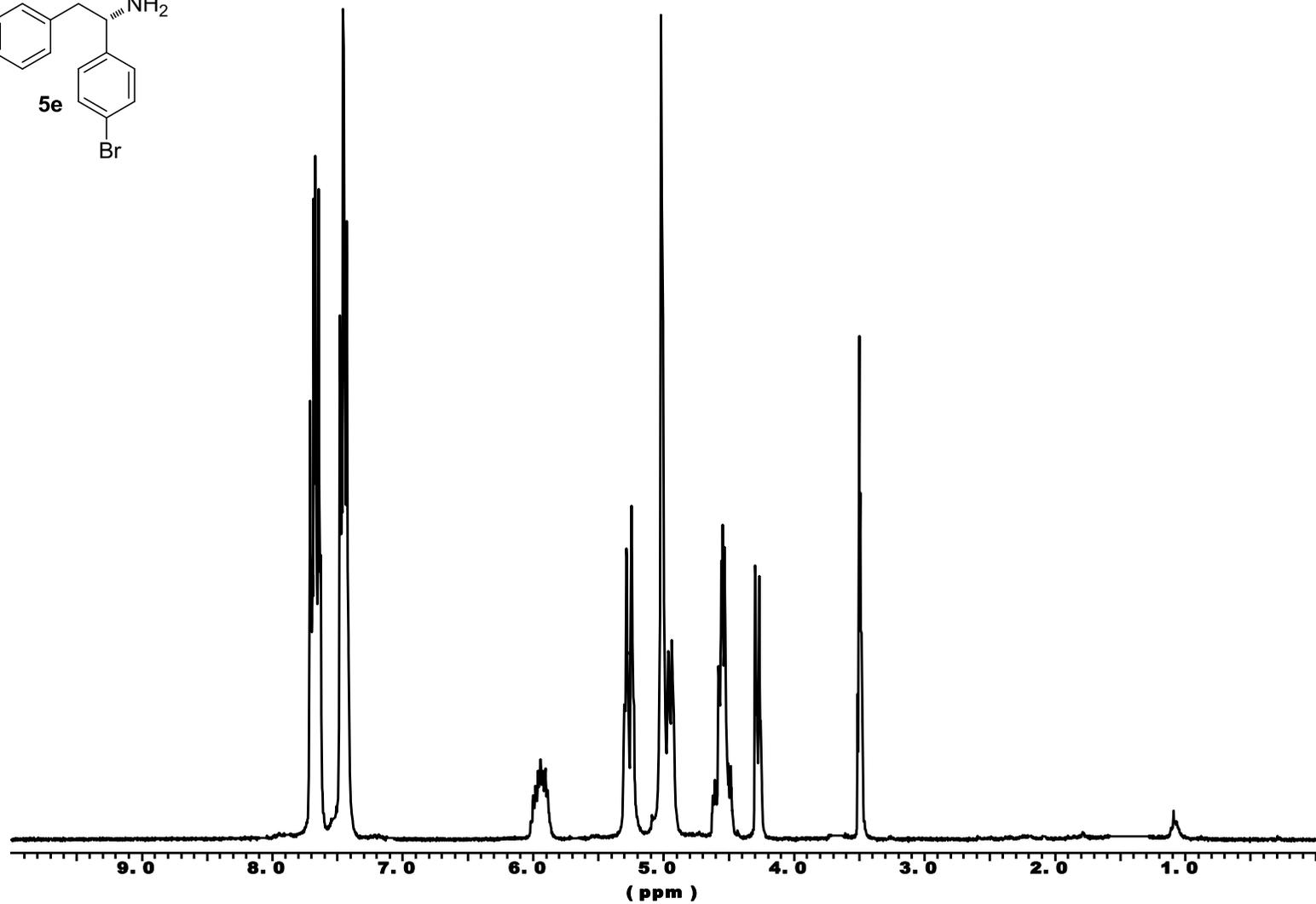
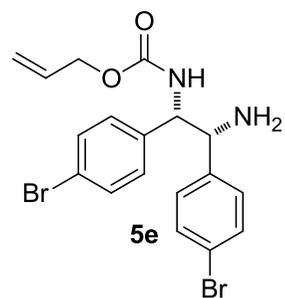


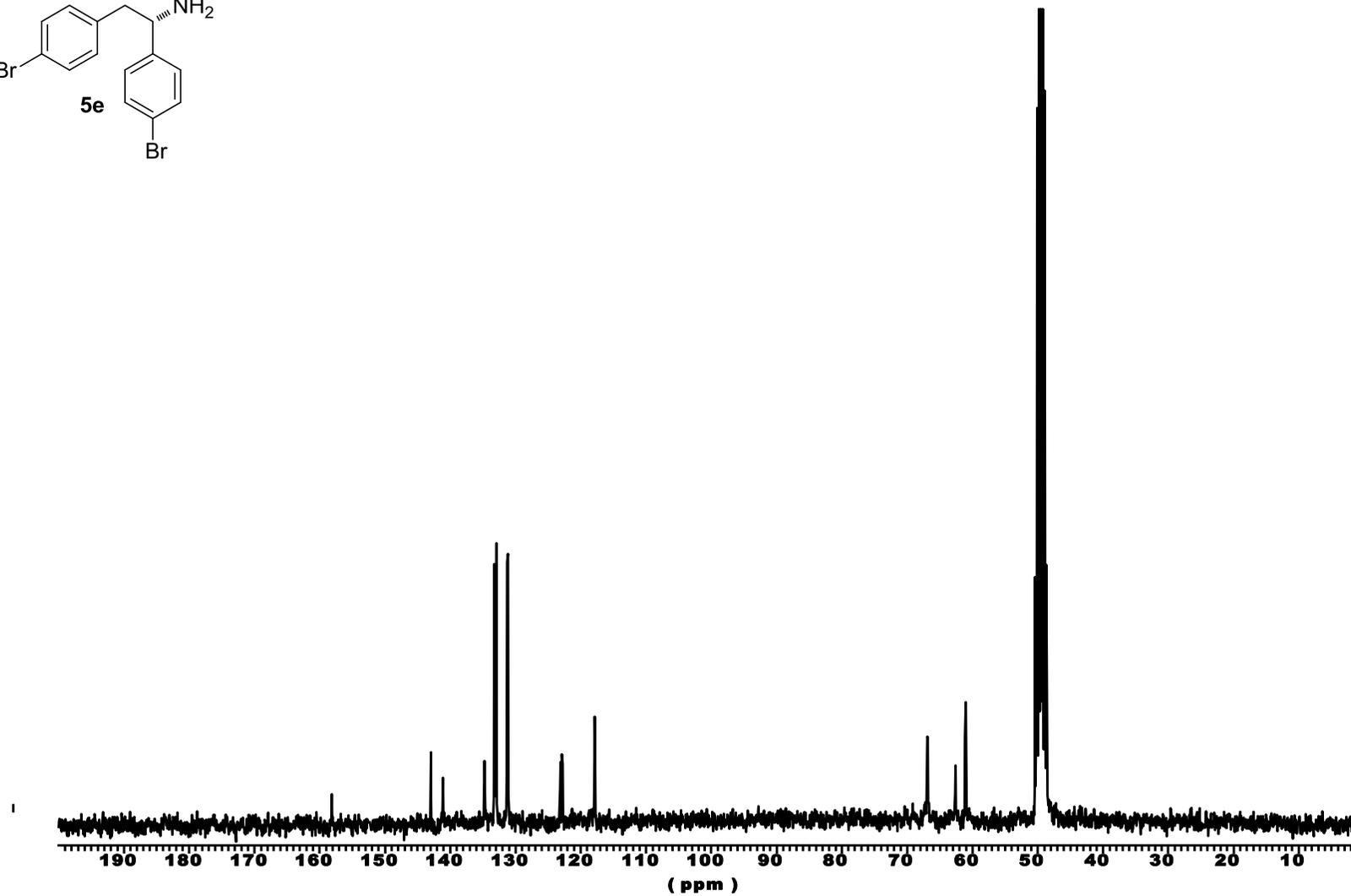
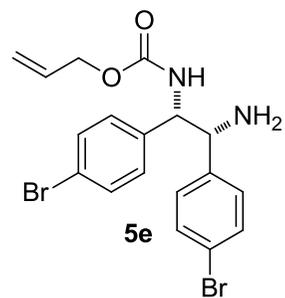


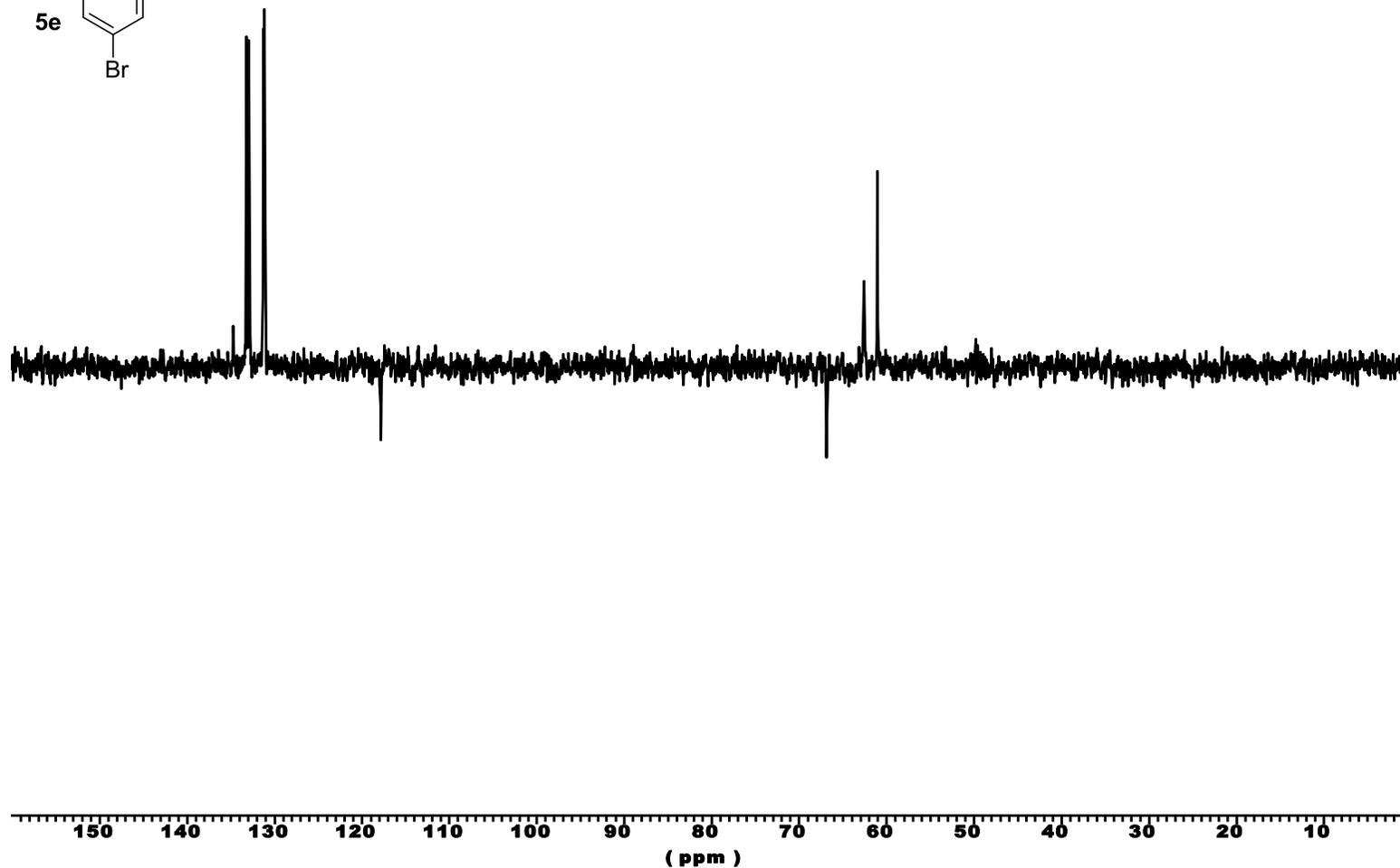
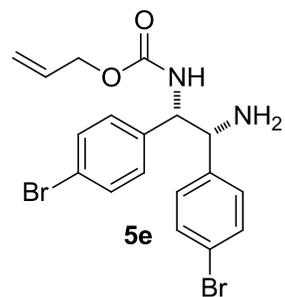


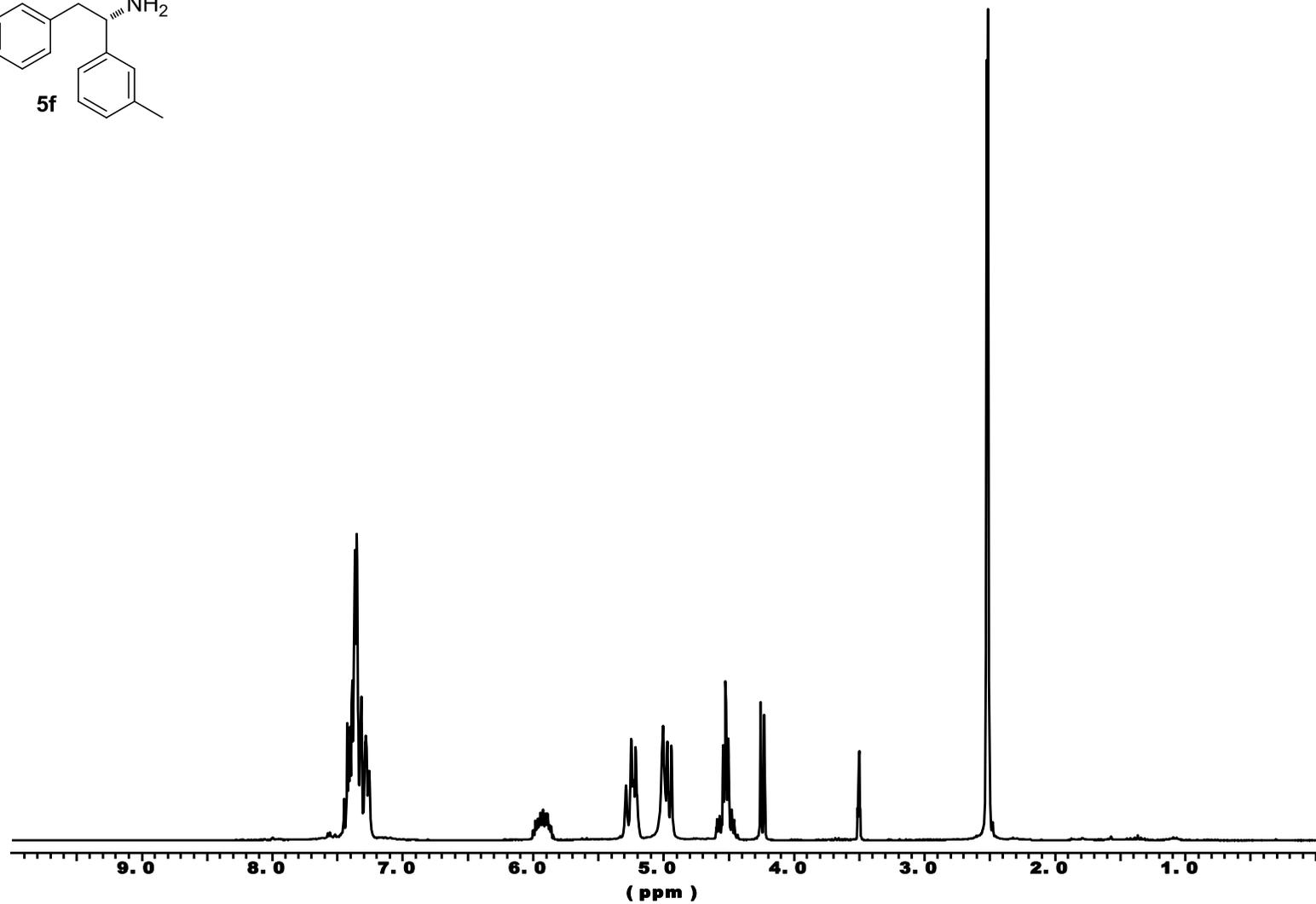
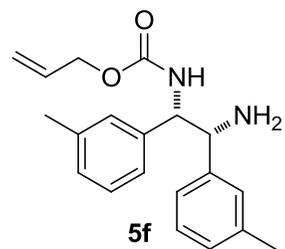


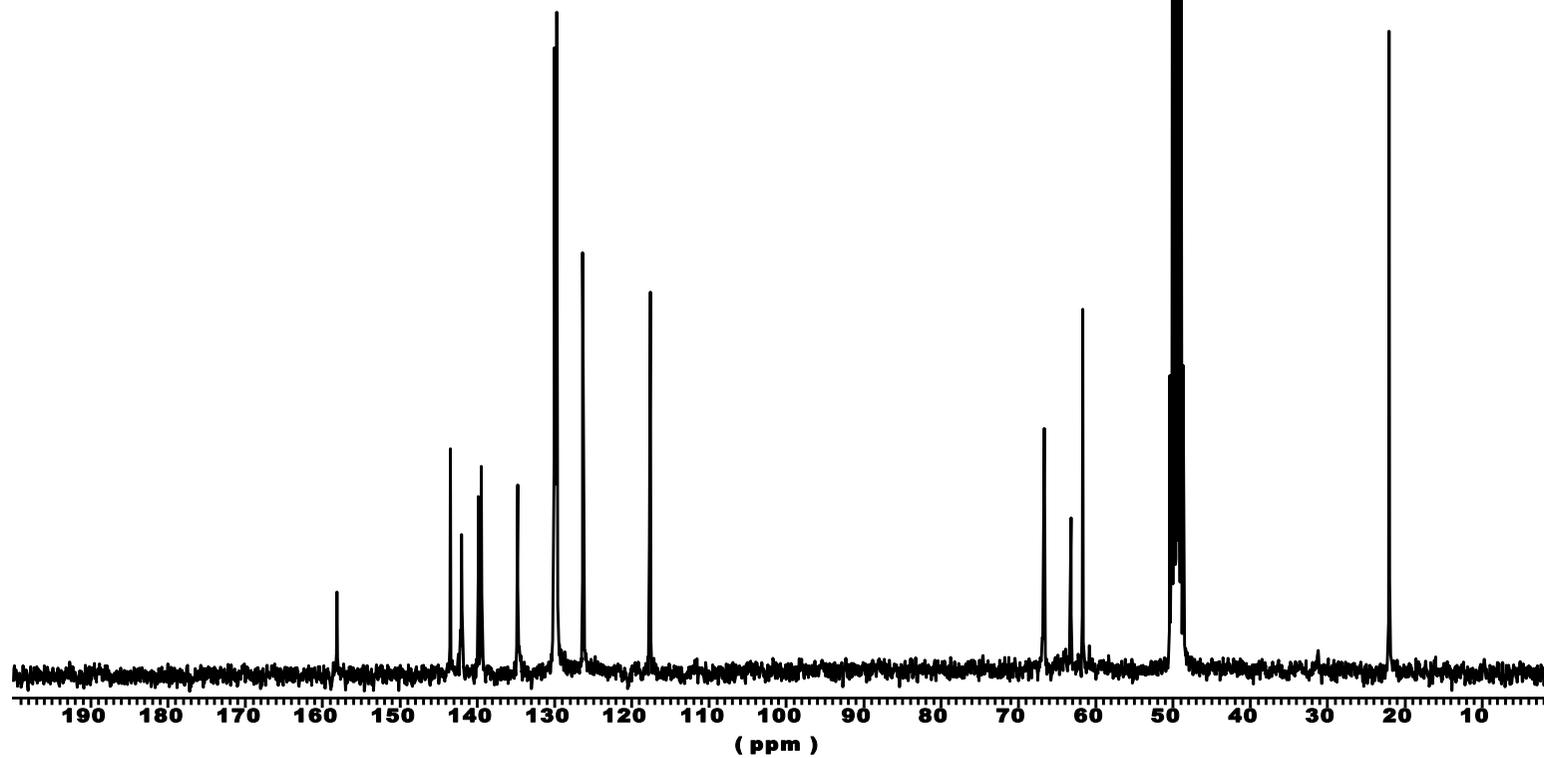
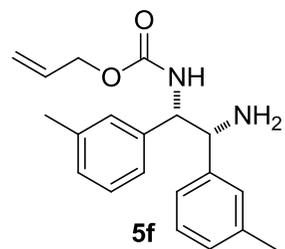


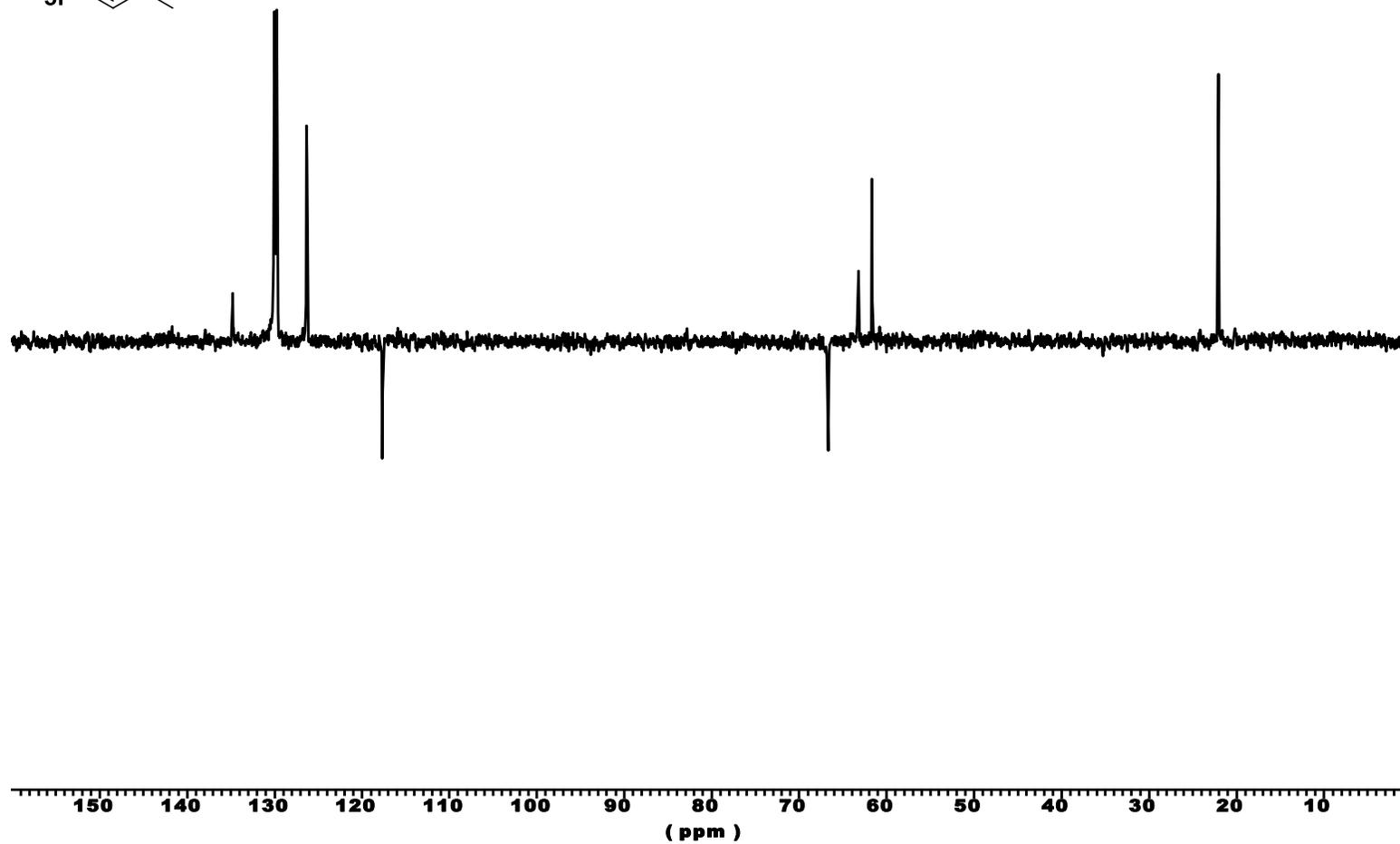
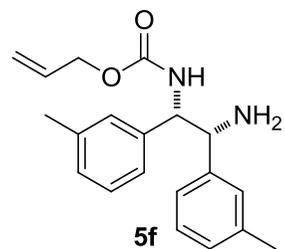


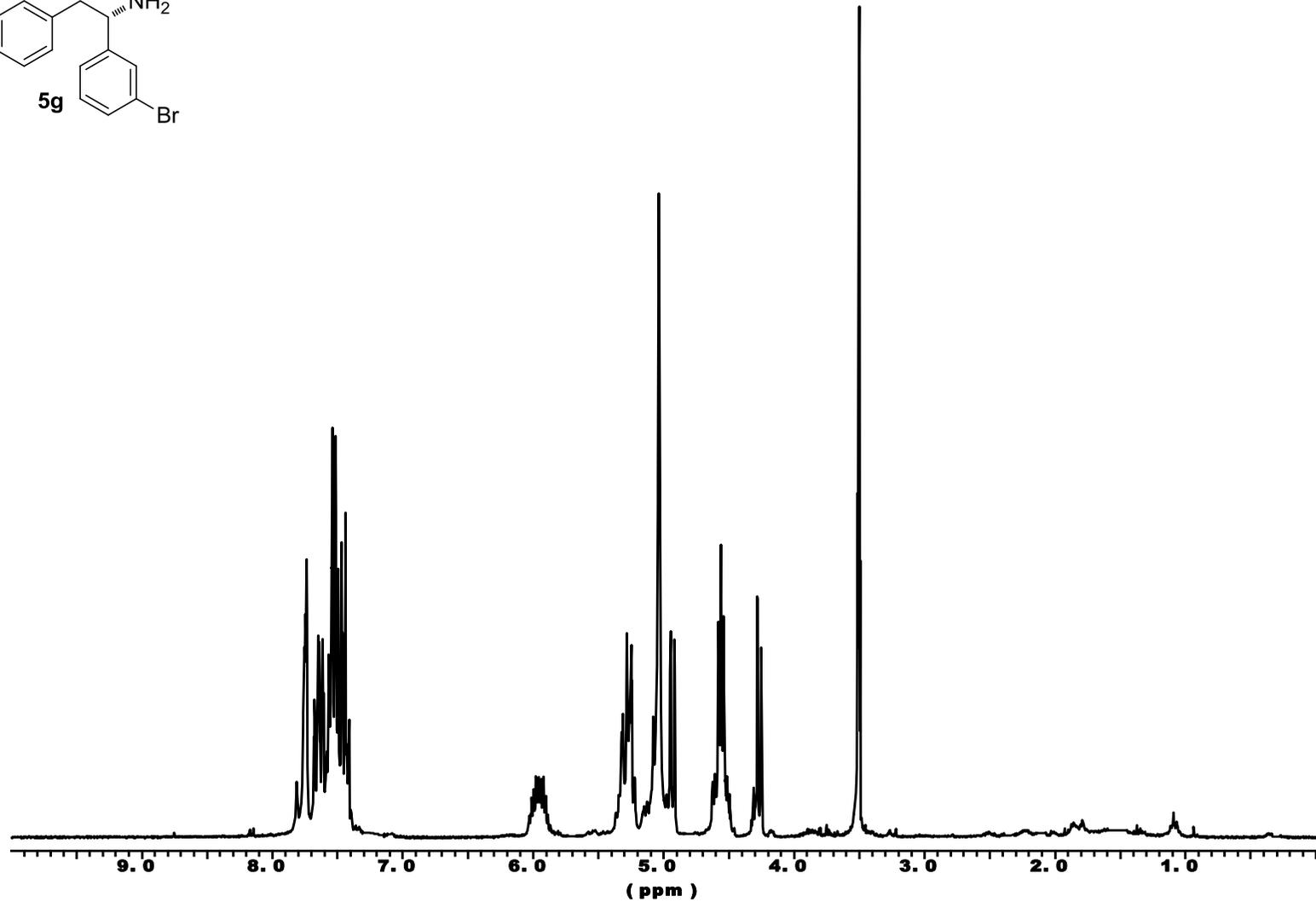
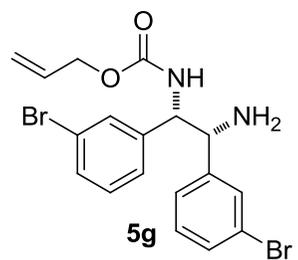


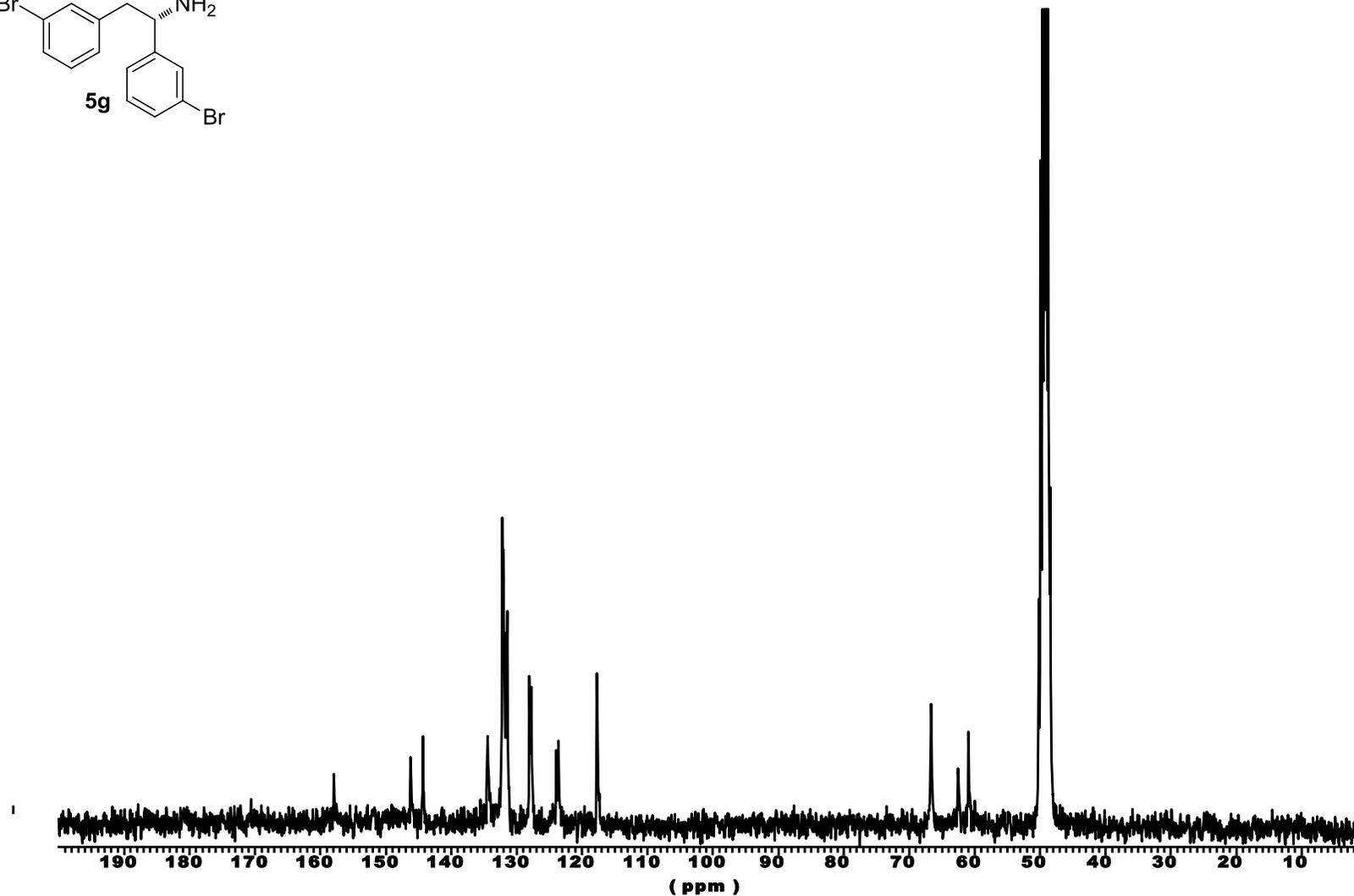
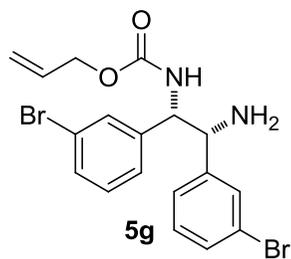


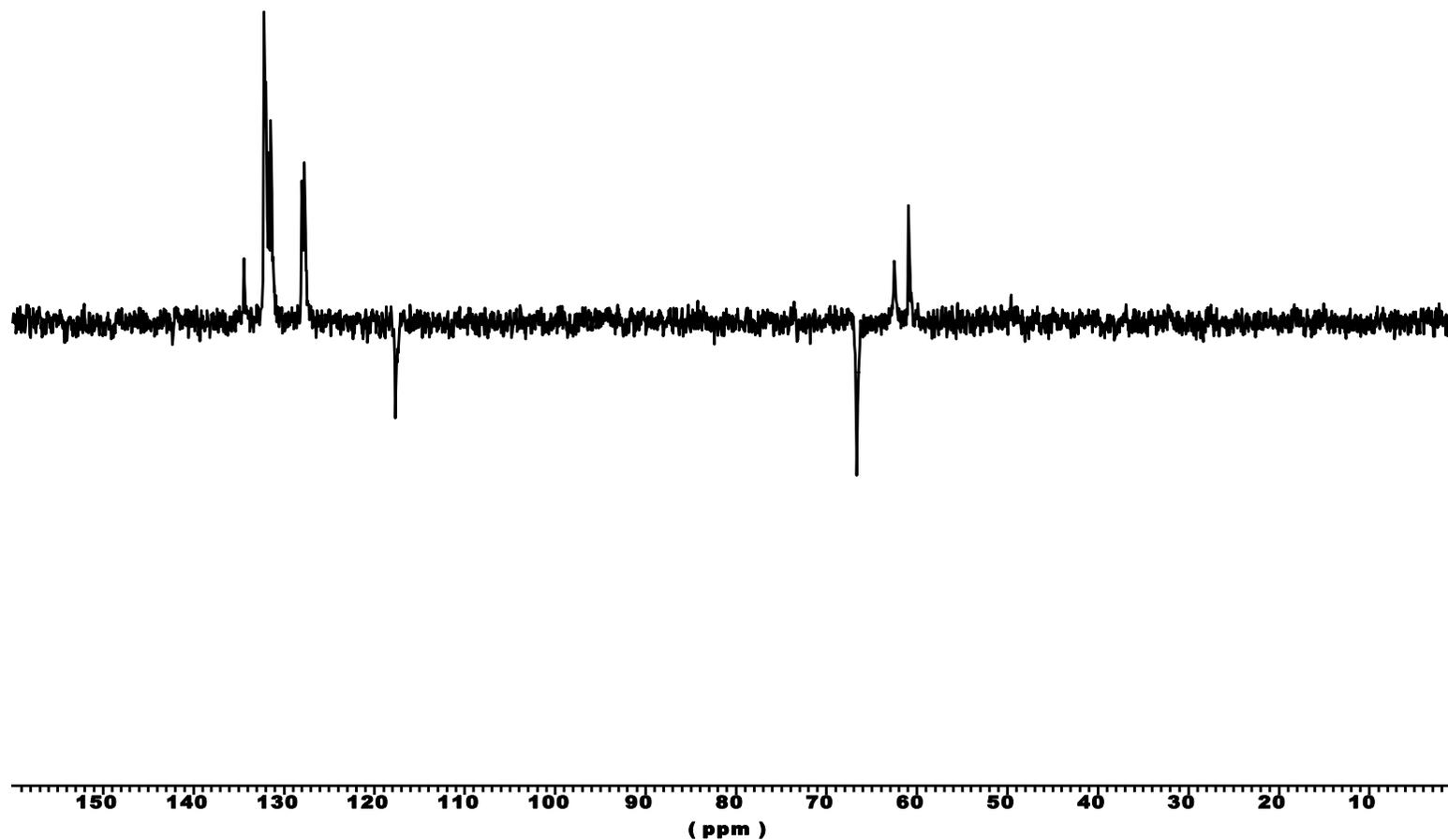
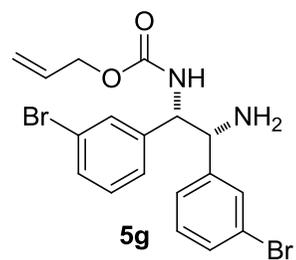


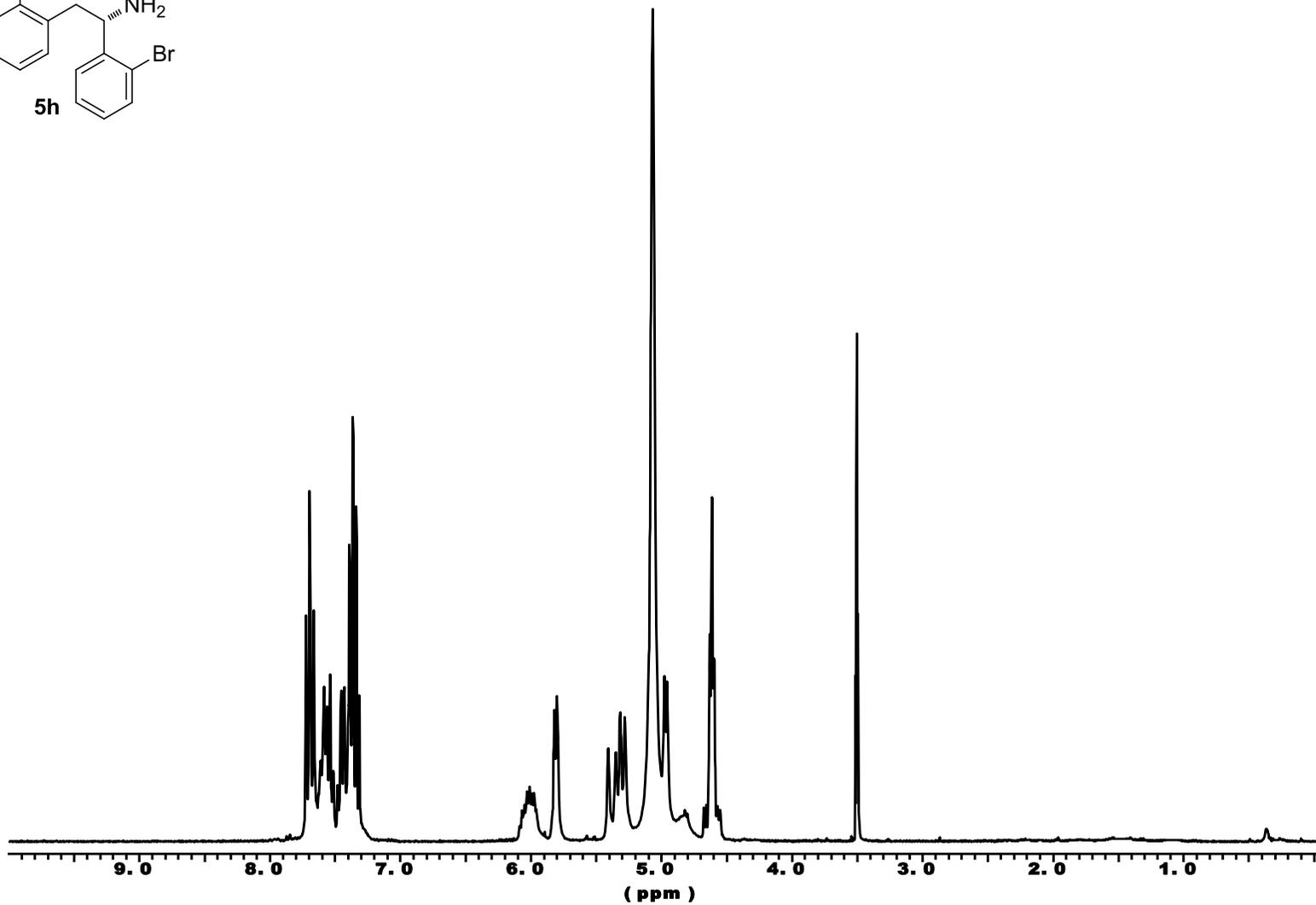
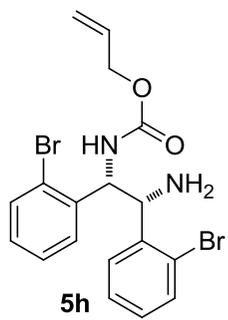


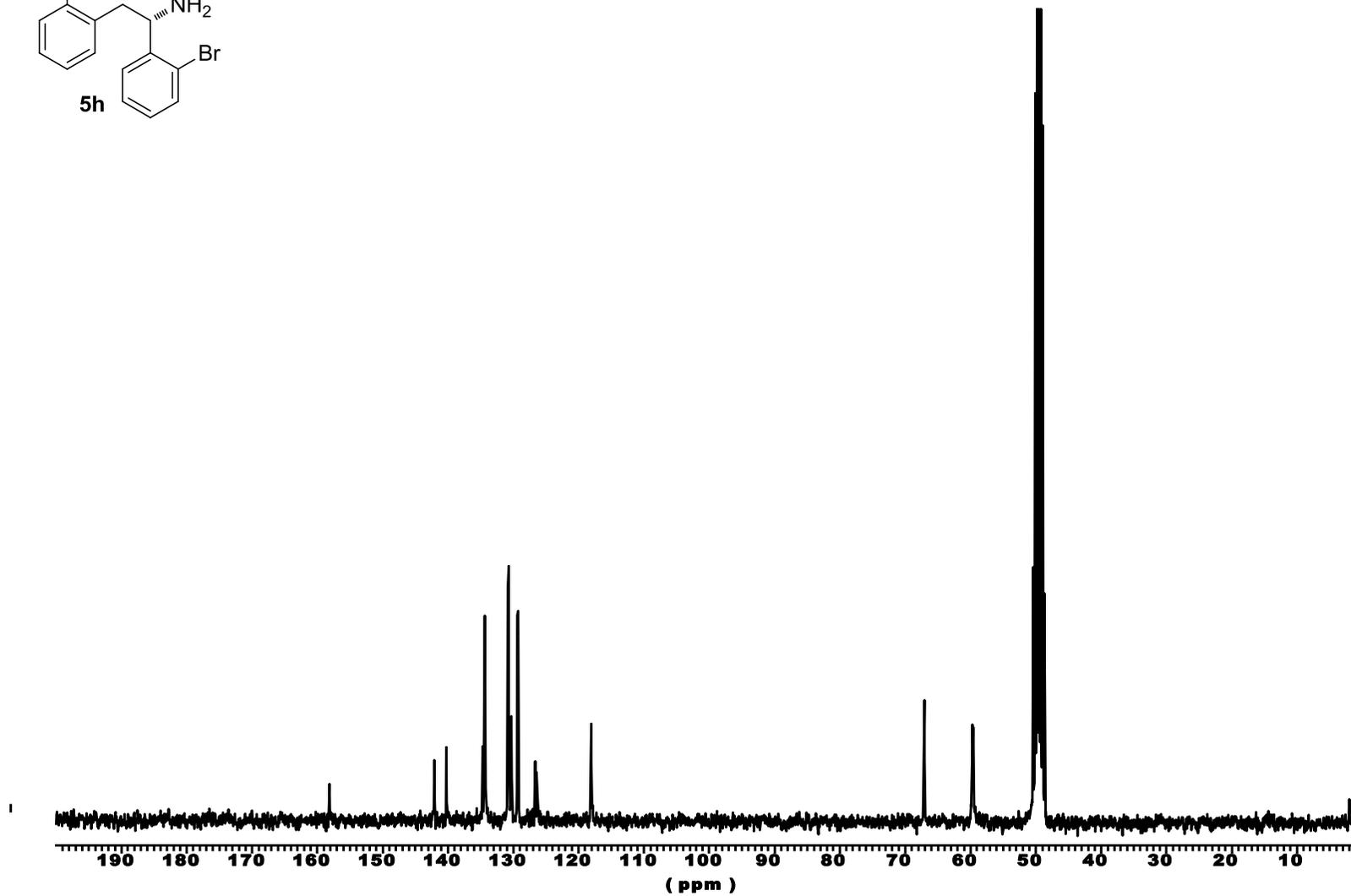
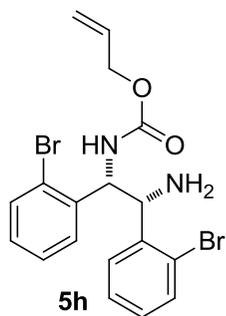


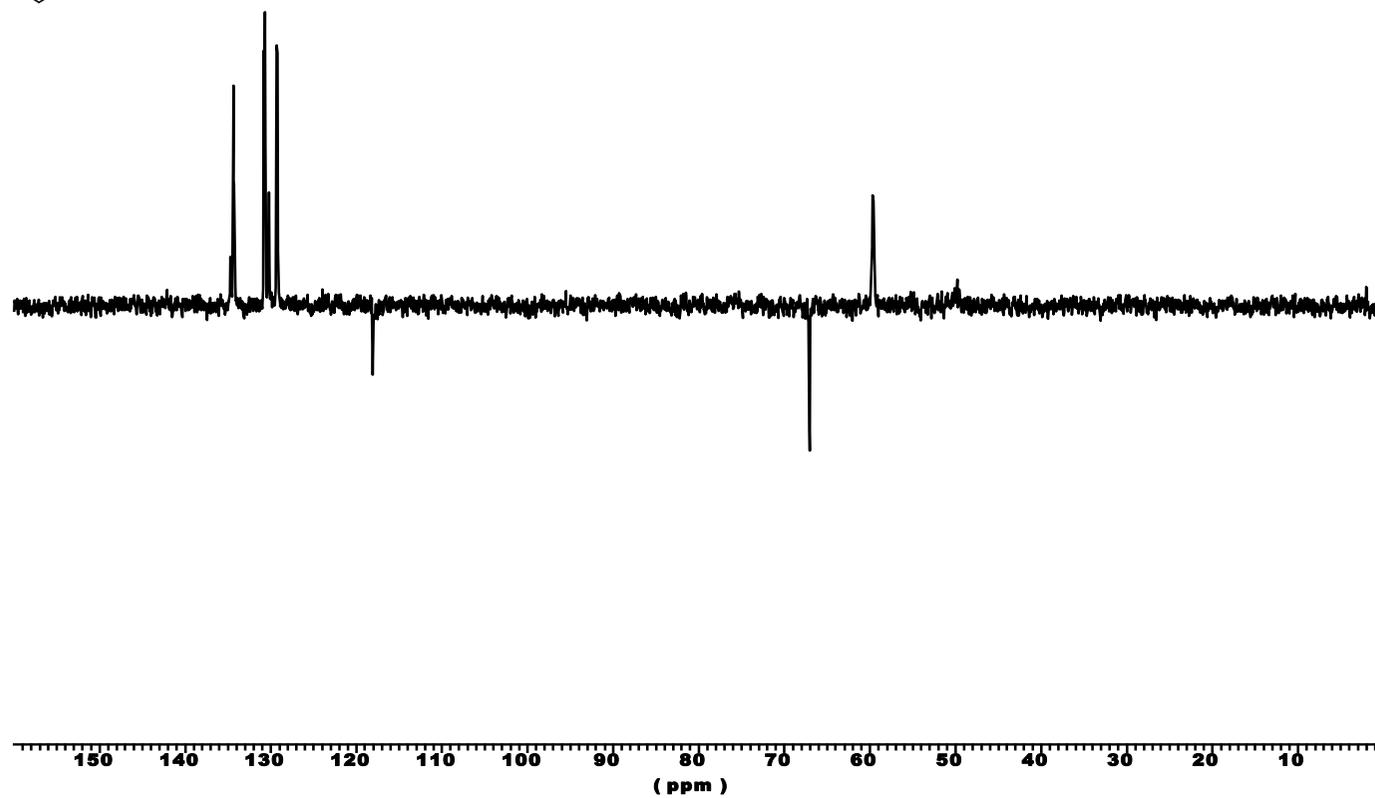
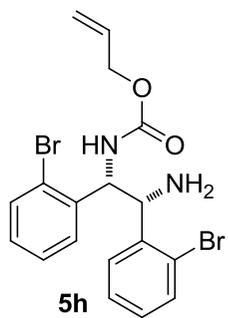












7. REFERENCIAS

1. C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605.
2. (a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072-7076; (b) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.
3. T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.
4. C. D. Murphy, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1949-1957.
5. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6^a Ed.; Springer, Berlín (Alemania), **2011**.
6. (a) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1988; (b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523.
7. A. G. Hassan Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331-3351.
8. J. M. Palomo, *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 1-14.
9. (a) G. Zheng, H. Yu, C. Li, J. Pan, J. Xu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *70*, 138-143; (b) R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 213-223.
10. R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437-1451.
11. P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452-1461.
12. G. Zheng, J. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *22*, 784-792.
13. (a) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *130*, 3007-3047; (b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.
14. (a) A. Caiazzo, P. M. L. García, R. Wever, J. C. M. van Hest, A. E. Rowan, J. N. H. Reek, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2926-2932; (b) A. C. Marr, S. Liu, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 199-204.
15. (a) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015; (b) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769-3802.
16. E. Schoffers, A. Golbiowski, C. R. Johnson, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769-3826.
17. E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180 (*Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354).

18. D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, S. L. Mowbray, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 109-119.
19. P. Domínguez de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 36-46.
20. (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; (c) J. Uppenberg, N. Öhmer, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T. A. Jones, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838-16851.
21. V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.
22. (a) M. Bucciarelli, P. Davoli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2489-2494; (b) A. Kamal, M. Sandbhor, K.V. Ramana, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 815-820; (c) A. Kirschner, P. Langer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2871-2874.
23. A. Liljeblad, L. T. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854.
24. (a) G. F. Busscher, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 775; (b) S. R. S. S. Kotti, C. Timmons, G. Li, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 101-114.
25. R. A. Casero Jr., P. M. Woster, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4551-4573.
26. X. Huang, M. Roushan, T. J. Emge, W. Bi, S. Thiagarajan, J. Cheng, R. Yang, J. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7871-7874.
27. (a) C. Anaya de Parodi, E. Juaristi, *Synlett* **2006**, 2699-2715; (b) J.-C. Kizirian, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 140-205; (c) F. Cardona, A. Goti, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 269-275; (d) J. González-Sabín, F. Rebolledo, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1916-1925; (e) D. S. Surry, S. L. Buchwald, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 13-31.
28. I. Alfonso, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2008**, *5*, 33-46.
29. I. Alfonso, *Curr. Org. Synth.* **2010**, *7*, 1-23.
30. (a) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197; (b) V. Gotor-Fernández, F. Rebolledo, V. Gotor, "Preparation of Chiral Pharmaceuticals through Enzymatic

Acylation of Alcohols and Amines” en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. Ed. R. M. Patel. Capítulo 7, 203-248. Taylor and Francis. New York (USA). **2007**.

- 31.** B. Orsat, P. B. Alper, W. Moree, C. Mak, C. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 712-713.
- 32.** E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4203-4206.
- 33.** (a) E. García-Urdiales, N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2875-2883; (b) N. Ríos-Lombardía, E. Busto, E. García-Urdiales, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 22571-2574.
- 34.** E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8393-8401.
- 35.** N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 484-493.
- 36.** N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5709-5718.
- 37.** A. Berkessel, M.-C. Ong, J.-M. Neudörfl, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 1215-1218.
- 38.** D. Koh, *J. Appl. Biol. Chem.* **2010**, *53*, 108-111.
- 39.** C. K. De, D. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14538-14541.
- 40.** (a) M. V. Proskurnina, N. A. Lozinskaya, S. E. Tkachenko, N. S. Zefirov, *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, *38*, 1149-1153; (b) S. Chamoin, H.-J. Roth, J. Zimmermann, T. Zoller, PCT Int. Appl. 2008/065068, PCT/EP2007/062804.
- 41.** (a) G. F. Breen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1427-1430; (b) V. Gotor-Fernández, P. Fernández-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2558-2564.