



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**



**TESIS**

**“INFLUENCIA DE LA RADIACIÓN MICROONDAS EN LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO 2-  
(3-(2-CARBOXIETIL)UREIDO)-4-(METILTIO)BUTANOICO”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA**

**ADAN SANCHEZ VASQUEZ**

**ASESORES:**

**D.C. JUDIT ARACELI AVIÑA VERDUZCO**

**M.C. RAMÓN GUZMÁN MEJÍA**

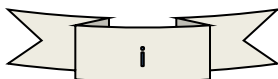
**M.C. STEPHANIE GARCÍA ZAVALA**

Morelia, Michoacán, febrero 2022

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Química Orgánica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de D.C. Judit Araceli Aviña Verduzco, M.C. Ramón Guzmán Mejía y M.C. Stephanie García Zavala, con financiamiento del proyecto aprobado por la Coordinación de la Investigación Científica (CIC-UMSNH).

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes foros académicos:

- 8°. Verano Nicolaita de Investigación, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Michoacán, agosto de 2019.
  
- 15° Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y 9° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán. Morelia Michoacán, octubre de 2020.
  
- XVI Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Modalidad virtual, abril de 2021.



## DEDICATORIA

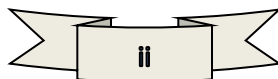
Este trabajo se lo dedico principalmente a dios, quien me ha regalado la vida y permitido llegar hasta este momento y alcanzar esta meta.

A mis padres, Camila Vázquez Gervacío y Benjamín Sánchez García quienes me han hecho creer que todo en esta vida es posible y me apoyaron en cada decisión que tomé, por sus palabras de aliento, sus sacrificios, esfuerzos, valores inculcados y comprensión. Los amo infinitamente.

A mis hermanos, Itzel, Alexis y Mayra, por darme fuerza, ánimos, valentía, consejos y amor.

A mis sobrinos, quienes me han regalado esa chispa de alegría cada día, motivándome para ser el mejor.

A la vida.



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a dios, por las virtudes que ha puesto en mí y permitirme cumplir una meta más.

Agradezco infinitamente a la D.C. Judit Araceli Aviña Verduzco, por toda su confianza, por las cosas buenas que ha visto en mí y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por los conocimientos aportados, palabras de aliento y permitirme estar en este maravilloso campo de la química bajo su asesoramiento.

Con la misma convicción agradezco a mi asesora y amiga Stephanie García Zavala, por las charlas amenas, consejos, paciencia, confianza, conocimientos aportados y por hacerme descubrir que siempre obtendré un mejor resultado con la ayuda y compañía perfecta.

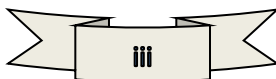
Al M.C. Ramón Guzmán Mejía, por enriquecer mi conocimiento con sus metodologías, sugerencias, por estar siempre al pendiente de los reactivos que necesitaba y por su valiosa amistad.

A la M.C. Concepción Armenta Salinas y al Q.F.B. José Manuel Zaragoza Ríos por su apoyo en la obtención de los espectros de RMN. De igual manera, agradezco a todo el personal que de manera directa o indirecta contribuyó para que este proyecto fuera posible.

A mis amigos del laboratorio, Fredy G. Morales y Juan Carlos Jiménez, de quienes he aprendido tanto, sobre todo en sencilles como seres humanos. Son un ejemplo a seguir.

A mi gran amigo Joel, quien ha sido un estímulo y de quien he aprendido que las limitaciones las pones tú.

A mis sinodales al D.C. Rafael Herrera Bucio, el D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez, la D.C. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja, la D.C. Janett Betzabe González Campos y a la M.C. Sandra Gabriela Barbosa Muñoz por el valioso tiempo que se tomaron para dar revisión a esta tesis.



## RESÚMEN

La estructura y reactividad de la materia son la esencia de la química, no obstante la obtención de compuestos puros que permitan su estudio conlleva a la búsqueda de nuevos procesos de optimización con un enfoque basado en la Química Verde, las nuevas secuencias en las rutas sintéticas de ureidopéptidos pueden incorporar tecnologías como la radiación microondas, con la intención de promover una alta eficiencia al evitar el uso de reactivos tóxicos, difíciles de manejar, altamente costosos y de difícil acceso, generando moléculas de alto grado de funcionalización a partir de precursores biosintéticos de fácil acceso, económicos, versátiles, maleables y amigables con el medio ambiente.

Por esta razón en el presente trabajo se muestra la síntesis en fase acuosa del ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico, un  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido generado por el reordenamiento molecular del dipéptido *N*-Cbz-Metionin- $\beta$ -Alanina-OMe promovido por radiación microonda como fuente energética.

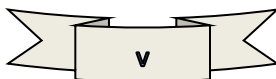
**Palabras clave:** aminoácidos, Péptidos Cbz-protectados, hidrólisis, Radiación Microondas, Ureidopéptido.

## ABSTRACT

The structure and reactivity of matter are the essence of chemistry, however obtaining pure compounds that allow their study leads to the search for new optimization processes with an approach based on Green Chemistry, the new sequences in the synthetic routes of ureidopeptides they can incorporate technologies such as microwave radiation, with the intention of promoting high efficiency by avoiding the use of toxic, difficult to handle, highly expensive and difficult to access reagents, generating molecules with a high degree of functionalization from easily accessible biosynthetic precursors , economical, versatile, malleable and friendly to the environment.

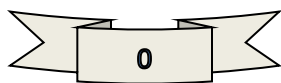
In this work shows the aqueous phase synthesis of 2-(3-(2-carboxyethyl)ureido)-4-(methylthio)butanoic acid, an  $\alpha,\beta$ -ureidopeptide generated by the molecular rearrangement of dipeptide N-Cbz-Metionin- $\beta$ -Alanine-OMe promoted by microwave radiation as an energy source.

**Keywords:** amino acids, Cbz-protected peptides, hydrolysis, microwave radiation, ureidopeptide.



Contenido

<b>1. ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	6
<b>3.1. <math>\alpha,\beta</math>-Ureidopéptidos</b> .....	6
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>5.- OBJETIVOS</b> .....	18
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	18
<b>5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	18
<b>6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	19
<b>6.1 Síntesis del ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico un <math>\alpha,\beta</math>-ureidopéptido</b> .....	19
<b>6.2. Mecanismo de reacción plausible en la síntesis del <math>\alpha,\beta</math>-ureidopéptido 6.</b> .....	31
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	34
<b>8. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	36
<b>8.1. Generalidades</b> .....	36
<b>8.2. <i>N</i>-Cbz-<i>L</i>-metionina (2).</b> .....	37
<b>8.3. Clorhidrato de amino propionato de metilo (4)</b> .....	38
<b>8.4. <i>N</i>-Cbz-<i>L</i>-metionin-<math>\beta</math>-alanina-OMe (5)</b> .....	38
<b>8.5. Ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico (6).</b> .....	39
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	41
<b>10. ANEXOS</b> .....	44





## 1.ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS

<b>A</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta
<b>Δ</b>	Desplazamiento químico
<b>β-Ala</b>	β-alanina
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo
<b>BTC</b>	Trifosgeno
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>Cbz</b>	Benciloxycarbonil
<b>CbzCl</b>	Cloroformiato de bencilo
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>D</b>	Señal doble
<b>Dd</b>	Señal doble de doble
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido deuterado
<b>h</b>	Hora
<b>Hex</b>	Hexano
<b><i>i</i>-BbCl</b>	Cloroformiato de isobutilo
<b><i>i</i>-PrOH</b>	Isopropanol
<b>M</b>	Concentración Molar
<b><i>m</i></b>	Señal múltiple
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MO</b>	Microondas
<b>NMM</b>	<i>N</i> -metil morfolina
<b>NRP-1</b>	Neurolipilina 1
<b>PSMA</b>	Antígeno Prostático específico de membrana
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>s</b>	Señal simple
<b>SOCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de tionilo
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sodio
<b><i>t</i></b>	Señal triple

**THF**

**TLC**

**TMS**

**NaHCO<sub>3</sub>**

Tetrahidrofurano

Cromatografía en capa fina

Tetrametilsilano

Bicarbonato de sodio

## 2. INTRODUCCIÓN

Con la finalidad de cumplir con los requisitos cada vez más exigentes de la industria farmacéutica en el mimetismo de péptidos, es necesaria la generación de derivados peptídicos biológicamente equivalentes. Los ureidopéptidos se presentan como una modificación al enlace peptídico, donde la función amida es reemplazada por el grupo ureido, el cual al contener aminoácidos completos en su estructura es denominado como ureidopéptido.<sup>1</sup> El estudio de las unidades constitutivas del ureidopéptido permite además otras modificaciones del esqueleto aminoacídico principal, como lo es el reemplazo de un solo aminoácido,<sup>2</sup> siendo una estrategia poderosa para mejorar las propiedades de los péptidos ya que incrementa su protección contra la proteólisis y, por lo tanto, su vida media en función de una acción biológicamente importante. Dentro de la literatura se encuentran distintos análogos a los  $\alpha$ -aminoácidos que comparten características estructurales y reactivas, destacando los  $\beta$ -aminoácidos como unidades constitutivas no proteinogénicas que generan las interacciones correspondientes para una factible actividad biológica. Cada una de las modificaciones anteriormente mencionadas prevén la obtención de compuestos estructuralmente similares a los péptidos naturales, clasificados como peptidomiméticos, donde la similitud estructural promoverá que el farmacóforo tenga la capacidad de interactuar con el receptor biológico y generar el mismo efecto biológico.<sup>3</sup> En las últimas décadas la síntesis de compuestos peptidomiméticos ha cobrado gran importancia, debido a las múltiples aplicaciones biológicas, químicas o farmacéuticas que presentan, siendo posible la existencia de una gran cantidad de moléculas ampliamente variadas. Al mostrar numerosas actividades farmacológicas importantes, tales como antibacteriano, antifúngico, antiparasitario, antiviral, anticancerígeno y anticonvulsivo,<sup>4</sup> han estimulado un amplio catálogo de síntesis que conllevan a estas moléculas de interés; no obstante, dichas rutas parten de reactivos tóxicos, difíciles de manejar, altamente costosos, así como la utilización de fuentes energéticas que generan gran gasto energético o una cantidad indeseable de productos secundarios.<sup>5</sup>

La importancia del precursor sintético de un ureidopéptido radica en varios aspectos dentro de los cuales se encuentra su origen, es por lo que, los aminoácidos, al ser uno de los compuestos más abundantes de la naturaleza, son de fácil acceso, de bajo costo y fáciles de manipular, además de que proveen los grupos reactivos suficientes para llevar a cabo un acoplamiento hacia una diana molecular. Por lo anterior, tomar modelos peptídicos de moléculas bioactivas para la síntesis de peptidomiméticos ha sido una herramienta poderosa para fabricación de fármacos. La incorporación de aminoácidos y péptidos como bloques de construcción para la síntesis de ureidopéptidos lleva a sistemas o esqueletos “ideales” ya que al contener la función urea, así como características de los aminoácidos, comparten algunas propiedades, otorgándole a la molécula un alto grado de funcionalización y múltiples ventajas entre las que destacan, alta estereoespecificidad, gran actividad, baja toxicidad, pocos efectos secundarios y el suministro en pequeñas dosis han hecho que estos, como sus derivados sean sustratos de excelencia en la síntesis de agentes terapéuticos.<sup>6</sup>

Dado que en la química sintética se provee optimizar los procesos en favor de la eficiencia se considera el uso tanto de sustratos altamente funcionalizados como de condiciones de reacción adecuadas que permitan alcanzar la barrera energética en la transformación molecular; una de las metodologías más eficientes es la radiación de microondas (MO), una energía electromagnética no ionizante que permite acelerar el tiempo de reacción utilizando las constantes dieléctricas de moléculas polares. Esto permite que las moléculas polares absorban de manera uniforme las MO y las transformen en calor por medio de la fricción, permitiendo un calentamiento más selectivo y homogéneo desde el seno de la reacción, favoreciendo los tiempos de reacción y reduciendo o evitando la aparición de productos secundarios al evitar puntos calientes; zonas formadas en función del gradiente de temperatura cuando estas son calentadas de manera convencional.<sup>7</sup>

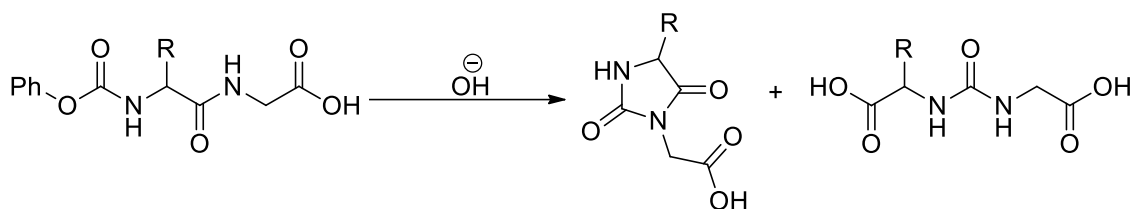
Para aprovechar estas fuentes innovadoras de energía limpia, en combinación con disolventes considerados dentro de la química verde, este proyecto contempla el aislamiento y caracterización del ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico, un  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido peptidomimético, formado por el reemplazo del enlace amida a través de la reacción intramolecular del  $\alpha,\beta$ -dipéptido *N*-Cbz-metionin- $\beta$ -alanina-OMe bajo tratamiento básico asistido por MO en solución acuosa.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. $\alpha,\beta$ -Ureidopéptidos

Los péptidos son biomoléculas ubicuas que proveen innumerables funciones durante el proceso de la vida, donde su estructura tridimensional es la responsable del rol biológico. No obstante, características como el reconocimiento enzimático, conlleva a que los péptidos tengan un tiempo de vida media relativamente corto debido a la proteólisis, lo que conduce a una baja biodisponibilidad, estabilidad metabólica *in vivo* y propiedades farmacocinéticas deficientes. Con la finalidad de superar estas limitaciones, se establece desarrollar modificaciones estructurales para la obtención de moléculas mímicas mediante el diseño racional y el empleo de modelos moleculares. Esto ha llevado a la aparición de pseudopéptidos, una clase de entidades novedosas utilizadas como posibles alternativas a los fármacos basados en péptidos, así como en el diseño computacional de moléculas, con intención de generar nuevos derivados peptídicos para la construcción de compuestos peptidomiméticos. Los ureidopéptidos y peptidil ureas son sintones frecuentemente empleados, dado su eficiente reconocimiento como la variedad más exitosa de peptidomiméticos debido a las propiedades metabólicas y enlaces hidrógeno que contiene el grupo ureico.<sup>8-11</sup>

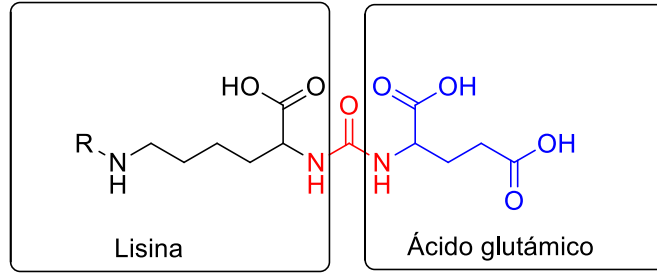
Uno de los primeros reportes  $\alpha,\alpha$ -ureidopéptidos remonta al año 1956, cuando Schlögl y col., en sus estudios acerca de la degradación a microescala de péptidos que contenían metionina, cisteína, serina, prolina, triptófano e histidina, reportan la aparición de un derivado ureico a partir de péptidos *N*-Cbz-protectados, los cuales generaban la ciclación hacia el anillo hidantoínico, y que posteriormente, podía ser transformado a su compuesto lineal, una urea asimétrica dicarboxílica (esquema 1).<sup>12</sup>



**Esquema 1.** Síntesis de ureas reportadas por Schlögl.

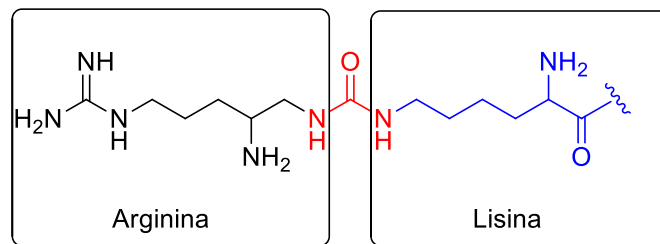
Cabe destacar que la transformación requiere de tiempos prolongados (días) y los requerimientos no suelen ser elevados en el caso de los ureidopéptidos debido al alto costo energético que genera la ciclación hidantoínica.

La importancia en la síntesis de ureidopéptidos, radica en la gran rigidez y restricción conformacional que poseen, pues la planaridad que le otorga el núcleo ureido a la molécula, conduce a una disposición definida de los cuatros sustituyentes que están unidos a los nitrógenos; además, los dos enlaces NH de la urea se coordinan perfectamente por medio de enlaces por puentes de hidrógeno con otras moléculas, lo que limita aún más su capacidad conformacional,<sup>13</sup> siendo una propiedad fundamental para la inhibición enzimática. También, al contener unidades de aminoácidos, poseen centros estereogénicos que conllevan al reconocimiento estereoespecífico por parte de las enzimas. Por otro lado, la gran similitud estructural que tiene con el péptido original le otorga la capacidad de interactuar específicamente con el receptor biológico, generando el disfraz perfecto para bloquear dianas específicas. Un ejemplo de esto es el ligando derivado del *N*-acetilaspargilglutamato sintetizado por Lowe y colaboradores a partir de lisina y ácido glutámico, en el que el enlace amida ha sido remplazado por una urea. Este compuesto funciona como un inhibidor peptidomimético del antígeno prostático específico de membrana (PSMA), dicha inhibición es utilizada para el diagnóstico radiológico mediante la obtención de imágenes clínicas de tumores de próstata cuando el inhibidor está marcado isotópicamente (figura 1).<sup>14</sup>



**Figura 1.** Inhibidor peptidomimético de la PSMA.

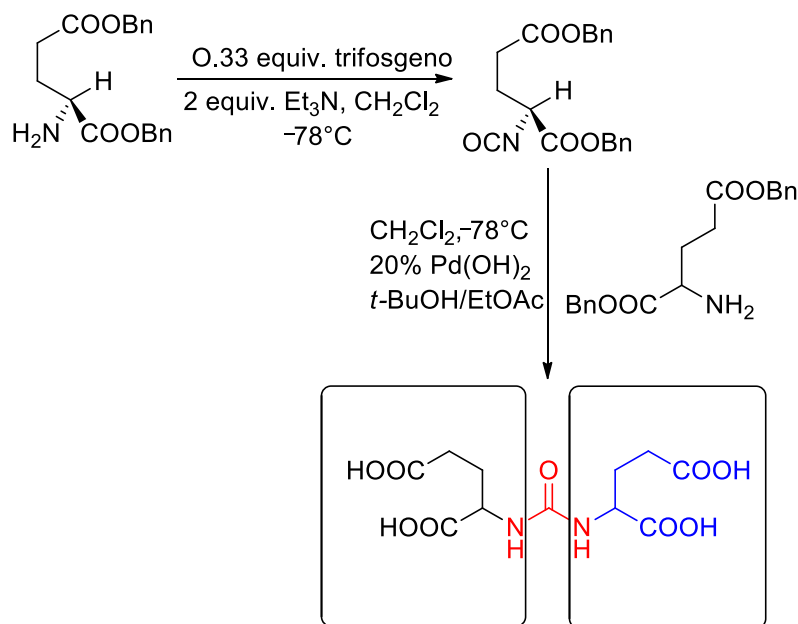
Puszko y col. reportaron un ureidopéptido que contiene en su estructura una unidad de arginina y lisina. Encontraron que esta urea interfería inhibiendo al complejo factor de crecimiento endotelial vascular-A165/neurolipina-1 (VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1) responsable del crecimiento tumoral, metástasis y en el proceso de angiogénesis, mostrando una mayor interacción con el receptor VEGF-A165 que la neurolipilina 1(NRP-1) (figura 2).<sup>15</sup>



**Figura 2.** Ureidopéptido inhibidor del complejo VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1.

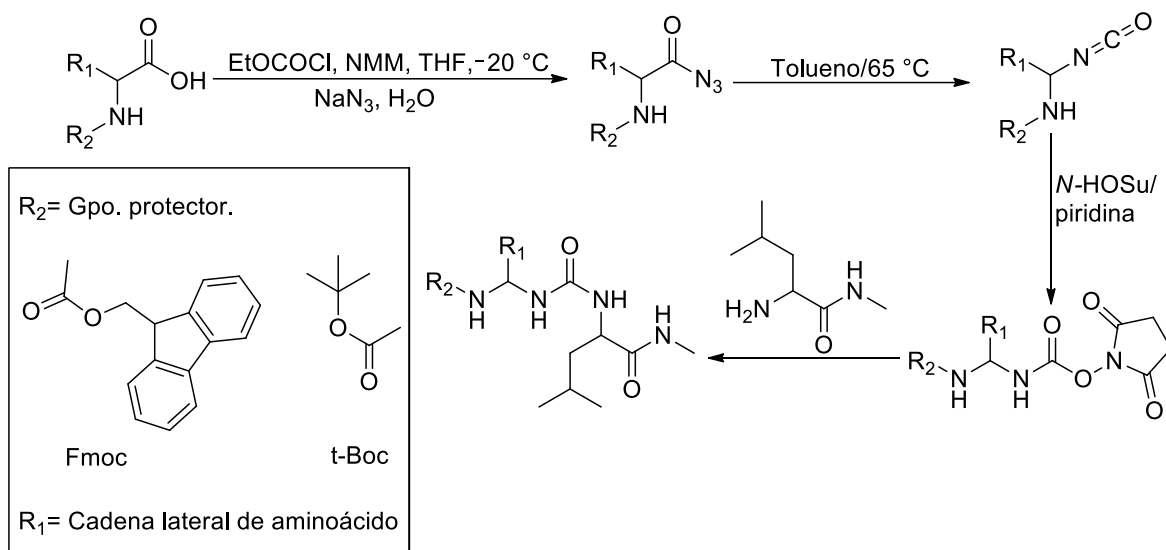
Por otro lado, Kozikowski y col.<sup>16</sup> reportaron la síntesis de un potente inhibidor de naturaleza ureidopeptídica de la carboxipeptidasa II (NAALADase), constituido por dos unidades de ácido glutámico, con el empleo de trifosgeno como reactivo clave para la formación de la urea (Esquema 2).





**Esquema 2.** Inhibidor peptidomimético de la carboxipeptidasa II.

En el año 2003 Lozano y col. reportan la síntesis de ureidodipéptidos derivados de leucina, alanina y serina con el fin de generar nuevos agentes terapéuticos de naturaleza péptica dirigidos a membranas celulares de bacterias. La síntesis procede a partir de la reacción de los  $\alpha$ -aminoácidos *N*-protegidos con cloroformiato de etilo y azida de sodio generando los azidas de acilo, las cuales sufren un rearrreglo de Curtius generando así los isocianatos correspondientes. La adición de *N*-hidroxisuccinimida provee el carbamato y el ataque nucleofílico del grupo amino de un segundo  $\alpha$ -aminoácido da lugar a la formación de la urea asimétrica (Esquema 3).<sup>17</sup>

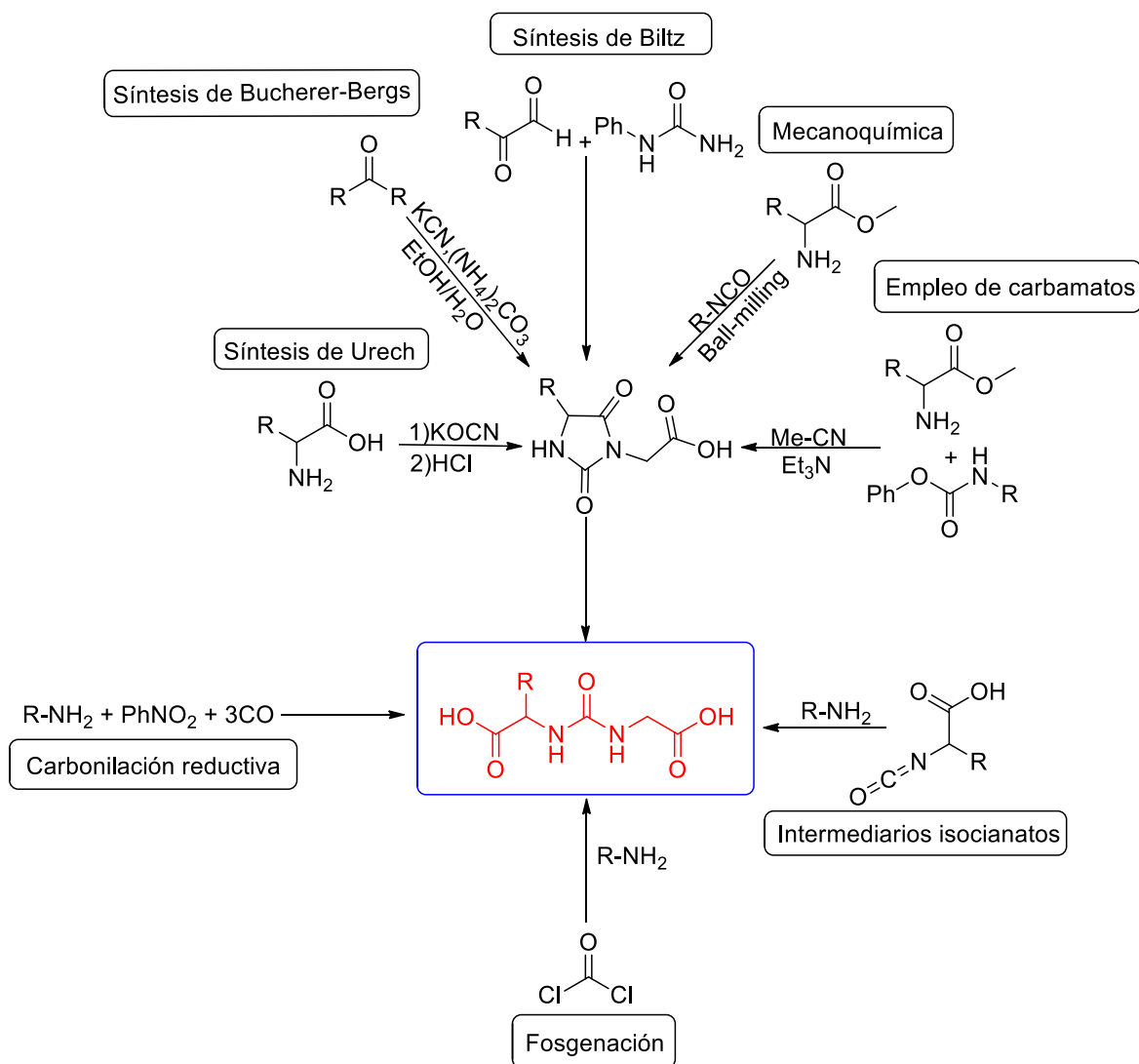


**Esquema 3.** Síntesis de ureidodipéptidos vía transposición de Curtius.

Al igual que la síntesis con fosgeno, el uso de azidas como reactivos clave para la síntesis de ureas presentan la inconveniencia que son altamente tóxicos. Además, los isocianatos como intermediarios son altamente reactivos, por lo que su manipulación, extracción y purificación son difíciles de realizar al ser sensibles a condiciones de pH y humedad. Por lo que, dentro de la química verde, no son reactivos de excelencia para su uso dentro de la síntesis química.

En este contexto, las metodologías convencionales empleadas para la síntesis directa de ureas asimétricas son fosgenación y, carbonilación reductiva u oxidativa. También, pueden ser sintetizadas por generación *in situ* de intermediarios isocianato a partir de precursores como cloruros de ácido (reordenamiento de Curtius), amidas (reordenamiento de Hofmann), ácido hidroxámico (reordenamiento de Lossen), formamida, ácido carbámico, carbamatos, acetoacetanilida e isocianidas.<sup>18</sup> Por otro lado, se han descrito varias metodologías intermoleculares que generan un intermediario hidantoínico que posteriormente se abre para la obtención de la urea asimétrica. Las tres vías intermoleculares principales que se conocen para la síntesis de hidantoínas son la síntesis de Urech, la cual se lleva a

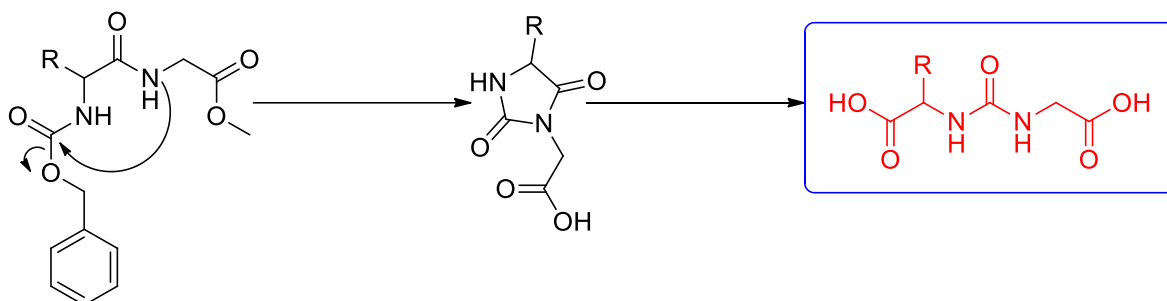
cabo entre un aminoácido e isocianato en condiciones ácidas, generando hidantoínas sustituidas en la posición 5. La segunda vía se conoce como la síntesis de Bucherer-Bergs, siendo una reacción de multicomponentes entre una cetona, cianuro de potasio o sodio y carbonato de amonio, en una mezcla de etanol y agua, la cual produce hidantoínas 5,5-disustituidas. El tercer método es conocido como la síntesis de Biltz, la cual también genera hidantoínas 5,5-disustituidas por reacción de benzoilo y ureas no sustituidas o monosustituidas (Esquema 4).<sup>19</sup> Otras dos rutas sintéticas intermoleculares que se han descrito actualmente son mediante la técnica de Ball-milling y mediante el uso de carbamatos, dando hidantoínas 3,5-disustituidas. Lamentablemente todas estas síntesis siguen utilizando como reactivos clave, aquellos que son tóxicos, de difícil de manipulación, que no cumplen con los principios de la química verde y que generan bajos rendimientos de reacción.<sup>20,21</sup>



**Esquema 4.** Síntesis de ureas asimétricas mediante reacciones intermoleculares.

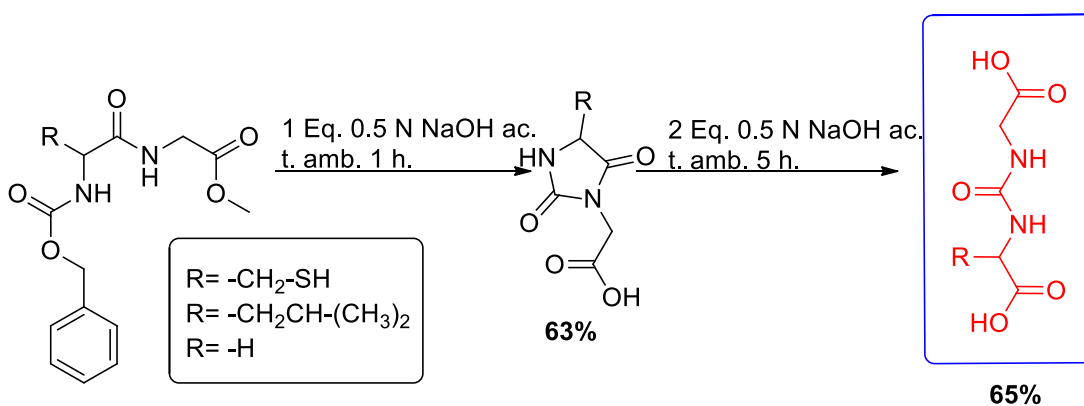
Las síntesis de tipo intramolecular de ureas asimétricas se llevan a cabo a partir de la condensación de dipéptidos *N*-Cbz-protectados. Estas metodologías ofrecen un amplio campo de beneficios sintéticos debido a la economía molecular que conlleva al partir de reactivos de fácil acceso. Además, la diversidad estructural de los aminoácidos hace que exista la posibilidad de fabricar una amplia biblioteca de compuestos polifuncionales altamente activos dentro de los sistemas biológicos. Por otro lado, los productos secundarios son mínimos, ya que el mecanismo intramolecular ofrece el beneficio de no interactuar con otro tipo de reactivos. Aunado a ello, el mecanismo intramolecular induce la formación de un anillo

hidantoínico que puede aislarse y caracterizarse. La importancia de este intermediario radica en que es la pieza clave para la formación de la urea asimétrica y que, en la actualidad, este anillo forma parte de una amplia gama de moléculas que presentan fuerte actividad farmacológica (Esquema 5).<sup>22,23</sup>



**Esquema 5.** Síntesis de ureas asimétricas mediante condensación intramolecular.

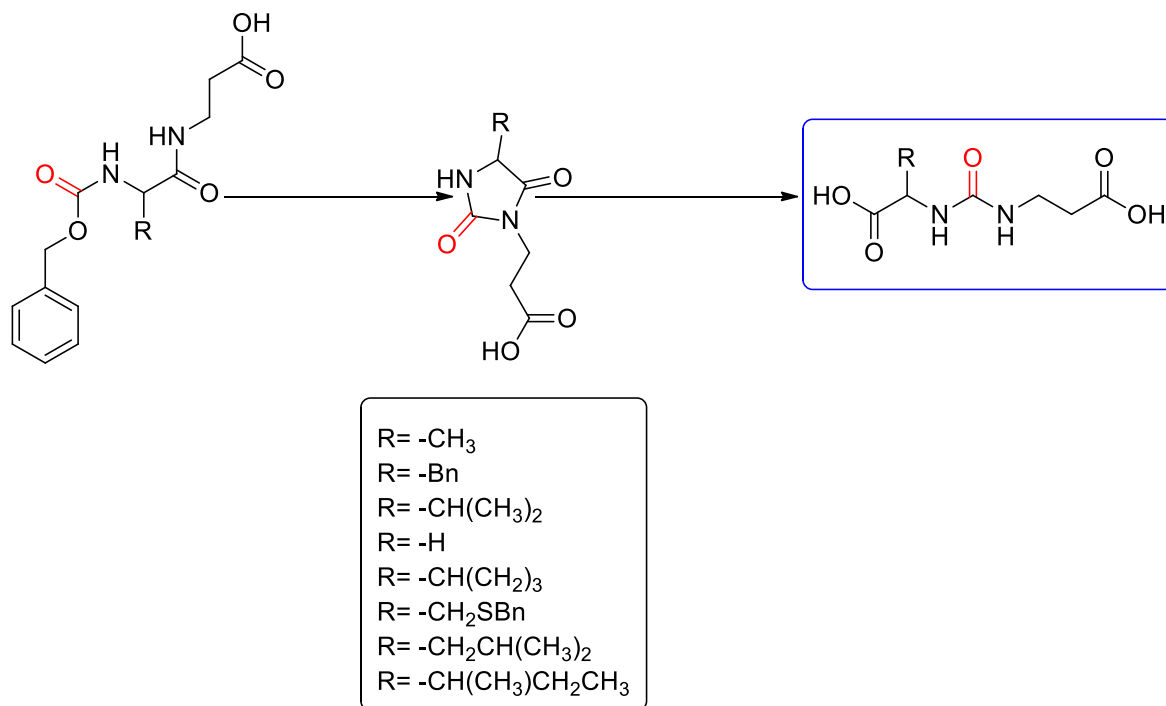
En este sentido, fue en 1958 cuando Maclaren realizó síntesis de ureidopéptidos vía condensación intramolecular con dipéptidos *N*-Cbz protegidos que contenían glicina, cisteína y leucina. En sus estudios, demostró la influencia del pH para obtener el esqueleto hidantoínico o la formación del derivado ureico, incluso, señala que cantidades alcalinas excesivas podrían descomponer el núcleo hidantoínico o ureido, e inclusive, al mismo dipéptido (Esquema 6).<sup>24</sup>



**Esquema 6.** Síntesis de ureidopéptidos reportadas por Maclaren.

Por su parte, García-Zavala<sup>25</sup> reporta la síntesis de  $\alpha,\beta$ -ureidopéptidos a partir de la condensación intramolecular de  $\alpha,\beta$ -dipéptidos  $\beta$ -alanina ( $\beta$ -Ala) O-terminales

promovida por radiación de microondas. Con ello obtuvo un amplio catálogo de  $\alpha,\beta$ -ureidopéptidos derivados de alanina, fenilalanina, valina, triptófano, prolina, glicina, cisteína, leucina e isoleucina. También, demostró la importancia del uso de un carbamato protector, el cual, es el responsable de la interacción intramolecular al donar el carbonilo en la reacción intramolecular para la formación de la urea (Esquema 7).

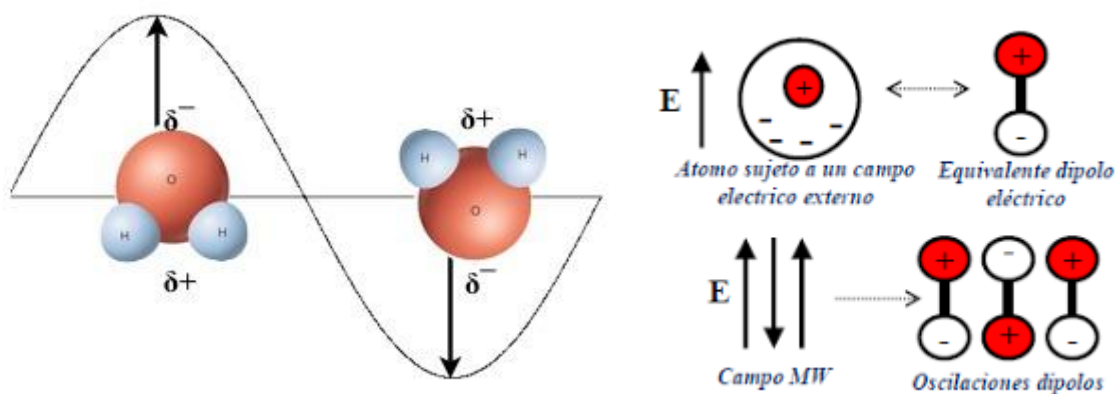


**Esquema 7.** Síntesis de ureidopéptidos derivados de  $\beta$ -alanina.

Debido a que los ureidopéptidos  $N,N$ -sustituídos son ideales por lo anteriormente mencionado, este proyecto describe la síntesis de una urea de naturaleza peptídica a partir del dipéptido  $N$ -Cbz- $\alpha$ -metionil- $\beta$ -alanina aplicando los principios de la química verde, con ello se realiza un aporte más a la biblioteca de compuestos reportados por el grupo de trabajo en el 2019.

### 3.2. Síntesis orgánica asistida por microondas

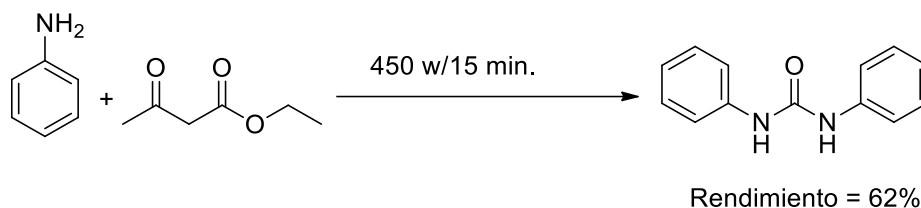
Las síntesis clásicas para la generación de compuestos orgánicos se han llevado a cabo utilizando energía térmica de fuentes convencionales por conducción y convección, esta manera de transferir energía se realiza gradualmente, por lo que el proceso de calentamiento es lento e ineficaz. Además, el calor en la reacción no es homogéneo, lo que genera un gradiente de temperatura y conduce a la formación de los llamados puntos calientes. Estos puntos o zonas al tener temperaturas más elevadas que otras zonas dentro de la reacción, provoca la descomposición de reactivos o productos con la generación de productos secundarios. Para evitar este problema, en las últimas décadas se han suplido las fuentes convencionales por MO. Este tipo de energía genera un rápido calentamiento desde el seno de la reacción al aprovechar las propiedades dieléctricas de cierto tipo de materiales o moléculas polares. Las moléculas, cuando son irradiadas con microondas, se alinean en el campo eléctrico aplicado, y a medida que el campo aplicado oscila, el dipolo intenta realinearse con la corriente eléctrica alterna, por lo que, en el proceso, se pierde energía en forma de calor generado por la fricción molecular (Figura 3).<sup>26</sup>



**Figura 3.** Efecto de la radiación microonda en una molécula polar.

El uso de las microondas comenzó con Gedye y Giguere en la década de 1980, ellos observaron la influencia de las MO en la velocidad de cuatro diferentes tipos de reacciones orgánicas. Una de ellas fue la hidrólisis ácida de benzamida para obtener ácido benzoico, dicha síntesis generó el 99% de ácido benzoico en tan solo 10 minutos, cuando la síntesis convencional requería un tiempo de reacción de una hora y con un rendimiento del 90%.<sup>27</sup> Desde entonces, las MO se ha aplicado para generar una mayor eficiencia de las reacciones orgánicas, por lo que, en 1922, veinte compañías farmacéuticas en el mundo lo adquirieron para ampliar el rango de producción.<sup>28</sup>

En este sentido, esta radiación ha sido aplicada a la síntesis orgánica debido a su simplicidad y conveniencia operacional. Actualmente esta fuente energética ha sido utilizada para la síntesis de ureas *N,N*-sustituidas con la finalidad de eficientizar los procesos y mejorar los rendimientos de reacción (Esquema 8), esto debido a las múltiples aplicaciones biológicas que presentan.<sup>29</sup>



**Esquema 8.** Síntesis de bis-arilureas con radiación MO.

Con base a lo anterior, este proyecto contempla la radiación MO como fuente energética para la síntesis del ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico, un  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido, siendo una fuente energética suave y amigable para el medio ambiente y que favorece la obtención de un solo producto al aportar la energía suficiente para el rearrreglo molecular.



#### 4. JUSTIFICACIÓN

La importancia de los derivados de naturaleza peptídica radica en su probable actividad biológica promoviendo especialmente estructuras peptidomiméticas, por lo que, la búsqueda de nuevas rutas sintéticas siguiendo los principios de la química verde con el empleo de fuentes energéticas que permitan un ahorro energético y que, en combinación con disolventes amigables para el medio ambiente que permitan aprovechar sus propiedades físicas y químicas ha sido un reto importante en las últimas décadas. Es por ello por lo que, en los últimos años, la radiación MO en combinación con el agua, ha venido a suplir las metodologías convencionales.

Con base en lo anterior, el presente trabajo representa una contribución a la continuidad de la derivatización de  $\alpha,\beta$ -dipéptidos al utilizar el *N*-Cbz- $\alpha$ -Metionin- $\beta$ -Alanina-OMe como sustrato para la síntesis del  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico, a partir del tratamiento básico promovido por radiación microondas.

## 5.- OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar el ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico como el  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido derivado del éster metílico *N*-Cbz-metionin- $\beta$ -alanina, mediante una ruta verde y de alta eficiencia que evalúa las condiciones necesarias para el aislamiento promovido por radiación de microondas en medio acuoso.

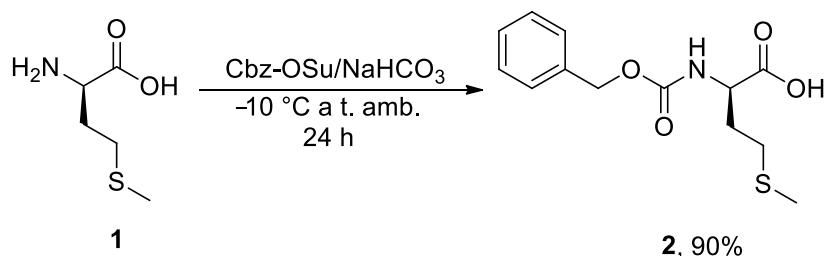
### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Preparación del  $\alpha,\beta$ -péptido *N*-Cbz-metionin- $\beta$ -alanina-OMe, a partir del acoplamiento entre el  $\alpha$ -*N*-Cbz-metionina y  $\beta$ -Ala en fase líquida.
- 2.- Realizar el tratamiento básico de *N*-Cbz-metionin- $\beta$ -alanina-OMe asistido por MO, generando las condiciones de reacción óptimas que lleven a la formación de la urea asimétrica.
- 3.- Aislar y caracterizar los productos de reacción por medio de sus propiedades físicas y por métodos espectroscópicos como resonancia magnética nuclear (RMN) de una y dos dimensiones, infrarrojo; además de espectrometría de masas.

## 6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 Síntesis del ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico un $\alpha,\beta$ -ureidopéptido

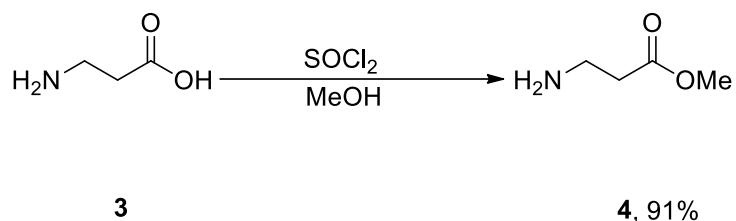
La primera etapa durante la síntesis del dipéptido *N*-Cbz-metionin- $\beta$ -alanina-OMe (**5**) involucra el uso de agentes protectores de los grupos funcionales aminoacídicos que pudieran interferir en el proceso de acoplamiento intermolecular, con lo cual se comenzó con la *N*-protección de *L*-metionina (**1**).



**Esquema 9.** *N*-protección de *L*-metionina (**1**).

Debido a la alta toxicidad del cloruro de bencilo (CbzCl) éste fue reemplazado por el uso de carbobenciloxisuccinimida (Cbz-OSu) como alternativa para la protección selectiva de la amina. La reacción se llevó a cabo mediante la adición de Cbz-OSu y una solución de bicarbonato de sodio a la *L*-metionina (**1**), a una temperatura de -10°C. La agitación a temperatura ambiente por 24 horas y posterior purificación mediante recristalización en 9:1 hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> del crudo de reacción generó el carbamato **2**, como un polvo de color blanco, con un rendimiento del 90% y un punto de fusión 67-69 °C. Los datos espectroscópicos concuerdan con los reportados en la literatura.<sup>30</sup>

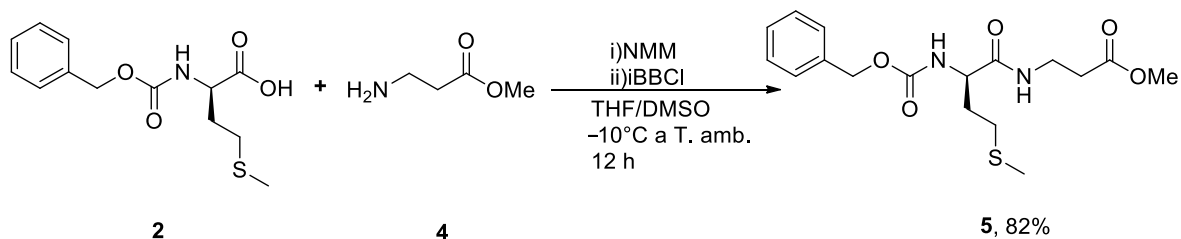
Posteriormente se realizó la *O*-protección de  $\beta$ -ala **3**, para esto se llevó a cabo una reacción de esterificación en metanol usando cloruro de tionilo (SOCl<sub>2</sub>) como catalizador, obteniéndose el éster metílico **4** en forma de clorhidrato, con un rendimiento del 91% (Esquema 10).



**Esquema 10.** Esterificación de  $\beta$ -ala **3**.

El compuesto **4** se obtuvo como un sólido cristalino higroscópico, en forma de agujas de color amarillo. Los datos espectroscópicos concuerdan con los reportados en la literatura.<sup>31</sup>

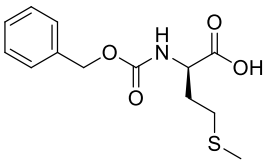
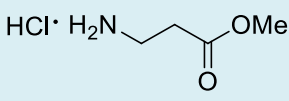
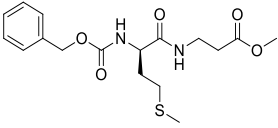
El siguiente paso consistió en la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos **2** y **4** por medio de la reacción de acoplamiento vía anhídridos mixtos, utilizando cloroformiato de isobutilo (*i*-BBOCl) como agente activante, *N*-metilmorfolina (NMM) y tetrahidrofurano (THF) como medio de reacción. La reacción se realizó a  $-10^\circ\text{C}$  durante media hora y posteriormente a temperatura ambiente por 24 horas. Una vez purificado el crudo de reacción por medio de cromatografía en columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de Hex/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , en una proporción 9:1, 8:2 y finalmente 7:3 para obtener el  $\alpha,\beta$ -dipéptido **5**, en forma de un sólido blanco con un punto de fusión de  $72\text{-}74^\circ\text{C}$  y un 82% de rendimiento (Esquema 11).



**Esquema 11.** Reacción de acoplamiento intermolecular.

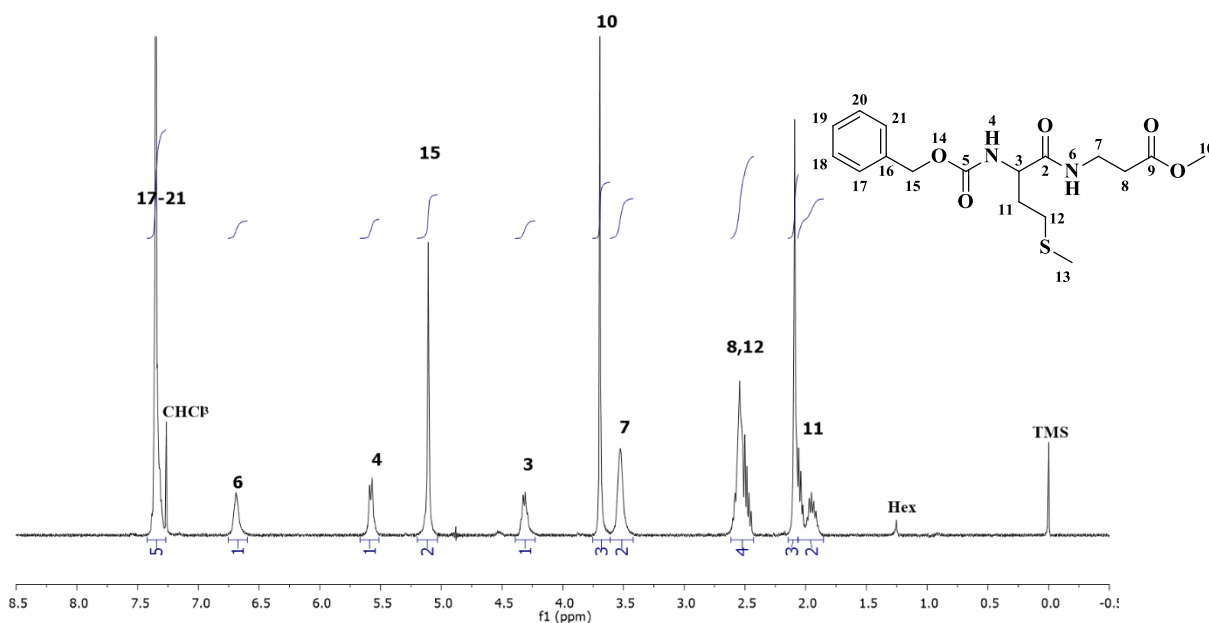
La tabla 1, resume las propiedades físicas de los aminoácidos protegidos **2** y **4**; además del éster peptídico **5**.

**Tabla 1.** Propiedades físicas de los compuestos **2**, **4** y **5**.

Compuesto	Rto (%)	Estado Físico	p.f. (°C)	Solubilidad
 <p><b>2</b></p>	90	Sólido	67-69	- Metanol - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - ACOEt
 <p><b>4</b></p>	91	Sólido cristalino higroscópico	Altamente higroscópico. Impide tomar p.f.	- Metanol - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - ACOEt
 <p><b>5</b></p>	82	Sólido cristalino	72-74	-Metanol -CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -ACOEt

El péptido **5** fue caracterizado por medio de RMN (figuras 4 y 5). En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (figura 4) podemos observar en 7.31 ppm una señal múltiple característica de los hidrógenos aromáticos H-17 al H-21 del grupo protector Cbz, en conjunto con la señal en 5.11 ppm correspondiente a los hidrógenos metilénicos H-15. Posteriormente en 6.69 ppm se localiza una señal simple ancha que integra para el hidrógeno asignado al grupo NH del enlace peptídico H-6, diferente a la señal observada en 5.58 ppm que, a pesar de que también corresponde a un NH, éste se presenta como base de un carbamato donde la cercanía con el hidrógeno asimétrico vecinal genera un acoplamiento que se traduce en un desdoblamiento doble ( $J = 8.1$  Hz) correspondiente al protón de H-4. Adicionalmente, en 4.32 ppm se encuentra la señal doble de dobles ( $J = 7.4, 13.9$  Hz) asignada al hidrógeno del centro estereogénico H-3, mientras que en 3.69 ppm se observa una señal simple

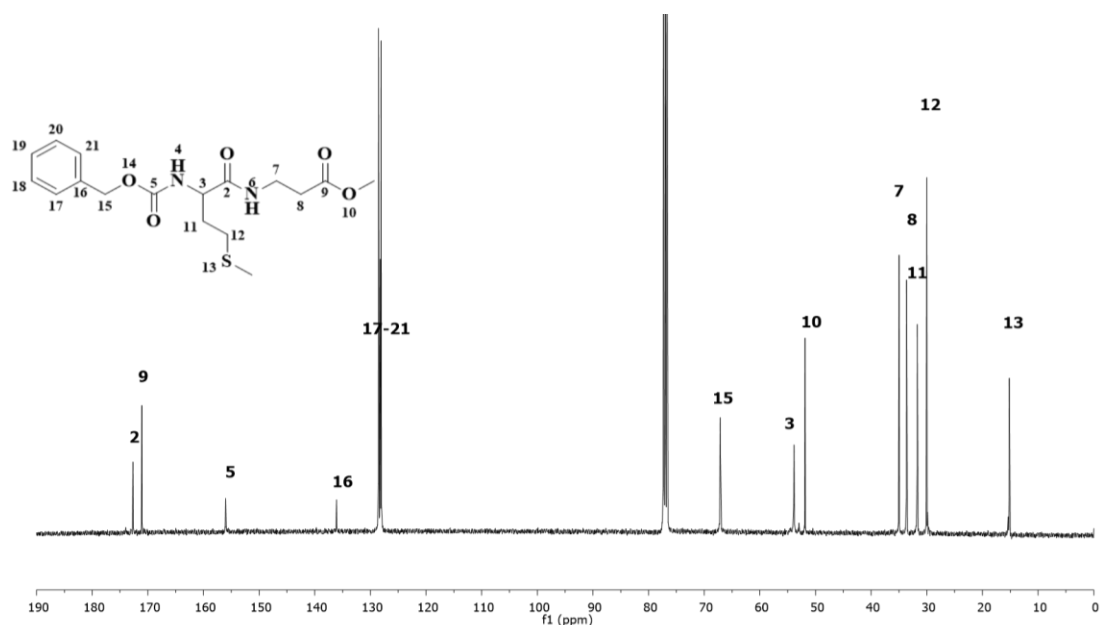
que integra para 3 hidrógenos del metilo del éster H-10, en conjunto con las dos señales correspondientes a los metilenos donde H-7 se presenta como una señal simple en 3.53 ppm y H-8 se encuentra traslapada en 2.50 ppm como una señal múltiple que integra para 4 protones correspondientes a los metilenos H-8 y H-12. Finalmente, en 2.09 ppm se observa una señal simple asignada al metilo del tioéter H-13 y una señal múltiple que corresponde al metileno H-11.



**Figura 4.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del α,β-dipéptido **5** en CDCl<sub>3</sub>.

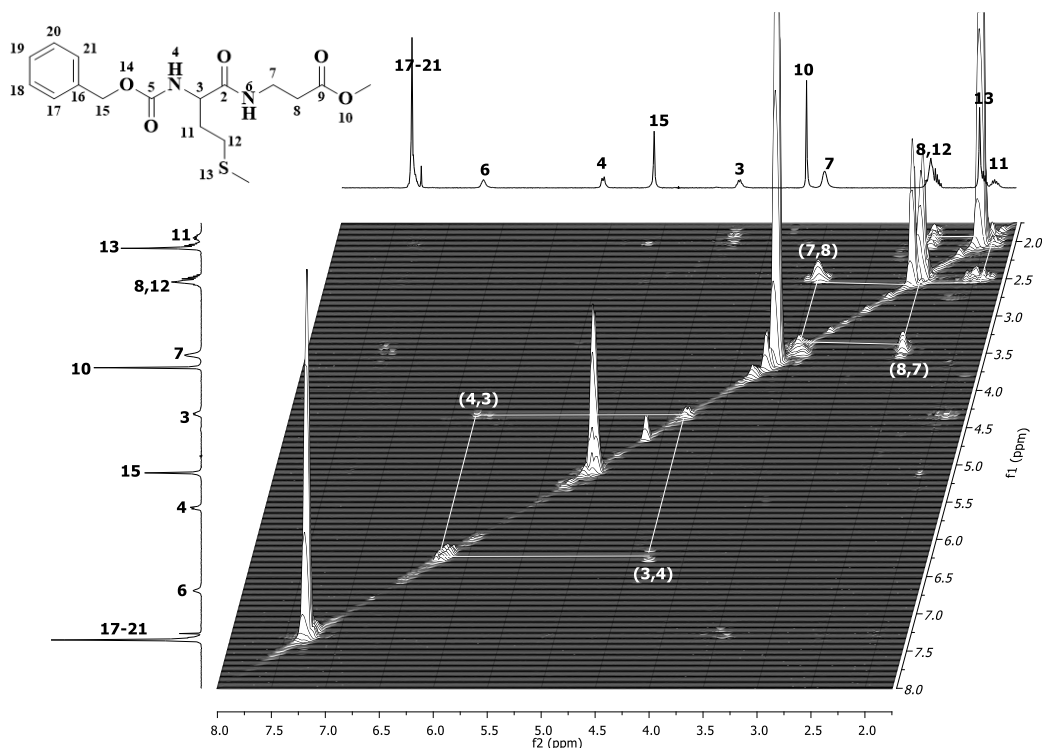
En el espectro de RMN de <sup>13</sup>C (figura 5) se observaron 17 señales características del compuesto **5**, mostrando en 172.7, 171.1 y 156.0 ppm las tres señales correspondientes a los carbonos C-2, C-5 y C-9; entre 128.5 y 128.1 ppm se observan las señales correspondientes a los carbonos aromáticos C-17 a C-21 y el carbono ipso en 136.1 ppm. Posteriormente en 67.1 ppm aparece la señal del carbono metilénico del grupo protector Cbz C-15, en 53.9 ppm aparece la señal asignada para el carbono del centro estereogénico C-3, en 51.9 ppm se encuentra localizada la señal correspondiente al metilo C-10. Las señales de los metilenos de la β-ala C-7 y C-8 se observan en 35.0 y 33.6 ppm, mientras que las señales

correspondientes a los metilenos C-11 y C-12 se encuentran en 31.7 y 30.0 ppm. Finalmente, la señal que corresponde al metilo del tioéter se observa en 15.2 ppm.



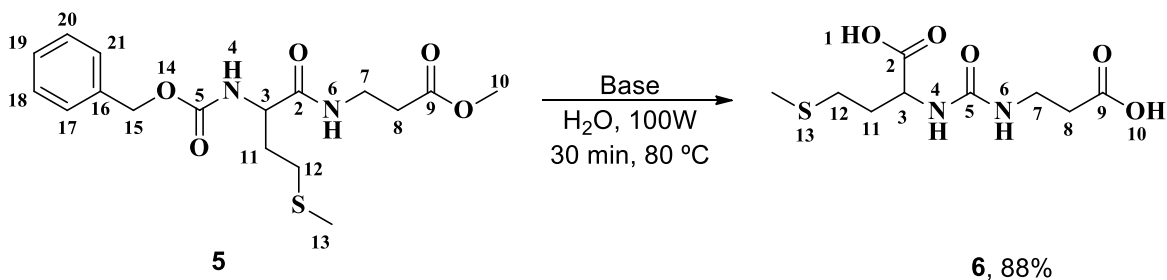
**Figura 5.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del  $\alpha,\beta$ -dipéptido **5** en  $\text{CDCl}_3$ .

La asignación exacta de **5** se obtuvo gracias a la espectroscopía de RMN en dos dimensiones COSY (figura 6) al proveer información sobre la conectividad atómica del dipéptido **5**, donde la señal doble del hidrógeno base carbamato H-4 se acopla con el centro estereogénico H-3, evidenciando fuertes correlaciones entre los hidrógenos metilénicos H-7 y H-8 correspondientes al esqueleto de la  $\beta$ -alanina, como de H-11 y H-12 de la cadena lateral de la metionina, estableciendo los hidrógenos vecinales para cada caso.



**Figura 6.** Espectro de RMN en 2D COSY del  $\alpha,\beta$ -dipéptido **5**, en  $\text{CDCl}_3$ .

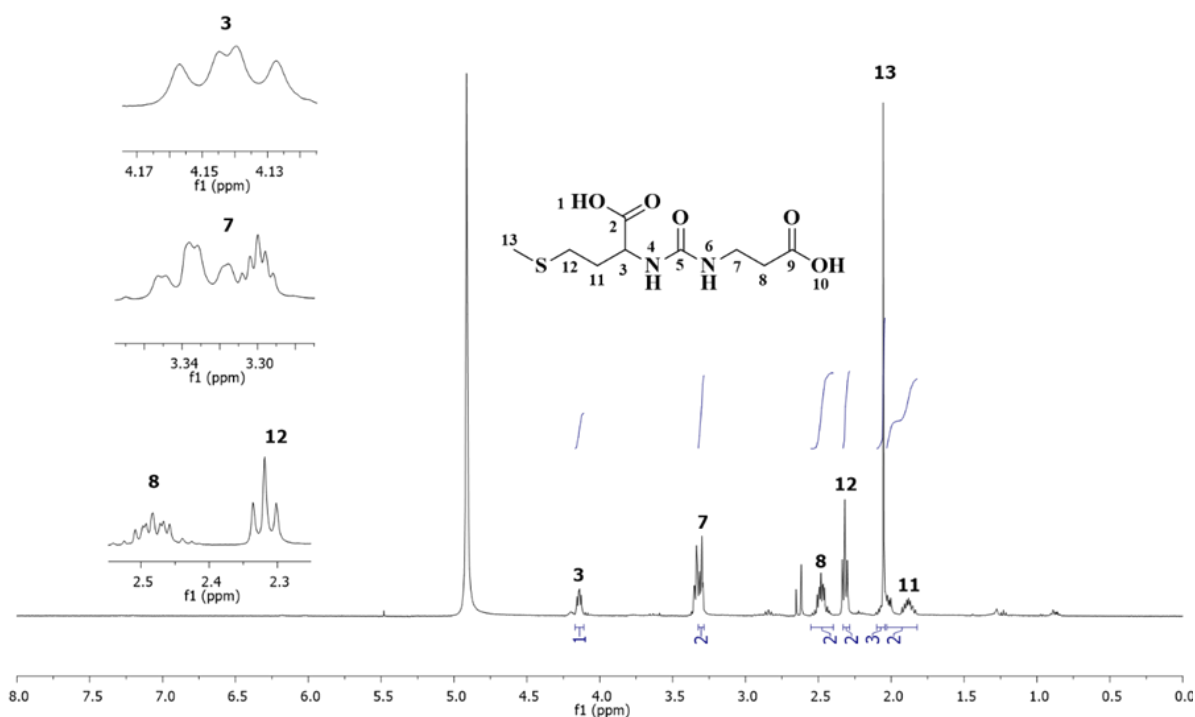
Una vez que se elucidó la estructura del éster *N*-Cbz- $\alpha,\beta$ -dipéptido **5**, el siguiente paso fue la hidrólisis básica del éster con hidróxido de litio (LiOH), en  $\text{H}_2\text{O}$  y radiación de MO a una potencia de 100 watts por un periodo de 30 minutos. Debido al incremento de energía aportado por la radiación MO, se promovió el reordenamiento molecular y se obtuvo el ácido **6** como un polvo cristalino de color blanco con un 88% de rendimiento, que se descompone cuando alcanza una temperatura de 188 °C.



**Esquema 12.** Reacción de hidrólisis del compuesto **5** bajo radiación MO.



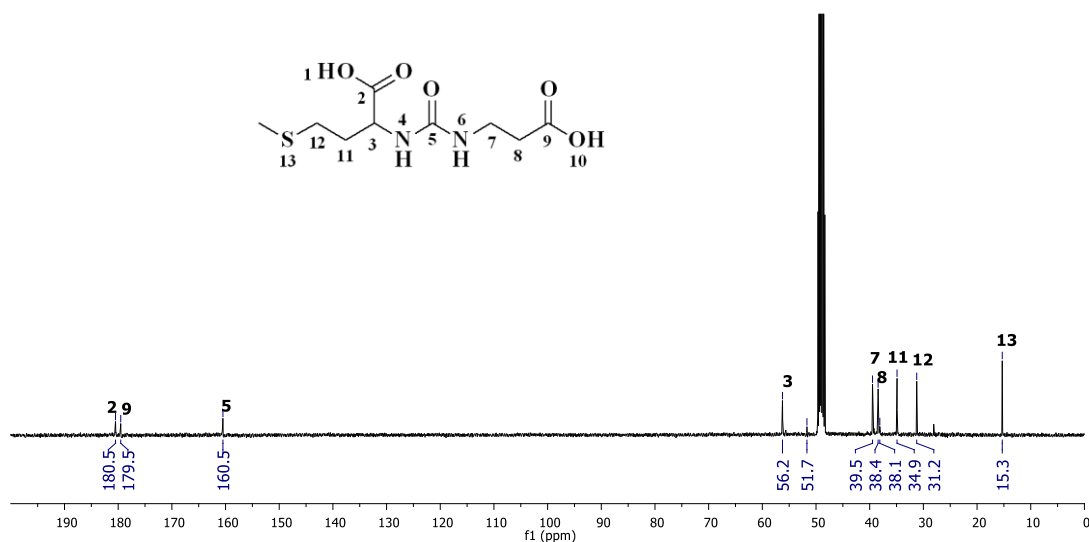
En el análisis espectroscópico del compuesto **6** se realizó mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figuras 7 y 8). En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 7) se observaron 6 señales que corresponden al nuevo compuesto, una señal doble de dobles en 4.14 ppm ( $J = 7.0, 4.9$  Hz) que corresponde al protón metínico del centro estereogénico, posteriormente en 3.32 y 2.48 ppm se observan dos señales en forma de multipletes que corresponden a los hidrógenos H-7 y H-8 de la porción metilénica de la  $\beta$ -ala. Así mismo, en 2.32 ppm se observa un triplete ( $J = 6.8$  Hz) que integra para dos hidrógenos asignadas al metileno H-12 y en 1.91 ppm un multiplete que corresponde a H-11. Finalmente, en 2.05 ppm aparece una señal simple asignada al metilo H-13.



**Figura 7.** Espectro de  $^1\text{H}$  del  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido **6** a 400 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura 8) se observa en 180.5, 179.5 y 160.5 ppm las señales que corresponden a los carbonilos C-2, C-5 y C-9, posteriormente en 56.2 ppm aparece el carbono del centro estereogénico C-3; en 39.5 y 38.4 ppm se observan las señales que corresponden a los metilenos de la  $\beta$ -alanina C-7 y C-8.

Así mismo, los metilenos que corresponden a la cadena lateral de la metionina C-11 y C-12 aparecen en 34.9 y 31.2 ppm. Finalmente, el metilo del tioéter aparece en 15.3 ppm.

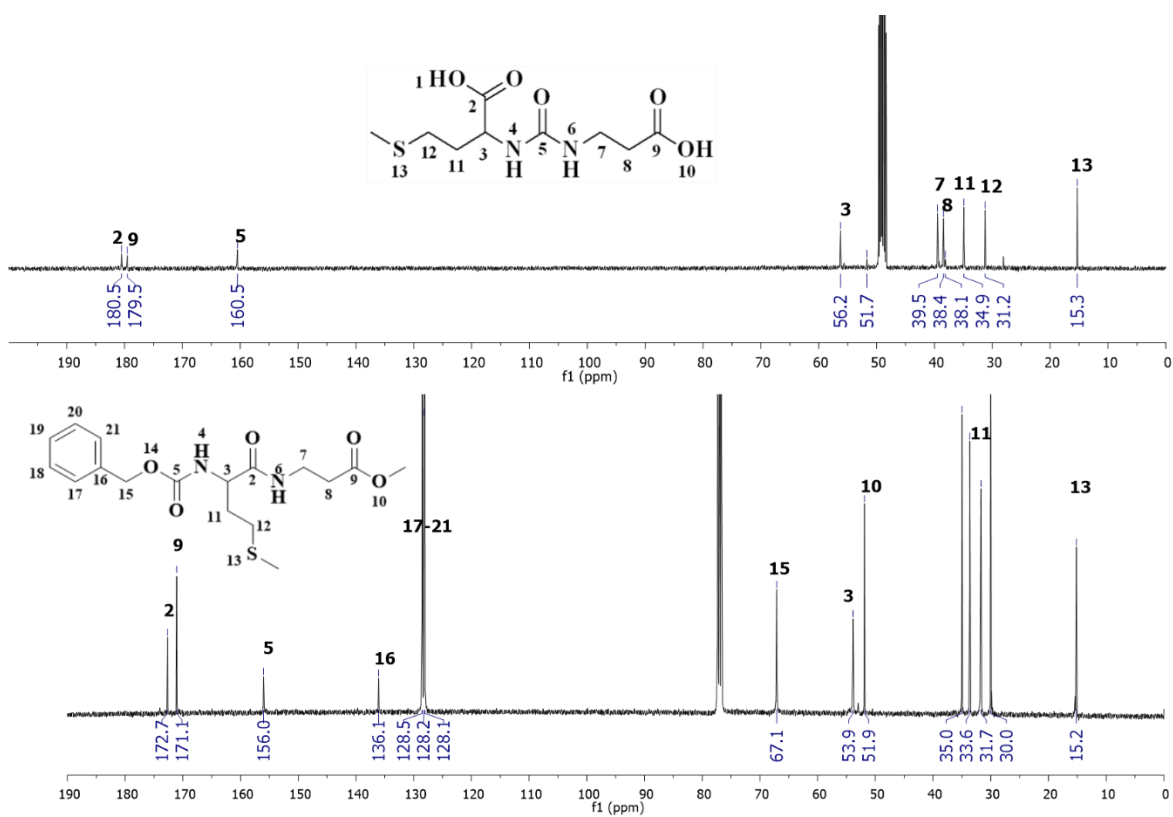


**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido compuesto **6** en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

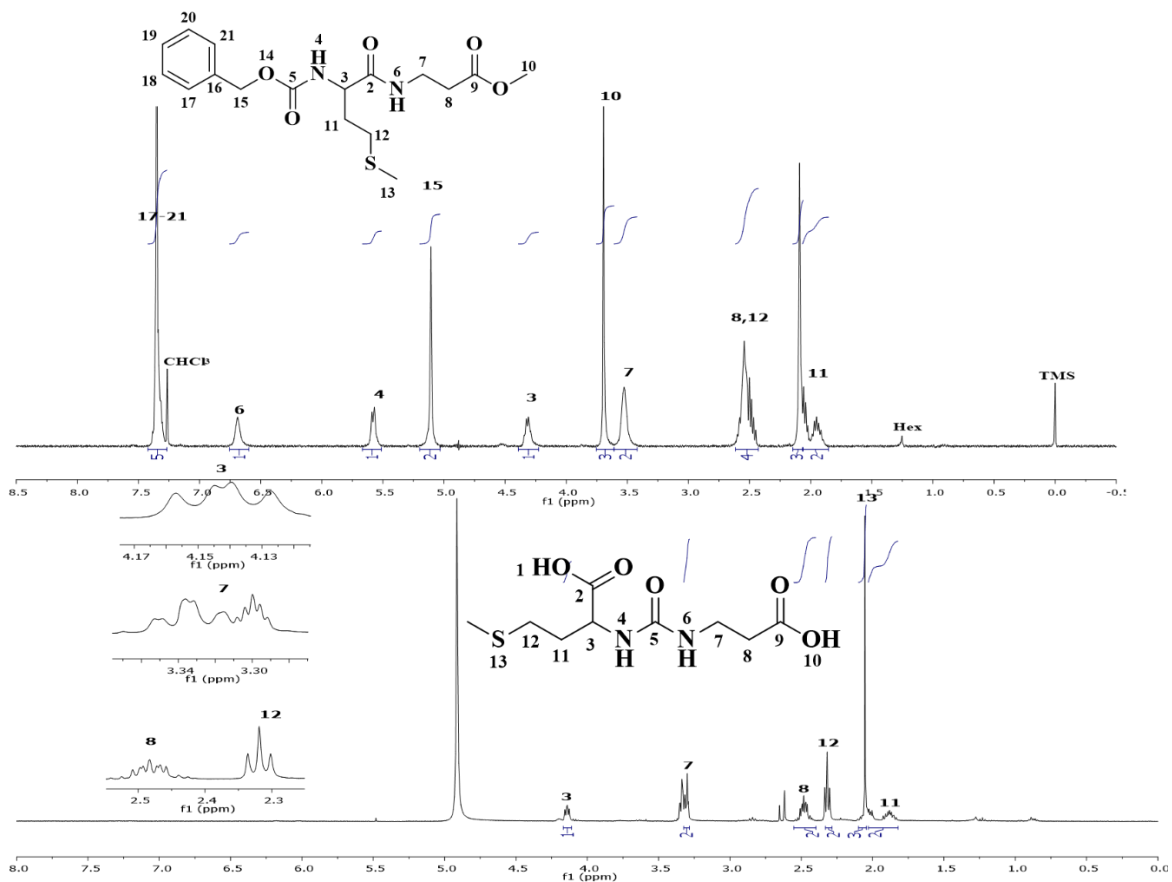
En este contexto, este nuevo  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido se obtuvo de manera amigable con el medio ambiente, aplicando los principios de la química verde mediante el empleo de MO como fuente energética y agua como disolvente, obteniendo un buen rendimiento de reacción y con alto grado de pureza, en comparación con las metodologías sintéticas anteriormente citadas que utilizan reactivos altamente tóxicos, costosos, de difícil acceso, difíciles de manejar, que generan productos secundarios elevados, bajos rendimientos y tiempos de reacción que duran días, lo que hace que no cumplan los requisitos dentro de la química verde y no se vean favorecidas como modelos a seguir por el alto impacto negativo que genera en el medio ambiente.

Posteriormente se realizó el análisis comparativo de los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del  $\alpha,\beta$ -dipéptido **5** frente al  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido **6** (figuras 9 y 10), esto con la finalidad de encontrar información de la conectividad estructural de los compuestos **5** y **6**, así

como para identificar las señales pérdidas durante el reordenamiento molecular del Cbz-  $\alpha,\beta$ -dipéptido.



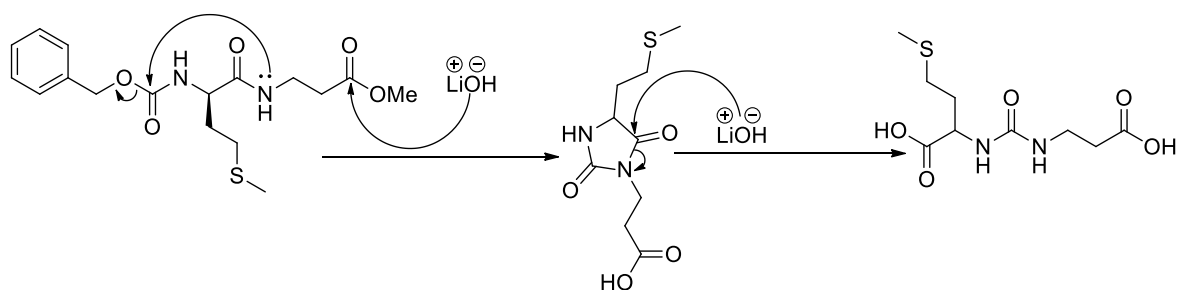
**Figura 9.** Comparación de espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 5 (arriba,  $\text{CDCl}_3$ ) y 6 (abajo,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) a 100 MHz.



**Figura 10.** Comparación de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los compuestos **5** (arriba,  $\text{CDCl}_3$ ) y **6** (abajo,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) a 300 MHz.

Analizando los espectros de RMN se pueden observar cambios importantes, de los cuales destaca la eliminación de las señales que corresponden a los carbonos de la porción bencílica del grupo protector Cbz (figura 9, C-17-21, C-16 y C-15). Hubo además una pérdida de las señales que corresponden a los protones de la porción bencílica (H-17 a H-21) y el metileno (H-15) del grupo protector Cbz (figura 10), mientras se mantiene presente la señal del carbonilo C-5 que corresponde al carbonilo base carbamato de la materia prima inicial, evidencia activa de la donación del carbonilo por parte del carbamato de Cbz tal como se describe en la literatura, dado el reordenamiento vía hidantoína que conlleva a un cierre del anillo de 5 miembros generando el núcleo ureico a partir del carbonilo base de carbamato, siendo la ciclación intramolecular lo que desplaza la función bencílica, la cual es

reducida a alcohol por el medio acuoso. Esto indicaría que la reacción intramolecular se ve propiciada por el nitrógeno amídico del enlace peptídico, donde el efecto inductivo de la cadena saturada de la  $\beta$ -Ala proporciona un mayor efecto nucleofílico para el par de electrones libres del nitrógeno que son los que proporcionan el ataque. Es entonces que la radiación MO ejerce su absorción tanto en el sustrato como en el disolvente, ya que ambos cuentan con constantes y pérdidas dieléctricas de absorción media provocando una pérdida dieléctrica en forma de calor y trabajo, disminuyendo la barrera de activación para la formación del ureidopéptido al promover la generación de conformeros que propicien el aducto cíclico, así como por la aceleración de los choques efectivos entre los iones básicos que promueven desde la hidrólisis hasta la apertura del anillo hidantoínico (esquema 12).

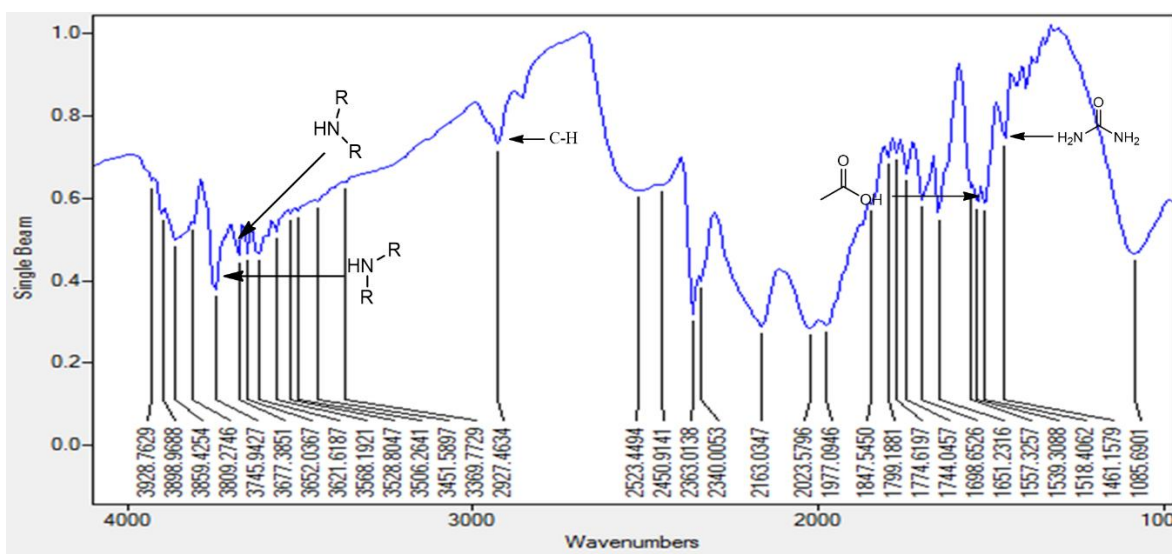


**Esquema 12.** Mecanismo propuesto de la hidrólisis básica del  $\alpha,\beta$ -dipéptido **5**.

Finalmente, cambios significativos en la figura 10 en los hidrógenos H-8 y H-12 de **6** también se observan, ya que en el compuesto **5** aparecen como un multiplete que integra a 4 protones; mientras que, para el  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido **6** se reduce la complejidad del multiplete generando dos sistemas de señales separadas, debido a que su acoplamiento se reduce al incrementar los grados de libertad sin el impedimento estérico que mantenía la molécula original con su parte aromática. Lo mismo sucede con H-7, donde la reducción de la rigidez en el nuevo compuesto y la pérdida de la función aromática permiten una desprotección de la zona en H-7, lo que se traduce como una ligera reducción en el desplazamiento ( $\delta$ ) de 0.21 ppm

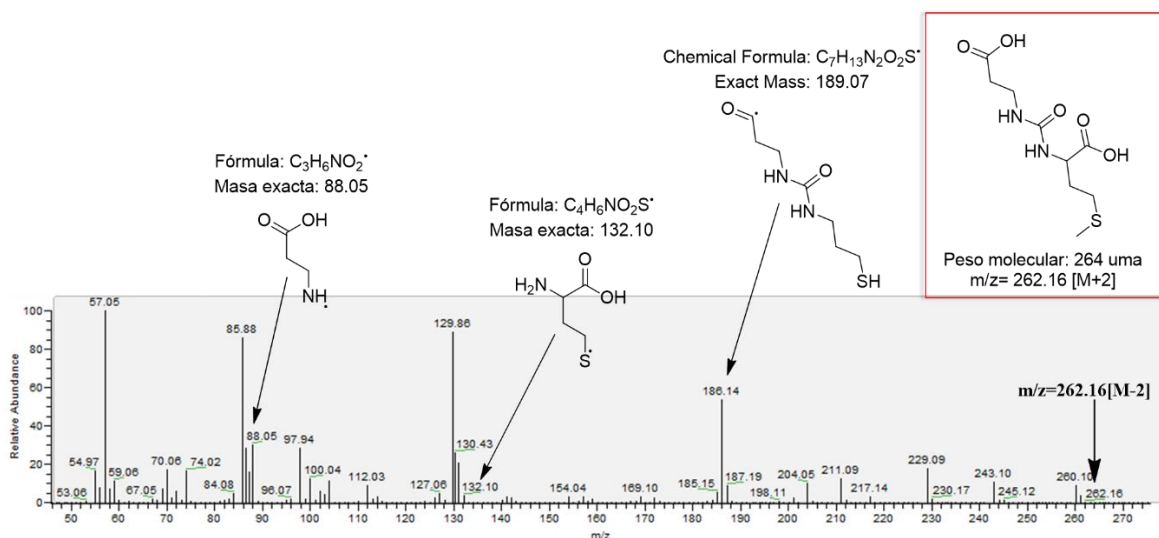
pasando de 3.53 ppm a 3.32 ppm en el  $\alpha,\beta$ -ureidopéptido **6**, así como un desdoblamiento más complejo.

En el espectro de Infrarrojo mostrado en la figura 11 se observan bandas de estiramientos para el compuesto **6**. En 3745 y 3677  $\text{cm}^{-1}$  se observa una vibración de estiramiento amina secundaria, en 2927  $\text{cm}^{-1}$  se observa una vibración de estiramiento de enlace C-H, se observa en 1557 y 1539  $\text{cm}^{-1}$  la vibración de estiramiento de grupo carbonilo de los ácidos carboxílicos y en 1461  $\text{cm}^{-1}$  se observa la vibración del grupo carbonilo de la urea.



**Figura 11.** Espectro de infrarrojo de la urea **6**.

El espectro de masas (IE) muestra un ion molecular de  $m/z=262.16$  una  $[M-2]^+$  que concuerda con el peso molecular esperado para el compuesto **6** menos dos una (figura 12).



**Figura 12.** Espectro de masas (IE) del compuesto **5**.

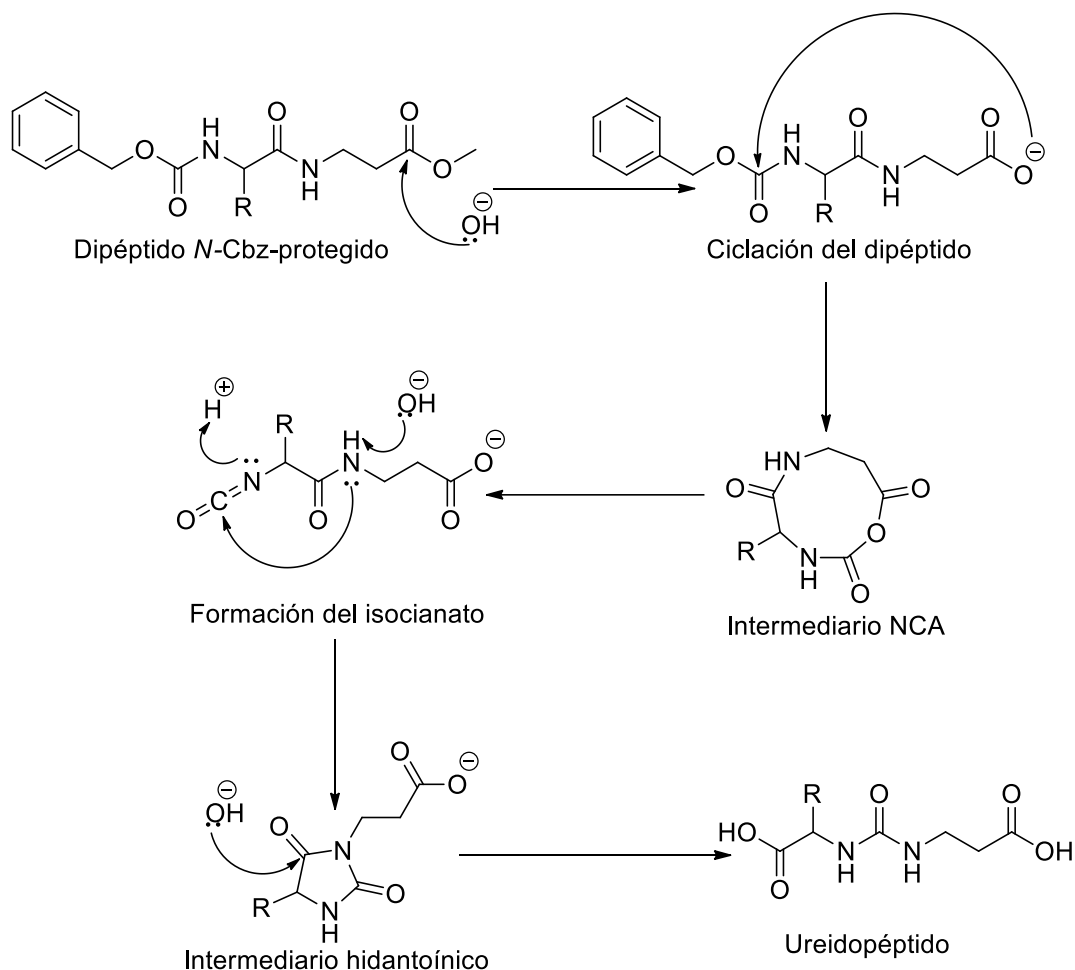
## 6.2. Mecanismo de reacción plausible en la síntesis del $\alpha,\beta$ -ureidopéptido **6**.

El conjunto de procesos elementales que permiten explicar la marcha de una reacción química recibe el nombre de mecanismo de reacción. Cada uno de estos procesos elementales puede ser monomolecular es decir intramolecular, o bien, bimolecular, trimolecular, etc., donde la reacción procede de manera intermolecular. En ese sentido, la síntesis del ureidopéptidos derivados de  $\alpha$ -aminoácidos con  $\beta$ -alanina *N*-terminal reportada en la literatura<sup>25</sup> procede de manera intramolecular y, por ende, otros  $\alpha$ -aminoácidos esperarían poseer el mismo mecanismo. El aducto cíclico que provee el reordenamiento del  $\alpha,\beta$ -dipéptido es denotado en la literatura como la hidantoína desde el año de 1949, donde Dekker y Fruton<sup>32</sup> generan el cierre del anillo tras días en medio básico, siendo una reacción donde las condiciones no le favorecían cinéticamente.

Por su parte, Mejía<sup>30</sup> describe una ruta sintética para la formación de *N*-Carboxianhidridos por ciclación de dipéptidos *N*-cbz-prottegidos. En este mecanismo, el ataque nucleofílico lo realiza el carboxilato hacia el carbonilo del carbamato protector, quedando un anillo de 8 miembros. Posteriormente, Zavala<sup>25</sup> al reproducir la misma metodología empleada por Mejía con el uso de  $\beta$ -

aminoácidos, observa que no son productos cíclicos los que se obtiene por esa ruta sintética, sino productos de carácter lineal, por lo que, el carboxianhidrido planteado, podría resultar como otro intermediario de reacción en la síntesis de ureidopéptidos. Teóricamente, este mecanismo que tiene como intermediario al *N*-carboxianhidrido, daría la formación de un isocianato que rápidamente se hidrolizaría para la formación del derivado ureico (esquema 13); sin embargo, el isocianato es muy difícil de aislar debido a su alta reactividad, por lo que sería difícil comprobar que la ruta sintética descrita por ambos siga estos pasos. Por otro lado, el intermediario hidantoínico ya ha sido aislado, caracterizado y reportado en la literatura.<sup>12,24,32</sup> Este anillo hidantoínico es el más importante y estable dentro de los intermediarios propuestos en las metodologías encontradas en la literatura, ya que hay una amplia variedad de fármacos que en su esqueleto principal incluyen a este anillo ofreciendo una amplia gama de beneficios clínicos, tal como lo hemos descrito anteriormente. Además, el anillo ofrece 4 posibles sustituciones, permitiendo una amplia variedad de moléculas totalmente diferentes que podría ampliar las bibliotecas de fármacos ya existentes en el mercado. También, dicho anillo imidazólico, se ha encontrado distribuido ampliamente en la naturaleza, formando parte principalmente de organismos marinos, aunque también de plantas y bacterias.<sup>33</sup>



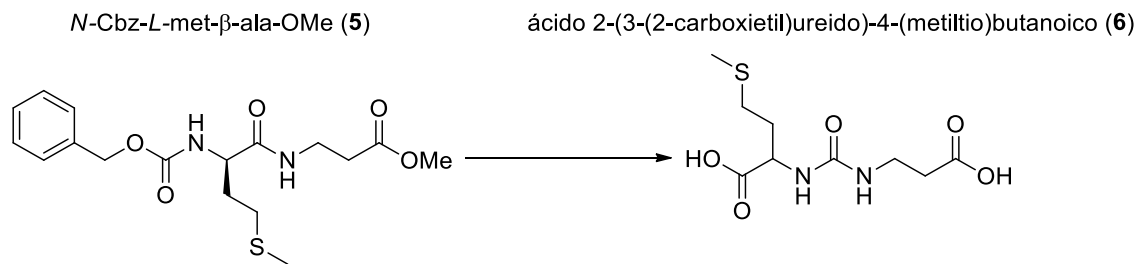


**Esquema 13.** Mecanismo de reacción propuesto en la síntesis del ureidopéptido **6**.

Con base a lo anterior, la síntesis intramolecular de ureidopéptidos es una de las rutas más seguras y amigables con el medio ambiente, además, ofrece la obtención de miméticos con alta probabilidad de potencial terapéutico, cumpliendo con las exigencias de las industrias farmacéuticas que dictan día a día los requisitos a cumplirse para la síntesis de fármacos. Esta ruta sintética ofrece el aislamiento y caracterización de dos moléculas altamente polifuncionales al ser de carácter peptídico.

## 7. CONCLUSIONES

En el presente proyecto se obtuvo la optimización en la síntesis asistida por microondas de  $\alpha,\beta$ -ureidopéptidos generando el ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico **6** el cual conduce a la formación de bibliotecas amplias de compuestos derivados con posible actividad biológica ya que incorpora en su estructura grupos funcionales variados, con el empleo de un  $\alpha$ -aminoácido como la metionina, la cual de manera natural desempeña un rol como bloque de construcción con la funcionalización adecuada, ya que el azufre genera puentes disulfuro o interacciones supramoleculares fuertes como los puentes de hidrógeno, logrando una transformación exitosa del  $\alpha,\beta$ -dipéptido **5** al  $\alpha,\beta$ -peptidomimético **6**. Así mismo, a pesar de las interacciones con los heteroátomos presentes en el ureidopéptido, fue posible su síntesis por reordenamiento intramolecular, donde la molécula final es prueba de una reacción altamente eficiente de un derivado de alto valor.



Adicionalmente, se demostró que esta metodología puede ser llevada a cabo en medio completamente acuoso, reduciendo en su totalidad el uso de disolventes orgánicos que conllevan a la contaminación del medio ambiente, cumpliendo con ello principios importantes de la química verde, ya que además ésta derivatización es regioselectiva, de manera que se genera el ureidopéptido como producto mayoritario hasta en un 88% de rendimiento, sin el uso de reactivos ni subproductos tóxicos, ya que los subproductos encontrados como impurezas se reducen a materia prima hidrolizada y empleando materias primas renovables por ser derivados aminoacídicos. El uso de la técnica empleada en este proyecto, al ajustarse a condiciones verdes, minimiza accidentes químicos al emplear condiciones suaves

de reacción, con reactivos sólidos de fácil manejo, a reactor abierto, sin el uso de condiciones especiales como presión o temperaturas drásticas, siendo posible su monitorización en tiempo real con el uso de cromatografía en placa fina o en conjunto con la espectroscopía infrarrojo para la identificación del producto final de manera consistente.

## 8. PARTE EXPERIMENTAL

### 8.1. Generalidades

El material de vidrio, cánulas, barras de agitación, etc., empleados en la realización de estas tesis, se lavaron perfectamente, enjuagando con alcohol isopropílico (*i*-PrOH) y secado en una estufa a 70 °C durante 12 horas.

Los disolventes utilizados como hexano, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol, fueron purificados por medio de destilación fraccionada en torre de Vigreux.

El tetrahidrofurano, disolvente utilizado en condiciones anhidras, se destiló sobre hidróxido de sodio (NaOH) y posteriormente se secó a reflujo con sodio metálico y benzofenona como indicador de humedad hasta la aparición de un color azul intenso. Posteriormente, se destiló el disolvente bajo atmósfera de nitrógeno.

Los reactivos de partida fueron adquiridos grado reactivo de la casa comercial Sigma-Aldrich.

El monitoreo de la reacción se efectuó mediante cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios Merk sílice 60 F<sub>254</sub> y como reveladores se utilizó luz UV y vapores de yodo.

La purificación de los compuestos se realizó por medio de cromatografía en columna usando como soporte estacionario gel de sílice de 300-400 Merk.

Las reacciones asistidas por radiación microondas se llevaron a cabo en un reactor CEM Discover Focussed Microwave System.

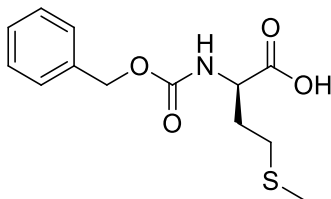
Los espectros de resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HETCOR, COSY, DEPT) se realizaron en un espectrofotómetro Varían Mercury plus a 400 MHz. Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm) empleando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Las constantes de acoplamiento (*J*) se describen en Hertz (Hz).

Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo JMS700-JEOL ionización positiva mediante la táctica FAB+ utilizando como matriz alcohol nitrobenílico.

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un espectrómetro de transformada de Fourier NICOLET 6700 con beamsplitter de KBr para los espectros de  $400\text{cm}^{-1}$  a  $4000\text{cm}^{-1}$  y en un espectrómetro infrarrojo NICOLET IS10 mediante técnica de ATR para los espectros de  $600\text{cm}^{-1}$  a  $4000\text{cm}^{-1}$ .

Los disolventes deuterados utilizados para la obtención de los espectros fueron cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), agua ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO-D}_6$ ).

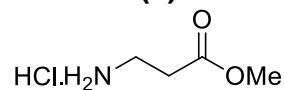
## 8.2. *N*-Cbz-*L*-metionina (2).



En un matraz balón provisto de agitador magnético y baño de hielo, disolvieron 0.5 g (34.35 mmol) de *L*-metionina con 0.840 g (9.99 mmol) de  $\text{NaHCO}_3$  como base y MeOH como disolvente, utilizando 10 mL por cada 0.1g del aminoácido. Posteriormente se adicionaron 0.91 g (3.65 mmol) de Cbz-OSu. La mezcla fue llevada desde los  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , aumentando gradualmente hasta alcanzar temperatura ambiente. Se dejó reaccionar por 24 horas. Al crudo de reacción se le realizaron dos lavados con cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), utilizando 30 mL por cada lavado. La fase acuosa se acidificó con HCl 1N hasta un pH de 3. Posteriormente, la fase acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50mL X 2), la fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro para eliminar humedad, se filtró por gravedad y se concentró a presión reducida en rotavapor. El producto de reacción se purificó mediante cromatografía en columna en un sistema 9:1 Hex/AcOEt, obteniendo 0.854 g del compuesto, como un polvo blanco, con un punto de fusión 67-69 y con 90% de rendimiento.

La información espectral de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  coinciden con los reportados en la literatura.<sup>30</sup>

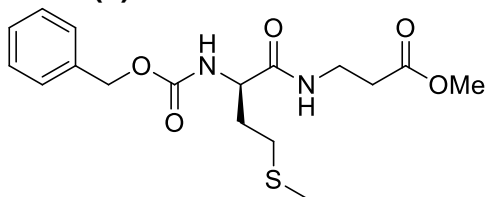
### 8.3. Clorhidrato de amino propionato de metilo (4)



En un matraz provisto de agitación magnética y en baño de hielo, se adicionó 1g (11.22 mmol) de  $\beta$ -ala disueltos en 40 mL de MeOH. Posteriormente se adicionaron lentamente 1.3 mL (23.98 mmol) de  $\text{SOCl}_2$  y la mezcla de reacción se dejó en agitación por 12 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente en el rotavapor, empleando una trampa de NaOH para neutralizar los vapores de HCl desprendidos. Posteriormente se realizaron lavados con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  con el fin de purificar el éster. Se obtuvieron 1.435 g del compuesto en forma de clorhidrato con un rendimiento del 91%, como un sólido cristalino altamente higroscópico. No se pudo determinar el punto de fusión debido a que absorbe mucha humedad del ambiente y no se puede realizar la cuantificación mediante la técnica convencional.

La información espectral datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  coinciden con los encontrados en la literatura.<sup>25</sup>

### 8.4. *N*-Cbz-*L*-metionin- $\beta$ -alanina-OMe (5)



Mezcla A: En un matraz balón provisto de agitación magnética bajo corriente de nitrógeno se adicionaron 1.76 mmol de  $\beta$ -ala-OMe **3** disueltos en THF/DMSO a una concentración 0.2 M. Posteriormente se adicionaron 2.11 mmol de NMM. La mezcla de reacción de dejó reaccionar por 1 h a temperatura ambiente en condiciones anhidras.

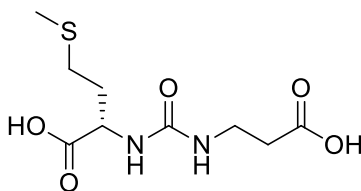
Mezcla B: En un matraz balón de tres bocas provisto de dos embudos de adición, bajo condición magnética y corriente de nitrógeno, se colocaron 1.76 mmol de *N*-Cbz-*L*-metionina (**2**) disueltos en THF a una concentración de 0.2 M. La solución se enfrió a -10 °C (baño de hielo húmedo y cloruro de sodio). Una vez enfriada la solución se adicionaron 2.11 mmol de NMM y se dejó en agitación por 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se adicionaron lentamente 2.11 mmol de *i*-BbCl disueltos en THF. La mezcla se dejó reaccionar por un periodo de 20 minutos.

Posteriormente se adicionó gota a gota la mezcla A al matraz que contenía la mezcla B. La mezcla resultante se agitó por una hora a -10 °C, dejando subir la temperatura hasta alcanzar la temperatura ambiente y se dejó reaccionar toda la noche. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el disolvente a presión reducida en el rotavapor, posteriormente se extrajo con AcOEt y se lavó con HCl al 10%, H<sub>2</sub>O, solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y finalmente se concentró en el rotavapor. El producto de reacción se purificó por medio de cromatografía en columna, empleando gel sílice 300-400 como fase estacionaria y mezclas de disolventes compuestas por hex, AcOEt, MeOH y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase móvil. Se obtuvieron 1.012 g del compuesto **5** como un sólido cristalino, con un rendimiento del 82% y con un punto de fusión de 67-69°C.

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.31 (m, 5H, H-17-21), 6.69 (s, 1H, H-6), 5.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4), 5.11 (s, 2H, H-15), 4.32 (dd, *J* = 7.43, 13.91 Hz, 1H, H-3), 3.69 (s, 3H, H-10), 3.53 (s, 2H, H-7), 2.50 (m, 4H, H-8, H-12), 2.09 (s, 3H, H-13), 2.09 (m, 2H, H-11).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172.7 (C-2), 171.1 (C-9), 156.0 (C-5), 136.1 (C-16), 128.5-128.1 (C-17-21), 67.1 (C-15), 53.9 (C-3), 51.9 (C-10), 35.0 (C-7), 33.6 (C-8), 31.7 (C-11), 30.0 (C-12), 15.2 (C-13).

#### 8.5. Ácido 2-(3-(2-carboxietil)ureido)-4-(metiltio)butanoico (**6**).



En un matraz para microondas provisto de agitación magnética se pesaron 0.27 mmol del *N*-Cbz-*L*-met- $\beta$ -ala-OMe **5** y se disolvieron en agua. Enseguida se adicionaron 0.81 mmol de LiOH La mezcla de reacción fue irradiada por microondas, cuyas condiciones utilizadas fueron temperatura de 80 °C, a 100 W de potencia, por un periodo de 12 minutos. La reacción fue monitoreada por TLC con un sistema eluyente de 1:1 hex/AcOEt hasta su término. Se evaporó el disolvente en rotavapor. Se hicieron lavados con H<sub>2</sub>O y AcOEt. Se obtuvo un compuesto sólido que se descompone a los 188 °C y con un rendimiento del 88% identificado como el ureoidopéptido **6**.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$**  4.14 (dd,  $J$  = 7.0, 4.9 Hz, 1H, H-3), 3.32 (m, 2H, H-7), 2.48 (m, 2H, H-8), 2.32 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, H-12), 2.05 (s, 3H, H-13), 1.91 (m, 2H, H-11).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$**  180.5(C-2), 179.5 (C-9), 160.5 (C-5), 56.25 (C-3), 39.5 (C-7), 38.4 (C-8), 34.9 (C-11), 31.2(C-12), 15.31(C-13).

**EM m/z (70 eV) =** 262.16 [M]<sup>-2</sup>, 189.07, 132.10, 88.05.



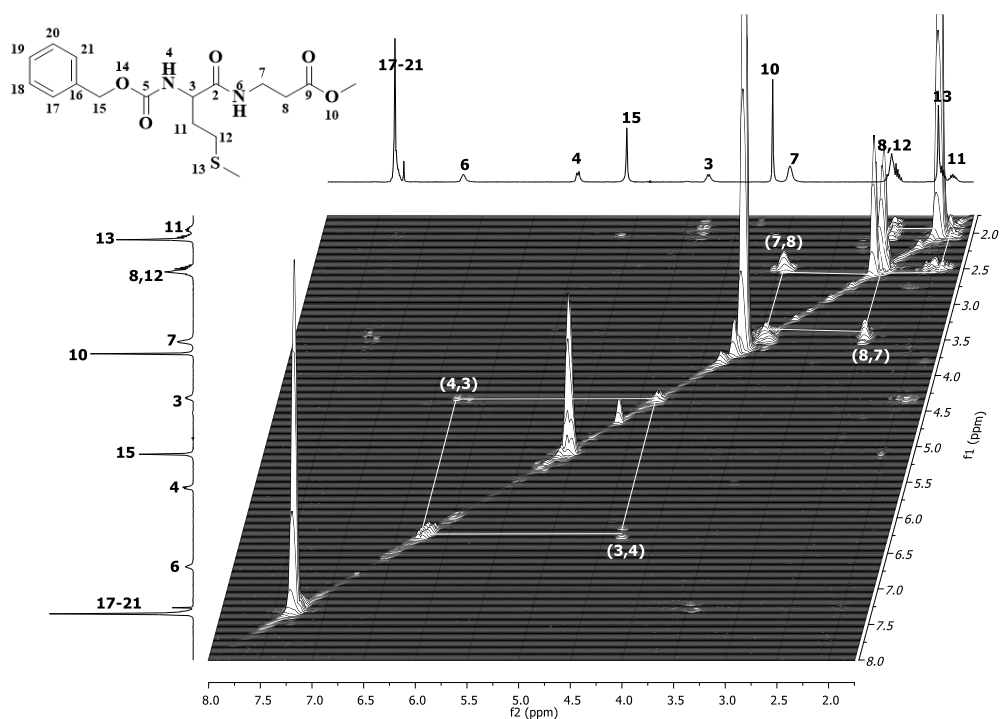
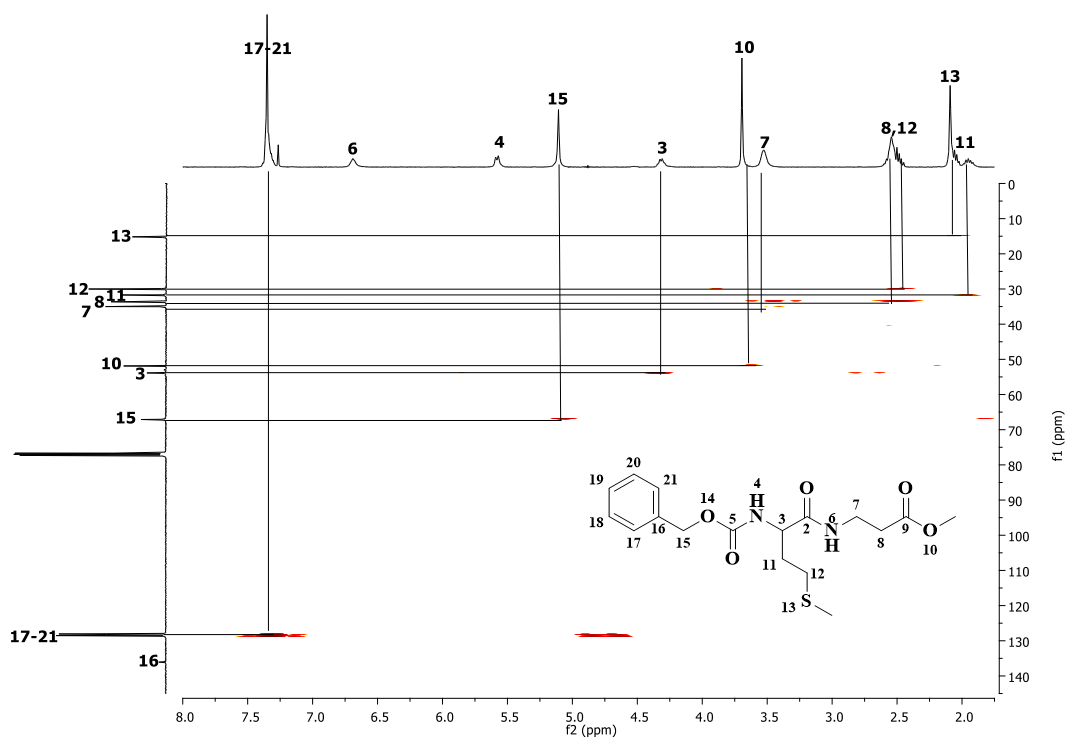
## 9. BIBLIOGRAFÍA

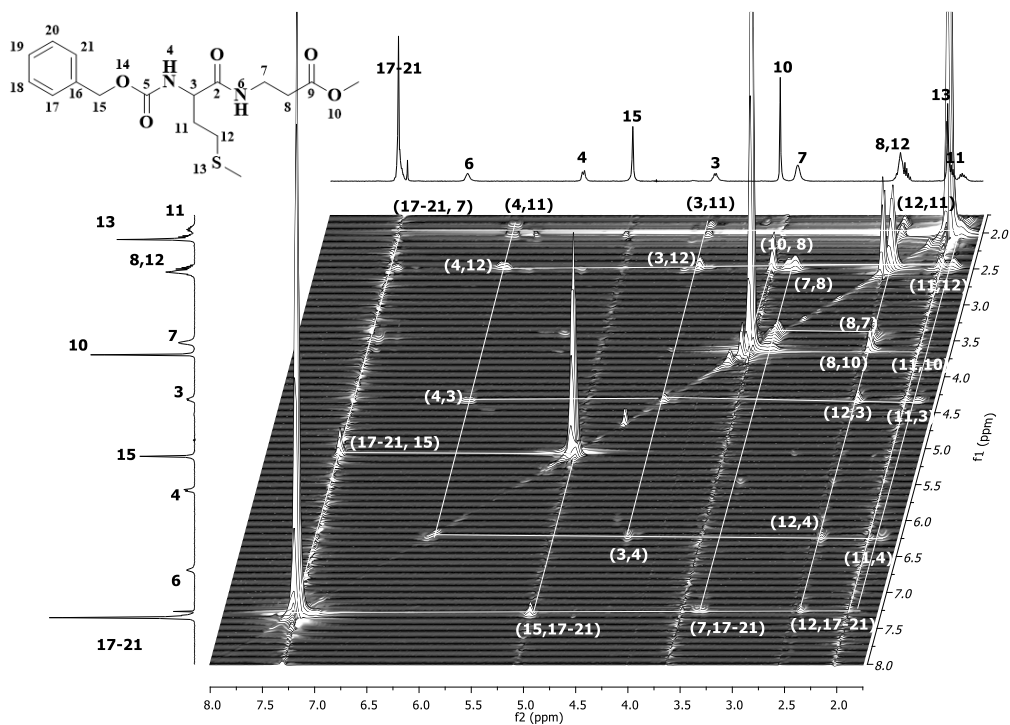
1. Mimmi, S.; Maisano, D.; Quinto, I; Iaccino, E. Phage Display: an overview in context to drug discovery. *Trends in pharmacological sciences* **2019**, *40*, 87-91.
2. Burgess, K.; Shin, H.; Linthicum, D.S. Solid-Phase Syntheses of Unnatural Biopolymers Containing Repeating Urea Units. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *34*, 907-909.
3. Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. Peptidomimetics, a Synthetic Tool of Drug Discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12*, 292-296.
4. Ghosh, A.K.; Brindisi, M. Urea Derivatives in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry, *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 2751–2788.
5. Li, Z; Wang, Z. Y.; Zhu, W.; Xing, Y. L.; Zhao, Y. L. CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O-KI-Catalyzed, Environmentally Friendly Synthesis of *N,N'*-Disubstituted Ureas in Water under Microwave Irradiation. *Synthetic Communications* **2005**, *35*, 2325-2331.
6. Lledó, E. G.; Palomera, F. A.; Jiménez, J. C. Péptidos y la Industria Farmacéutica. *En Anales de la Real Sociedad Española de Química*, **2004**, pp. 10-16.
7. Díaz-Ortiz, Á.; Prieto, P.; De la Hoz, A. A Critical Overview on the Effect of Microwave Irradiation in Organic Synthesis. *The Chemical Record* **2019**, *19*, 85-97.
8. Kappe, C. Oliver. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **2004**, *43*, 6250-6284.
9. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B.; Moos, W. H. Efficient Method for the Preparation of Peptoids [oligo (N-substituted glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis. *Journal of American Chemical Society*, **1992**, *114*, 10646-10647.
10. Wender, P. A.; Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Kreider, E. L.; Wylie, B. L. Oligocarbamate Molecular Transporters: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a New Class of Transporters for Drug Delivery. *Journal of American Chemical Society* **2002**, *124*, 13382-13383.
11. Liskamp, R. M. Opportunities for New Chemical Libraries: Unnatural Biopolymers and Diversomers. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1994**, *33*, 633-636.

12. Schlögl, K.; Wessely, F.; Woidich, H. Konstitutionsermittlung von Peptiden VIII. *Monatshefte für Chemie und Verwandte Teile anderer Wissenschaften*, **1956**, 87, 425-438.
13. Volz, N.; Clayden, J. The Urea Renaissance. *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**, 50, 12148-12155.
14. Lowe, P. T.; Dall'Angelo, S.; Fleming, I. N.; Piras, M.; Zanda, M.; O'Hagan, D. Enzymatic Radiosynthesis of a <sup>18</sup>F-Glu-Ureido-Lys Ligand for the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2019**, 17, 1480-1486.
15. Puszko, A. K.; Sosnowski, P.; Pułka-Ziach, K.; Hermine, O.; Hopfgartner, G.; Lepelletier, Y.; Misicka, A. Urea Moiety as Amide Bond Mimetic in Peptide-Like Inhibitors of VEGF-A165/NRP-1 Complex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2019**, 29, 2493-2497.
16. Kozikowski, A. P.; Nan, F.; Conti, P.; Zhang, J.; Ramadan, E.; Bzdega, T.; Wroblewski, J. T. Design of remarkably simple, yet potent urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase). *Journal of Medicinal Chemistry*, **2001**, 44, 298-301.
17. Lozano, J. M.; Guichard, G.; Briand, J. P.; Torres-Castellanosq, J. L.; Espejo, F.; Patarroyo, M. E. Síntesis de Ireidodipeptidos a partir de O-succinimidil carbamatos derivados de α-aminoácidos protegidos de su función amino terminal. *Rev. Colomb. Quim.* **2003**, 32, 65-73.
18. Chamni, S.; Zhang, J.; Zou, H. Benign Synthesis of Unsymmetrical Arylurea Derivatives Using 3-Substituted Dioxazolones as Isocyanate Surrogates. *Green Chemistry Letters and Reviews*, **2020**, 13, 246-257.
19. López-López, L.I.; Loera-Carrera, D. A. de; Rivera-Ávalos, E. de Jesús; Saénz-Galindo, A. Hidantoína y Derivados como Estructuras de Importancia en la Química Medicinal: Avances Recientes, **2018**, 75, 584.
20. Mascitti, A.; Lupacchini, M.; Guerra, R.; Taydakov, I.; Tonucci, L.; d'Alessandro, N.; Lamaty, F.; Martinez, J.; Colacino, E. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, 13, 19–25.
21. Tanwar, D. K.; Ratan, A.; Gill, M. S. Facile One-Pot Synthesis of Substituted Hydantoins from Carbamates. *Synlett*, **2017**, 28, 2285-2290.
22. Muccioli, G. G.; Poupaert, J. H.; Wouters, J.; Norberg, B.; Poppitz, W.; Scriba, G. K.; Lambert, D. M. A Rapid and Efficient Microwave-Assisted Synthesis of Hydantoins and Thiohydantoins. *Tetrahedron*, **2003**, 59, 1301-1307.
23. Konnert, L.; Lamaty, F.; Martinez, J.; Colacino, E. Recent Advances in the Synthesis of Hydantoins: the State of the Art of a Valuable Scaffold. *Chemical Reviews*, **2017**, 117, 13757-13809.
24. Maclaren, J. A. Amino Acids and Peptides. V. The Alkaline Saponification of N-Benzoyloxycarbonyl Peptide Esters. *Australian Journal of Chemistry*, **1958**, 11, 360-365.
25. García Zavala, S. (2019). Tesis de Maestría, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas UMSNH, Morelia, Michoacán, México.

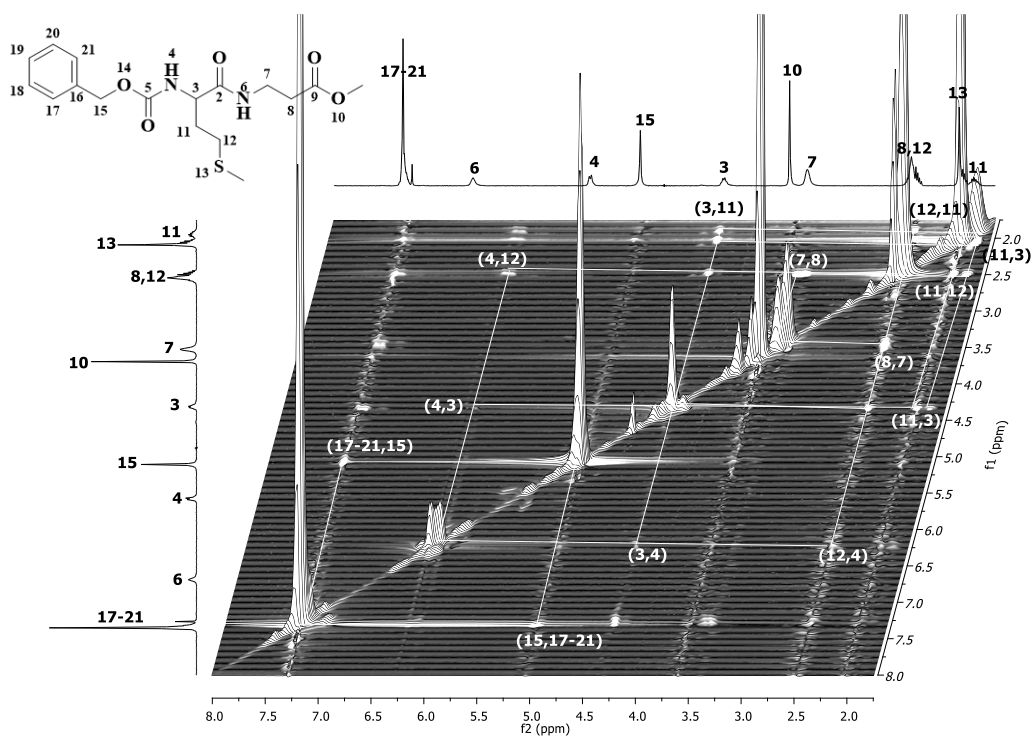
26. Kappe, C. O. (2006). The use of microwave irradiation in organic synthesis. From laboratory curiosity to standard practice in twenty years. *Chimia International Journal for Chemistry*, **2006**, 60, 308-312.
27. Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters*, **1986**, 27, 279-282.
28. Correa, L. P.; Hernández Baltazar, E. El Uso de las Microondas en la Industria Farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **2011**, 42, 6-25.
29. Sarveswari, S.; Raja, T. K. (2006). A Rapid Microwave Assisted Synthesis of *N,N'*-Diarylureas Under Solvent-Free Condition. *Indian Journal of Chemistry*, **2006**, 45, 546-547.
30. Torres Mejía, F.J. (2017) Tesis de Maestría, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas UMSNH, Morelia, Michoacán, México.
31. García Zavala, S. (2017) Tesis de Licenciatura, Facultad De Q.F.B. UMSNH, Morelia, Michoacán, México.
32. Dekker, C. A.; Taylor Jr, S. P.; Fruton, J. S. Synthesis of Peptides of Methionine and their Cleavage by Proteolytic Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **1949**, 180, 155-173.
33. Spengler, G.; Evaristo, M.; Handzlik, J.; Serly, J.; Molnar, J.; Viveiros, M.; Amaral, L. (2010). Biological Activity of Hydantoin Derivatives on P-glycoprotein (ABCB1) of Mouse Lymphoma Cells. *Anticancer Research*, **2010**, 30, 4867-4871.

## 10. ANEXOS





Espectro de RMN en 2D TOCSY de *N*-Cbz-*L*-metionin- $\beta$ -alanina-OMe (**5**) en  $\text{CDCl}_3$ .



Espectro de RMN en 2D NOESY de *N*-Cbz-*L*-metionin- $\beta$ -alanina-OMe (**5**) en  $\text{CDCl}_3$ .