

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS



“Síntesis de ácidos carboxílicos de naturaleza peptídica y su reactividad frente a alcoholes derivados de pirrolizidinas aisladas de *Chromolaena pulchella*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. Fernando Pablo Avila Poliz

Asesora:

DC. Judit Araceli Aviña Verduzco

Co-asesor:

DQ. Mario Armando Gómez Hurtado

Morelia, Michoacán; Febrero 2015

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Síntesis de ácidos carboxílicos de naturaleza peptídica y su reactividad frente a alcoholes derivados de pirrolizidinas aisladas de *Chromolaena pulchella*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. Fernando Pablo Avila Poliz

Asesora:

Doctora en Ciencias Judit Araceli Aviña Verduzco

Co-asesor:

Doctor en Química Mario Armando Gómez Hurtado

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Síntesis orgánica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección de los doctores Judit Araceli Aviña Verduzco y Mario Armando Gómez Hurtado y se realizó con financiamiento del proyecto CB-2009-131812-Q aprobado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), UMSNH-PTC-332, aprobado por PROMEP y proyectos 2.34 y 2.40 de la Coordinación de la Investigación Científica (CIC-UMSNH).

Para la realización del proyecto se contó con el apoyo económico de la beca otorgada por el CONACyT con el número de becario 269483. Y con el apoyo de la beca institucional otorgada por la UMSNH.

Parte de este trabajo se presentó en:

- ✍ La 9a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales “Dra. Luisa Urania Román Marín”, del 29 al 31 de Mayo de 2013 en la UAEH, Pachuca, Hidalgo.
- ✍ El 48° Congreso Mexicano de Química y 32° Congreso Nacional de Educación Química del 31 de agosto al 4 de septiembre del 2013, Guanajuato, Gto.
- ✍ El 8° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación (CECTI), los días 7 y 8 de noviembre del 2013, Morelia, Mich.

*La felicidad no es Tener todo lo que queremos, sino
Querer todo lo que tenemos.*

*El éxito es la mezcla de Suerte y Talento, o dicho de
una mejor forma, es cuando se juntan la Oportunidad
y la Preparación.*

Busca la Felicidad haciendo felices a los demás.

Rosalinda Políz

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mis padres Rosalinda Poliz Vallejo y Fernando Ávila García por permitirme venir a este mundo y por siempre, dentro de sus posibilidades darme lo mejor, por su amor y comprensión por nunca dejarme solo y ayudarme; mamá te amo mucho y te agradezco todo lo que has hecho por mí, por estar siempre pendiente de mí, por tu dedicación para con nosotros, por aconsejarme, sacarme de mis tristezas, siempre darme fuerza para salir adelante, por cuidarme y acompañarme en mis desvelos y que a lo largo de mi formación siempre has estado allí para mí; papá por todo tu esfuerzo por sostenernos como familia y dar lo que más puedes. A mi hermano Dante Esteban que durante 23 años fue mi compañía, amigo de vida y juegos a quien quiero mucho y he aprendido mucho de él. A mi familia tan grande y a las personas que se han cruzado en mi camino para darme su apoyo, amor y comprensión.

Agradecimientos

Primero que nada quiero ofrecer una disculpa a aquellas personas que se me pudiera pasar mencionar, ya que no es intencionalmente, y a veces ya anda uno muy apurado, trataré de que no se me olvide nadie, en caso de ser así, ustedes son los primeros a los que saludo y agradezco de todo corazón.

Agradezco en primer lugar a Dios por darme la vida y permitirme llegar a esta etapa de mi vida, que aunque no ha sido fácil siempre me ha ayudado a salir adelante y en los momentos que más desfallezco busca el modo de hacerme sentir que no estoy solo y debo confiar en él.

Doy enormes gracias a mis papás que sin ellos todo esto no hubiera sido posible. Agradezco grandemente a la Doctora Judit Araceli Aviña Verduzco por aceptarme en su equipo de trabajo y enseñarme tantas cosas, agradezco el que me haya enseñado tantas cosas, y que me haya hecho aprenderlas por mí mismo ya que nunca nos resolvía las cosas, sino que quería que nosotros lo pensáramos y eso es lo más valioso que he tenido del paso por este camino, que aunque no fue fácil me hizo madurar mucho, gracias por su paciencia doctora, por ser tan buena conmigo y siempre comprenderme en mis necesidades.

Agradezco al Doctor Mario Armando Gómez Hurtado que siempre fue tan amable y dispuesto a escucharme y ayudarme en lo que necesitara, siempre fue un gran apoyo para mi doctor, gracias por enseñarme del mundo de productos naturales y de la vida en sí. A mis sinodales quienes amablemente revisaron mis borradores de tesis y mis seminarios, Dr. Hugo Alejandro García Gutiérrez, la Dra. Betzabe González Campos que siempre tenían una sonrisa y saludo caluroso para

mí, y la Dra. Rosa Elva Norma del Río Torres quien siempre me decía “Ánimo, ánimo”, usted es ejemplo de sencillez, amabilidad y buena persona doctora Rosy, la estimo mucho. A los Doctores Juan Diego, Urania, Yliana, Albiter, Chacón, Dr. Rafa, que me dieron clases y me ayudaron en mi formación académica, y a la Dra. Gaby que no me dio clase pero estuvo cerca de mí en el laboratorio, siempre tan amable y cálida y dispuesta a ayudarme, que algún día me reveló lo de los casos imposibles y me levantó mucho aquella ocasión. Al Maestro Ramón Guzmán Mejía que llegó a ayudarme muchísimo y a abrirme un poco más los ojos en cuanto al trabajo de laboratorio.

A la maestra Q.F.B. Carmen Adriana Tena Guido, quien fue la persona que cambió mi vida y la marcó para siempre, pues como ya se lo he dicho, de no ser por usted (mi maestra favorita) yo no habría escogido esta carrera y no tendría tantas cosas buenas que tuve con ello, ahorita quien sabe que sería de mi vida, pero agradezco a Dios haberla puesto en mi camino, la quiero mucho maestra.

A la persona que me motivó a entrar a la maestría, mi amigo Julio Antonio Espinosa Chávez, gracias en serio Julión por tu apoyo, y por siempre darme ánimos y palabras de aliento para salir adelante en este complicado trabajo. Si no te hubiera encontrado ese día (por aquellos barrios tan peligrosos de Farma) no sé qué estaría haciendo, pero como siempre digo, Dios te pone en los momentos correctos con las personas correctas, gracias Julio porque por ti hice esto y mírame ya terminé al finnn!! :D (Julión Álvarez-Toñin-saban...).

A mis compañeros y amigos, en primer lugar mi amigo y compañero de laboratorio Alejandro Huerta Uribe de quien aprendí tanto con sus consejos y regaños, y gracias a ti Alex al principio pude hacer muchas cosas, cuando no sabía nada de nada, aún recuerdo el día cuando me dijiste “¿Qué estás haciendo??” y yo recuperando la fase donde se fue el Cbz no reaccionante jeje, y me dijiste así no jovencito!, desde aquel momento fuiste de gran ayuda para mí, me sacaste de muchos apuros y fuiste un verdadero amigo. A mi amiguísima Maribel García Segura la luchona de farma, que con su carácter me ha enseñado a tratar de ser mejor persona, que me enseñó el mundo de la docencia a niños necesitados (creo gracias a eso pude entrar al Cecytem Mary) te quiero mucho y te llevo en un lugar muy especial de mi corazón. A Angy mi compañera del lab que vio mi caminar por este lugar y siempre me prestaba material y me ayudaba en todo, a Juan Carlos tan servicial y que amenizaba y aligeraba el laboratorio con su música (y por eso me hacía cantar je), Mayra Vargas que llegó a darme tantos consejos de vida, a Gali por ser tan chévere y siempre animarme, con sus frases “Leve-Levy’s”, ¿Por qué apagas mi vacío?” y tu pávido-návido, Karina risas y risas (Puchito!!), Karen tan tierna y amable conmigo, Freddy tan risueño y picarón, a Héctor, Gera, Paco, Jessy, Mario. Y en especial agradezco a Jourdan Carrillo y Lupita mis primeros pupilos y

tú Jourdan sin tu ayuda yo no sé qué hubiera sido de mí, en verdad me echaste la manota a tu llegada y creo pude concretar todo gracias a ti, ya que yo ya estaba muy atorado, presionado y desesperado, pero fuiste mi brazo derecho y un gran alumno y maestro a la vez, te estimo mucho bro, espero sigas siempre así o mejor y te deseo todo el éxito del mundo y ahora en tu maestría también, algún día tendrás alguien a quien explotar también y te desquitarás jeje (y mil gracias por acompañarme incluso fines de semana, no creas que no me acuerdo, al contrario siempre lo recordaré). Otros compañeros del instituto: Alex Corona, Álvaro, Ángel, Techy Ferrer, Toño, Ana-anilina, que de algún modo me ayudaron a algo. Mis compañeros de generación Melissa Tapia, Viridiana, Julio Pardo (“Manadita” y yo el grupo saliente aww) a todos ustedes los aprecio mucho.

A mis amigos que me han ayudado en la vida Elsa Pérez (mejor amiga), Elsin Madaí, Monse, Cristian, Faby, Laura Valerio, Estelita, Anabel, Lupita, Lauricaz, David, Azu, Sharel, Fernanda, Citlali, Liz, Fernando Espino, Joel García E., los recuerdo con gran cariño desde la secundaria y demás estudios, Ulises y el grupo Cristo Amigo, que cambió mi vida y la de mi familia, donde conocí muchos amigos.

No me resta más que agradecer también a todas aquellas personas que sin su valiosa labor todo esto tampoco sería posible y que contribuyen enormemente en trabajos como estos, por ejemplo: el Químico Manuel de Resonancia, a Cony-Concepción Armenta Salinas por su inigualable ayuda y amabilidad para conmigo, al Maestro Juan Pablo García Merinos, también por su ayuda y sonrisa tan grata, a Blanquita de la Biblioteca, siempre atenta conmigo, a Don Peter que siempre le pisaba el suelo recién trapeado, a la señora Rosa y Chely que me prestaron su horno y estufita en los últimos meses que yo andaba apretado de dinero, y por siempre tener el laboratorio limpio e impecable, A Vicky que siempre me saludaba tan amable y me decía “Mi niño” y me hacía sentir bien siempre, pues era a la primera persona que saludaba al llegar al Instituto, a la Secretaria Rosy que me ayudó muchísimo y más ahora en los trámites de titulación, muchas gracias Rosy siempre fuiste tan amable conmigo, no sé si con todas las personas seas así, pero yo sentía un excelente trato para conmigo y al menos quiero ser de las personas que te lo agradecen, secretarias como tú hay pocas, que se ve que les gusta su trabajo, Moisés, Luis y demás personal.

En verdad GRACIAS a todas las personas que me han acompañado en el camino y de las que me olvidé mencionar, gracias, gracias, gracias, se llega el momento de cerrar ciclos, de finalizar proyectos y recuerdas a todas las personas que de forma directa o indirecta te han apoyado y te han hecho ser la persona que eres, gracias por ayudarme a concluir este trabajo y por ser parte de mi vida...

El éxito es el resultado de una lucha constante...

ÍNDICE

Abreviaturas y Símbolos	6
Resumen	9
Abstract	10
1. Introducción	11
2. Antecedentes	13
3. Justificación	31
4. Objetivos	32
4.1 Objetivo General.....	32
4.2 Objetivos Específicos.....	32
5. Discusión de Resultados	34
5.1 Obtención del ácido Cbz- <i>N-L</i> -Tir(O-Cbz)-Gli-OH (1).....	34
5.2 Obtención del ácido Cbz- <i>N</i> -Gli- <i>L</i> -Tir(O-Bn)-OH (2).....	46
5.3 Obtención del ácido Fmoc- <i>N-L</i> -Trp- <i>L</i> -Tir(<i>N</i> -Fmoc)-OH (3).....	56
5.4 Obtención de Supinidina (4).....	59
5.5 Estudio de reactividad de los derivados peptídicos 1 y 2 con alcohol 4	64
6. Conclusiones	77
7. Parte experimental	79
8. Referencias	98
9. Anexos	102

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grado Celsius
a	señal ancha
aa	Aminoácido
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
Aloc/Alloc	Aliloxicarbonilo
AP	Alcaloide pirrolizidínico
Boc	<i>t</i> -Butoxicarbonil
BOP	Hexafluorofosfato de (Benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetilamino) fosfonio
Bpoc	2-(4-bifenil)-isopropoxicarbonil
c	señal cuádruple
CbzCl	Cloroformiato de Bencilo
CCF	Cromatografía en capa fina
d	señal doble
DCC	Diciclohexil-Carbodiimida
DCM	Diclorometano (Cloruro de Metileno)
dd	señal doble de dobles
ddd	señal doble de doble de dobles
DIC	Diisopropil-carbodiimida
DIEA	Diisopropil-etilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DppCl	Cloruro del ácido difenilfosfínico
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
EM	Extracto metanólico
EP	Extracto de pirrolizidinas
Eq.	Equivalente químico

Fmoc	Cloruro de 9-fluorenilmetiloxicarbonil
g	Gramo
Gli	Glicina
GP	Grupo protector
h	hora (s)
HATU	Hexafluorofosfato de 3-Oxido 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio
HBTU	Hexafluorofosfato de (O-Benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-uronio
Hz	Hertz
<i>i</i> BCF	Cloroformiato de isobutilo
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	señal múltiple
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mmol	Milimol
MO	Microondas
mol	Mol
MP	Materia Prima
N	Normal (Normalidad)
NaHMDS	Hexametildisililazuro de sodio o Bis(trimetilsilil) amida de sodio
NMM	<i>N</i> -Metilmorfolina
Nps	2-Nitrofenilsulfenilo
p.f.	Punto de fusión
PN	Producto Natural
<i>p</i> NBS	<i>p</i> -nitrobenzensulfonilo
ppm	partes por millón
<i>R_f</i>	Factor de retardo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rto.	Rendimiento
s	señal simple

sept	señal séptuple
t	señal triple
T° amb (TA)	Temperatura ambiente
TEA (o Et ₃ N)	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
Tir	Tirosina
TMS	Tetrametilsilano
Tritil (Trt)	Trifenilmetil
Troc	Tricloroetil carbamato
Trp	Triptófano
UV	Ultravioleta
W	Watts
δ	Desplazamiento Químico

RESUMEN

Desde la antigüedad, el hombre ha hecho uso de los compuestos brindados por la naturaleza para satisfacer sus necesidades. Al conocerlos mejor, gracias a los avances científicos y tecnológicos, ha podido determinar sus propiedades, estructuras y características, por lo tanto ha despertado su interés en la elaboración de nuevos compuestos para su estudio. Uno de estos compuestos son los aminoácidos presentes en seres vivos, que son especies reactivas ya que además de poseer al menos un grupo amino y un grupo carboxilo, también presentan otros grupos funcionales en su cadena lateral, todo esto les confiere una gran versatilidad y su uso en el área de síntesis orgánica ha cobrado gran relevancia actualmente debido a la gama de actividades biológicas que estos compuestos poseen.

Por otro lado, el afán por imitar a los productos naturales ha sido de gran beneficio, y en la lucha por desarrollar nuevos fármacos se han logrado obtener nuevos compuestos, ya sea 100% sintéticos, semisintéticos, derivados, análogos y más recientemente compuestos “híbridos”, en los que se acoplan productos naturales a derivados semisintéticos. Es por lo anterior que en el presente proyecto se describe la obtención de compuestos derivados de péptidos provenientes de aminoácidos como tirosina, glicina y triptófano, y se describe también su reactividad frente a alcoholes obtenidos de fuentes naturales, específicamente de supinidina (4), un alcohol derivado de alcaloides pirrolizidínicos aislados de *Chromolaena purlchella*.

Palabras claves: Aminoácidos, pirrolizidinas, ácidos carboxílicos, acoplamiento, grupos funcionales.

ABSTRACT

Since the ancient, man has used the compounds provided by nature to satisfy its needs. By knowing them better, and thanks to the scientific and technological advances, he has been able to determine its properties, structures and characteristics, for that reason it has awaked its interest for elaborate new compounds for its study. One of those compounds are amino acids, found in living beings, those are reactive species since, besides of possessing at least one amine group and a carboxyl group, they have other functional reactive groups in their side-chain, all that confers them a marked versatility and therefore its use in the organic synthesis area has gained relevance nowadays because of the big gamma of biological activities that this compounds own.

On the other hand, the eagerness to imitate natural products has been very beneficial, and in the fight to develop new drugs, it has been possible to obtain new compounds, either 100% synthetics, semi-synthetics, derivatives, analogues y more recently “Hybrid” compounds, in which natural products are coupled to semi-synthetic derivatives. It is for this said previously, that in this project obtaining compounds peptide derivatives from amino acids such as tyrosine, glycine and tryptophan is described, and it is also described its reactivity towards alcohols obtained from natural sources, specifically supinidine (**4**), an alcohol derived of pyrrolizidinic alkaloids isolated from *Chromolaena pulchella*.

Key words: amino acids, pyrrolizidines, carboxylic acids, coupling, functional groups.

1. INTRODUCCIÓN

La síntesis de moléculas orgánicas ha sido campo de trabajo científico por más de un siglo. Desde hace mucho tiempo el hombre se ha interesado en obtener nuevos compuestos que puedan satisfacer sus necesidades, dichos compuestos pueden ser sintetizados con la finalidad de convertirse en fármacos, aditivos alimenticios, compuestos químicos como fertilizantes, insecticidas, conservadores, perfumes, entre otros. Es por eso que los científicos se han preocupado por incursionar en ésta área, siendo una de las ramas más importantes la síntesis de medicamentos y compuestos novedosos a los que se les puede estudiar sus propiedades, reactividad, efectos sobre la salud, etc. Durante el último siglo nuestra capacidad de construir moléculas complejas ha aumentado considerablemente y sigue creciendo a medida que se descubren o desarrollan nuevas reacciones, se optimizan otras ya conocidas y se comprenden mejor los mecanismos de reacción involucrados [1].

Recientemente, el avance científico ha permitido que muchas enfermedades consideradas incurables, ahora puedan ser curadas. Éste éxito se debe al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de leucemia y otros tipos de cáncer, enfermedades inmunológicas como el SIDA, enfermedades inflamatorias y otras. Sin embargo, existe aún un número significativo de padecimientos para los cuales no existen fármacos efectivos, por ejemplo los males neurodegenerativos que dan lugar a enfermedades mentales, problemas de circulación que derivan en deficiencias cardíacas, varios tipos de cáncer, la obesidad, entre otros.

El proceso necesario desde el descubrimiento de un fármaco hasta su producción y distribución es muy laborioso y costoso; sin embargo, en México se debe dedicar un mayor esfuerzo y recurso encaminado a desarrollar y producir medicinas y vacunas requeridas, con el objeto de ser más autosuficientes, ya que desafortunadamente México no figura dentro de los principales productores de fármacos a nivel mundial (menos del 1.4%) [2].

Para la obtención de moléculas con actividad farmacológica, se emplean dos procedimientos, el escrutinio masivo de compuestos y el escrutinio aleatorio. El método tradicional de *selección aleatoria* sigue jugando un papel importante en el diseño de fármacos. De hecho, esta *selección* no es del todo “ciega”, ya que son diversas las fuentes de inspiración que la orientan y la estimulan. Entre ellas se encuentran:

- A) La herbolaria asociada a la medicina tradicional, de la cual se han aislado numerosas moléculas con actividad farmacológica;
- B) La farmacopea de medicamentos de primera generación o que han sido retirados por exhibir efectos secundarios indeseables;
- C) El aislamiento de metabolitos naturales involucrados en proceso bioquímicos o fisiológicos naturales en hombre y animales.

Así, el *escrutinio aleatorio* se convierte en un proceso de *mimetismo* que busca preparar moléculas que se asemejen a aquellas que han mostrado ya un potencial farmacológico [2].

La modificación de extractos naturales mediante metodologías químicas también abre una nueva ventana en la búsqueda de diversidad [3]. Esto considera la síntesis total de compuestos que, por lo general posee una estructura compleja y difícil de preparar y que algunas veces no asegura que exhibirá el perfil farmacológico deseado. Una opción viable es encontrar las regiones de la estructura o grupos *haptóforos* que auxilian la fijación del fármaco al receptor, y grupos *farmacóforos* que son responsables de la actividad farmacológica. Esto conducirá a la preparación de moléculas menos complejas y con los requerimientos estructurales necesarios para mostrar una mayor actividad y, quizá, una menor toxicidad [2].

2. ANTECEDENTES

En un estudio reciente se ha analizado el origen los nuevos fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 y 2010. De este estudio se desprende que un 48.6% corresponde a Productos Naturales (PN), entendiendo como tal a los propiamente llamados así, a sus derivados y a los miméticos de los mismos [3, 4]. Con estos datos se refleja que la ciencia se ha interesado por el estudio de estos compuestos brindados por la naturaleza, para extraerlos, aislarlos, conocer sus propiedades, determinar su estructura, composición, obtener derivados y emplearlos en una gran diversidad de reacciones químicas.

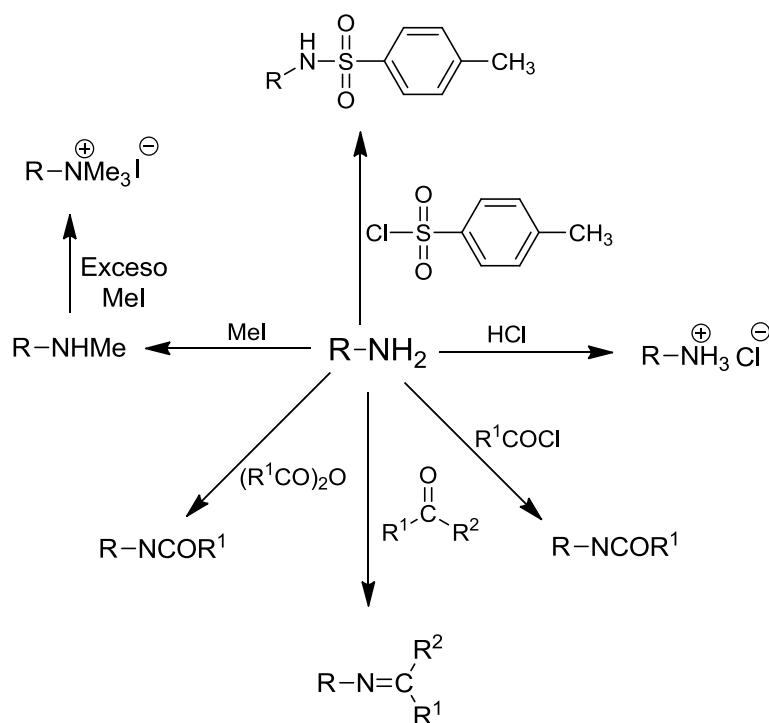
Por otro lado, el hombre de ciencia también se ha interesado no solamente por obtener de manera sintética estos PN, sino además compuestos análogos o derivados que puedan mimetizar las propiedades de los productos naturales o bien obtener “híbridos” los cuales son la mezcla de PN con derivados sintéticos.

Desde el siglo antepasado el estudio de los aminoácidos (aa) ha cobrado relevancia ya que estas biomoléculas han demostrado una amplia variedad de aplicaciones en diversas áreas, como la química farmacéutica y la medicina.

Los aa son moléculas formadas principalmente por un grupo amino y un carboxilo, además de ser los componentes principales de péptidos y proteínas. Se encuentran alrededor de 300 de ellos en microorganismos, plantas y animales pero solamente 20 son codificados por el ADN para formar proteínas [5]. Son especies muy reactivas debido a su esqueleto base así como a los grupos funcionales que presentan en la cadena lateral, convirtiéndolos en compuestos químicamente versátiles [6].

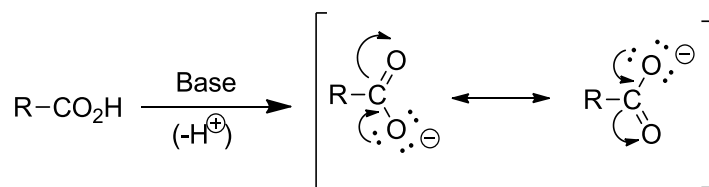
El grupo amino del aa reacciona de manera típica, actuando ya sea como base de Lewis, de Bronsted-Lowry o como nucleófilo (ver esquema 2.1). Por ejemplo, puede ser fácilmente protonada o metilada; puede atacar a los grupos

carbonilo, aún a los de reactividad moderada; los aldehídos y cetonas producen iminas, mientras que los cloruros de ácido y los anhídridos generan los derivados de amidas. Adicionalmente, puede reaccionar con reactivos electrofílicos de sulfuro, en la reacción con cloruro de *p*-toluensulfonylo (TsCl) se forma la sulfonamida correspondiente [6].



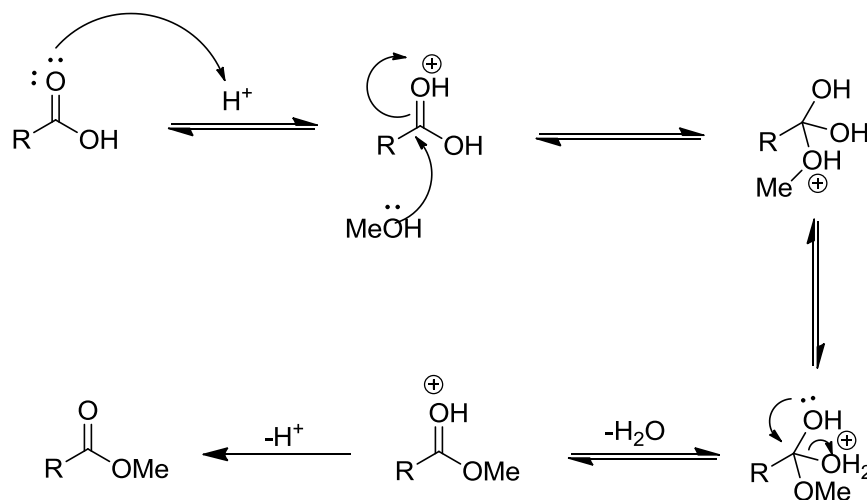
Esquema 2.1. Reactividad del grupo amino.

Aunque los aminoácidos poseen también un grupo carboxílico típico, este grupo puede ser menos reactivo, esto es porque la adición de un nucleófilo usualmente resulta en la remoción del protón lábil, dando así el deslocalizado ión carboxilato. Esquema 2.2 [6].



Esquema 2.2. Deslocalización del ion carboxilato.

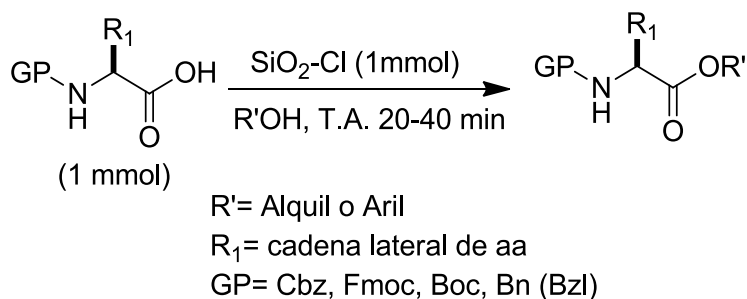
Además de que el ión carboxilato es rico en electrones, también la carga está distribuida y por lo tanto es un nucleófilo muy pobre por sí mismo; esto significa que el ácido carboxílico es poco reactivo. Sin embargo, bajo condiciones de catálisis ácida, la formación de ésteres es relativamente sencilla. Esquema 2.3 [6].



Esquema 2.3 Formación de ésteres a partir del carboxilo.

En los últimos años se ha determinado que la síntesis de ésteres es uno de los protocolos más fundamentales y cruciales para la producción de compuestos naturales y sintéticos útiles en química orgánica. Además los ésteres de aminoácidos *N*-protegidos son ampliamente usados en la química de péptidos y en la preparación de varios auxiliares como β -aminoalcoholes, oxazolidinonas y α -aminoaldehídos. A la fecha se han descrito una importante variedad de condiciones de esterificación. Dentro de estas, se han empleado las reacciones de acoplamiento entre derivados activados de ácidos carboxílicos y alcoholes. Sin embargo, la mayoría de los procedimientos requieren ya sea la presencia de ácidos fuertes como HCl, H₂SO₄, cloruro de tionilo (SOCl₂), ácido *p*-toluensulfónico (PTSA, *p*TsOH, TsOH), etc; agentes deshidratantes costosos como las carbodiimidas ó reactivos peligrosos tales como haluros de alquilo, diazometano o cloroformatos; además, altas temperaturas, lo cual compromete la integridad de las moléculas. Por lo tanto, aún existe la necesidad de un método alternativo para la esterificación de varios

aminoácidos *N*-protegidos. Alternativamente, en los últimos años, el uso de reactivos y catalizadores anclados sobre soportes sólidos como el gel de sílice ha llamado la atención y se ha empleado para transformaciones en química orgánica, al igual que los soportes de sílice modificada, por ejemplo el cloruro de sílice [7]. Esquema 2.4.



Esquema 2.4. Esterificación de aminoácidos *N*-protegidos.

Por otra parte, los α -aminoácidos al reaccionar con ciertos iones metálicos, pueden formar los complejos de quelación o “Quelatos”. Esto es importante ya que complejos de este tipo desactivan los grupos amino y carboxilo, lo cual permite que la cadena lateral reaccione de una forma selectiva. Por ejemplo con iones Cu^{+2} se forma el siguiente complejo (de un característico color azul) [6]. Figura 2.1.

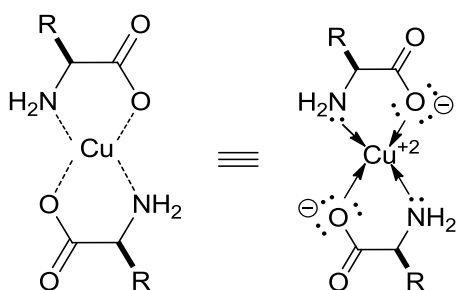
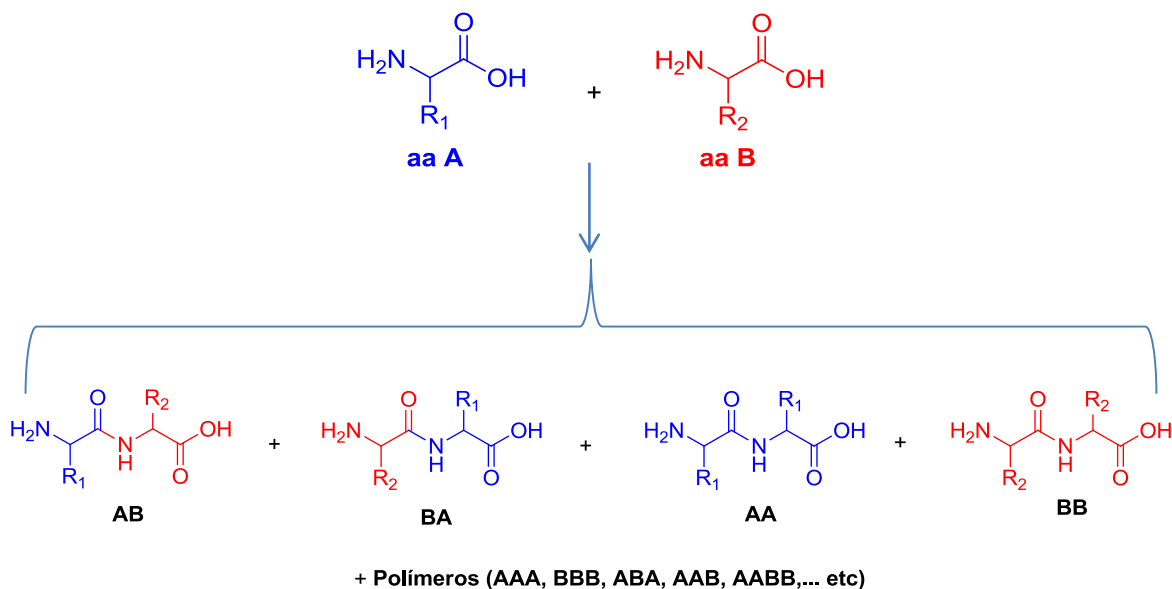


Figura 2.1. Quelato entre aa y Cu^{+2} .

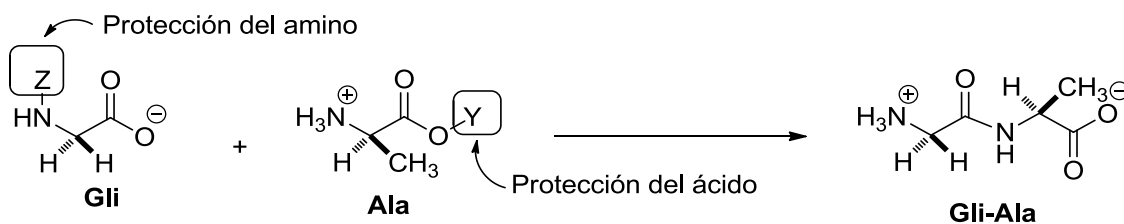
Debido a su reactividad, los aa son especies químicamente versátiles, lo cual los vuelve candidatos ideales para su utilización y en la síntesis química, sin embargo, es esta misma reactividad la que conduce a un planteamiento estratégico

de síntesis, para evitar la formación de productos indeseables, entre ellos la mezcla de homopolímeros y copolímeros [8]. Esquema 2.5



Esquema 2.5. Reactividad de aminoácidos.

Por lo tanto, en la formación de péptidos es necesario desactivar (proteger) todos los grupos funcionales presentes en los aminoácidos, excepto aquellos que están directamente involucrados en la formación del enlace de interés (esto incluye el amino y el ácido carboxílico). Así mismo, se debe tener en cuenta al escoger el grupo protector, que este pueda ser removido fácilmente y sin ruptura del enlace peptídico [9]. Esquema 2.6.

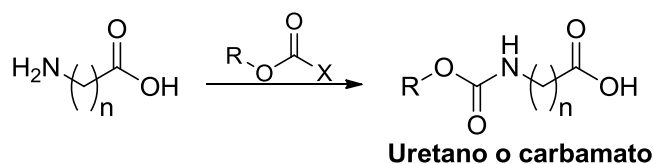


Esquema 2.6. Protección de aminoácidos para promover el enlace deseado.

Un Grupo protector (GP) es una especie química que es introducida a una molécula con el fin de obtener quimioselectividad en una reacción subsecuente, estos juegan un papel muy importante en síntesis orgánica [10]. Un grupo protector debe cumplir varios requisitos:

1. Reaccionar selectivamente y en buenos rendimientos para dar un sustrato protegido estable a las reacciones subsecuentes.
2. Ser removido selectivamente por reactivos fácilmente disponibles, preferentemente no tóxicos y que no ataquen al grupo funcional regenerado.
3. No generar nuevos centros estereogénicos.
4. Ser separado fácilmente de los productos secundarios asociados con su formación o ruptura.
5. Tener un mínimo de funcionalidad adicional para evitar formación de nuevos sitios de reacción. [11]

La desactivación del grupo amino se puede proponer por la formación de carbamatos (alcoxiámidas), cuya ruptura puede ocurrir bajo condiciones aún más suaves que para amidas normales. Esquema 2.7 [9].



Esquema 2.7. Formación de uretanos o carbamatos.

Los derivados de uretano o carbamatos son empleados actualmente como grupos protectores de amino, estos fueron implementados gracias a los trabajos de Bergman y Zervas quienes observaron que eran particularmente adecuados para la protección del α -amino, debido a su alto grado de estabilidad óptica, es decir, no promueven racemización de los centros estereogénicos adyacentes a estos grupos protectores [9].

El uso de benciloxilcarbonil (Cbz), *ter*-butoxicarbonil (Boc), 9-fluorenil-metoxycarbonil (Fmoc), 2-(4-bifenilil)-isopropoxycarbonil (Bpoc), tricloroetoxycarbonil (Troc) y Aliloxycarbonil (Aloc) como grupos protectores de aminas primarias y secundarias han sido los más estudiados ya que adicionalmente al proteger el grupo amino, minimizan la racemización; además estos grupos pueden ser removidos suavemente bajo condiciones básicas, ácidas y por medio de hidrogenólisis. Figura 2.2 [9].

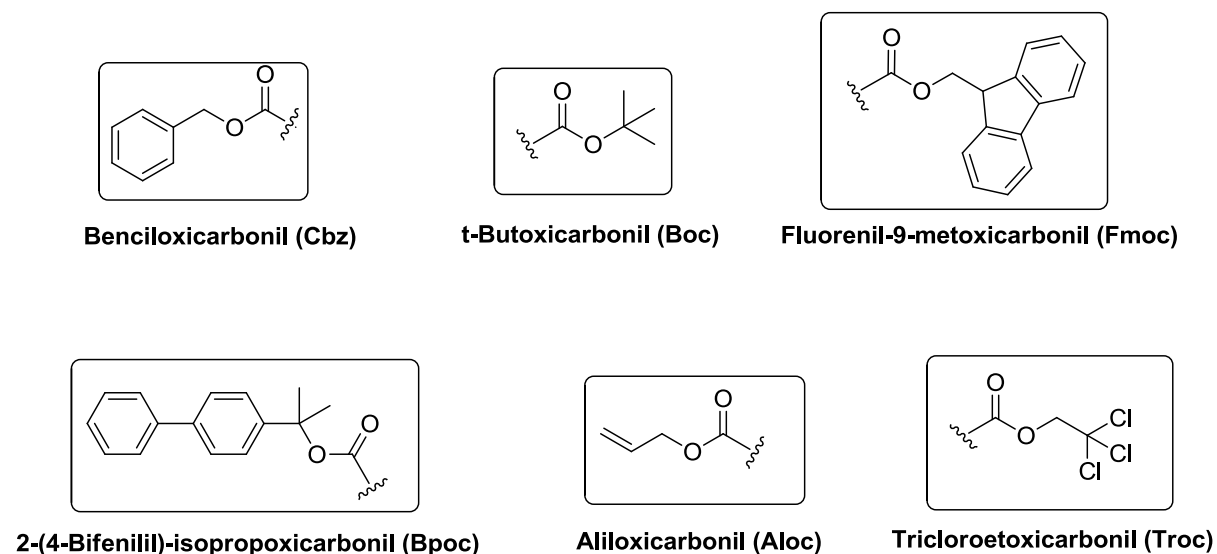


Figura 2.2. Grupos protectores del grupo amino.

Existen otros grupos *N*-protectores que no forman carbamatos pero que también son utilizados, estos grupos también pueden ser removidos bajo condiciones de reacción suaves. Figura 2.3 [12].

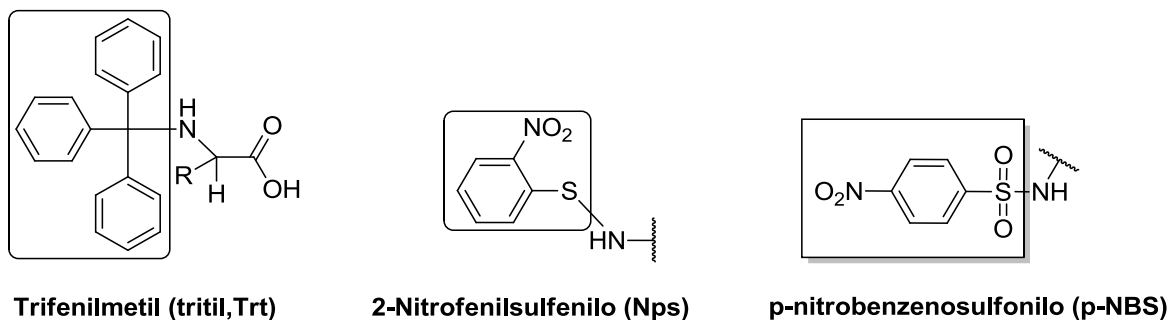
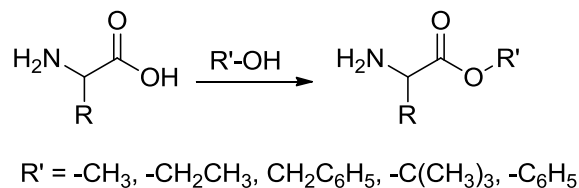


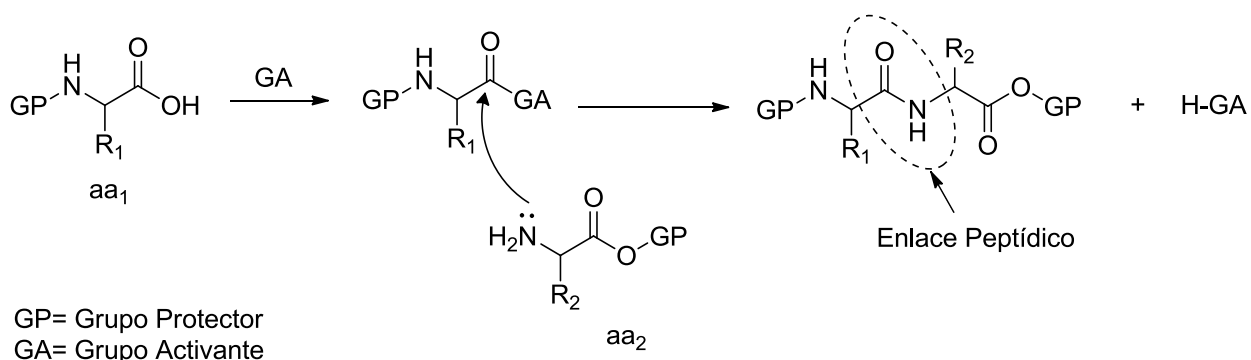
Figura 2.3. Grupos protectores no derivados de uretanos.

Por otro lado, el ácido carboxílico es protegido mediante la transformación al “éster”, como se mencionó anteriormente. La liberación del grupo protector se realiza por medio de una hidrólisis básica o ácida. Los esteres más utilizados con este fin son metílico, etílico, bencílico, *t*-butílico y fenílico. Esquema 2.8.



Esquema 2.8. Protección del grupo carboxílico.

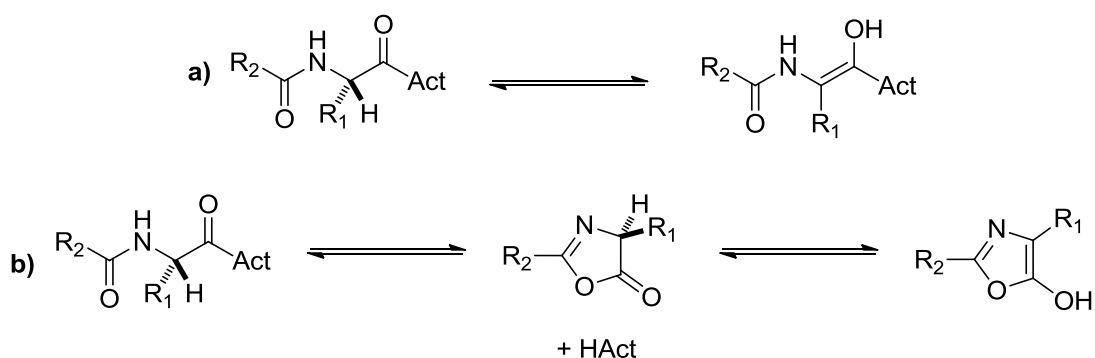
La formación del enlace peptídico es una reacción endergónica, es decir que la adición simple de un ácido carboxílico a una amina dará como resultado la obtención de la sal orgánica correspondiente; por lo que, si lo que se busca es la formación de una amida, el grupo carboxilo debe ser “activado”. El mecanismo que se sigue para el acoplamiento de dos aminoácidos se resume en el esquema 2.9. La reacción se inicia con la activación del ácido carboxílico con un agente activante de naturaleza electrofílica y posterior ataque nucleofílico del grupo amino para llevar a cabo el acoplamiento entre los dos fragmentos y formar el enlace peptídico [9].



Esquema 2.9. Generación del enlace peptídico.

Debe señalarse que en el caso de formación de enlaces péptidicos, deben cuidarse las condiciones de reacción, ya que si el grupo carbonilo es activado bajo condiciones fuertes puede dar lugar a una serie de reacciones colaterales así como ocurrir racemización. Esta racemización se da cuando el ácido tiene un carbono estereogénico en la posición α respecto al carbonilo, como es el caso de los α -aminoácidos, y se produce la activación, puede ocurrir a través de dos mecanismos:

- Enolización de la especie activada (Esquema 2.10a).
- La formación y posterior enolización de una 5(4H)-oxazolona (Esquema 2.10b) [12-14].



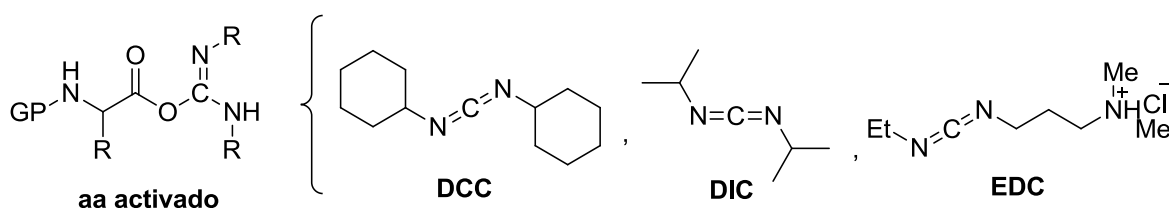
Esquema 2.10. Mecanismos de racemización de aminoácidos.

El grado de racemización depende del método de activación empleado. Así, en los métodos en que se empleen bases habrá tendencia a la enolización por pérdida del protón en α . Además, si el grupo activante (Act) es un buen grupo saliente será más fácil que se forme la oxazolona y el protón en α será todavía más ácido, siendo más fácil de abstraer por la base.

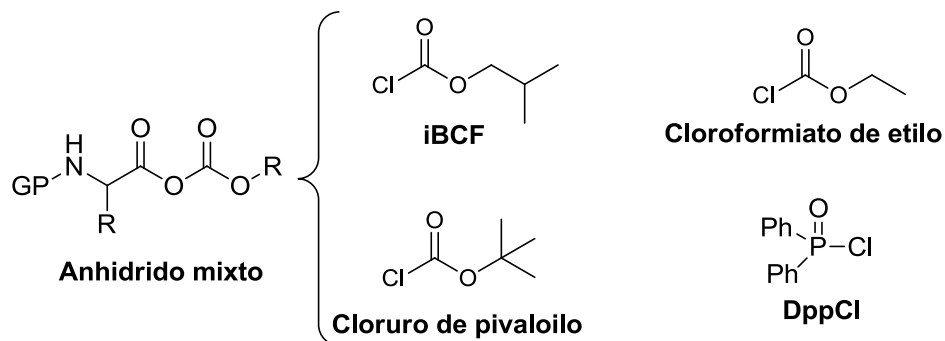
La activación del grupo carboxilo bajo condiciones suaves generalmente involucra tiempos de reacción muy largos, y por lo tanto resulta en acoplamientos incompletos, aunque se evita la racemización así como reacciones colaterales.

Por tanto, la selección del método de activación es fundamental antes de llevar a cabo la síntesis peptídica. A continuación se enumeran los principales grupos activantes utilizados en la síntesis de péptidos [6, 9, 15-17]:

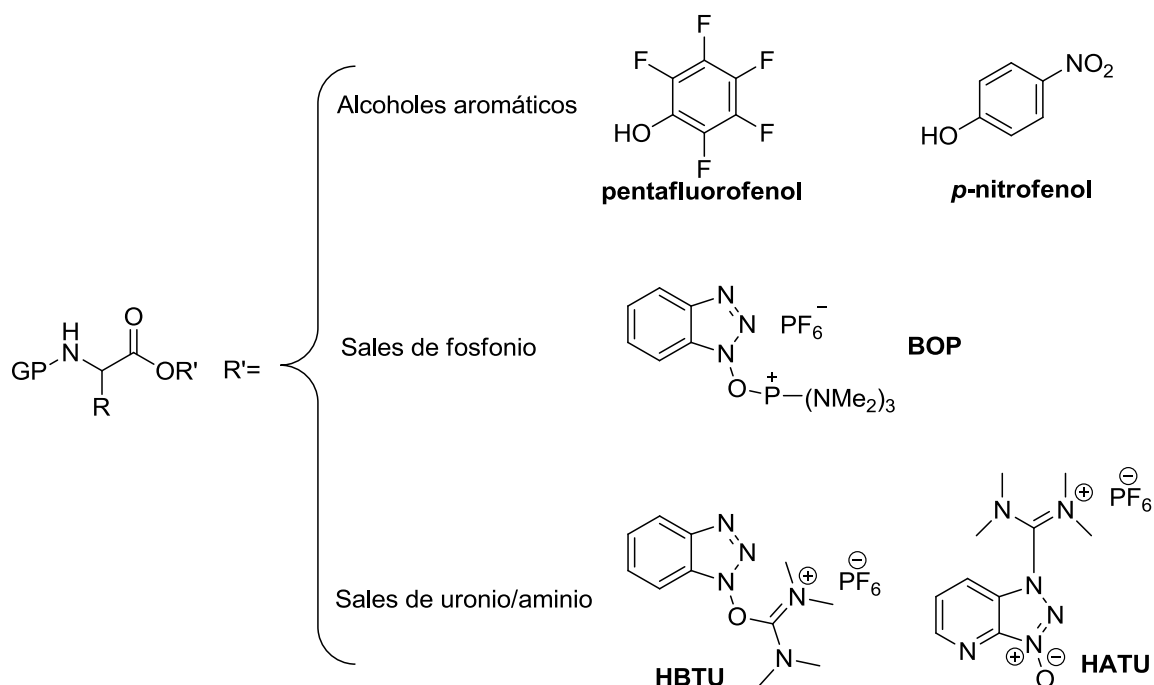
1. Carbodiimidas



2. Anhídridos Mixtos

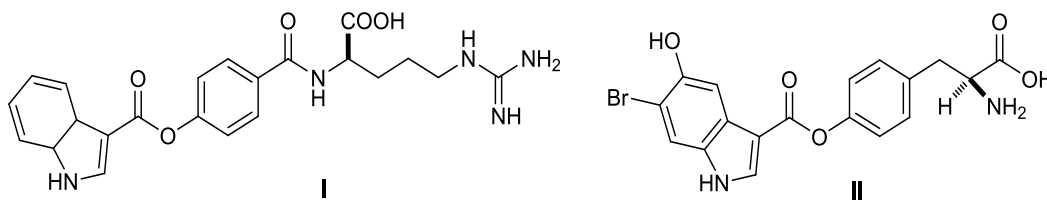


3. Ésteres activados derivados de:



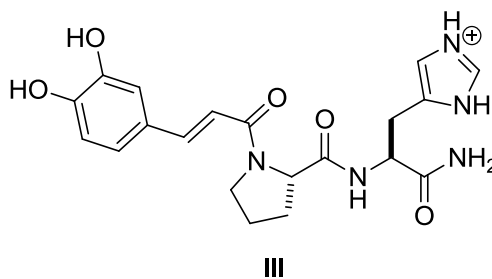
Los péptidos están presentes de manera abundante en los organismos vivientes. Miles de ellos han sido aislados de plantas, animales y microorganismos, según su estructura pueden ser lineales o cíclicos y exhiben potentes actividades biológicas. Estudios farmacológicos han probado que muchos péptidos tienen un potencial efecto antitumoral, presentando muchas ventajas sobre otros agentes químicos. En años recientes, una de las áreas más activas de la investigación es la búsqueda de compuestos naturales de plantas con potente actividad antitumoral y baja toxicidad; sin embargo, el estudio de péptidos enfocado a esta actividad biológica no ha progresado tan rápido como en el caso de otros compuestos naturales [18].

En un estudio reciente, se encontró que los ésteres derivados de aminoácidos como arginina I y tirosina II llamados “Herdmaninos” presentan una potente actividad antiinflamatoria y antioxidante [19]. Estos compuestos fueron aislados de la ascidia “*Herdmania momus*”, una clase de animal marino.



Como se puede observar, I y II poseen un grupo indol el cual también está presente en el triptófano, el cual posee una importante actividad antioxidante [20,21].

La funcionalización de productos naturales con aminoácidos y derivados peptídicos también ha demostrado un efecto benéfico en la actividad biológica de estos compuestos. El ácido cafeico, un antioxidante natural, el cual al ser funcionalizado con dipéptidos a base de histidina (His) mostró un sinergismo en la actividad antioxidante, comprobada mediante la captura de radicales libres de DPPH y prueba de peroxidación de lípidos. La más alta actividad la presentó el derivado cafeico-Pro-His-amida III [22].



También se han obtenido compuestos híbridos derivados de alcaloides de la Vinca y el péptido Fomopsin A (Figura 2.4). Estos compuestos fueron obtenidos a partir del acoplamiento entre cadena lateral (un tripéptido) del octahidrofomopsin y la amina terciaria del residuo de los alcaloides anhidrovinblastina, vinorelbina y vincristina. Los híbridos resultaron ser potentes inhibidores del ensamblaje de microtúbulos y presentaron buena citotoxicidad contra la línea de células KB (células tumorales formadoras de Queratina), mostrando una mayor actividad que los alcaloides precursores por si solos [23].

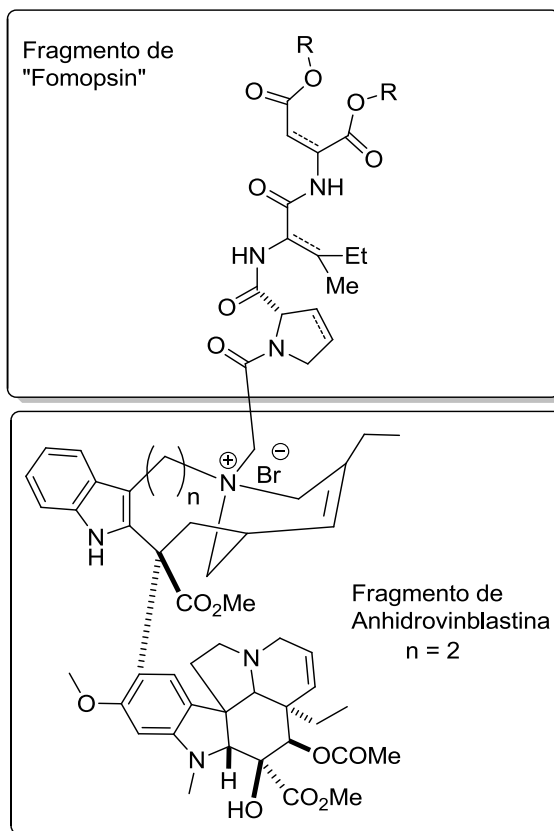


Figura 2.4. Híbrido de Vinblastina y Fomopsin.

Por otra parte, se ha observado que la unión de aminoácidos como Gli, Ala y Tir con el ácido linoleico (**IV-VI**) favorece la actividad antiinflamatoria de modelos biológicos [24].

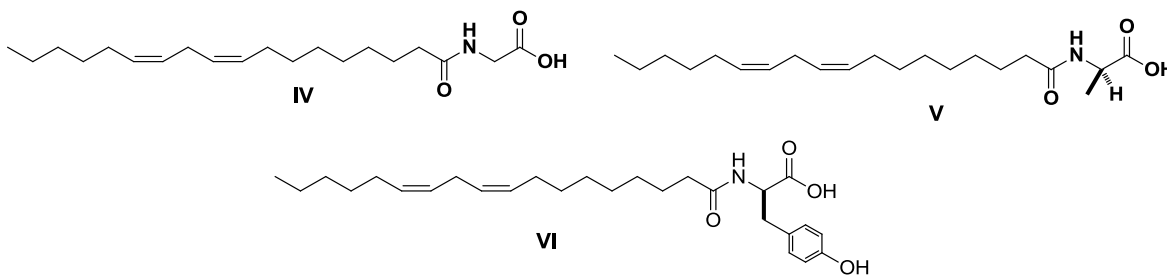


Figura 2.5. Derivados O-aminoacídicos de ácido linoleico.

Los derivados de Diazobiciclo [4.3.1]-decanos acoplados a residuos de aminoácidos mostraron actividad antiinflamatoria en animales de experimentación (VII-XI) [25].

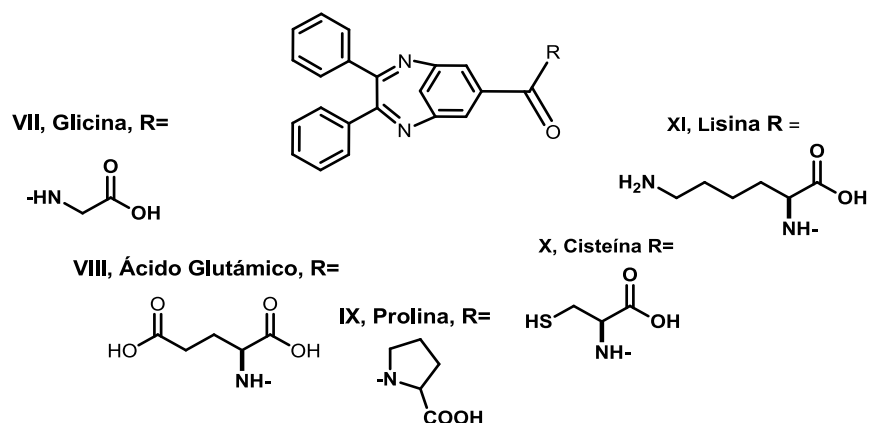


Figura 2.6. Diazobiciclos acoplados a aminoácidos con actividad antiinflamatoria.

En un estudio farmacológico de Cianometil-ésteres derivados de aminoácidos *N*-protegidos (Figura 2.7) se observó que inhiben la proliferación celular de la ascitis de Ehrlich y fueron activos contra la inflamación inducida por carragenina (antiinflamatorios y antineoplásicos) [26].

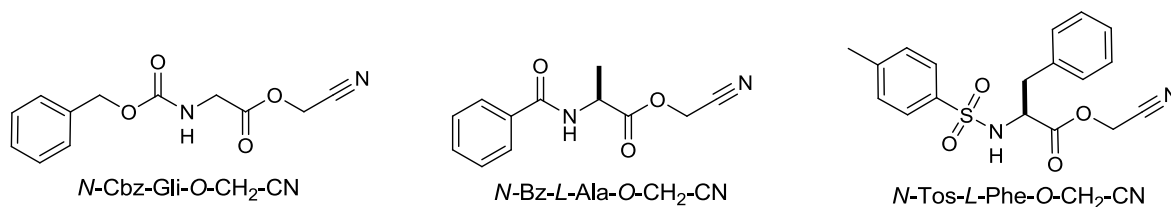


Figura 2.7. Cianometil-ésteres de aa *N*-protegidos

Alcaloides pirrolizidínicos

Los alcaloides son compuestos nitrogenados que poseen acciones fisiológicas intensas muy importantes en animales y humanos aún a bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Presentan una estructura de dos anillos de 5 miembros fusionados, con un átomo de nitrógeno como cabeza de puente, y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. La mayor parte de los alcaloides pirrolizidínicos son ésteres formados por la unión de aminoalcoholes (necinas), derivados de la pirrolizidina, con uno o dos ácidos carboxílicos alifáticos (ácidos néricos). Estos ejemplos se pueden encontrar en los estudios hechos por Toma W., *et al*, donde aislaron alcaloides de *Senecio brasiliensis* [27]. Figura 2.11.

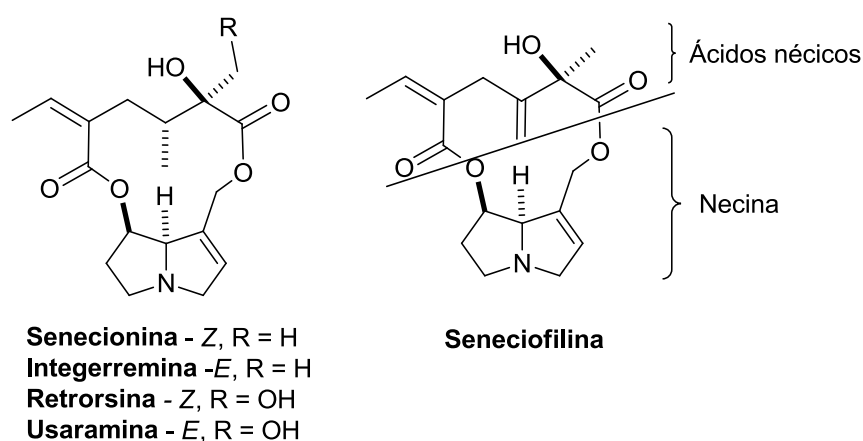


Figura 2.11. Estructura de los AP's aislados del extracto de *Senecio brasiliensis*.

Aunque se conoce desde hace muchos años que los alcaloides pirrolizidínicos (AP) pueden ser genotóxicos y hepatotóxicos, no todos ellos poseen esta actividad. Existe estudios sobre la relación “estructura-actividad” relativa a su toxicidad. Como regla general se tiene que los monoésteres son menos tóxicos que los diésteres macrocíclicos. Para poseer toxicidad, el alcaloide debe estar deshidrogenado en la posición 1,2 y al menos monoesterificado como se muestra en la figura 2.12 [28].

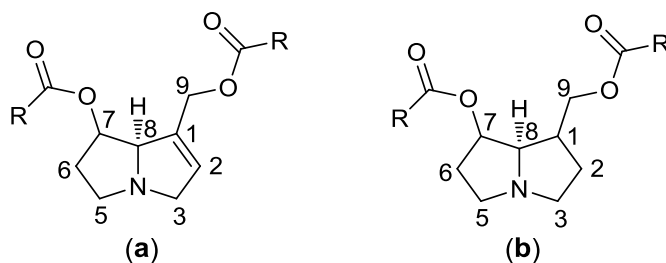
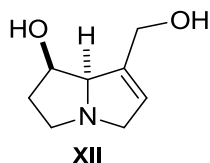


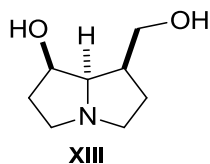
Figura 2.12. Alcaloide Pirrolizidínico tóxico (a) y no tóxico (b).

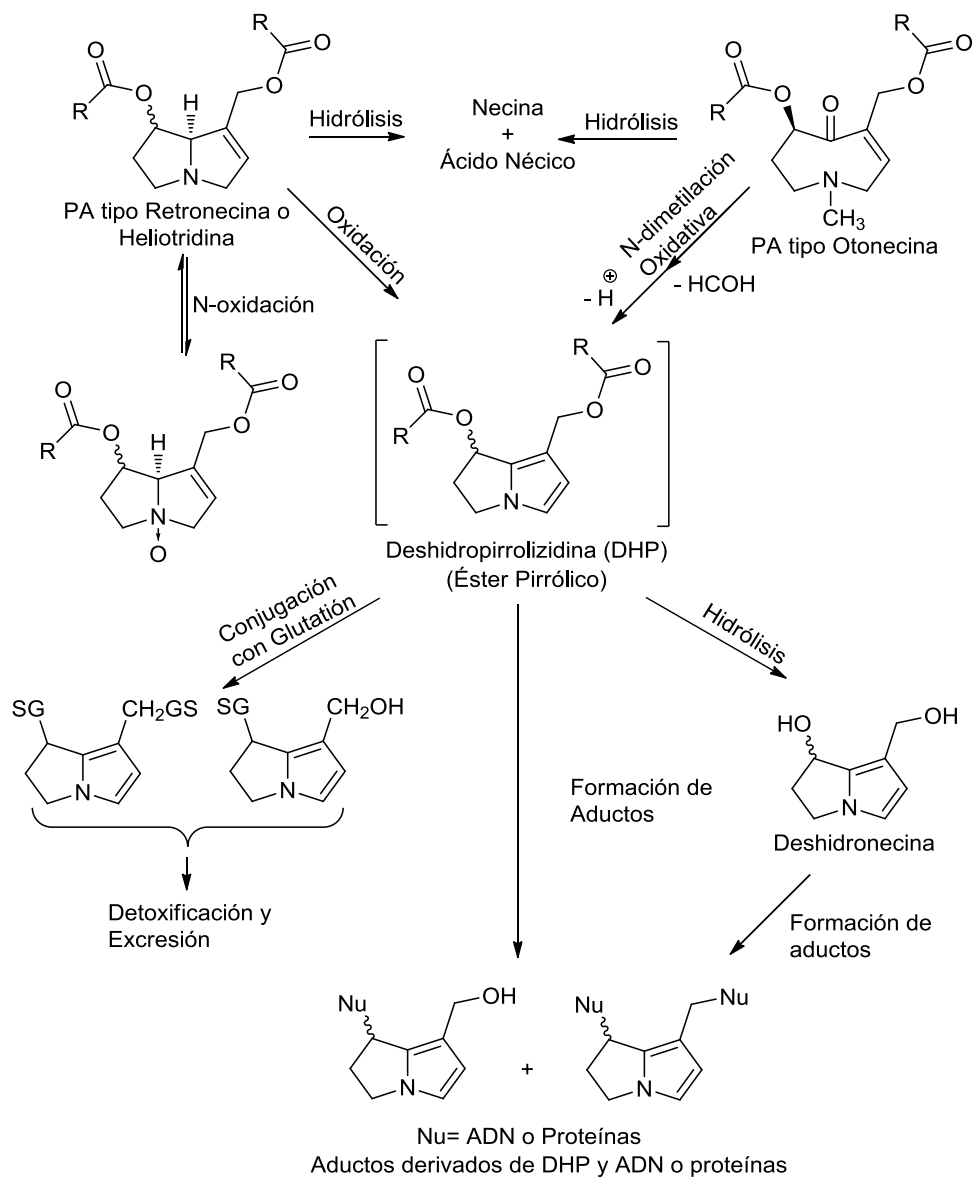
Los responsables de la toxicidad son los derivados pirrólicos que resultan de la oxidación de las pirrolizidinas a nivel de los microsomas hepáticos, convirtiéndose en agentes alquilantes de macromoléculas nucleicas y proteicas; y mediante procesos de oxidación e hidrólisis enzimática resultan en mutaciones en el ADN, causando daño tisular considerable en el hígado y trastornos en los procesos bioquímicos normales, generando así su toxicidad. Esquema 2.11 [29,30].

La hidrólisis del grupo éster de los alcaloides de pirrolizidina para dar la base necina, es una vía de desintoxicación y esta vía es catalizada por el hígado mediante enzimas carboxiesterasa citosólicas y microsomales. Los enlaces C-O en la posición 7 de compuestos como Retronecina (**XII**) se convierten en carbocationes, que al reaccionar con agua genera una adición en ambos lados del plano de la necina para formar la deshidropirrolizidina (DHP) racémica.



Los alcaloides de pirrolizidina que no contienen un doble enlace en la base, por ejemplo la Platinecina (**XIII**) no presentan propiedades genotóxicas.



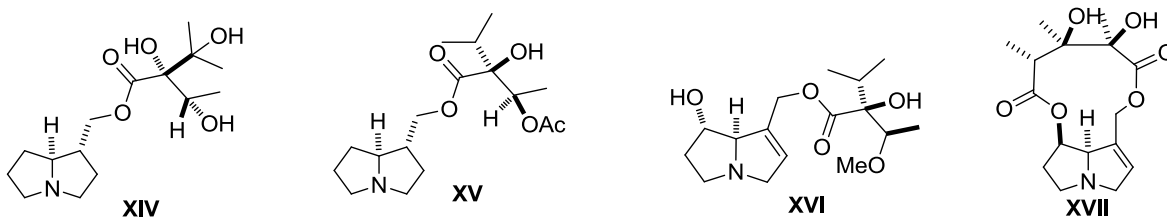


Esquema 2.11. Mecanismo de Toxicidad de Alcaloides de Pirrolizidina.

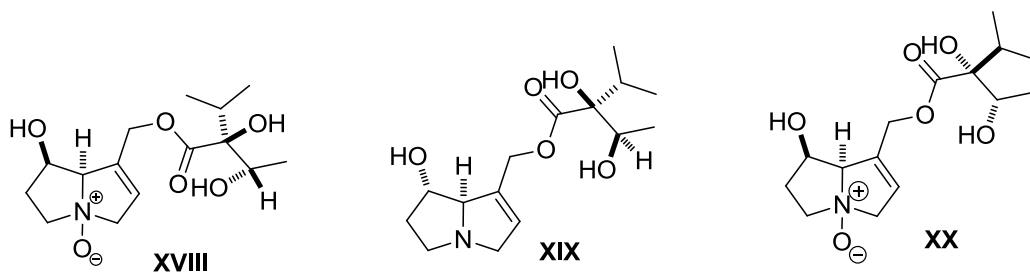
Sin embargo, Toma W., *et. al.*, encontraron que los extractos de inflorescencias de la planta *Senecio brasiliensis*, los cuales contienen una mezcla de PA mostrados en la figura 2.11 (*vide supra*), presentan actividad antiulcerogénica, citoprotectora y antiinflamatoria [27].

Además, se han realizado otros estudios biológicos sobre la floridina (**XIV**) y 3'-acetiltraquelantamida (**XV**) (aisladas de *Heliotropium floridum*) mostraron

actividad antifúngica moderada frente a *Fusarium monoliforme* [31]. La senecionina, retronecina (**XII**) [*vide supra*], heliotrina (**XVI**) y monocrotalina (**XVII**), presentan actividad antitripanosoma [32]. La Monocrotalina también ha mostrado indicios de actividad sobre enfermedades humanas congénitas del corazón asociadas con la hipertensión pulmonar [33].



En el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), se han realizado estudios clínicos con indicina (**XVIII**), intermedina (**XIX**), licopsamina (**XX**) y sus respectivos *N*-óxidos los cuales resultaron ser activos contra leucemia, además de no provocar efectos secundarios significativos en comparación a los que generan la mayoría de los agentes anticancerígenos utilizados en quimioterapia.



Se ha encontrado además que los *N*-óxidos de indicina (**XVIII**) sufren reducción mayoritaria en las células tumorales hipóxicas, lo que lleva a la especificidad de sitio-producción de pirroles metabólicos y a la selectividad por el tumor que por las células normales [34].

De la especie *Chromolaena pulchella* (Asteraceae). Se obtuvieron AP's a partir del extracto metanólico de raíces (**XXI** y **XXII**, Fig. 2.13), que mostraron capacidad inhibitoria del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), una citoquina

proinflamatoria o regulador de la inflamación, inhibiéndolo hasta en un 70% TNF- α , a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$.

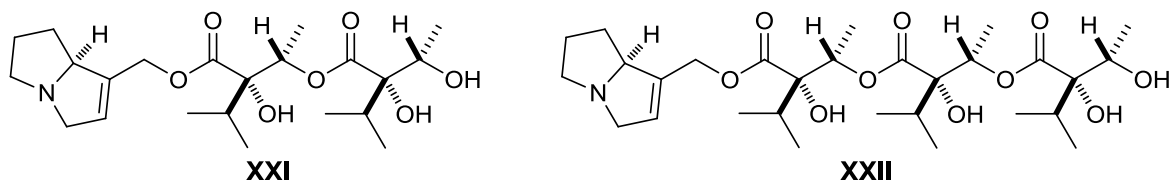


Figura 2.13. AP's diviridiflorato de necina (XXI) y triviridiflorato de necina (XXII).

La hidrólisis básica de estos compuestos permitió obtener al ácido néctico y a la correspondiente necina, la cual puede ser empleada en reacciones de esterificación que permitan explorar su comportamiento reactivo frente a ácidos carboxílicos presentes en sistemas peptídicos [35-37].

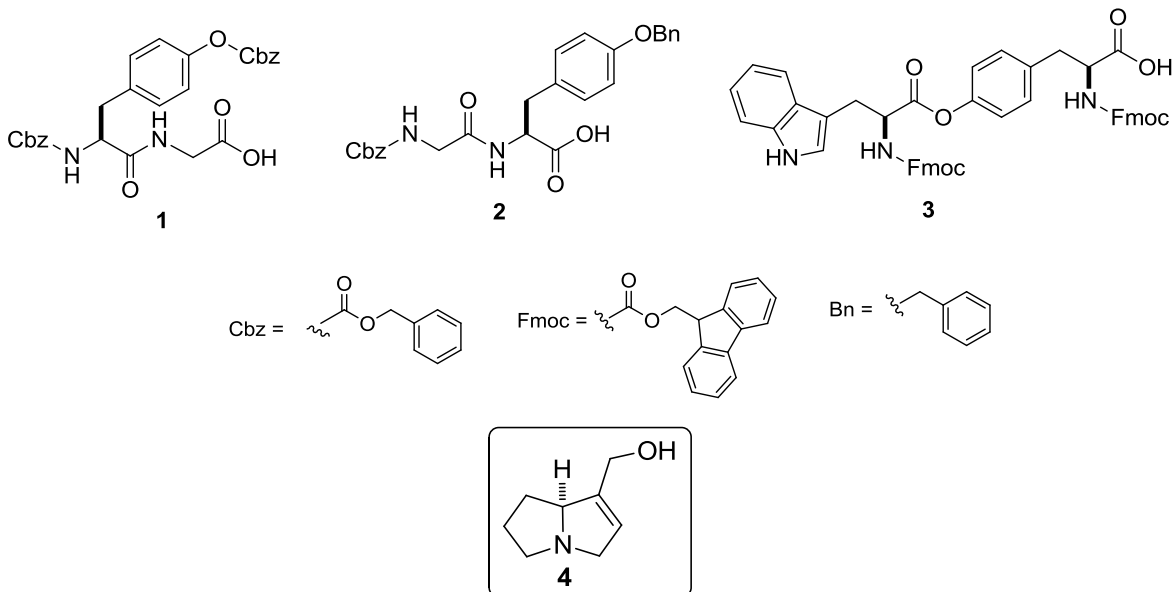
3. JUSTIFICACIÓN

Estudios previos han demostrado que los compuestos híbridos de péptidos y productos naturales presentan un sinergismo de sus actividades biológicas, además de las múltiples actividades mostradas por los aminoácidos que los vuelve candidatos para su estudio en el área de la síntesis orgánica así como el contribuir en la Química de productos naturales, se plantea llevar a cabo la síntesis de derivados peptídicos y la evaluación de su reactividad frente a supinidina obtenida de *Chromolaena pulchella*.

4. OBJETIVOS

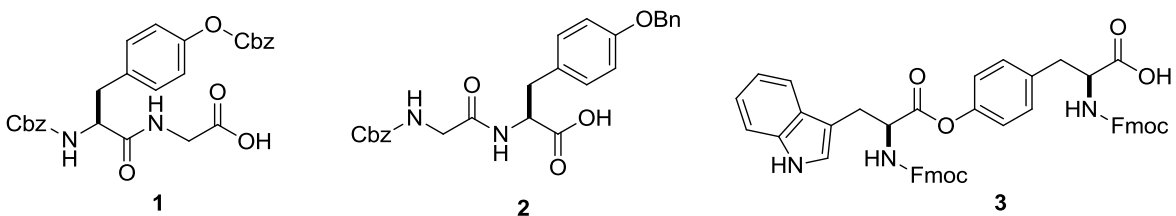
4.1. Objetivo General:

- Sintetizar los derivados peptídicos **1-3** y evaluar su reactividad frente a supinidina (**4**) en reacciones de esterificación.

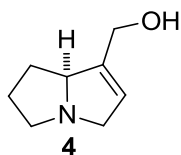


4.2. Objetivos específicos:

- Sintetizar los ácidos carboxílicos de naturaleza peptídica **1-3**.



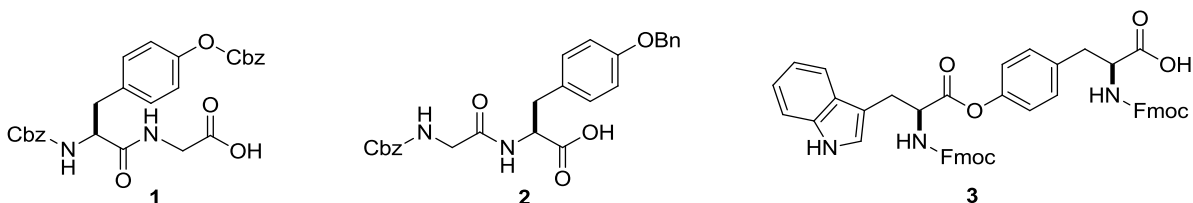
- Realizar la extracción selectiva de los alcaloides pirrolizidínicos presentes en las raíces de *Chromolaena pulchella*.
- Hidrolizar el extracto de pirrolizidinas (EP) para obtener supinidina (**4**).



- Determinar la reactividad de los ácidos derivados de péptidos **1-3** frente al alcohol pirrolizidínico **4**, mediante técnicas de esterificación.
- Realizar la elucidación estructural de los derivados peptídicos por métodos físicos y espectroscópicos.

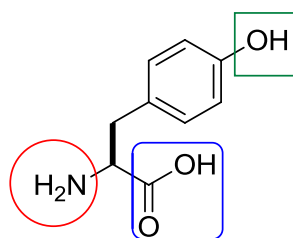
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con la finalidad de cumplir con los objetivos del presente proyecto se comenzó con la síntesis de los ácidos peptídicos **1**, **2** y **3**. Es importante resaltar que todos los aminoácidos quirales que se utilizaron son de configuración *S* (*L*-aminoácidos). Los compuestos **1** y **2** son dipéptidos con fragmentos de Gli y *L*-Tir, mientras que en el caso del compuesto **3**, se trata de la unión de dos fragmentos de aminoácido, *L*-Trp y *L*-Tir, pero no por un enlace peptídico convencional, estos aminoácidos están unidos por medio de un enlace tipo “éster”.

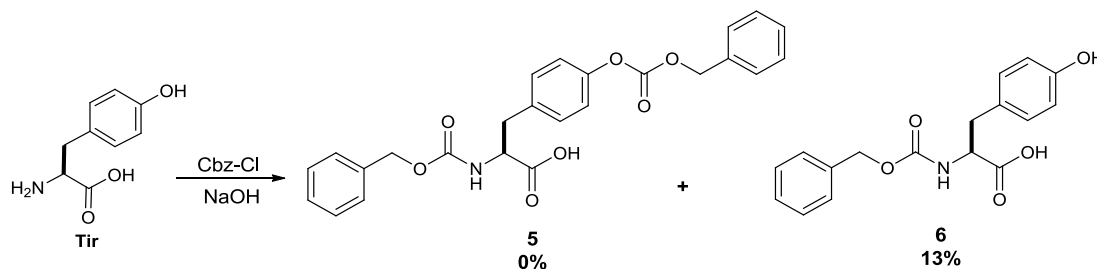


5.1. Obtención del ácido Cbz-*N*-*L*-Tir(O-Cbz)-Gli-OH (**1**):

En la síntesis del dipéptido Cbz-*N*-*L*-Tir(O-Cbz)-Gli-OH (**1**) y para evitar reacciones colaterales en el proceso de transformación, es necesario “proteger” los grupos funcionales que no participan en la formación del enlace peptídico. Al analizar la estructura de la *L*-Tir se observa que tiene tres grupos funcionales susceptibles o reactivos a las condiciones de formación del enlace peptídico, un amino, un ácido y un alcohol derivado del fenol. De los tres grupos funcionales, solo el ácido carboxílico es necesario para el acoplamiento con la Gli, por lo que los otros dos grupos deben ser protegidos. En este sentido, una de las ventajas del grupo benciloxicarbonil (Cbz) es que puede ser utilizado para proteger tanto el amino como el hidroxilo, además de que su eliminación se lleva a cabo mediante condiciones de reacción suaves y de manera eficiente.

**L-tirosina**

La diprotección de la Tir se realizó mediante la adición de dos equivalentes de cloroformiato de bencilo (Cbz-Cl) al aminoácido disuelto en una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH) a una temperatura de 0 a 25°C, como se muestra en el esquema 5.1.

**Esquema 5.1.** Diprotección de la Tir con CbzCl.

La reacción procedió con bajos rendimientos proporcionando únicamente el compuesto monoprottegido **6** (13%), por lo que con la finalidad de obtener el aminoácido diprottegido y mejorar rendimientos se realizaron diferentes modificaciones a las condiciones de reacción como se observa en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Condiciones de reacción para obtener los compuestos **5** y **6**.

Ensayo	Eq. CbzCl	Base	Disolvente	Condiciones de Rx*	Proporción (5:6)
1	2	NaOH	H ₂ O	2	0:1
2	2	NaOH	H ₂ O	1,2	2:1
3	3	NaHCO ₃ [#]	H ₂ O/dioxano	3	1:6
4	3	NaHCO ₃	H ₂ O/dioxano	2	1:3
5	4	NaOH	H ₂ O/dioxano	2	7:1

* ¹ Solvatación, ² Agitación mecánica, ³ Sonicación. # Referencia [38]

Como se puede observar en la Tabla 5.1, con el cambio de base en la reacción se observa la formación de ambos compuestos **5** y **6**; sin embargo, estas condiciones no favorecieron la formación preferencial o exclusiva del compuesto **5** (ensayos 2, 3 y 4). Los mejores resultados se obtuvieron al llevar a cabo la reacción dejando solvatar la Tirosina por 1 h en NaOH 1 N y posteriormente se adicionaron 4 equivalentes de Cbz diluidos en dioxano (ensayo 5). En este caso se favoreció la formación de la tirosina diprotegida **5** en una relación 7:1, como se aprecia en la figura 5.2.

En el espectro de RMN de ¹H se observan 4 señales dobles desplazadas a campo bajo, las cuales corresponden a los hidrógenos aromáticos del sistema *p*-sustituido del fenol de la tirosina. En 6.97 y 6.70 ppm se observan dos señales dobles ($J = 8.4$ Hz) que corresponden a los hidrógenos 14', 15', 17' y 18' del compuesto monoprotegido **6**, en 7.14 y 7.08 ppm dos señales dobles ($J = 8.6$ Hz) asignadas a 14, 15, 17 y 18 del aminoácido diprotegido **5**. En el espectro también se distingue la relación de intensidades entre los dos grupos de señales lo que permite calcular la proporción de los dos productos en la reacción.

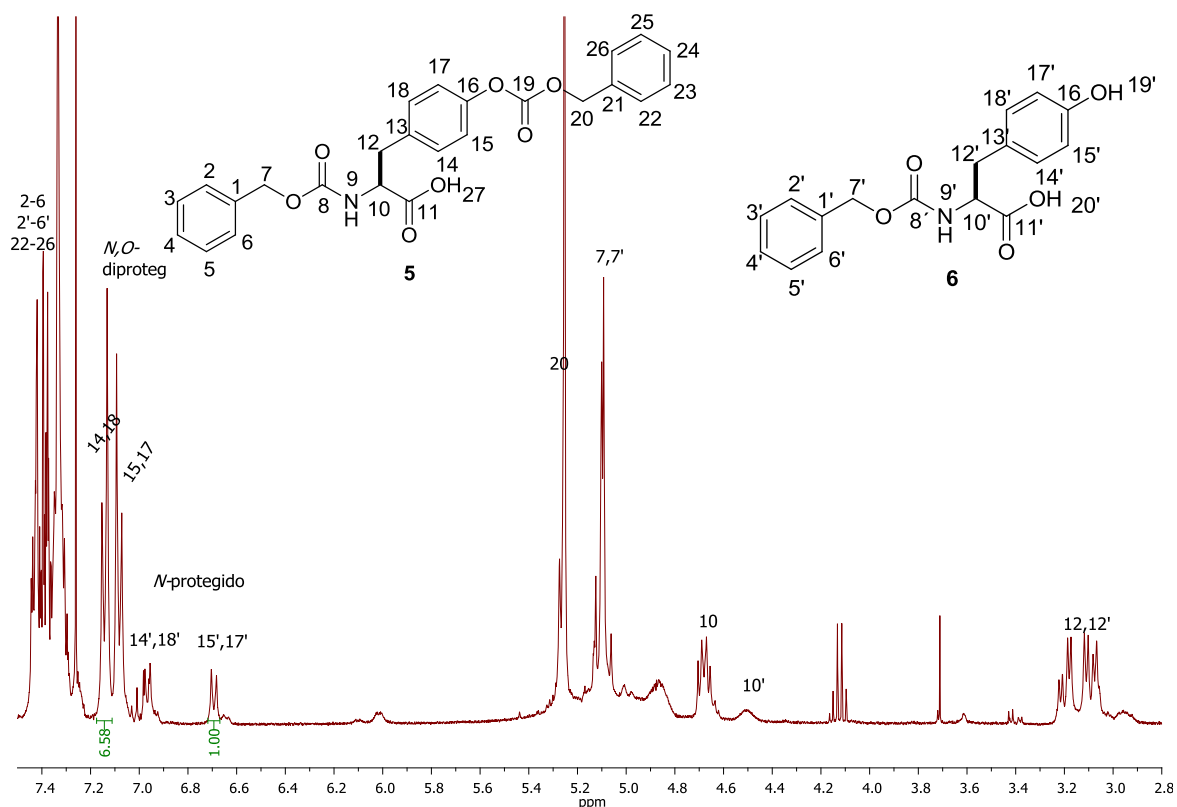


Figura 5.2. Espectro de RMN de ^1H del crudo de reacción de **5** y **6** (CDCl_3 , 400MHz).

El compuesto **5** se purificó por medio de cromatografía en columna empleando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de disolventes diclorometano (DCM), metanol (MeOH) y ácido acético (AcOH) en una proporción 19:1:0.1 y posterior recristalización en mezcla AcOEt-hexano. El producto se obtuvo como polvo blanco con p.f. 104-106 °C y un rendimiento del 31%. Los dos productos se caracterizaron por resonancia magnética nuclear como se observa en las figuras 5.3 a 5.6.

Como se puede apreciar en el espectro de RMN de ^1H (Figura 5.3) a campo bajo, entre 7.40 y 7.20 ppm se encuentra una señal múltiple que integra para 10 protones correspondientes a los hidrógenos aromáticos de los dos grupos protectores Cbz, entre 7.00 y 7.20 se observan las dos señales dobles ($J = 8.5$ Hz) características de un benceno *p*-sustituido H-14, 15, 17 y 18. Posteriormente, hacia

5.29 ppm se observa una señal doble atribuida al protón H-9. También en esta región (5.00-5.30 ppm) se encuentran las señales correspondientes a los metilenos del Cbz, como una simple en 5.24 ppm para H-20 y una señal doble ($J = 4.3$ Hz) en 5.08 ppm para H-7. Por último en 4.70 y 3.10 ppm se observan las señales correspondientes a un sistema ABX formado por el metino H-10 como una señal doble de dobles ($J = 6.4$ y 5.3 Hz) y en 3.10 ppm las dos señales dobles de dobles correspondientes a los protones H-12b ($J = 14.0$ y 5.3 Hz) y H-12a ($J = 14.1$ y 6.4 Hz), respectivamente.

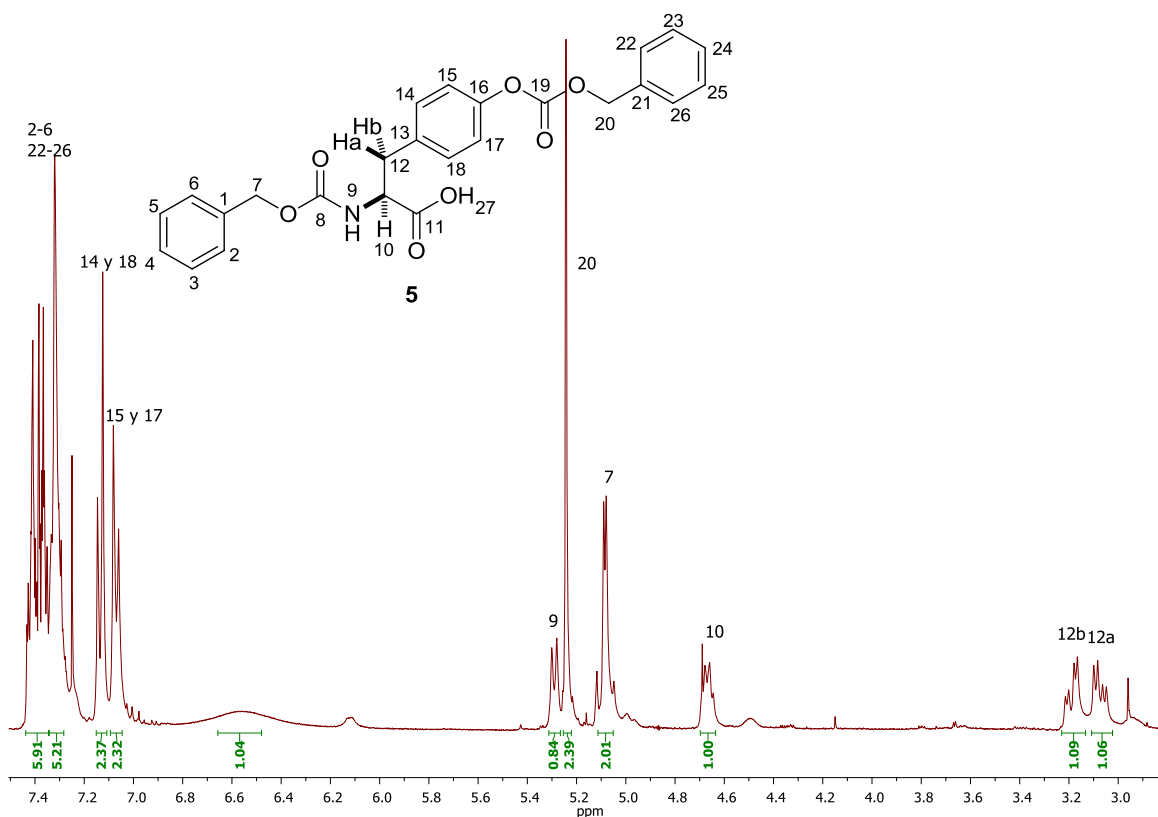


Figura 5.3. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **5** (CDCl₃, 400MHz).

En su espectro de RMN de ¹³C (Figura 5.4) se observan 3 señales de carbonilo a 175.3, 155.8 y 153.6 ppm para C-11, C-8 y C-19 respectivamente. Adicionalmente en 150.2, 136.0, 134.7, 133.5 ppm las 4 señales de C-*ipso* de los carbonos 16, 1, 21 y 13, en 130.4 ppm aparece una señal para 2 metinos aromáticos C-14 y C-18, así como en 121.1 ppm correspondientes para C-15 y C-17. Entre

128.8 y 127.0 ppm se encuentran 10 señales de carbonos aromáticos de los fenilos (C-2 a C-6 y C-22 a C-26). Finalmente entre 71.0 y 35.0 ppm se observan los carbonos alifáticos, hacia 70.4 ppm se encuentra C-20, a 67.2 ppm C-7, en 54.5 se observa el metino C-10 y a 37.0 el metileno C-12.

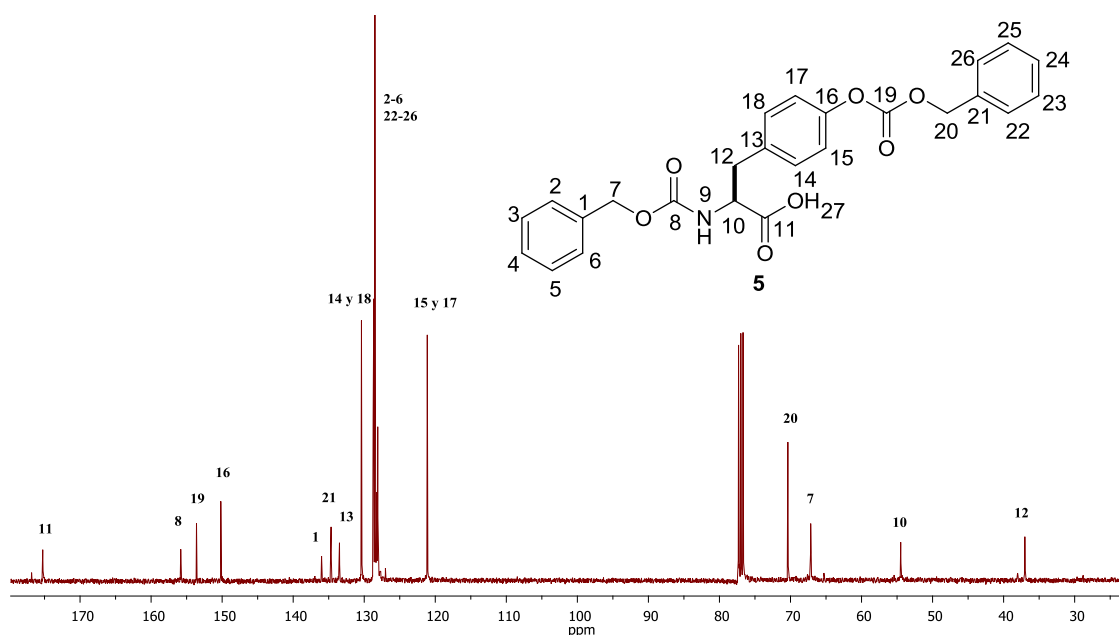


Figura 5.4. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **5** (CDCl_3 , 100 MHz).

El espectro de RMN de ^1H del compuesto **6** (Figura 5.5) muestra en la región de los aromáticos una señal múltiple en 7.34 ppm, que integra para 5 protones lo cual indica la presencia de un solo grupo Cbz, en 7.00 y 6.70 ppm dos señales dobles ($J = 8.5$ Hz) características para el benceno *p*-sustituido y solo una señal simple hacia 5.20 ppm del metileno de bencilo H-7. Por último el sistema ABX típico de la Tir en 4.65 ppm y 3.09 ppm.

En su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.6) se simplifica mucho notando que en la región de los carbonos alifáticos solo hay 3 señales y en la región de los aromáticos estas se reducen a la mitad. No se distinguen bien los carbonilos.

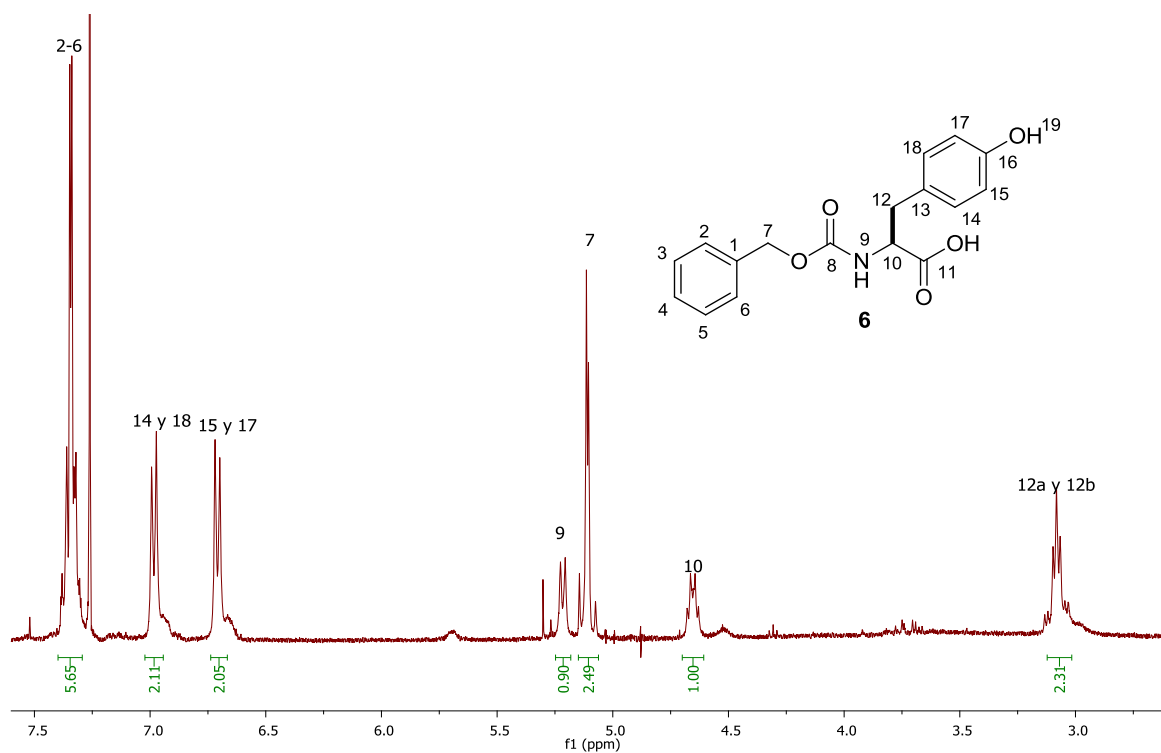


Figura 5.5. Espectro de RMN de ^1H de Cbz-*N*-L-Tir-OH (**6**), (CDCl_3 , 400 MHz).

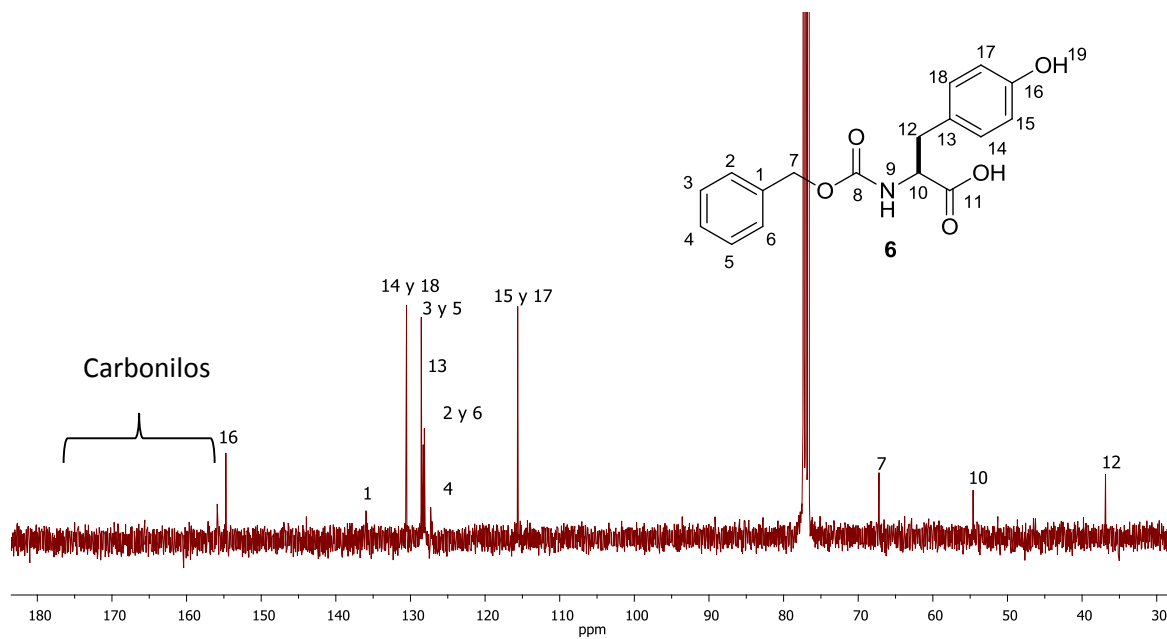
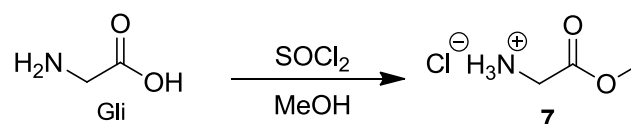


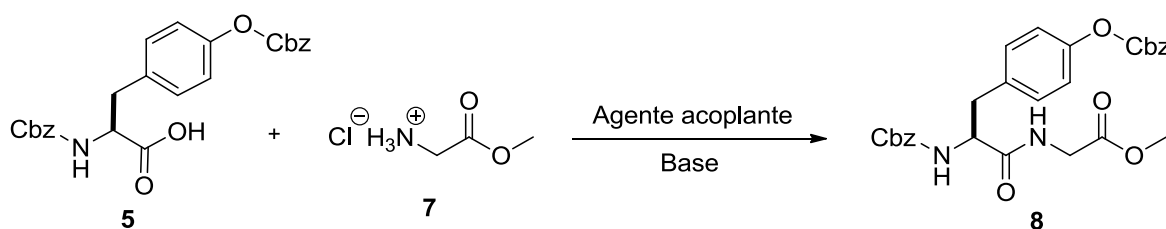
Figura 5.5. Espectro de RMN de ^{13}C de Cbz-*N*-L-Tir-OH (**6**), (CDCl_3 , 100 MHz).

Por otra parte, se realizó la protección del grupo carboxilo de la Gli por medio de reacción de esterificación con MeOH, empleando cloruro de tionilo (SOCl_2) como catalizador, en agitación por 18 h (Esquema 5.2). Esta reacción es sencilla, limpia y se obtienen rendimientos altos ya que el MeOH actúa como reactivo y a la vez como disolvente. Se obtuvo el éster metílico **7** como un sólido blanco de aspecto algodonoso con R_f 0.35 (DCM/MeOH, 9:1), en un rendimiento cuantitativo.



Esquema 5.2. O-protección de la glicina.

Una vez obtenidos los aminoácidos protegidos **5** y **7**, se sometieron a reacción para la formación del enlace peptídico. La reacción ocurre a través del ataque nucleofílico del grupo amino del éster de la Gli al carbonilo del ácido carboxílico de la Tir previamente activado, para así llevar a cabo el acoplamiento entre los dos residuos. Esquema 5.3.



Esquema 5.3. Acoplamiento entre el aminoéster **7** y el ácido **5**.

Para llevar a cabo la reacción y con la finalidad de obtener los mejores rendimientos de reacción, ya que al ser esta una de las primeras etapas en el proceso de síntesis de los derivados peptídicos es importante que proceda con

buenos rendimientos, se realizaron diferentes ensayos variando condiciones de reacción como el disolvente, base, orden de adición de reactivos, entre otros. Ver Tabla 5.2

Tabla 5.2. Condiciones de reacción para el acoplamiento entre **5** y **7**.

Ensayo	Reactivo activante	Base	Disolvente	Rendimiento (%)
1	<i>i</i> BCF	TEA	THF	19
2	<i>i</i> BCF	TEA	THF	31 ¹
3	<i>i</i> BCF	NMM	THF	34 ²
4	<i>i</i> BCF	NMM	THF	69 ^{1,2}
5	<i>i</i> BCF	NMM	THF-DMSO (3:2)	88
6	<i>i</i> BCF	DIEA	THF-DMSO (3:2)	81 ²

¹ Adición inversa [39], ² Atmósfera inerte

Como se observa en la tabla anterior, los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó cloroformiato de isobutilo (*i*BCF), *N*-metilmorfolina (NMM) y una mezcla de THF-DMSO (3:2). El dipéptido protegido **8** se obtuvo con un rendimiento del 88% (ensayo 5). La obtención de este compuesto se confirmó mediante el análisis de RMN de ¹H y ¹³C (Figuras 5.7 y 5.8).

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 5.7) se observa una señal múltiple, alrededor de 7.41 ppm, que integra para 10 protones correspondientes a los protones aromáticos de los Cbz; en 7.19 y 7.09 ppm se observan las dos señales dobles ($J = 8.4$ Hz) características de la sustitución *para* del benceno de la tirosina, en 6.46 ppm se observa una señal simple ancha correspondiente a H-27, en 5.38 ppm se observa una señal doble ancha ($J = 7.72$ Hz) correspondiente a H-9, en 5.26

y 5.07 ppm se aprecian dos señales simples atribuidas a los metilenos H-20 y H-7, hacia 4.47 ppm se encuentra una señal doble de dobles ($J = 13.2, 6.2$ Hz) asignada para el metino H-10, en 3.90 ppm se encuentran dos señales dobles de dobles ($J = 18.1, 5.4$ y 18.2 y 5.2 Hz) correspondientes a los protones al metileno 28, en 3.72 ppm se localiza la señal simple característica del O-Me H-30, por último en 3.09 ppm se observa una señal doble ($J = 6.6$ Hz) correspondiente a H-12.

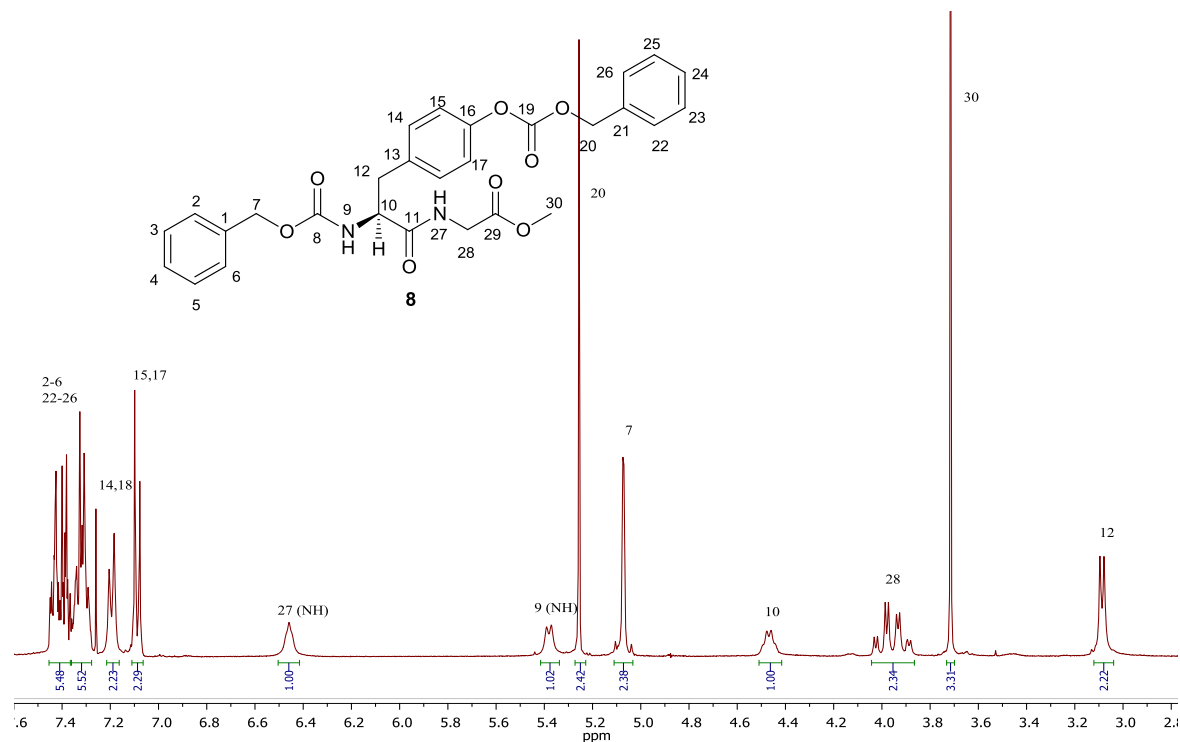


Figura 5.7. Espectro de RMN de ^1H de Cbz-*N*-L-Tir(O-Cbz)-Gli-OMe (**8**), (CDCl_3 , 400 MHz).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.8) se observan a campo bajo 4 señales de carbonilo, en 170.9, 169.7, 155.9, 153.5 ppm para C-11, C-29, C-8 y C-19, respectivamente, posteriormente se encuentran 4 señales correspondientes a carbonos *ipso* en 150.1, 135.9, 134.6, 134.1 ppm (C-16, C-21, C-1 y C-13, respectivamente), en la región de los aromáticos se observan en 130.3 ppm una señal para C-14 y C-18, entre 128.8-128.1 ppm se encuentran 10 señales correspondientes a los fenilos de Cbz (C-2 a C-6 y C-22 a C-26), en 121.2 ppm se tienen las señales traslapadas de C-15 y C-17. Hacia la región de los alifáticos, en

70.3 y 67.2 ppm se distingue la señal de los metilenos base de oxígeno C-20 y C-7 respectivamente, en 55.9 ppm se observa la señal del metino C-10; en 52.4 ppm se tiene la señal del metilo C-30 y por último, hacia 41.1 y 37.6 ppm las correspondientes a los metilenos C-28 y C-12, respectivamente.

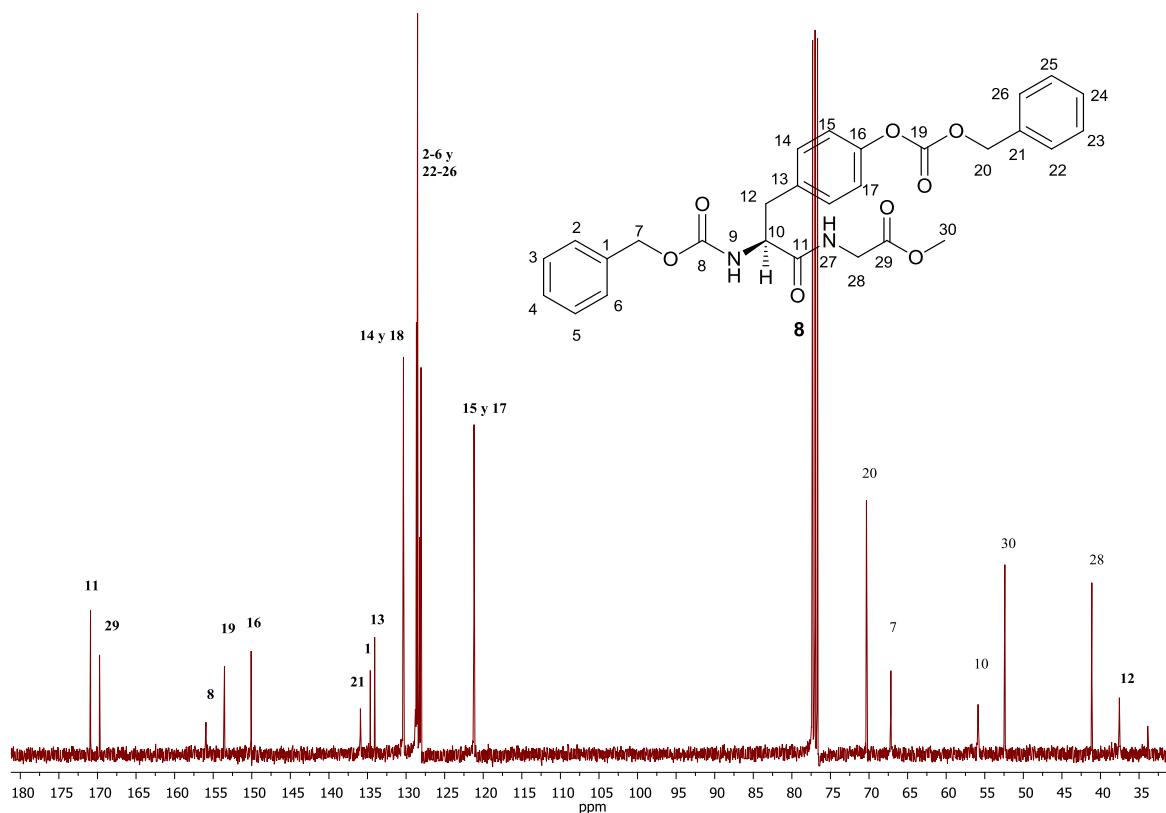
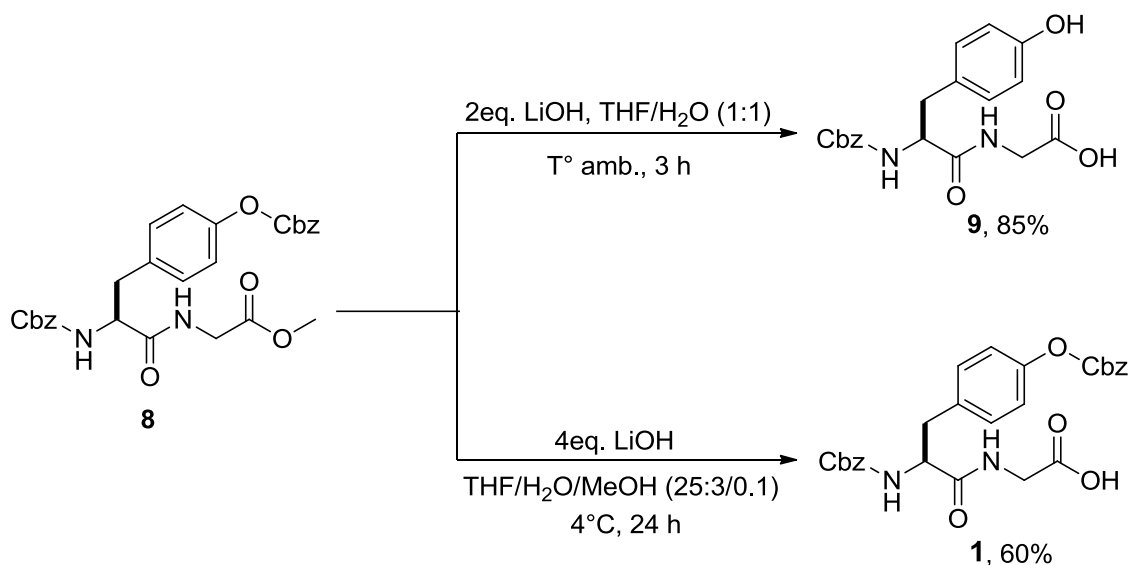


Figura 5.8. Espectro de RMN de ^{13}C de Cbz-*N*-L-Tir(O-Cbz)-Gli-OMe (**8**), (CDCl_3 , 100 MHz).

Una vez obtenido el dipéptido, el siguiente paso fue desproteger el grupo carboxilo del dipéptido, esto se logró por medio de la hidrólisis básica del éster metílico **8** con hidróxido de litio (LiOH), como se muestra en el esquema 5.4. La adición de 2 equivalentes de base en un medio de reacción formado por THF y agua a $T^\circ \text{ amb}$, dio lugar a la hidrólisis de dos grupos protectores en la molécula, del ácido carboxílico y del fenol (Figura 5.9b).



Esquema 5.4. Hidrólisis del dipéptido **8**.

Por otro lado, la adición de 4 equivalentes de base y una mezcla de disolventes compuesta por THF/H₂O/MeOH a 4 °C condujeron exclusivamente a la hidrólisis del éster, dando **1** en un rendimiento moderado.

En el espectro 5.9 a), adicional a las señales típicas de un sistema aromático *p*-sustituido de la Tir, se observan dos señales múltiples a campo bajo que integran para 10 hidrógenos correspondientes a los H's aromáticos de los grupos Cbz. En 5.25 y 5.00 ppm se muestran una señal simple y dos señales dobles ($J = 12.5$ Hz) que corresponden a los metilenos 20 y 7 respectivamente, lo que indica la presencia de los dos grupos protectores tanto en el amino como en el fragmento hidroxilo. Además la señal del grupo OMe desaparece. La obtención de este compuesto se confirmó mediante el análisis de RMN de ¹H (Figura 5.9a).

En el espectro 5.9 b) se muestra la simplificación de las señales a campo bajo, en la región de los hidrógenos aromáticos cuyas señales integran para 9 hidrógenos y no para 14 como era de esperarse si se tuviese el compuesto diprotectado con Cbz. Adicionalmente, en 5.15 ppm se observan 2 señales dobles ($J = 12.6$ Hz) correspondiente a los hidrógenos de H-7.

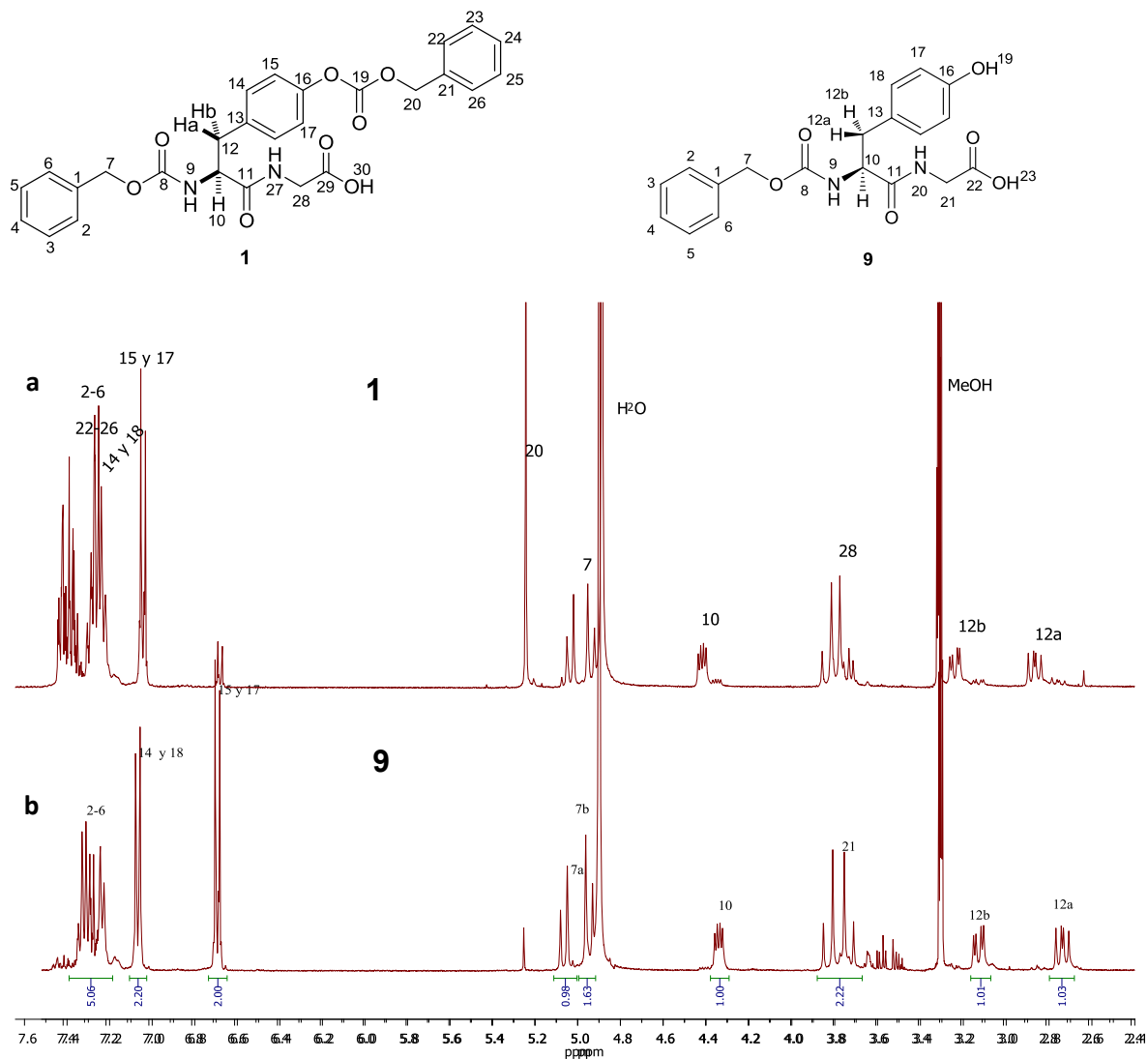
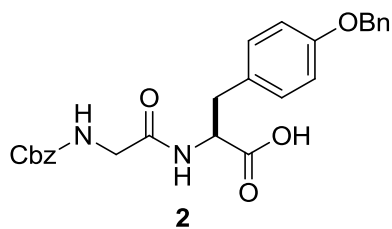
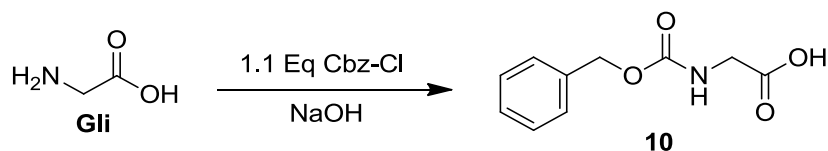


Figura 5.9. Espectro de RMN de ^1H de a) **1** y b) **9** (CD_3OD , 400 MHz).

5.2. Obtención del ácido Cbz-*N*-Gli-*L*-Tir(O-Bn)-OH (**2**).



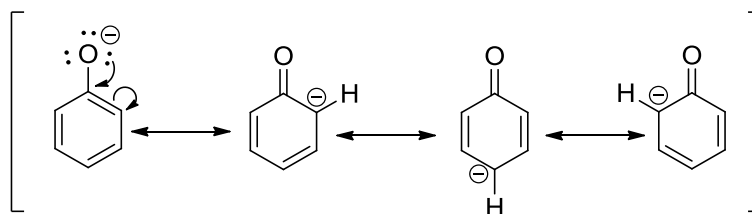
Siguiendo la estrategia planteada se procedió a obtener el ácido Cbz-*N*-Gli-*L*-Tir(O-Bn)-OH **2**, por lo que se inició con la *N*-protección de la Gli. Esto se logró haciendo reaccionar la Gli con Cbz-Cl en una solución acuosa de NaOH a una temperatura de 0 a 25 °C y 48 h en agitación, como se muestra en el esquema 5.5. El producto esperado **10** (carbamato), se obtuvo después de la purificación por recristalización (hexano/AcOEt) como un sólido en forma de escamas de punto de fusión de 106-108 °C, en un rendimiento del 89%.



Esquema 5.5. *N*-protección de la Glicina (Con Cbz-Cl)

Dado que se contaba con el éster metílico de la tirosina, el siguiente paso en la reacción era la reacción de condensación intermolecular entre **10** y **11**.

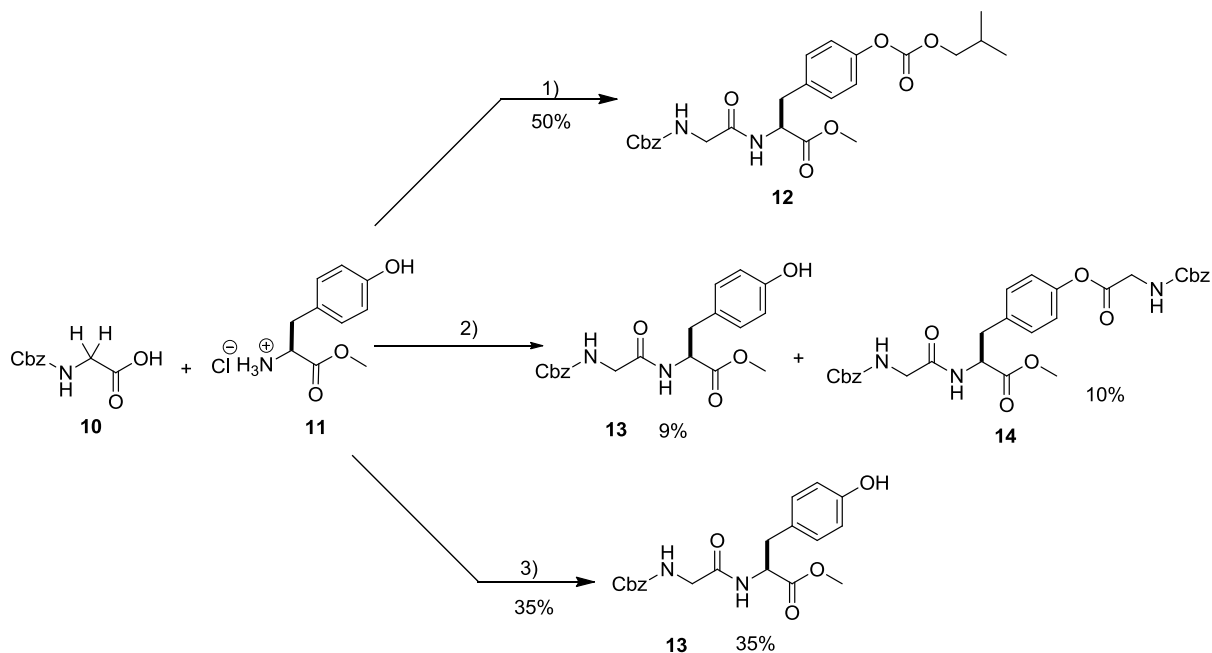
Analizando la estructura de la tirosina, esta cuenta con un grupo fenol, el cual al ionizarse, permite su estabilización por resonancia (Esquema 5.6), esto hace que el carácter nucleofílico del alcohol aromático esté disminuido, haciendo de él un grupo poco reactivo ante especies electrofílicas.



Esquema 5.6. Estabilización del ión fenóxido por resonancia.

Tomando en consideración lo anterior, se propusieron inicialmente tres diferentes estrategias de acoplamiento como se describe en el esquema 5.7.

- 1) La condensación intermolecular vía la formación de anhídridos mixtos, con la adición de trietilamina (Et_3N) seguida de la adición de *t*BCF en THF como disolvente dio lugar a la formación del péptido **12**, debido a la reacción del *t*BCF con el -OH fenólico.
- 2) Por otro lado, el uso de HBTU (Hexafluorofosfato de *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-Tetrametil-Uronio) como agente activante y 2 equivalentes de base (Et_3N) condujo a la formación de los compuestos **13** y **14** en 9 y 10% de rendimiento, respectivamente. Esta reacción generó el producto esperado **14**, sin embargo, el rendimiento con el que se obtuvo fue muy bajo por lo que se optó por realizar una tercera modificación.
- 3) Por último, la reducción en los equivalentes de base condujo a la formación exclusiva del producto **13**.

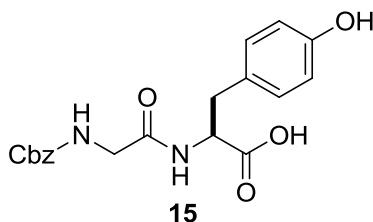


1) *t*BCF, 2 eq. de Et_3N en THF; 2) HBTU, 2 eq. Et_3N en DCM/DMF; 3) HBTU, 1 eq. Et_3N en DCM/DMF

Esquema 5.7. Condensación intermolecular entre **10** y **11**.

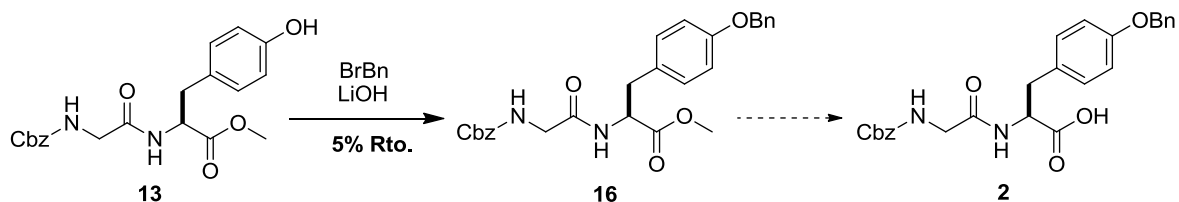
Los compuestos **12**, **13** y **14** fueron identificados por espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C (Ver Anexos).

Dado el bajo rendimiento en la síntesis del derivado **13**, aunado a que el siguiente paso en la ruta sintética involucraba una activación y posterior esterificación del péptido **15** con un alcohol pirrolizidinico hubo la necesidad de replantear la estrategia de síntesis.



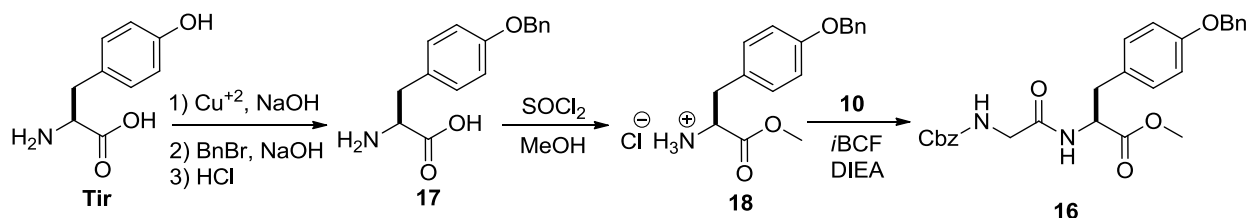
Examinando con detalle la reactividad del sustituyente fenol de la Tir la acidez de este alcohol es mayor ($\text{pK}_a = 10$) comparada con la acidez de los alcoholes alifáticos ($\text{pK}_a = 16-18$) por lo que en medio básico puede formar el ión fenóxido, siendo este ión una especie nucleofílica puede reaccionar con el carbonilo activado del ácido **10**, con el reactivo activante que es un cloroformiato o bien con otra molécula del mismo compuesto **15**.

En base a lo anterior se propuso proteger el hidroxilo del fenol, mediante las dos estrategias mostradas en los esquemas 5.8 y 5.7. La primera de ellas por medio de una reacción de eterificación con bromuro de bencilo (BrBn) partiendo del éster **13** y posterior hidrólisis del éster metílico. Sin embargo la reacción procedió con un 5% de rendimiento lo que hizo imposible seguir con la hidrólisis del éster metílico. Esquema 5.8.



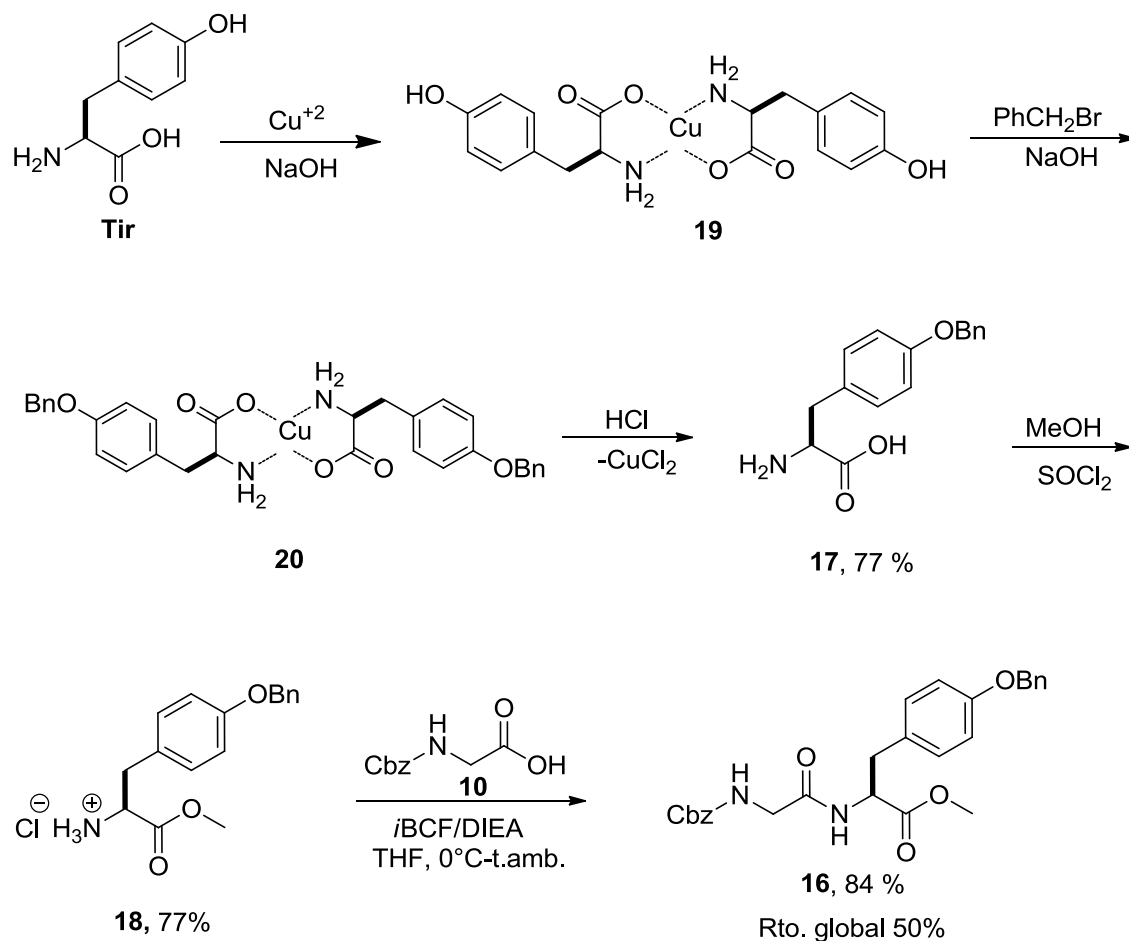
Esquema 5.8. O-bencilación del compuesto **13**.

En la segunda propuesta se planteó partir de la *O*-bencilación de la Tir [40] seguida de la esterificación del ácido carboxílico y finalmente el acoplamiento con la Cbz-*N*-Gli. Esquema 5.9.



Esquema 5.9. Propuesta de síntesis del dipéptido triprotegido **16**.

Para ello se hizo reaccionar la tirosina con sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en medio básico [40] obteniendo el complejo tetracoordinado de Cu **19** y su posterior reacción de eterificación con BrBn , obteniendo de esta manera el complejo **20** (Esquema 5.10). La *O*-bencil-Tir (**17**) se obtuvo por tratamiento del complejo *O*-bencilico con HCl como un polvo blanco insoluble en agua, en un rendimiento del 77% y con p.f.= 184-188 °C.



Esquema 5.10. Esquema general de síntesis de **16**.

El siguiente paso en el esquema general de síntesis fue la esterificación de la O-bencil-tirosina (**17**) con alcohol metílico anhidro y 2.2 equivalentes de SOCl_2 , la reacción se llevó a cabo en un periodo de 48 h. El éster metílico **18** se obtuvo como un sólido blanco de p.f. = $158\text{-}161^\circ\text{C}$, después de su purificación por medio de lavados con DCM, en un rendimiento del 77%.

Posteriormente, se llevó a cabo el acoplamiento entre la amina **18** y el ácido Cbz-N-Gli (**10**), mediante la adición a -10°C de $i\text{BCF}$ y diisopropiletilamina (DIEA) a una solución del ácido disuelto en THF. A continuación, se adicionó lentamente la amina disuelta en una mezcla de THF/DMSO (3:2) y se dejó reaccionar a T° ambiente por 24 h, obteniendo de esta forma el dipéptido triprotegido **16** en un

rendimiento del 84%, después de su purificación por cromatografía en columna en una mezcla de hexano/AcOEt (6:4 y 1:1). Como se puede observar esta propuesta resultó ser la mejor a pesar de involucrar un proceso de 5 pasos, mostrando un rendimiento global del 50%.

En su espectro de RMN de ^1H que se muestra en la figura 5.10 se puede apreciar alrededor de 7.37 ppm una señal múltiple que integra para 10 hidrógenos correspondientes a los protones aromáticos de los grupos Cbz y Bn (H-1 a H-6 y de H-22 a H-27), en 7.00 y 6.88 ppm se puede observar las 2 señales dobles ($J = 8.4$ Hz) características de la *para*-sustitución del benceno de la tirosina asignadas a H-16, H-20 y H-17, H-19, respectivamente; en 6.46 ppm aparece una señal doble ($J = 7.4$ Hz) asignada al H-9, en 5.41 ppm se observa una señal ancha correspondiente al protón de amida H-12; en 5.13 y 5.01 ppm se observan dos señales simples atribuidas a H-7 y H-21, en 4.85 ppm se aprecia una señal doble de dobles ($J = 13.4, 5.6$ Hz) que integra para un protón del metino H-13. En 3.87 ppm se observan dos señales doble de dobles, una para H-10a ($J = 17.6, 6.7$ Hz) y otra para H-10b ($J = 17.6$ y 5.8 Hz); en 3.71 ppm se observa una señal simple asignada a H-29 y por último, en 3.05 ppm se aprecia una señal ancha atribuida al metileno H-14.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.11), se observa a campo bajo las señales de carbonilos a 171.7 ppm C-11, 168.4 ppm C-28 y 157.9 ppm C-8; en los desplazamientos químicos 156.4, 136.8, 136.0 ppm se encuentran los carbonos *ipso* C-18, C-22 y C-1 respectivamente, en 130.2 ppm se observan los 2 metinos aromáticos C-16 y C-20, en los desplazamientos 128.5, 128.2, 128.1, 128.0 y 127.7 ppm se tienen 10 señales de carbonos aromáticos, C-2 a C-6 y C-23 a C-27, en 127.5 se encuentra C-15, en 114.9 ppm se traslapan las señales de C-17 y C-19, hacia 69.9 y 67.2 ppm se observan los metilenos de bencilo C-21 y C-7, en 53.1 ppm se encuentra el metino C-13 y en 52.38 el metilo C-29, en 44.4 y 36.9 ppm se presentan las señales de los metilenos C-10 y C-14, respectivamente.

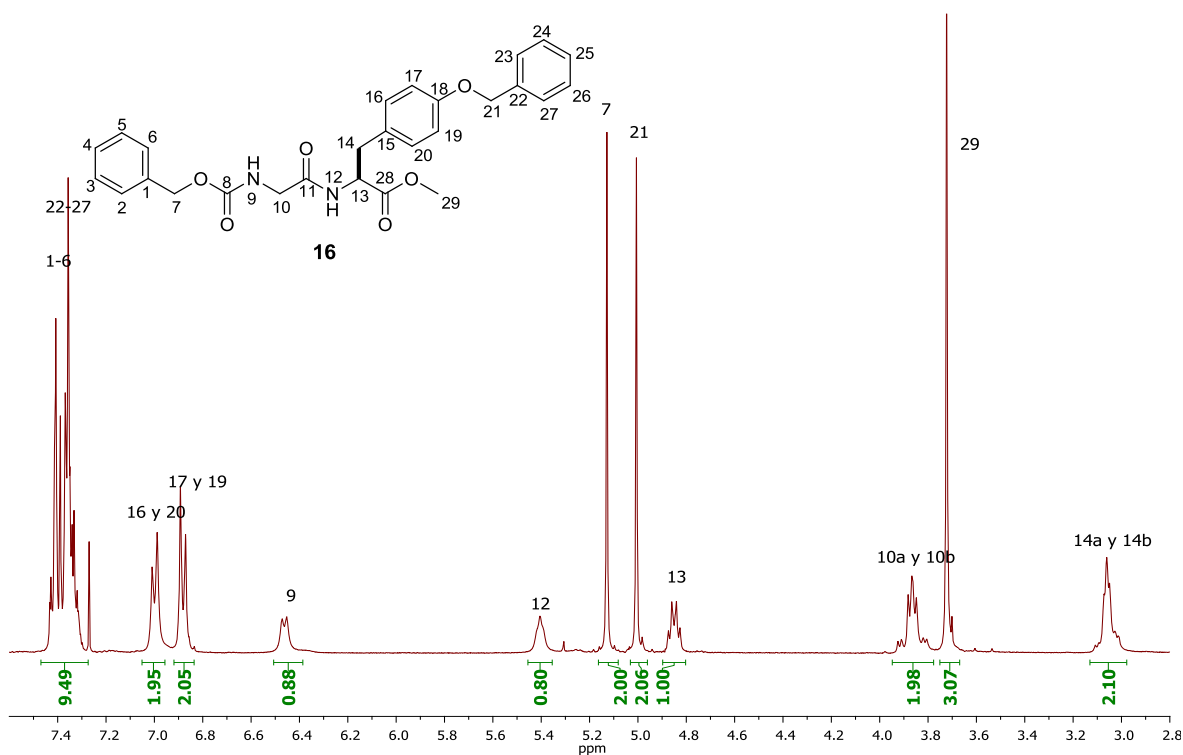


Figura 5.10. Espectro de RMN de ¹H de Cbz-N-Gli-Tir(OBn)-OMe (**16**), (CDCl₃, 400 MHz).

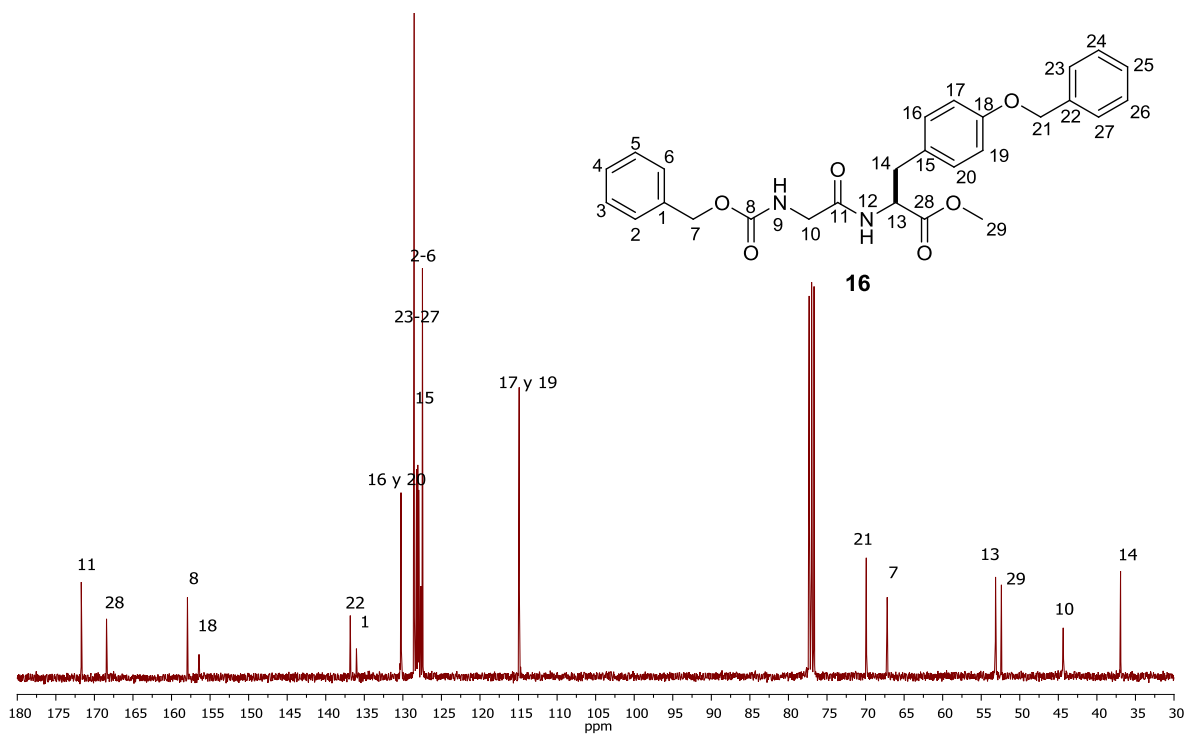
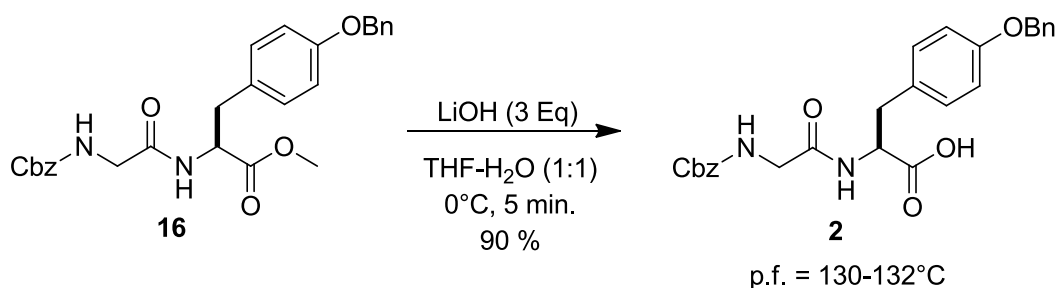


Figura 5.11. Espectro de RMN de ¹³C de **16**, (CDCl₃, 100 MHz).

Finalmente, se realizó la hidrólisis suave del éster metílico **16** mediante la adición de 3 equivalentes de LiOH a 0 °C, en una mezcla compuesta de THF-H₂O (1:1), a 0 °C por un periodo de 5 minutos (Esquema 5.11). El sólido obtenido se purificó por medio de recristalización con una mezcla THF/DCM obteniéndose el producto puro como cristales translúcidos en forma de prismas con p.f. 130-132 °C y un rendimiento del 90%.



Esquema 5.11. Hidrólisis básica del dipéptido **16**.

En el espectro de RMN de ¹H mostrado en la Figura 5.12, se observa la desaparición de la señal correspondiente a los hidrógenos del -OMe de éster. El resto de las señales fueron asignadas confirmando la estructura del ácido **2**.

En el espectro de R de ¹³C (Figura 5.13) tampoco se observa la señal correspondiente al éster metílico, y la señal del carbonilo terminal (C-28) se desplaza a campo bajo encontrándose ahora a 175.3 ppm, lo que coincide con el desplazamiento típico de carbonilo de ácido, el resto de las señales de carbono del ácido **2** permanecen sin cambio.

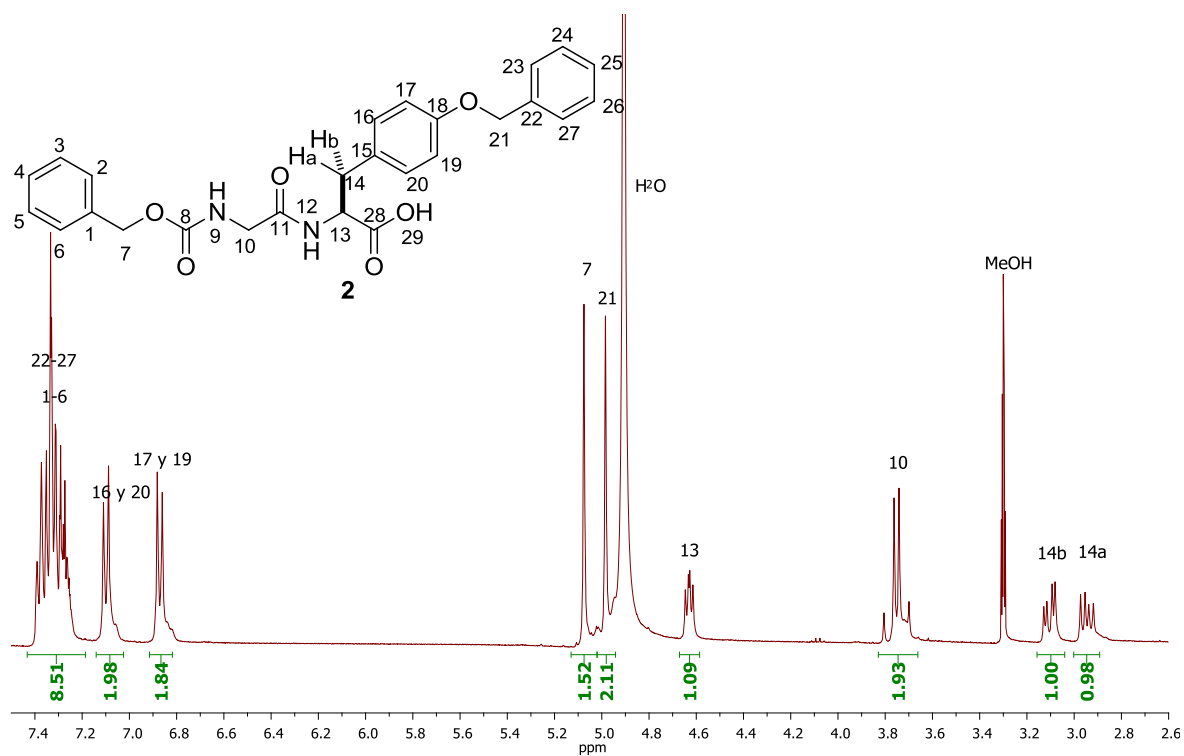


Figura 5.12. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **2** (CD_3OD , 400 MHz).

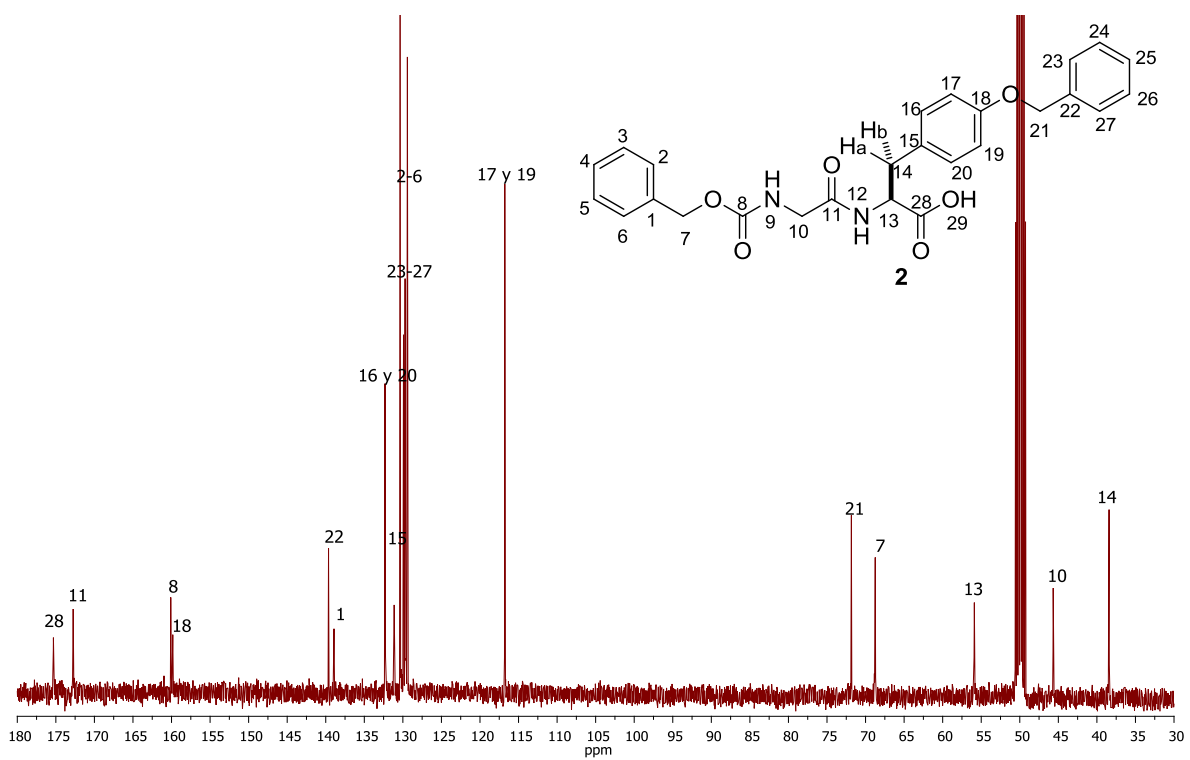
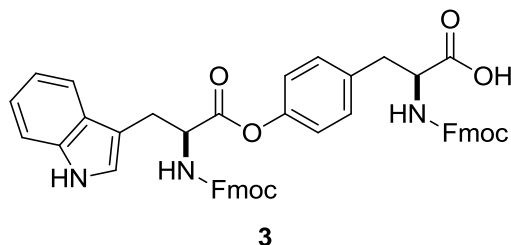
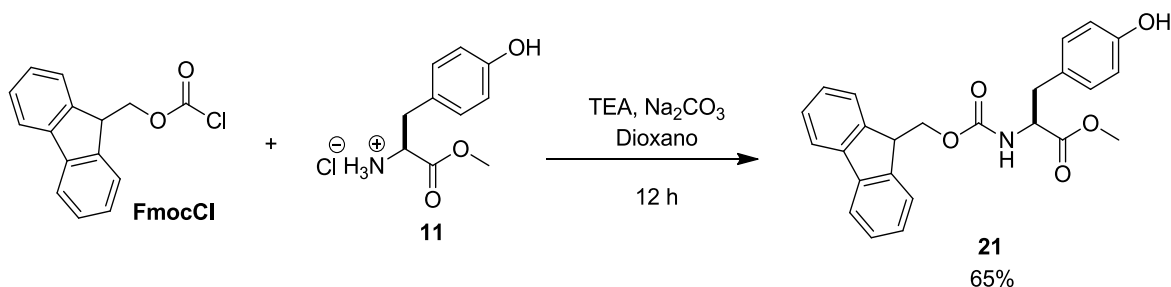


Figura 5.13. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **2** (CD_3OD , 100 MHz).

5.3. Obtención del ácido Fmoc-*N-L*-Trp-*L*-Tir(*N*-Fmoc)-OH (**3**).

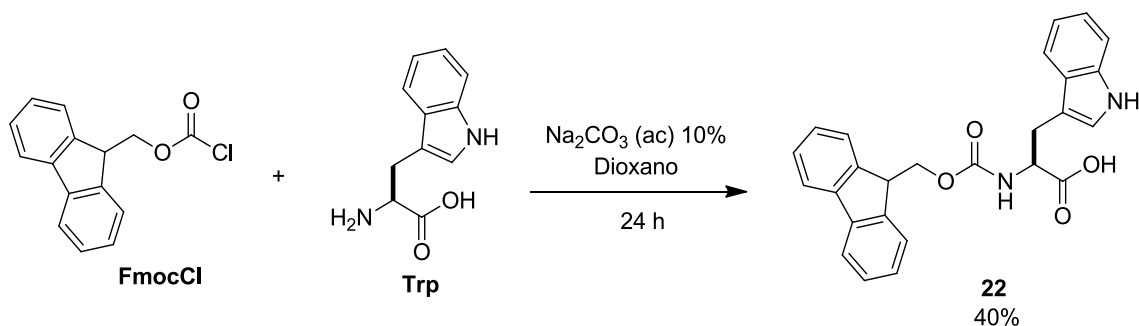


Finalmente, para obtener el derivado peptídico **3**, se partió de la *N*-protección del clorhidrato de *L*-Tirosina-*O*-Me (**11**) con cloroformiato de 9-fluoroenilmetilo (FmocCl) para lo cual disolvió el éster metílico **11** en una mezcla formada por una solución acuosa de Na₂CO₃ al 10% y dioxano, y se hizo reaccionar con FmocCl por un periodo de 12 h. Después de la purificación del crudo por medio de cromatografía en columna usando gel de sílice como fase estacionaria y un sistema hexano/AcOEt (4:1 a 7:3) como fase móvil, se obtuvo el aminoácido protegido **21** en forma de cristales de color amarillo, con un rendimiento del 65% y un punto de fusión 108-112 °C. La formación del compuesto se comprobó mediante espectroscopía de RMN de ¹H y ¹³C (ver anexo).



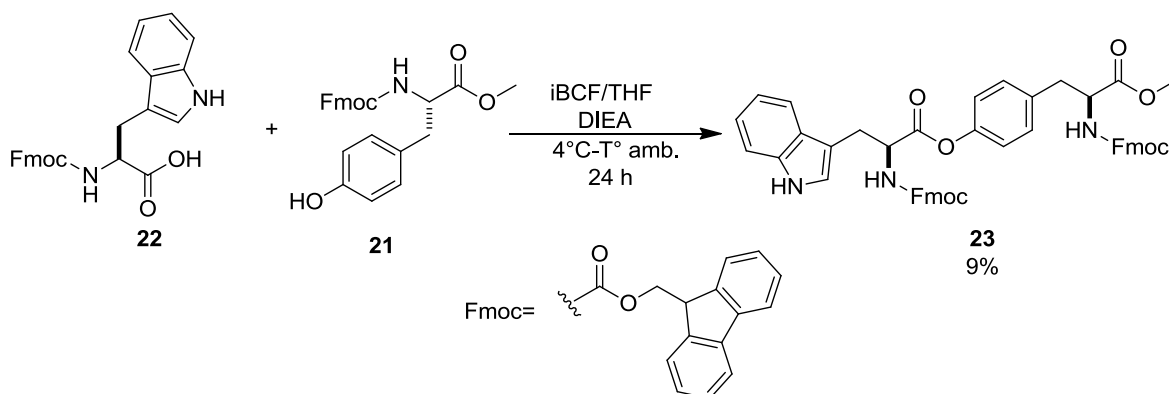
Esquema 5.12. *N*-protección de éster metílico de Tir **11** con Fmoc.

Siguiendo la metodología anterior, se procedió a la *N*-protección de *L*-Triptófano (Trp) con FmocCl (Esquema 5.13). El crudo de reacción fue purificado por medio de cromatografía en columna empleando un sistema DCM/MeOH/AcOH (19:1:0.1) y posterior recristalización con hexano, con lo que se obtuvo un polvo color beige, con punto de fusión de 100-104 °C y un 40% de rendimiento del compuesto identificado como Fmoc-*N-L*-Trp (**22**).



Esquema 5.13. N-protección de L-Trp con FmocCl.

Posteriormente, se procedió a la obtención de Fmoc-N-Tir(O-L-Trp-N-Fmoc)-OMe (**23**). Como se observa en el esquema 5.14, la unión de los dos aminoácidos no es mediante un enlace peptídico convencional, en este caso es por medio de la formación de un éster aromático. Para ello se partió del ácido Fmoc-N-Trp (**22**), que mediante una reacción de esterificación usando DIEA como base y *i*BCF en THF condujo al anhídrido mixto, activando así el grupo carbonilo. Posteriormente se adicionó lentamente el alcohol aromático **21** disuelto en THF, conduciendo de esta manera al éster Fmoc-N-Tir(O-L-Trp-N-Fmoc)-OMe (**23**), en un rendimiento del 9%.



Esquema 5.14. Formación del éster Fmoc-N-Tir(O-L-Trp-N-Fmoc)-OMe (**23**).

El espectro de RMN de ^1H que se observa en la figura 5.14, muestra elevada complejidad y las señales anchas en su mayoría. En 8.10 ppm se localiza el protón H-6 característico del indol, en la región entre 7.90 y 7.10 ppm se encuentran las

señales características de los protones aromáticos correspondientes a los 2 grupos Fmoc y el indol del triptófano, además se observan en 7.03 y 6.85 ppm las dos señales dobles ($J = 8.0$ Hz) características de la *p*-sustitución del benceno de la tirosina, hacia 5.45 y 5.28 ppm se encuentran las señales de los 2 aminos H-12 y H-39, en 4.97 y 4.65 ppm se localizan los metinos H-11 y H-36, respectivamente; en la región de los alifáticos se observan entre 4.50 y 3.00 ppm los protones H-14, 41, 42 y 15, y por último los metilenos H-10 y H-35 en 3.45 y 3.1 ppm, respectivamente.

El bajo rendimiento de este producto, impidió que se llevara a cabo la reacción de hidrólisis.

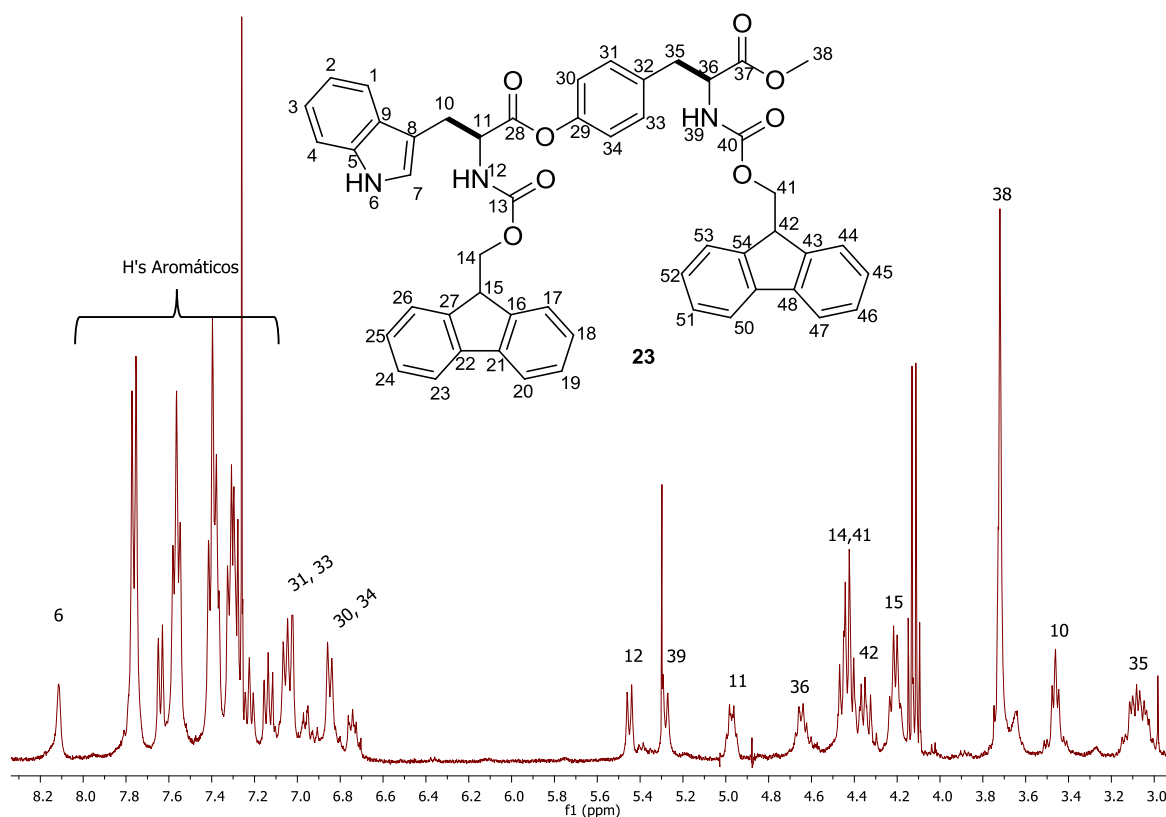
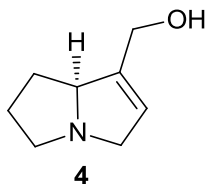


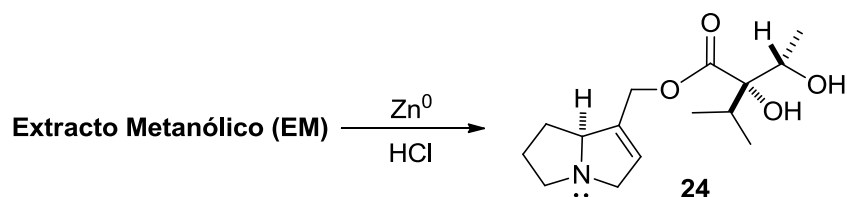
Figura 5.14. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **23** (CDCl_3 , 400 MHz).

Una vez obtenidos los productos **1** y **2**, se llevó a cabo la obtención de la supinidina (**4**) a partir de las raíces de *C. pulchella*, para hacerla reaccionar frente a dichos compuestos.



5.4. Obtención de Supinidina (**4**).

Un lote de 500 g de raíces de *Chromolaena pulchella* fueron molidas y posteriormente puestas a reflujo con MeOH por un periodo de 6 horas, el extracto crudo se obtuvo empleando rotavapor, este proceso se repitió en 3 ocasiones. Enseguida se realizó la extracción selectiva de alcaloides pirrolozídínicos [41]; se tomó un lote de 25 g del extracto metanólico (EM), se le adicionó una solución de HCl 2% y Zn⁰ (12.5 g) como se observa en el esquema 5.15. De este procedimiento se obtuvieron 480 mg de un producto de consistencia mielosa de color marrón identificado como la coromandalinina (**24**) cuyo espectro de RMN de ¹H se muestra en la Figura 5.15.



Esquema 5.15. Extracción selectiva de alcaloides pirrolozídínicos.

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 5.15) se observan una señal simple en 5.96 ppm atribuida al protón vinílico H-2 y en 4.86 y 4.77 ppm dos señales dobles

($J = 13.3$ Hz) correspondiente al sistema AB de los protones H-9a y H-9b. En 4.17 ppm se tiene una señal simple ancha correspondiente al protón cabeza de puente H-8, en 4.12 ppm se observa una señal cuádruple que integra para un hidrógeno atribuida a H-13; en 3.94 y 3.43 ppm se observan las señales de un sistema AM formado por los protones alílicos H-3a y H-3b respectivamente. Los protones H-5a y H-5b se encuentran en los desplazamientos 3.28 y 2.74 ppm, entre 2.10 y 1.91 ppm se traslapan 3 señales, formando una señal múltiple que integra para 5 protones asignados como H-6, H-7 y H-16, en 1.21 ppm se observa una señal doble ($J = 6.4$ Hz) que integra para 3 protones correspondiente al metilo H-14 y por último entre 0.99 y 0.93 dos señales dobles ($J = 7.0$ y 6.9 Hz) correspondientes a los metilos del grupo *i*Pr (H-17 y H-18). Los datos espectroscópicos (^1H y ^{13}C) de **24** fueron comparados con la literatura [37] y coincidieron. El compuesto **0.025** fue sometido a hidrólisis básica (NaOH) obteniend con esto a la supinidina (**4**) y al respectivo ácido. Cabe resaltar, que el crudo de reacción de la hidrólisis fue llevado a reacciones de esterificación.

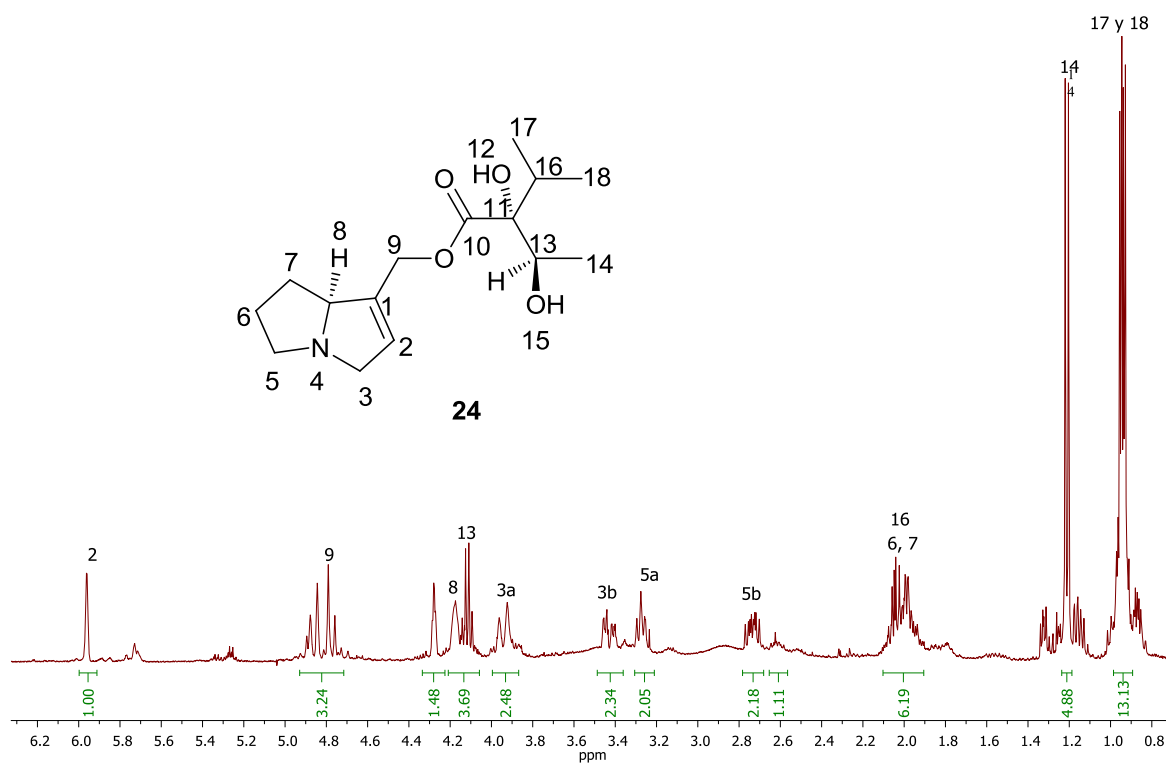
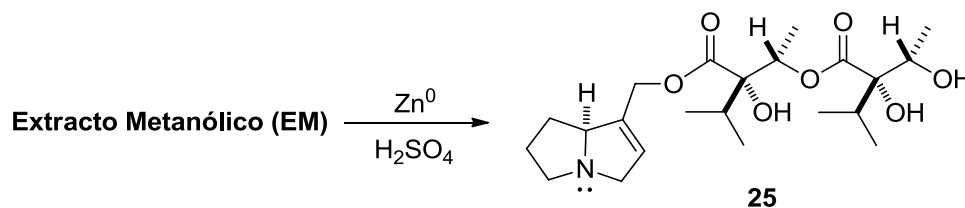


Figura 5.15. Espectro de RMN de ^1H de coromandalina (**24**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Por otro lado, un lote de 29.6 g de extracto metanólico se sometió a reducción con Zn^0 (14.8 g) por 24 h y posterior extracción selectiva de pirrolizidinas empleando H_2SO_4 1 M (Esquema 5.16), obteniéndose 0.6 g de una miel color ámbar la cual fue sometida a cromatografía en columna con gel de sílice como fase estacionaria, empleando polaridades crecientes de disolventes DCM/MeOH/ NH_4OH como fase móvil y reactivo de Dragendorff como revelador con el fin de obtener fracciones enriquecidas de pirrolizidinas. De las fracciones 27-29 se obtuvieron 15 mg de un compuesto con $R_f = 0.29$ (DCM/MeOH/ NH_4OH , 85:15:0.1) identificado por RMN de ^1H (Figura 5.16) como el diviridiflorato de Necina (**25**).

**Esquema 5.16.** Extracción selectiva de alcaloides pirrolizidínicos.

Como se puede apreciar en la Figura 5.16, en su espectro de RMN de ^1H , se observan las señales características de un alcaloide pirrolizidínicos, con el núcleo de necina 1-2 insaturado; en 5.79 ppm se observa una señal simple, correspondiente a un protón vinílico H-2, en 5.31 y 4.04 ppm se observan 2 señales cuádruples atribuidas a los metinos H-12 y H-15, respectivamente, en 5.07 ppm se encuentra la señal simple ancha del protón cabeza de puente H-8. En 4.81 y 4.72 ppm se observan dos señales dobles ($J = 13.4$ Hz) correspondientes a un sistema AB del metileno H-9a y 9b, posteriormente en los desplazamientos 4.56 y 3.70 ppm se tiene un sistema AM formado por los protones vinílicos H-3a y 3b respectivamente, viéndose como 2 señales dobles ($J = 16.0$ Hz). Hacia 3.8 ppm se encuentra el protón H-5a y en 2.9 ppm se observa una señal ddd ($J = 11.3, 8.0, 6.1$ Hz) que integra para un protón, correspondiente a H-5b. En 2.37 ppm se observa

una señal ddd ($J = 12.9, 6.5$ Hz) atribuida a H-7a, en 2.15 se encuentra una señal séptuple ($J = 6.6$ Hz) típica de un grupo *i*Pr para H-18, entre 2.10 y 1.95 ppm se encuentran traslapadas 2 señales formando una múltiple que integra para 3 protones H-6a, H-6b y H-19, en 1.85 ppm se observa la señal múltiple del protón H-7b, en 1.31 y 1.18 ppm se encuentran dos señales dobles ($J = 6.5$ Hz) para los metilos H-17 y H-16, por último hacia 1.00–0.86 ppm se encuentran traslapadas 4 señales dobles ($J = 6.97$ Hz) correspondientes a los metilos H-20, 20', 21 y 21'. Los datos espectroscópicos fueron comparados con la literatura [37] y con una muestra real.

La hidrolisis de las fracciones enriquecidas con pirrolizidinas permitió la obtención de la supinidina (**4**) (aproximadamente 120 mg de un lote de 400 mg) para llevar a cabo reacciones de esterificación.

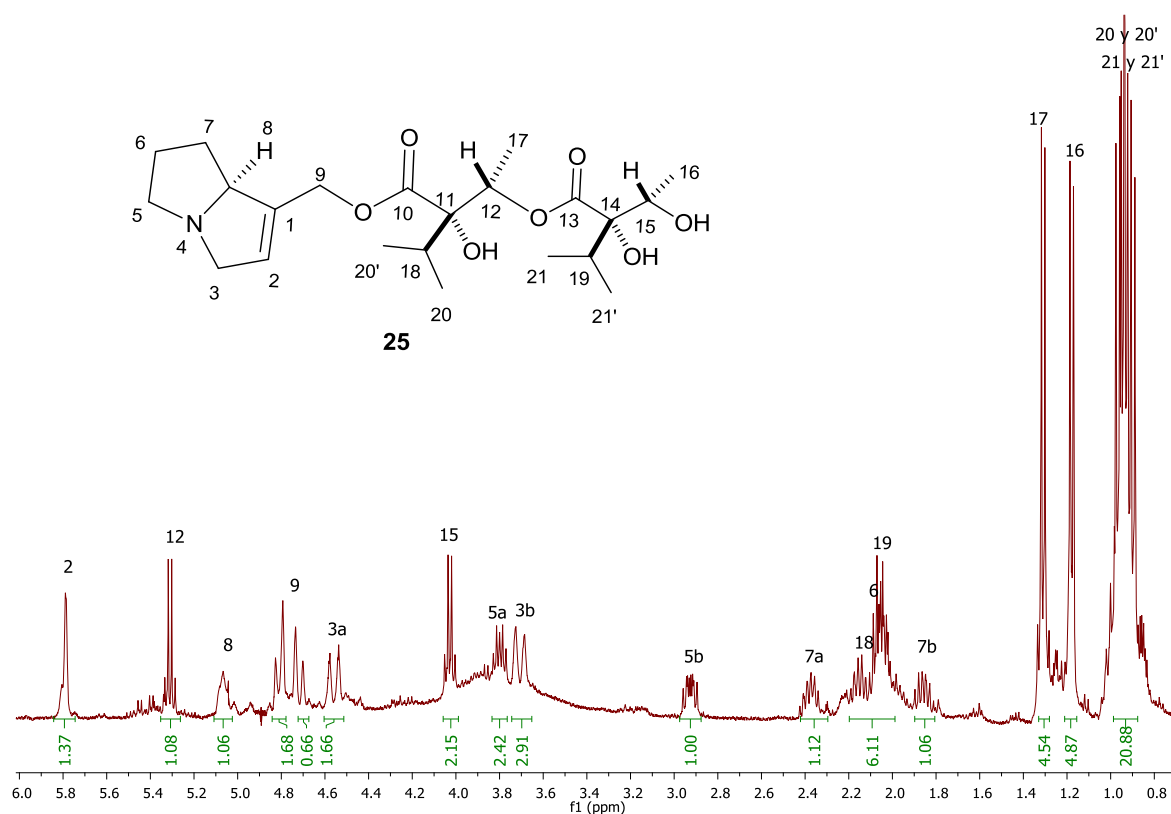
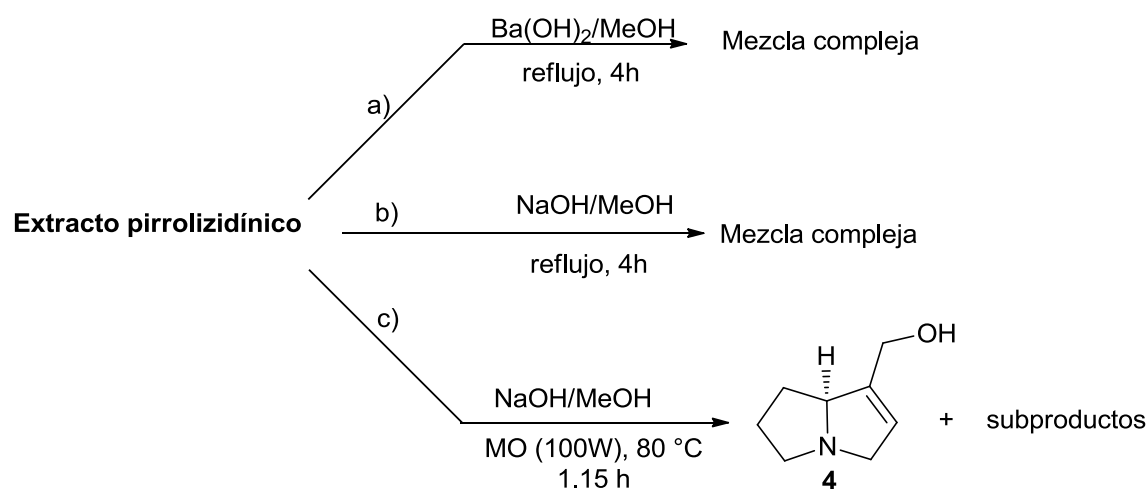


Figura 5.16. Espectro RMN ^1H de Diviridiflorato de necina (**25**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Debido a que el grado de pureza de la supinidina obtenida por hidrólisis básica a partir extracto metanólico así como a partir de un previo enriquecimiento de estos era similar se decidió llevar a cabo variaciones en el proceso de hidrólisis con el fin de incrementar el grado de pureza de **4** (Esquema 5.17)

A partir 800 mg de extracto de pirrolizidinas (EP) obtenidos por medio de la extracción selectiva de alcaloides se sometieron a reacción de hidrólisis básica.



Esquema 5.17. Hidrólisis básica de AP's.

Como se observa en el Esquema 5.17 a) y b), al utilizar Ba(OH)_2 e NaOH en condiciones de reflujo solo se obtuvo una mezcla compleja impurificable de productos de descomposición de los ésteres respectivos. En contraste, cuando se cambió la fuente de calentamiento de reflujo convencional a energía de MO a 100 watts de potencia y 80°C de temperatura [Esquema 5.17 c)] se obtuvieron 146 mg de una miel color ámbar en la cual el producto principal fue identificado como supinidina **4**. De igual manera, este compuesto fue utilizado sin purificar en el proceso de esterificación.

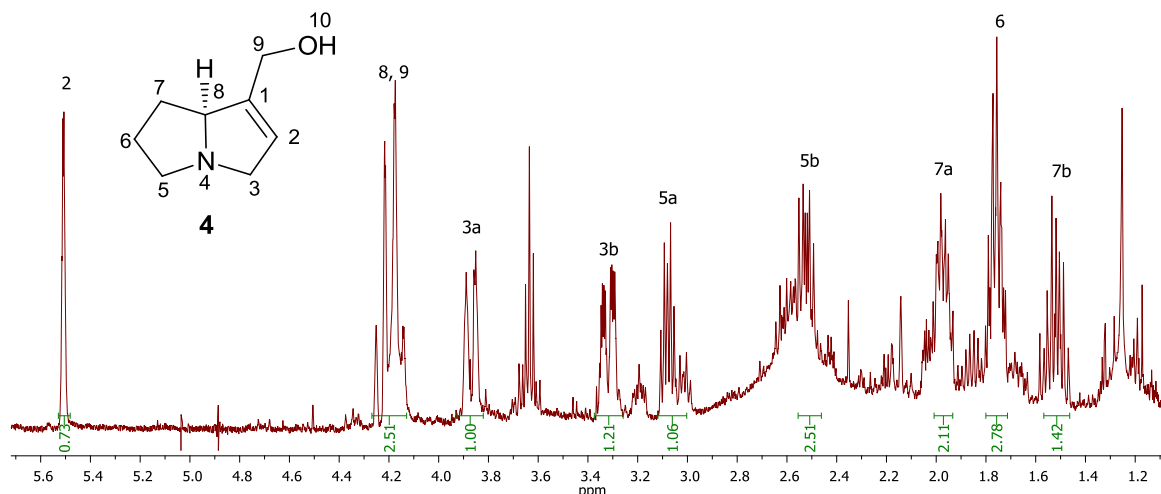
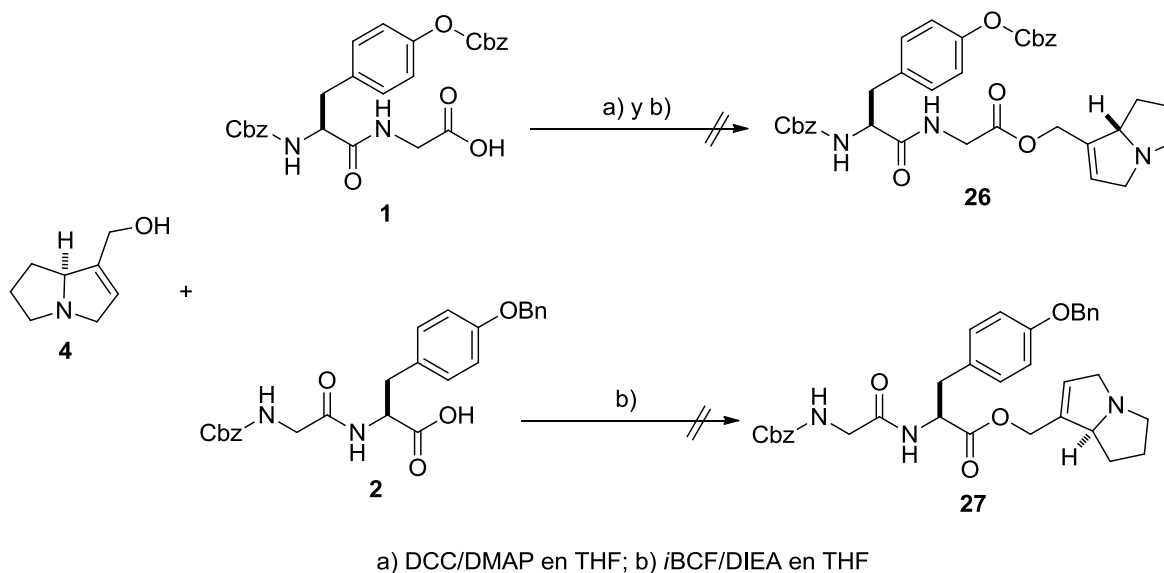


Figura 5.17. Espectro de RMN de ^1H de **4** obtenida del crudo de Rx de hidrólisis.

5.5. Estudio de reactividad de los derivados peptídicos **1** y **2** con el alcohol **4**.

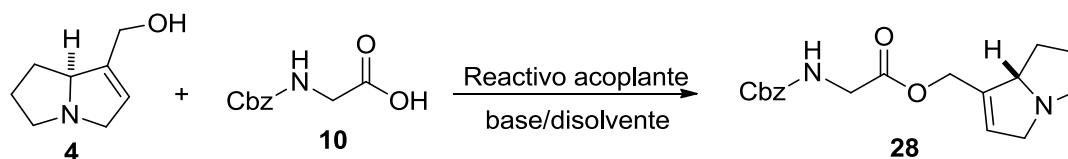
Con la finalidad de formar los ésteres pirrolizidínicos derivados de la supinidina (**4**), se hicieron reaccionar los ácidos peptídicos **1** y **2** con el producto crudo de la reacción de hidrólisis básica anteriormente descrita, como se muestra en el Esquema 5.18.



Esquema 5.17. Esterificación de **1** y **2** con el alcohol pirrolizidínico **4**.

De acuerdo con la estrategia planteada, la reacción se llevaría a cabo por medio de la esterificación del péptido **1** y el alcohol pirrolizidínico con dicitohexilcarbodiimida (DCC) como activante y dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador. En este caso la DCC activa el grupo carbonilo del ácido peptídico para posteriormente llevarse a cabo la adición del alcohol pirrolizidínico por medio de un ataque nucleofílico, sin embargo, la reacción no procedió, observándose una mezcla inseparable de subproductos de reacción. Se repitió nuevamente la reacción con los derivados **1**, **2** pero ahora utilizando *t*BCF como reactivo activante y DIEA como base. En este caso la reacción no generó los productos de esterificación esperados.

Debido a los inconvenientes que se presentaron, se decidió modificar el fragmento ácido del dipéptido empleando ahora solamente la glicina *N*-protegida **10** y una vez encontradas las condiciones idóneas de reacción volver a utilizar los compuestos **1** y **2** (Esquema 5.19 y tabla 5.3).



Esquema 5.19. Esterificación de Cbz-*N*-Gli (**10**) con el alcohol pirrolizidínico **4**.

Tabla 5.3. Condiciones de reacción en la esterificación de Cbz-*N*-Gli **10** con **4**.

Ensayo	Reactivo acoplante	Base	Disolvente	Tiempo de Rx	Producto
1	DCC	DMAP	THF	24 h	----
2	DCC	DMAP	THF/DCM	24 h	----
3	DCC	DMAP	THF	8 días*	----
4	<i>t</i> BCF	NMM	THF	12	28

*Lavado con ácido cítrico [42]

Como se observa en la tabla 5.3 cuando se utilizó el DCC como reactivo acoplante (RA) y DMAP como catalizador, el producto de reacción fue una mezcla impurificable de subproductos. Por otra parte, al cambiar el RA a *t*BCF (ensayo 4) se observó un producto mayoritario por TLC por lo que se procedió a purificar el crudo de reacción por medio de cromatografía en columna con un sistema de DCM/MeOH (95:5 y 9:1) y DCM/MeOH/NH₄OH (9:1:0.1), obteniéndose aproximadamente 15 mg del éster **28**. El espectro de RMN de ¹H (Figura 5.18) se observa que el éster no está puro; sin embargo debido al bajo rendimiento y alta polaridad con el que se obtuvo, no fue posible purificarlo totalmente.

El espectro de RMN de ¹H (Figura 5.18) muestra una señal múltiple en la región de los aromáticos alrededor de 7.35 ppm que integra para 5 protones, así como una señal simple en 5.10 ppm que integra para 2 protones características del grupo protector Cbz, en 5.65 ppm se observa la señal atribuida al protón vinílico característico de la supinidina (H-14), en 4.70 ppm se aprecia la señal del metileno base de oxígeno H-12, en 4.30 ppm se encuentra el metileno cabeza de puente H-20 como una señal simple ancha característica del biciclo de necina; en 4.00 ppm se distingue una señal doble atribuida al metileno H-10 de la glicina, en los desplazamientos 3.8 -1.6 ppm se aprecian las señales correspondientes a los protones alifáticos de la supinidina.

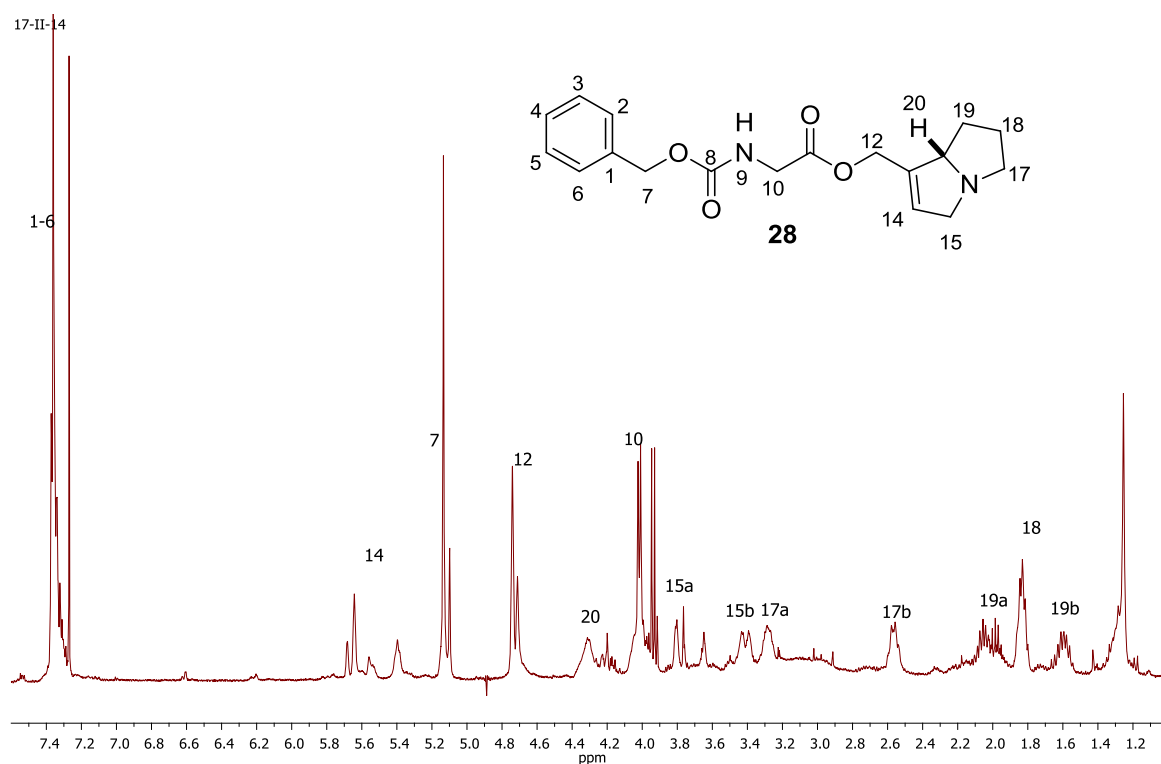
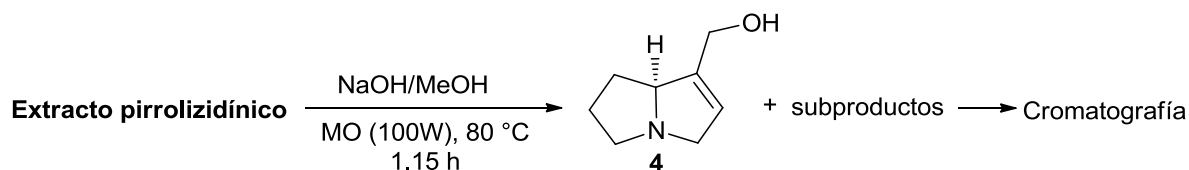


Figura 5.18 Espectro de RMN de ¹H de Cbz-*N*-Gli-supinidina (**28**) (CDCl₃, 400 MHz).

Posteriormente observando los bajos rendimientos, se decidió someter a purificación los productos de la hidrólisis básica de pirrolizidinas. Esquema 5.19.



Esquema 5.19. Hidrólisis básica de AP's asistida por MO.

La mezcla obtenida de la hidrólisis básica con NaOH y asistida por MO fue separada y purificada por medio de cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de disolventes comenzando con DCM/MeOH/NH₄OH 9:1:0.1 e incrementando la polaridad hasta MeOH/NH₄OH (1:1). De las fracciones de MeOH

(100%) se obtuvieron 36 mg de un compuesto como una miel amarillo-naranja identificada como supinidina (**4**).

El espectro de RMN de ^1H de **4** (Figura 5.19) mostró una señal doble ($J = 1.4$ Hz) en 5.5 ppm característica de un protón vinílico, en 4.20 ppm se observa un juego de 3 señales correspondientes al sistema AB de los protones 9a y 9b (2 dobles ($J = 13.1$ Hz), y a una señal simple asignada al protón cabeza de puente H-8. A 3.90 ppm se encuentra la señal doble ancha ($J = 15.2$ Hz) del protón H-3 α y en 3.30 ppm una señal doble de doble de dobles (ddd) ($J = 15.2, 4.3, 2.1$ Hz) atribuida al protón H-3 β . En los desplazamientos 3.10 y 2.55 ppm se encuentran las señales ddd de los protones metilénicos H-5 α y 5 β , a campo más alto se aprecian las 2 señales múltiples asignadas a H-7 α y 7 β en los desplazamientos 2.00 y 1.50 ppm; por último, se aprecia una señal múltiple en 1.75 ppm correspondiente al metileno H-6.

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **4** (Figura 5.20) se observan 8 señales características del compuesto. Entre 145.0 y 120.0 ppm se encuentran las dos señales correspondientes a carbonos vinílicos, a 144.8 ppm la correspondiente para el carbono cuaternario C-1 y en 120.7 ppm la correspondiente al metino C-2; en 71.1 ppm se observa la señal asignada al metino cabeza de puente C-8; en 61.8 ppm se distingue la señal correspondiente al metileno alílico C-3; en 59.7 ppm se aprecia la señal atribuida al metileno base de oxígeno, C-9; en 56.5 ppm aparece la señal correspondiente al metileno C-5; en 30.3 ppm se observa la señal asignada a C-7 y por último a 25.7 ppm se encuentra la señal atribuida al metileno C-6.

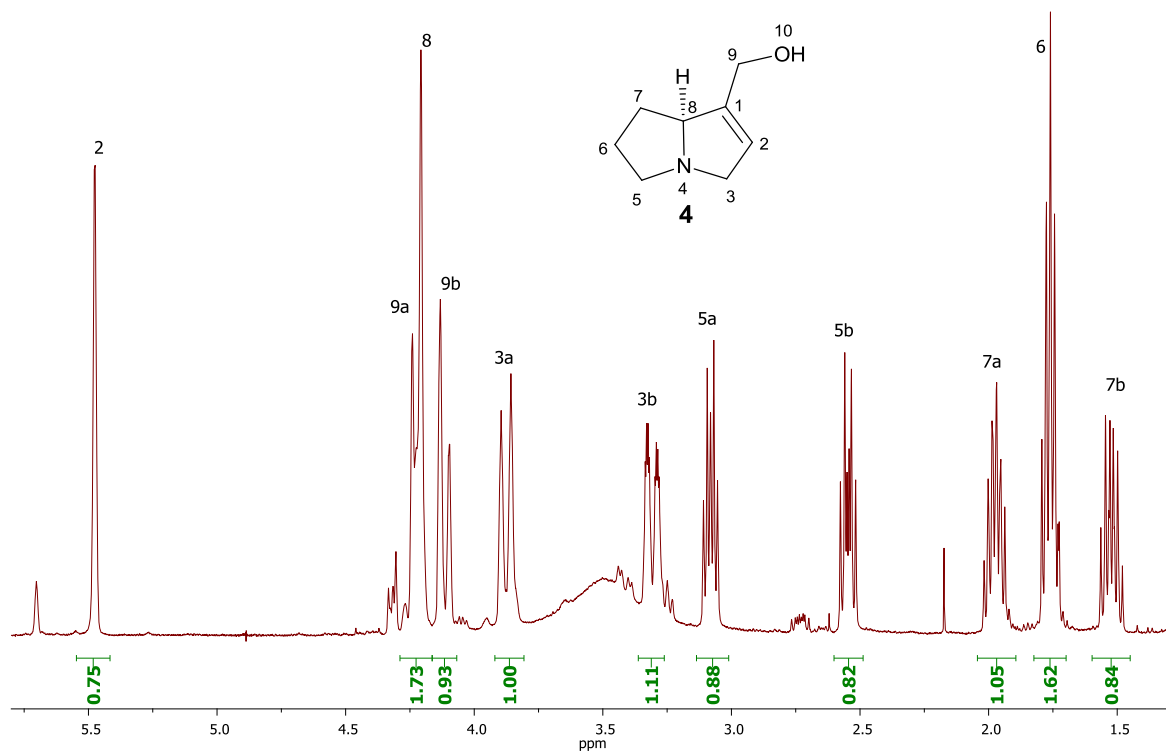


Figura 5.19. Espectro de RMN de ^1H de la supinidina (**4**) (CDCl_3 , 400 MHz).

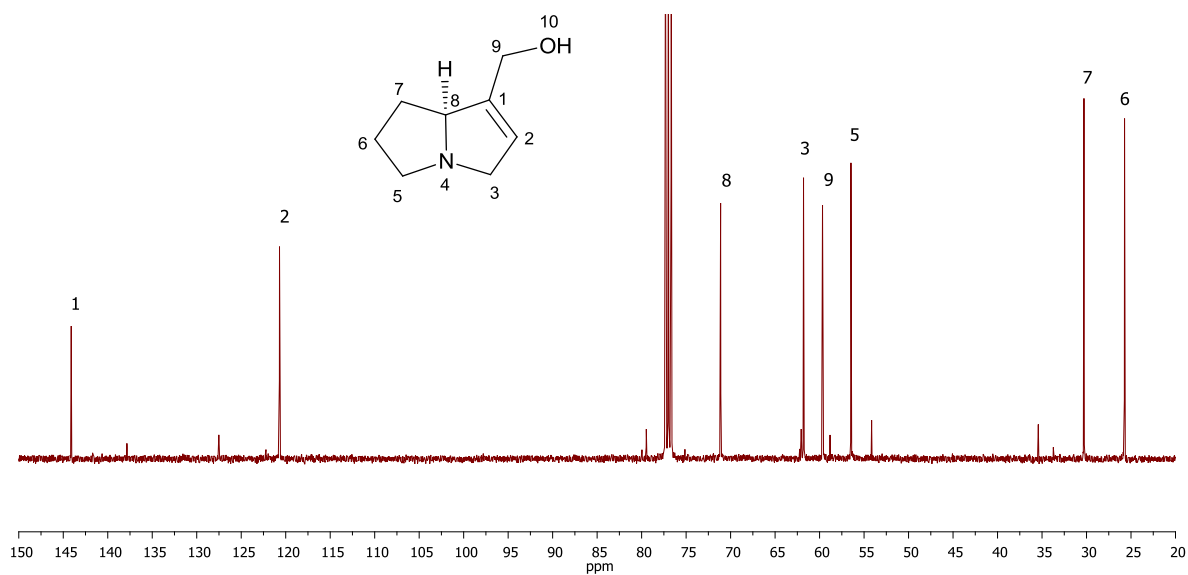


Figura 5.20. Espectro de RMN de ^{13}C de supinidina (**4**) (CDCl_3 , 100 MHz).

Cabe destacar que de las fracciones de MeOH/NH₄OH (1:1) también se obtuvieron aproximadamente 15 mg de un compuesto como miel naranja, identificado como el alcohol isorretronecanol (**29**).

En el espectro de RMN de ¹H del compuesto **29** (Figura 5.21) se puede observar que entre 3.67-3.58 ppm se encuentran 2 señales dobles de dobles ($J = 12.8, 6.35$ Hz) correspondientes a los hidrógenos base de oxígeno H-9a y H-9b; en 3.25 ppm se encuentra la señal doble de doble de dobles ($J = 13.3, 6.4$ Hz) asignada al protón cabeza de puente H-8, en 3.16 se observa una señal múltiple correspondiente al protón H-3 α , en 2.98 ppm se aprecia una señal múltiple atribuida a H-5 α , en 2.61 ppm se aprecia una señal múltiple asignada al protón H-5 β . En 2.55 ppm se distingue una señal múltiple, asignada al protón H-3 β ; entre 2.06 y 1.54 ppm se observan señales múltiples correspondientes a los protones restantes de la molécula (H-2 α , H-7 α , H-1, H-6 α , H-6 β , H-7 β y H-2 β).

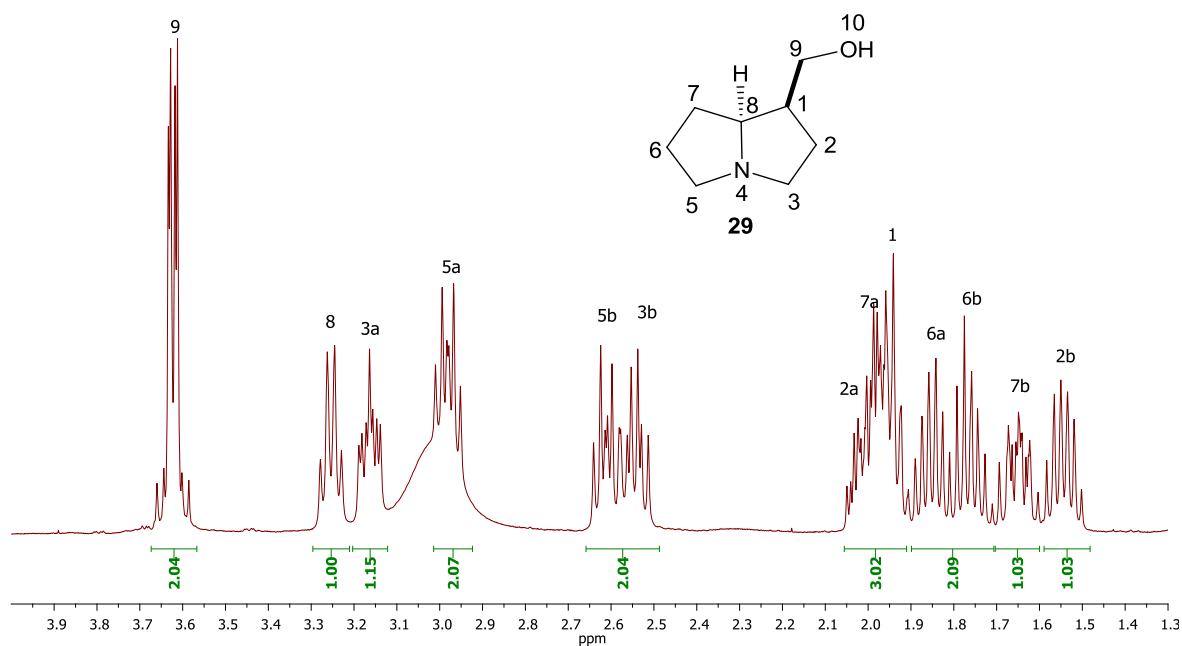


Figura 5.21. Espectro de RMN de ¹H de isorretronecanol (**29**), (CDCl₃, 400 MHz).

En su espectro de RMN de ¹³C (Figura 5.22), se pueden observar 8 señales, en 67.9 ppm se tiene la señal correspondiente al carbono cabeza de puente C-8, en

65.1 ppm se observa la señal atribuida al metileno base de oxígeno C-9, en 54.7 y 54.5 ppm se aprecian las señales de los carbonos base de heteroátomo C-5 y C-3 respectivamente, en 48.2 ppm se observa la señal del metino C-1, en 31.8 ppm se distingue la señal correspondiente al metileno C-2; en 30.0 ppm se encuentra la señal correspondiente a C-7; por último en 25.7 ppm se observa la señal atribuida a C-6.

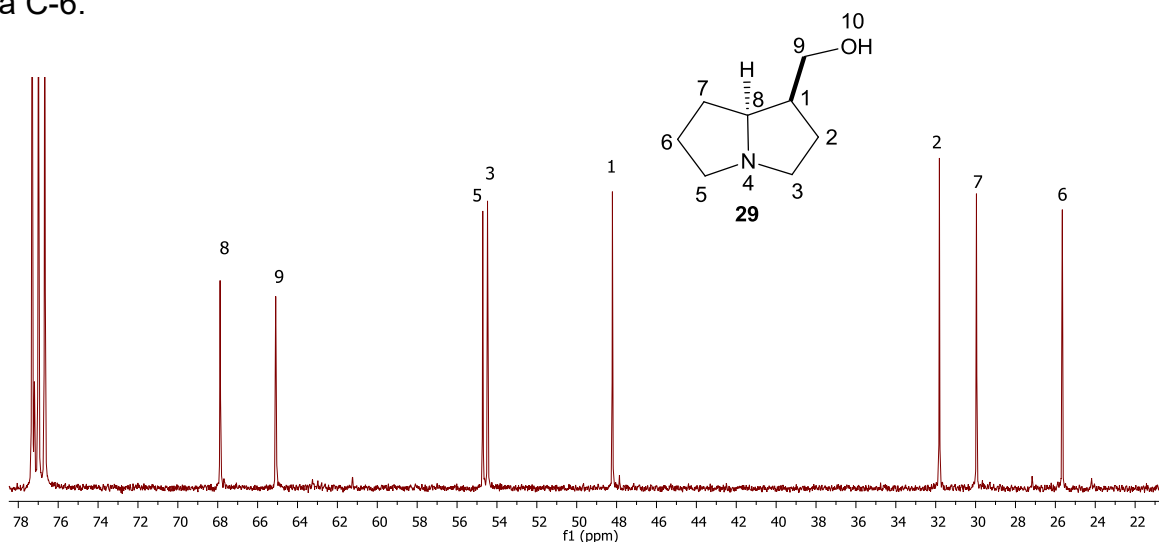
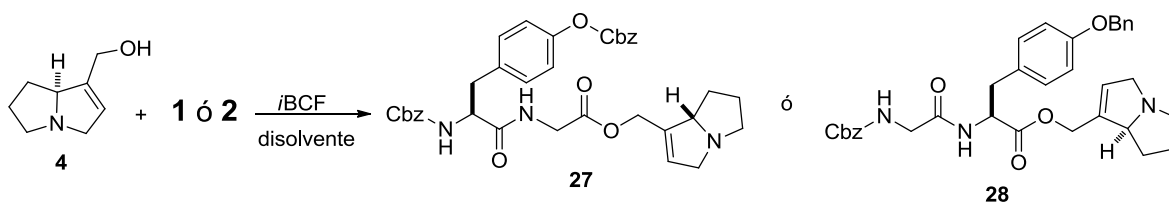


Figura 5.22. Espectro de RMN de ^{13}C del isorretrocanol (**29**), (CDCl_3 , 100 MHz).

Una vez puros la supinidina **4** y el isorretrocanol (**29**), se procedió a repetir nuevamente las reacciones de esterificación como se muestra en la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Condiciones de reacción para la obtención de los ésteres **27** y **28**.



Ensayo	Ácido	Base	Disolvente	Producto
1	1	DIEA	THF/DMSO/DCM	----
2	2	NMM	THF/DMSO	-----

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 5.3 (*vide supra*), se utilizó cloroformiato de isobutilo como reactivo activante del grupo carbonilo y utilizando DIEA y NMM como base. También, con el fin de aumentar la solubilidad de tanto del alcohol **4** como de los ácidos carboxílicos **1** y **2** e incrementar la superficie de contacto en el seno de la reacción, se empleó una mezcla de disolventes polares compuesta por THF, DMSO y DCM. Sin embargo, como se observa en la Tabla 5.4, en este caso tampoco se obtuvieron los productos esperados.

Un análisis detallado de los compuestos sugirió que el hidroxilo del alcohol **4** probablemente no era lo suficientemente nucleofílico para poder llevar a cabo la adición sobre el carbonilo activado de los péptidos **1** y **2**. Figura 5.23.

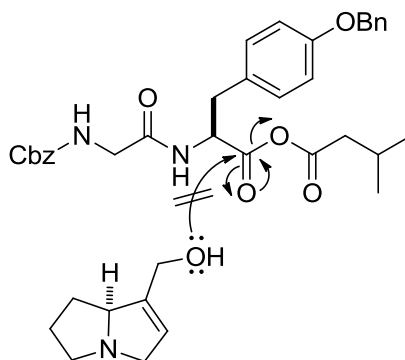
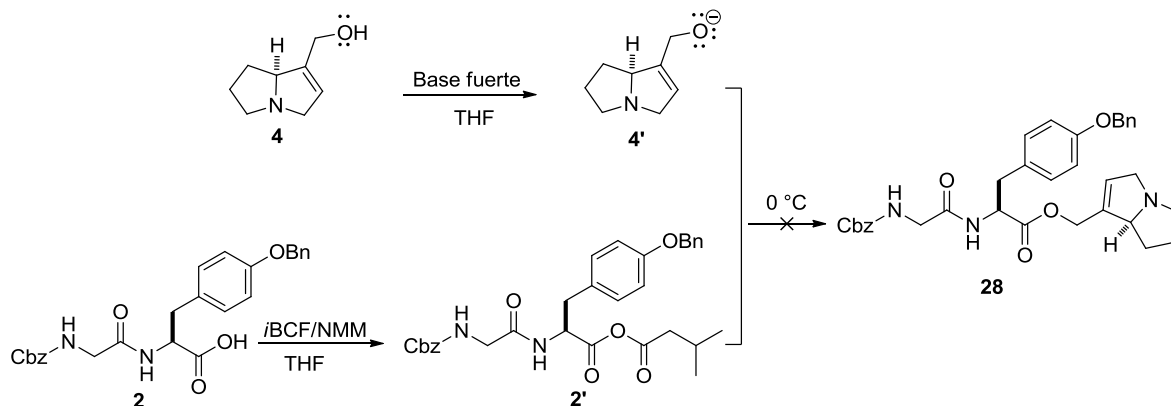


Figura 5.23. Adición del alcohol al carbonilo activado de **2**.

Con la finalidad de obtener los ésteres **27** y **28** se planteó una nueva estrategia de esterificación como se describe en el esquema 5.20.



Esquema 5.20. Esterificación del ácido **2** con el alcóxido de la supinidina **4'**.

En esta estrategia se propuso “activar” el grupo hidroxilo de la supinida (**4**) formando el ion alcóxido, por medio de la desprotonación del -OH con una base fuerte como el hexametildisililazuro de sodio (NaHMDS) o *n*-butil litio (*n*-BuLi). Posteriormente este alcóxido se adiciona al anhídrido mixto **2'** por medio de un ataque nucleofílico al carbonilo activado. La reacción se llevó a cabo en condiciones anhidras y atmósfera de nitrógeno, a una temperatura de 0 a 25 °C y utilizando THF como disolvente (Tabla 5.5). En este caso la reacción no procedió recuperándose solamente el ácido **2**.

Tabla 5.5. Uso de bases fuertes para la formación del alcóxido **4'**.

Ensayo	Base	Producto
1	<i>n</i> -BuLi	---
2	NaHMDS	MP

Pensándose ahora que posiblemente se trata de una situación de impedimento estérico debido al tamaño y complejidad de los dipéptidos, así como un posible encapsulamiento del sitio reactivo (ácido carboxílico).

Con el propósito de explicar la poca reactividad entre los ácidos **1** y **2** con la supinidina (**4**) en la reacción de esterificación, se realizó el modelado molecular de los compuestos **1**, **2** y **4** empleando el programa Spartan'14, por medio de mecánica molecular con un nivel de cálculo MMFF (Merck Molecular Force Field).

En la figura 5.24 se observan tres de los seis confórmeros de mínima energía de la supinidina (**4**), los cuales corresponden rotámeros, ya que la diferencia conformacional solamente es sobre el sustituyente CH₂OH. También se aprecia en la figura que el grupo OH de **4** está totalmente disponible para el acercamiento con el electrófilo.

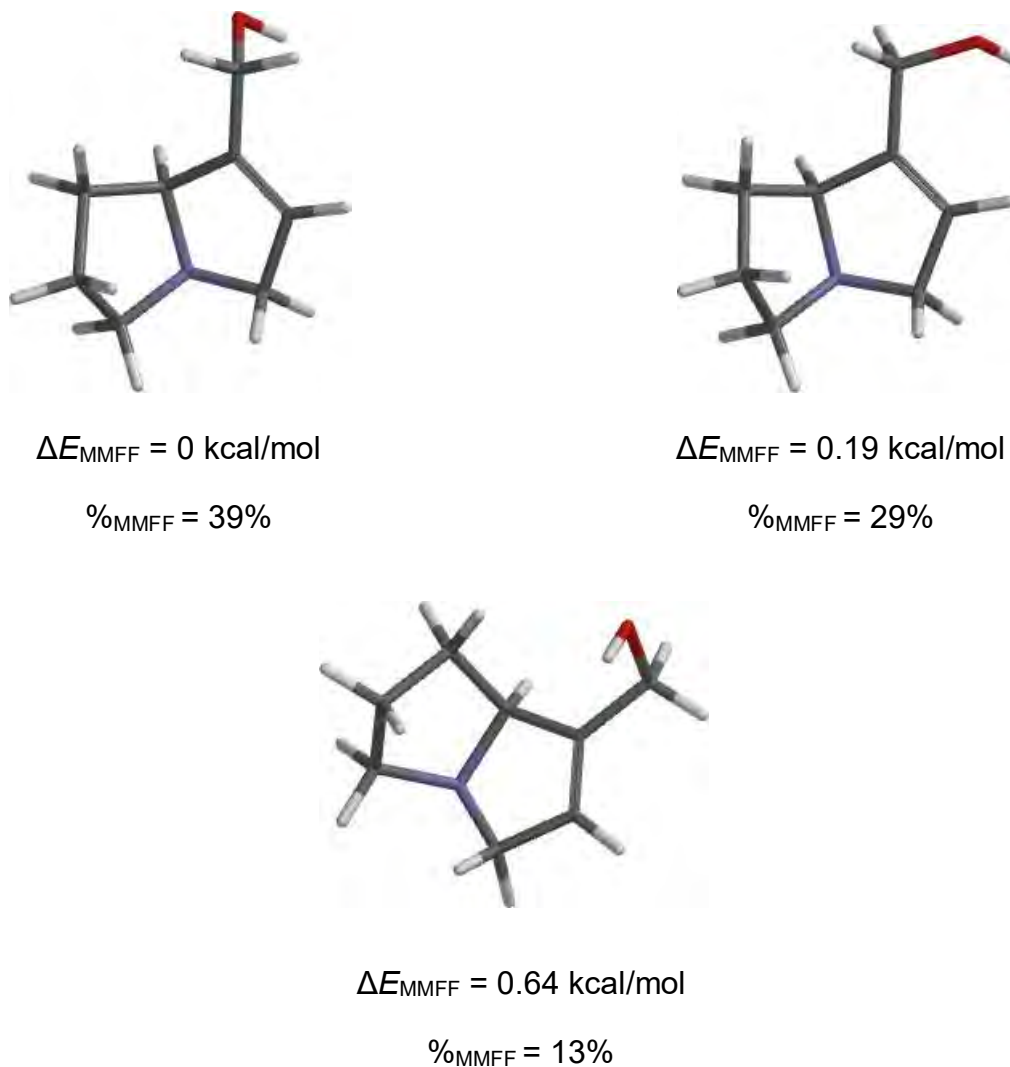


Figura 5.24. Confórmeros de mínima energía del compuesto **4** encontrados por MMFF.

Por otra parte, el cálculo del potencial de ionización de **4** revela las zonas ricas en electrones (color rojo), las zonas deficientes en densidad electrónica (color azul) y las zonas neutras (verde) (Figura 5.25). Con estos resultados se esperaría que con la adición de la base (*n*-BuLi y NaHMDS) ocurriera la desprotonación del grupo hidroxilo y se llevara a cabo la adición al electrófilo, lo que no está de acuerdo con los resultados.

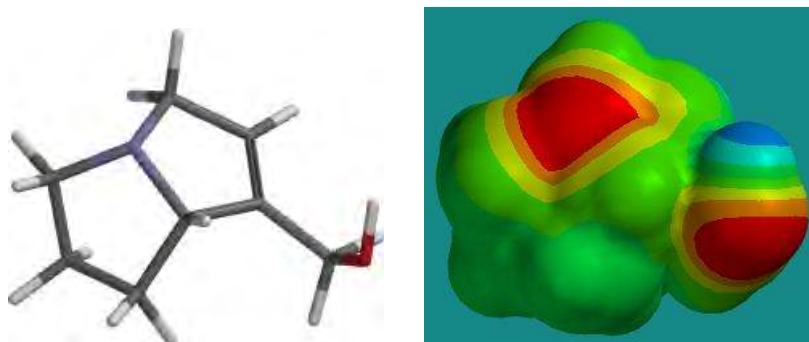


Figura 5.25. Mapa del potencial de ionización de la supinidina (4).

El análisis conformacional por Mecánica Molecular de Cbz-*N-L*-Tir(O-Cbz)-Gli-OH **1** revela que el confórmero de menor energía y con mayor porcentaje de contribución (36%) (Figura 5.26) presenta interacciones por puente de hidrógeno intramoleculares entre el hidrógeno del carboxilo del fragmento Gli con el carbonilo del grupo O-Cbz de la Tir y entre el oxígeno del COOH de la Gli con el hidrógeno del NH de la Tir, estas interacciones hacen que en esta conformación de la molécula el grupo carboxilo esté impedido para el acercamiento del nucleófilo.

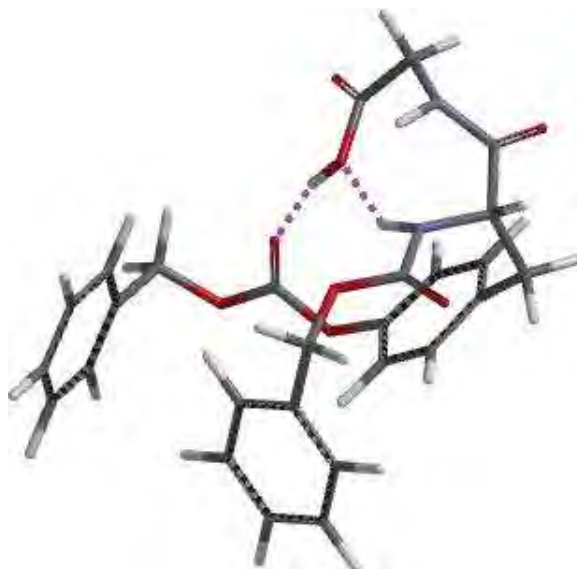


Figura 5.26. Confórmero de mínima energía del ácido Cbz-*N-L*-Tir(O-Cbz)-Gli (1).

La Figura 5.27 representa los conforméres de mínima energía del dipéptido **2**, en el conforméreo **A** (el de menor energía), se puede apreciar que la molécula se encuentra totalmente plegada, de tal manera que el carboxilo se encuentra impedido para el acercamiento del nucleófilo. Además se observa claramente una interacción $\pi-\pi$ entre los anillos aromáticos de los grupos Cbz y Bencilo, lo que estabilizada en gran medida esta conformación. En el conforméreo **B**, también se advierte una interacción $\pi-\pi$ entre los anillos aromáticos de los grupos Cbz y Bn, pero además se distinguen dos interacciones por puentes de hidrógeno, el primero entre hidrógeno del ácido carboxílico y el carbonilo del grupo *N*-Cbz, y el segundo entre hidrógeno del ácido carboxílico y el nitrógeno del fragmento tirosina.

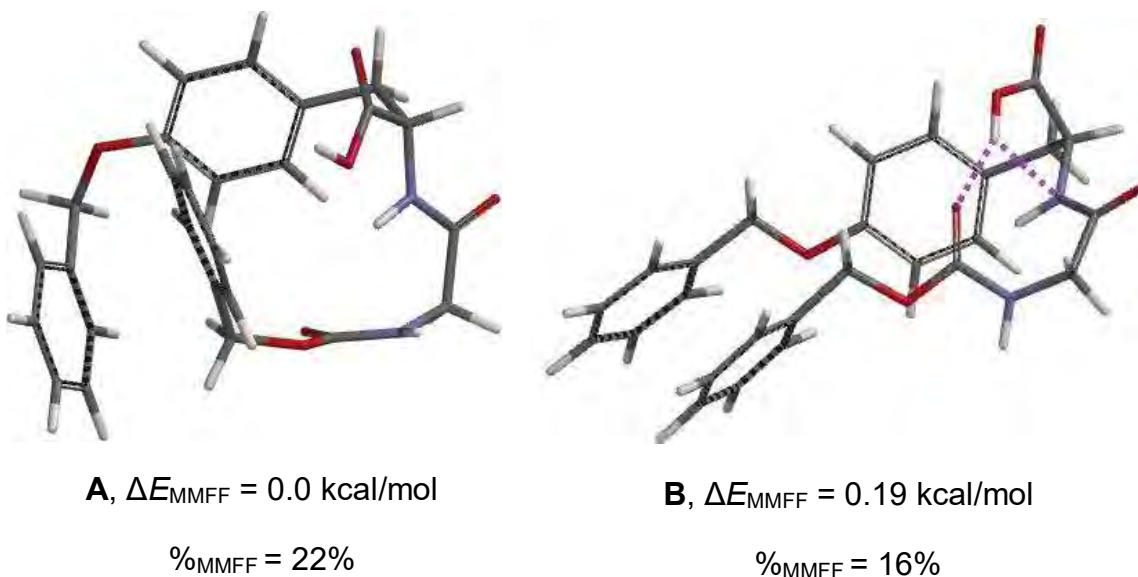
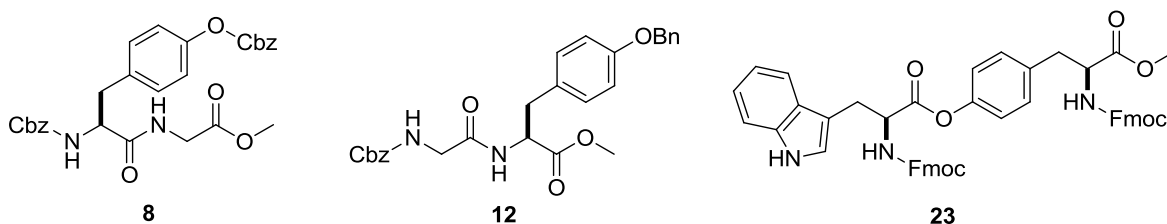


Figura 5.27. Conforméros de mínima energía del ácido Cbz-*N*-Gli-*L*-Tir(*O*-Bn) (**2**).

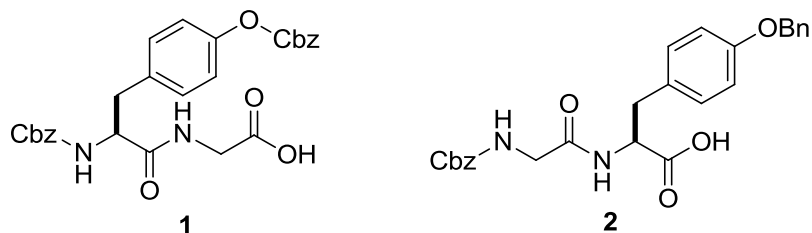
Por tal motivo se propone de manera tentativa que la conformación adoptada por los ácidos **1** y **2** es la responsable de la nula reactividad en la reacción de esterificación de los péptidos *N*-protegidos con el alcohol pirrolizidínico **4**, ya que esta conformación bloquea totalmente el grupo carbonilo del ácido dificultando el acercamiento del nucleófilo a la molécula.

6. CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar los dipéptidos triprotegidos Cbz-*N*-L-Tir(O-Cbz)-Gli-OMe (**8**) y Cbz-*N*-Gli-Tir(OBn)-OMe (**12**), así como el derivado peptídico Fmoc-*N*-L-Trp-Tir-(*N*-Fmoc)-OMe (**23**), mismo que presenta la unión de los dos fragmentos de aa por medio de un enlace tipo “éster” y no por medio de un enlace peptídico convencional.

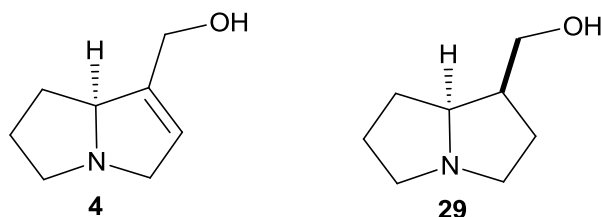


Se obtuvieron los ácidos carboxílicos de naturaleza peptídica Cbz-*N*,-L-Tir-(O-Cbz)-Gli-OH (**1**) y Cbz-*N*-Gli-L-Tir(OBn)-OH (**2**).



Del extracto metanólico de las raíces de *Chromolaena pulchella* se lograron aislar los alcaloides pirrolizidínicos coromandalinina (**24**) y diviridiflorato de necina (**25**).

-Se realizó la hidrólisis básica (en MO) de los extractos crudos de pirrolizidinas para obtener el compuesto Supinidina (**4**) e Isorretronecanol (**29**), los cuales se obtuvieron en muy alto grado de pureza lo que permitió su correcta asignación.



De estos alcoholes se les realizaron pruebas de esterificación hacia los ácidos peptídicos con diferentes metodologías y probando diferentes bases de lo cual se pudo concluir a través de estudios de análisis conformacional por cálculos teóricos, que presentan impedimentos estéricos, atracciones electrostáticas e interacciones intramoleculares que provocan su baja reactividad.

Se determinó que la reactividad de los ácidos carboxílicos **1-3** frente al alcohol pirrolizidínico **4** es nula por factores inherentes a las moléculas peptídicas protegidas.

7. PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Los disolventes requeridos fueron destilados previo a su uso en torre de vigreux y secados en caso necesario. Los reactivos de partida fueron obtenidos de la casa comercial ALDRICH. Para la purificación de los intermediarios se realizaron cristalizaciones, cromatografías en columna y en placa usando gel de sílice 70-230 Mesh como fase estacionaria y como fase móvil los sistemas de disolventes más adecuados según correspondiera, tales como AcOEt, hexano, MeOH, DCM, previamente destilados.

El monitoreo de la reacciones e identificación de compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando cromatofolios Merk de fase estacionaria gel de sílice 60 F₂₅₄, revelando con lámpara de luz UV y vapores de yodo.

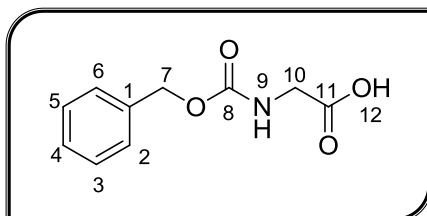
Los puntos de fusión se determinaron en el Equipo Fisher, marca EVEL Mod. 1237 y no están corregidos.

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C, 1D y 2D se obtuvieron en equipo Mercury 400. Los disolventes deuterados empleados fueron CDCl₃, DMSO-d₆ y CD₃OD con TMS como referencia interna. Los δ se reportan en ppm, las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz) y para indicar la multiplicidad de las señales se usan las abreviaturas: s = simple, d = doble, dd = doble de dobles, ddd = doble de doble de dobles, t = triple, c = cuádruple, m = múltiple, a = ancha, sept = séptuple. Para la interpretación de espectros se recurrió al software "MestReNova".

Para las reacciones de microondas (MO) se empleó el reactor marca CEM-Discover System (Mod. 908005).

✓ **Cbz-N-Gli (10):**

En un matraz redondo provisto de agitación magnética y baño de hielo se colocaron 0.50 g de glicina (6.66 mmol) disueltos en 20 mL de una solución de NaOH_(ac) 1N, enseguida se adicionaron 1.03 mL de CbzCl (7.32 mmol) y se dejó reaccionar una hora a 0 °C y toda la noche a temperatura ambiente, manteniendo el pH en 10. Posteriormente la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se lavó con DCM (CH₂Cl₂) (2x30 mL), la fase acuosa se acidificó con HCl 1 N hasta pH de 4. La fase orgánica se extrajo con DCM (3x50 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se concentró en rotavapor a presión reducida. Después de la purificación por recristalización (AcOEt/DCM) se obtuvieron 1.23 g de un sólido blanco con un rendimiento del 89%. p. f. = 106-108 °C



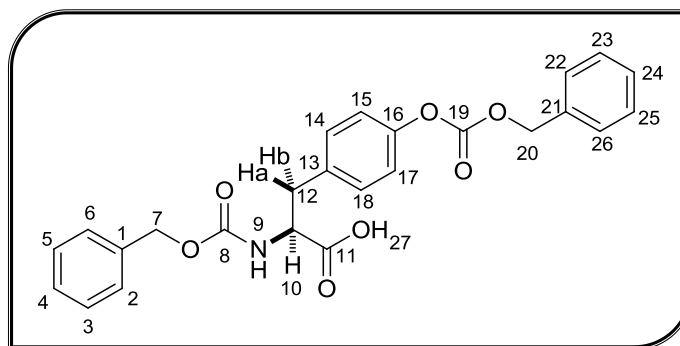
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.35 (s, 5H, H's-2-6), 5.34 (sa, 1H, H-9), 5.12 (s, 2H, H-7), 4.01 (sa, 2H, H-10).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 171.7 (C-11), 156.7 (C-8), 136.3 (C-1), 129.6, 128.8, 128.5, 128.4 (CH's-2 a 6), 67.5 (C-7), 42.8 (C-10).

✓ **Cbz-N-L-Tir(O-Cbz) (5):**

En un matraz redondo provisto de agitación magnética y baño de hielo se colocó 1 g (5.52 mmol) de *L*-Tirosina disuelto en 40 mL de NaOH 1 N, posteriormente se adicionaron 3.2 mL de CbzCl (22.08 mmol) diluidos en 3.75 mL de dioxano (para reacción monofásica) dejando transcurrir la reacción 1 hora a 0 °C y 48 h a temperatura ambiente, teniendo cuidado de que el pH se mantenga por arriba de 10. Posteriormente la mezcla de reacción se enfrió y se lavó con DCM. La fase acuosa se acidificó con HCl 1 N hasta pH de 4 y se extrajo con DCM, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor a presión

reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna, empleando gel de sílice (SiO_2) de 70-230 mesh como fase estacionaria y como fase móvil el sistema DCM/MeOH (9:1), obteniéndose un polvo blanco en un rendimiento del 32% (0.8 g), con p.f. 104-106 °C y un R_f de 0.33 (DCM/MeOH/AcOH, 19:1:0.1).



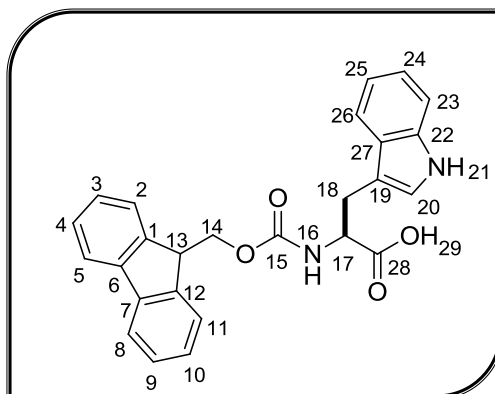
$^1\text{H-RMN}$: (400 MHz, CDCl_3) δ 7.44–7.34 y 7.33-7.29 (2m, 10H, H's-2 al 6 y 22 al 26), 7.14 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-14,18), 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-15,17), 6.56 (s-a, 1H, H-27), 5.29 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-9), 5.24 (s, 2H, H-20), 5.08 (m, 2H, H-7), 4.67 (dd, J = 6.4, 5.1 Hz, 1H, H-10), 3.19 (dd, J = 14.0, 5.3 Hz, 1H, H-12b), 3.07 (dd, J = 14.1, 6.4 Hz, 1H, H-12a).

$^{13}\text{C-RMN}$: (100 MHz, CDCl_3) δ 175.3 (C-11), 155.8 (C-8), 153.6 (C-19), 150.2 (C-16), 136.0, 134.7, 133.5 (C-13, 1, 21), 130.4 (C-14 y 18), 128.8, 128.7, 128.5, 128.2, 128.1, 127.0 (C's-2 al 6 y 22 al 26), 121.1 (C-15 y 17), 70.4 (C-20), 67.2 (C-7), 54.5 (C-10), 37.0 (C-12).

✓ **Fmoc-*N*-L-Trp (22):**

En un matraz balón provisto de agitación magnética y en baño de hielo, se colocaron 2.6 g de Triptófano (Trp) (12.73 mmol) y se disolvió con 27 mL de una solución acuosa de Na_2CO_3 al 10% y 1.15 mL x 0.1 g de aa de dioxano, posteriormente se adicionaron lentamente 3.6 g de FmocCl (14.0 mmol) disuelto en 30 mL de dioxano. La mezcla se dejó reaccionar 12 horas y pasado este tiempo a la reacción se le hicieron 2 lavados con hexano; la fase acuosa se acidificó con HCl

1 N hasta pH de 4, para liberar el carboxilato y así extraer el compuesto con DCM (3 x 50 mL), esta fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró en rotavapor, se obtuvo un producto en forma de miel ámbar que fue necesario purificar por cromatografía en columna empleando un sistema DCM-MeOH-AcOH (19:1:0.1) y posteriormente recrystalizar con hexano, con esto se obtuvo un polvo beige (2.2 g) con un punto de fusión 100-104 °C y en un rendimiento del 40%.



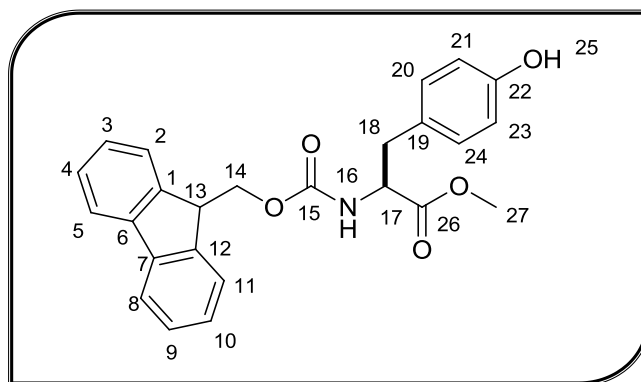
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.07 (s, 1H, H-21), 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, H-5, 8), 7.60 (d, *J* = 7.64, 1H, H-26), 7.52 (2d, *J* = 8.3-8.9 Hz, 2H's, H-2,11), 7.37 (2dd, 2H's, H-3,10), 7.28 (m, CH, 3H's, H-4,9,23), 7.20 (dd, *J* = 7.4, 7.7 Hz, 1H, H-25), 7.12 (dd, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-24), 6.90 (s, 1H, H-20), 5.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-16), 4.76 (dd, *J* = 5.4, 13.44 Hz, 1H, H-17) 4.40 (2dd, *J* = 7.2, 14.8 Hz, 2H's, H-14), 4.17 (dd, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-13), 3.34 (2dd, 2H's, H-18).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 175.3 (C-28), 156.0 (C-15), 143.8-141.2 (C's-1, 6, 7, 12), 136.0 y 127.6 (C's-22, 27), 127.6-111.3 (C's-2-5, 8-11, 23-26), 123.1 y 109.5 (C's-19 y 20), 67.0 (C-14), 54.5 (C-17), 47.0 (C-13), 27.6 (C-18).

✓ **Fmoc-*N*-L-Tir-O-Me (21):**

Siguiendo la metodología descrita (excepto por la acidificación), se hicieron reaccionar 0.9 g (3.88 mmol) del aa Cl⁻H₃N⁺-L-Tir-OMe (**11**) disueltos en 8.23 mL de solución de Na₂CO₃ al 10% (7.76 mmol), con 1.1 g (4.26 mmol) de Fmoc-Cl disueltos

en 13.64 mL de dioxano por 12 h. La mezcla de reacción se lavó 2 ocasiones con hexano; se extrajo con DCM (3 x 50 mL), esta fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró en rotavapor. El producto crudo se sometió a purificación por cromatografía en columna con sistema Hex-AcOEt (7:3) y así obtenerse un producto en forma de cristales de color amarillo, teniendo un rendimiento final de 65% (1.05 g). p.f. 108-112 °C.



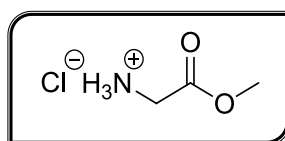
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.77-6.73 (m, 8H, H's-2-5, 8-11) 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-5, 8), 7.56 (dd, *J* = 4.4, 7.2 Hz, 2H's, H-2, 11), 7.40 (dd, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-4, 9), 7.31 (dd, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3, 10), 6.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H's, H-20, 24), 6.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H's, H-21, 23), 5.28 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-16) 4.63 (ddd, *J* = 8.2, 5.8 Hz, 1H, H-17), 4.44 (dd, *J* = 10.6, 7.2 Hz, 1H, H-14a), 4.35 (dd, 6.88, *J* = 10.6 Hz, 1H, H-14b), 4.20 (dd, *J* = 7.00 Hz, 1H, H-13), 3.73 (s, 3H, H-27), 3.06 (dd, *J* = 14.1, 6.1 y 14.1, 5.6 Hz, 2H, H-18a y 18b).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 172.1 (C-26), 155.6 (C-15), 154.9 (C-22), 143.8 y 143.6 (C's-1, 12), 141.3 (C's-6, 7), 130.4 (C's-20, 24), 127.7 (C's-4, 9), 127.5 (C-19), 127.0 (C's-3, 10), 125.1 y 125.0 (C's-2, 11), 120.0 (C's-5, 8), 115.5 (2 CH-aromat-Tir, C-21, 23), 66.9 (CH₂ Fmoc, C-14), 54.9 (CH Tir, C-17), 52.4 (C-27), 47.1 (C-13), 37.4 (C-18).

✓ **Gli-OMe (7):**

600 mg (8 mmol) de Gli se suspendieron en 15 mL de MeOH (25 mL/g de aa), posteriormente se adicionaron 0.64 mL de SOCl₂ (8.8 mmol) a 0 °C y se dejó

reaccionar por 18 horas en agitación. La mezcla de reacción se lavó con DCM y se concentró en el rotavapor a presión atmosférica y con trampa de NaOH para neutralizar el HCl formado. Se obtuvo un sólido blanco de aspecto algodonoso que se purificó por recristalización empleando mezcla MeOH/DCM, obteniéndose 990 mg de cristales blancos en un 100% de rendimiento y p.f. 174-176 °C.

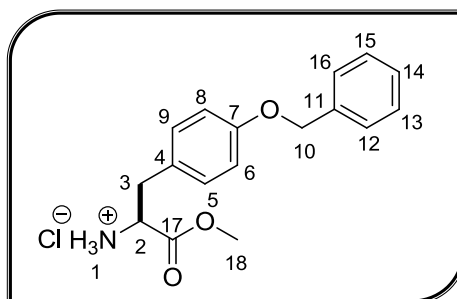


¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 3.85 (s, 2H's) y 3.82 (s, 3H's).

¹³C-RMN (101 MHz, CD₃OD): δ 167.7 (CO), 51.8 (CH₃), 39.1 (CH₂).

✓ **Tir(OBn)-OMe (18):**

Empleando la técnica descrita anteriormente, pero además secando el MeOH, haciéndolo pasar sobre Na₂SO₄, sílice y NaCl, usando 2.2 Eq's de SOCl₂ (1.2 mL) y 48 h de reacción, se hicieron reaccionar 2 g (7.4 mmol) de **17**, obteniéndose como crudo un sólido amarillento al ser concentrada la reacción pero que fueron lavados con DCM hasta obtener el producto como un sólido en forma de escamas blancas que se recristalizaron con MeOH/DCM, dando un peso final de 1.83 g, lo que representa el 77% de rendimiento y un p. f. = 158-161 °C.



¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7.42 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H's, H-12 y 16), 7.36 (dd, *J* = 7.4 Hz, 2H's, H-13 y 15), 7.30 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-14), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H's, H-5 y 9), 6.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H's, H-6 y 8), 5.08 (s, 2H's, H-10), 4.27 (dd, *J* = 6.6

Hz, 1H, H-2), 3.79 (s, 3H's, H-18), 3.20 (dd, $J = 14.4, 6.1$ Hz, 1H, H-3b), 3.13 (dd, $J = 14.5, 7.3$ Hz, 1H, H-3a).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 170.3 (C-17), 159.9 (C-7), 138.6 (C-4), 131.6, 129.5, 128.9, 128.5 y 127.3 (C's aromáticos), 116.6 (C-11), 70.9 (C-10), 55.3 (C-2), 53.6 (C-18), 36.6 (C-3).

❖ Procedimiento general para la reacción de Acoplamiento:

○ Método 1: Vía formación de Anhídridos mixtos

En un matraz balón provisto de agitación magnética y atmósfera inerte, se suspendieron 1.1 equivalentes de la amina en tetrahidrofurano (THF). La mezcla de reacción se trató con 1.2 equivalentes de base, dejando en agitación durante 1 hora.

En otro matraz balón provisto de agitación magnética, atmósfera inerte y baño de hielo, se colocó 1 equivalente del aminoácido *N*-protegido disuelto en THF, esta solución se trató con 1.1 equivalentes de base; posteriormente se añadieron 1.12 equivalentes de cloroformiato de isobutilo (*i*BCF) al 0.2 M en THF; la mezcla de reacción se dejó en agitación por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se le adicionó gota a gota la mezcla que contiene la amina (aproximadamente 60 minutos de adición), una vez terminada la adición se dejó en agitación 1 hora en baño de hielo y toda la noche a temperatura ambiente.

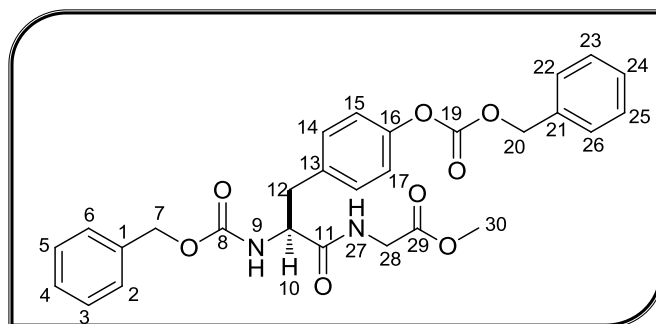
La mezcla de reacción se concentró en rotavapor a presión reducida, el residuo se resuspendió en AcOEt y se lavó con HCl al 10% (1 x 50 mL), agua (2 X 50 mL), solución saturada de NaHCO₃ (2 X 50 mL) y agua (2 X 50 mL), la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró en el rotavapor a presión reducida.

- **Método 2: Vía formación de ésteres activos**

En un matraz balón provisto de agitación magnética y baño de hielo se colocó 1 eq de aa *N*-protegido y se disolvió en una mezcla DCM-DMF en proporción 7:3. A continuación se adicionaron 2 eq's de trietilamina (TEA). La mezcla se dejó reaccionar por 10 min, posteriormente se agregó 1eq de HBTU y se dejó reaccionar por 20 min más; en seguida se adicionó lentamente la mezcla formada por 1 eq. del aminoéster con 1 eq. de TEA (con una hora de agitación previa) y se dejó en agitación por 1h a 0 °C y 12 h a T° amb. Finalizado el tiempo de reacción se efectuaron 4 lavados con solución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se concentró en rotavapor a presión reducida.

- ✓ **Cbz-*N*-L-Tir(O-Cbz)-Gli-OMe (8):**

Siguiendo el Método 1 se colocaron 0.55 g (1.22 mmol) del ácido **5** diluidos en 6.3 ml de THF-anhidro (solución 0.2 M), a los que se les agregó 0.15 mL de NMM (1.36 mmol), una vez frío se adicionó lentamente una solución de 0.18 mL de *t*BCF (1.38 mmol) en 6.7 ml de THF (solución 0.2 M) para reaccionar por 20 min y posteriormente se agregaron 0.23 g de clorhidrato del aminoéster **7** (1.84 mmol) y 0.47 mL de NMM (0.424 mmol) diluidos en una mezcla THF-DMSO (3:2, solución 0.2 M). Una vez purificado el crudo de reacción se obtuvieron 0.56 g de dipéptido triprotegido **8** en un rendimiento del 88% y con un p. f. = 136-137 °C.



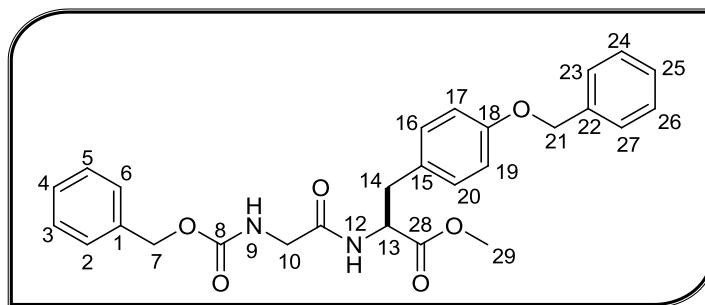
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.46-7.37 y 7.36-7.28 (2m, 10H, H's-2-6 y 22-26), 7.19 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-14, 18), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-15, 17), 6.46 (s, 1H, H-27), 5.38 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-9), 5.26 (s, 2H, H-20), 5.07 (s, 2H, H-7), 4.47

(d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-10), 4.00 (dd, $J = 18.2, 5.4$ Hz, 1H, H-28a), 3.91 (dd, $J = 18.1, 5.2$ Hz, 1H, H-28b), 3.72 (s, 3H, H-30), 3.09 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-12).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ 170.9 (C-11), 169.7 (C-29), 155.9 (C-8), 153.5 (C-19), 150.1 (C-16), 135.9-134.1 (C's-1, 13, 21), 130.34 (C's-14, 18), 128.8-128.1 (C-2-6, 22-26), 121.2 (C-15, 17), 70.3 (C-20), 67.2 (C-7), 55.8 (C-10), 52.4 (C-30), 41.1 (C-28), 37.6 (C-12).

✓ (Cbz)-*N*-Gli-Tir(OBn)-OMe (16):

Empleando el Método 1, se colocaron en un matraz provisto de agitación magnética 1.68 g de $\text{Cl-H}_3\text{N}^+\text{-Tir(OBn)-OMe}$ (18) (5.22 mmol), diluidos en 26.2 mL de THF (solución 0.2 M) y se trataron con 2.0 mL de diisopropiletilamina (DIEA) (11.48 mmol). Enseguida se le adicionó lentamente la mezcla formada por 1.09 g (5.22 mmol) de Cbz-*N*-Gli (10) a una concentración 0.2 M de THF, 1 ml (5.74 mmol) de DIEA y 0.76 mL de una solución 0.2 M de $i\text{BCF}$ en THF. El producto obtenido fue purificado por cromatografía en columna empleando gel de sílice como fase estacionaria y sistemas Hex-AcOEt (6:4 y 1:1) como eluyente, dando así como producto final 2.06 g del dipéptido triprotegido 16 como un polvo blanco que por recristalización forma agujas blancas, teniendo un rendimiento de 83% y p.f. = 76-78 °C.



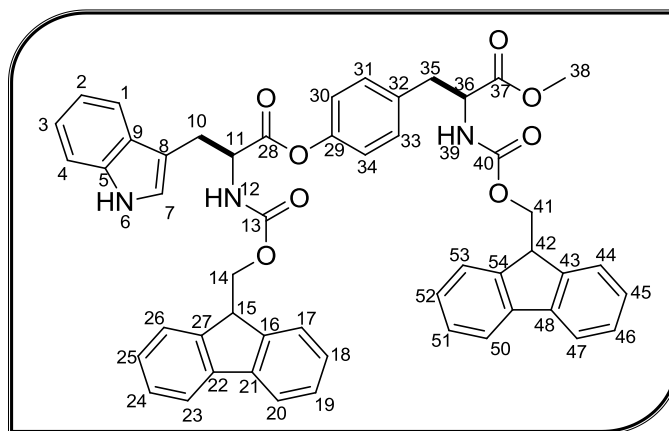
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.47–7.27 (m, 10H, H's-2-6, 23-27), 7.00 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-16, 20), 6.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H-17, 19), 6.46 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-9), 5.41 (s, 1H, H-12), 5.13 (s, 2H, H-7), 5.01 (s, 2H, H-21), 4.85 (dd, $J = 13.4, 5.6$

Hz, 1H, H-13), 3.87 (dd, $J = 5.9$ Hz, 2H, H-10a y 10b), 3.72 (s, 3H, H-29), 3.05 (dd, 2H, H-14a y 14b).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 171.7 (C-12), 168.4 (C-28), 157.9 (C-8), 156.4 (C-18), 136.8 (C-22), 136.0 (C-1), 130.2 (C-16,20), 128.5, 128.2, 128.1, 128.0, 127.7 (C-2-6 y 23-27), 127.5 (C-15), 114.9 (C-17, 19), 69.9 (C-21), 67.2 (C-7), 53.1 (C-13), 52.4 (C-29), 44.4 (C-10), 36.9 (C-14).

✓ **Fmoc-N-Trp-Tir(N-Fmoc)-OMe (23):**

Seguendo el método 1, se colocaron 300 mg (0.7 mmol) del aminoácido Fmoc-N-L-Trp (**22**), en un matraz y fueron diluidos con 9 mL de THF, se trataron con 0.14 mL de DIEA y 0.1 mL de tBCF diluidos en 4 mL de THF. Posteriormente se adicionó lentamente la mezcla de 324 mg (0.77 mmol) del aminoácido diprotectado Fmoc-N-L-Tir-OMe (**21**) diluido en 2 mL THF y 0.14 mL de DIEA, que había reaccionado previamente por 1 h. La reacción se dejó en baño de hielo por 1h y 24 a T° amb. De ésta se obtuvo un producto como miel café que por purificación empleando sistema Hex-AcOEt (7:3) arrojó un producto como miel amarillo-naranja en un 9% de rendimiento (49 mg).



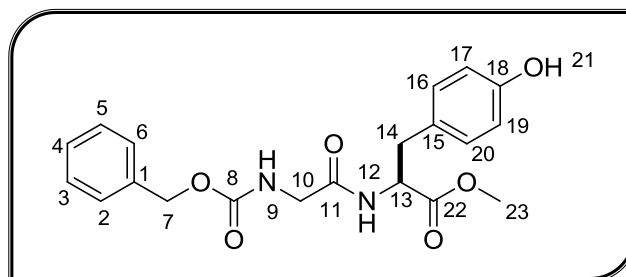
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (s, 1H, H-6), 7.80-6.8 (m's, 25H H's-1-4, 7, 17-20, 23-26, 30, 31, 33, 34, 44-47, 50-53), 5.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-12), 5.28 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-39), 4.97 (dd, $J = 5.42, 13.6$ Hz, 1H, H-11), 4.65 (dd, $J = 14.7, 6.9$

Hz, 1H, H-36), 4.43 (2dd, $J = 16.9, 9.4$ Hz, 4H, H-14, 41), 4.35 (m, 1H, H-42), 4.21 (dd, $J = 13.3, 6.5$ Hz, 1H, H-15), 3.72 (s, 3H, H-38), 3.46 (dd, $J = 6.1$ Hz, H-10), 3.08 (m, 2H, H-35).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170-141.27 (C-28,37,13,40), 130.25-118.75 (C's Aromáticos), 111.30 (C-8), 66.95-28.06 (C-42,15,10), 66.95 (C-14,41), 54.88 (CH, C-36), 54.69 (C-38), 52.43 (C-11), 47.12 (C-15,42), 37.6 (C-35), 28.06 (C-10).

✓ **Cbz-N-Gli-Tir-OMe (13):**

Utilizando la técnica descrita en el Método 2, se hicieron reaccionar 150 mg (0.72 mmol) de Cbz-N-Gli (**10**) con el clorhidrato de L-Tir-OMe (**11**). **10** se disolvió en 3.6 mL de una mezcla DCM-DMF (7:3) y se le agregaron 0.23 mL (1.51 mmol) de TEA y posteriormente 0.28 g de HBTU, después del tiempo de reacción se le agregaron 0.183 g (0.79 mmol) de **11**, diluidos en 4 mL de DCM-DMF y previamente tratados con 0.11 mL de TEA. La reacción se dejó proceder por 1 h a 0 °C y después 12 h más a T° amb. Después de la purificación por cromatografía en columna con Hex-AcOEt (1:1), se obtuvieron 96.6 mg (0.25 mmol) de una miel cristalina correspondiente a **13** con un rendimiento del 35%.

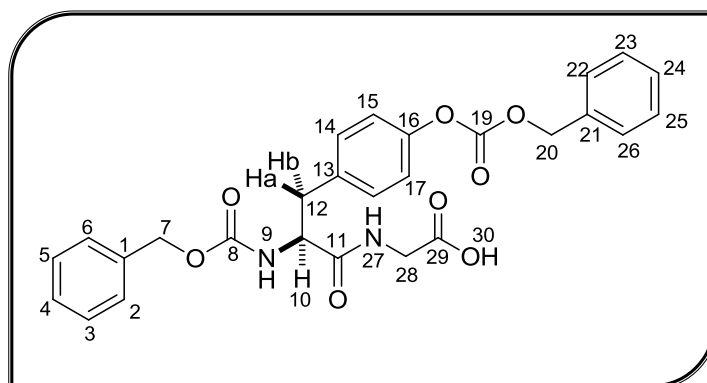


$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32 (s, $J = 8.7$ Hz, 5H, H-2-6), 6.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-16,20), 6.83 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-21), 6.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-17,19), 5.73 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-9), 5.07 (s, 2H, H-7), 4.81 (dd, $J = 13.3, 5.8$ Hz, 1H, H-13), 3.79 (2dd, $J = 4.4, 4.3$ Hz, 2H, H-10), 3.69 (s, 3H, H-23), 2.98 (2dd, $J = 14.0, 5.9$ Hz, 2H, H-14).

^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 172.1 (C-22), 169.2 (C-11), 156.7 (C-8), 155.5 (C-18), 135.9 (C-1), 130.2 (C-16,20), 128.5, 128.2, 128.1, 126.6 (C-2-6), 115.5 (C-17,19), 67.2 (C-7), 53.2 (C-13), 52.5 (C-23), 44.1 (C-10), 38.6 (C-14).

✓ **Cbz-N-Tir(O-Cbz)-Gli-OH (1):**

En un matraz redondo provisto de agitación y baño de hielo se hicieron reaccionar 120 mg (0.23 mmol) del dipéptido triprotegido **8**, diluidos en 5 mL de la mezcla de disolventes THF- H_2O -MeOH (25:3:0.1), con 0.0387 g (0.92 mmol) de $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ disueltos en la mínima cantidad de agua y adicionados en porción: 1.5 eq a las 0 h, 1.5 eq a las 3 h y un eq. a las 6 h. Esta solución se dejó reaccionar por 24 h. Pasado este tiempo la reacción se acidificó con HCl 1M hasta llegar a pH de 4. El disolvente se concentró con vacío y el crudo de reacción se suspendió en H_2O , y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se obtuvieron 100 mg del producto como polvo blanco en un rendimiento del 86% y un p.f. = 140-145 °C.

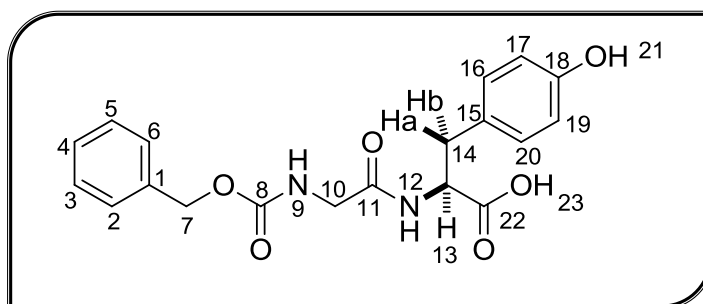


^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 7.48–7.33 (m, 5H, H-22-26), 7.32–7.18 (m, 5H, H-2-6), 7.26 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-14,18), 7.04 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-15,17), 5.24 (s, 2H, H-20), 4.99 (dd, 2H, H-7), 4.42 (dd, $J = 9.9, 4.7$ Hz, 1H, H-10), 3.79 (2d, $J = 17.3$ Hz, 2H, H-28), 3.23 (dd, $J = 13.9, 4.7$ Hz, 1H, H-12b), 2.85 (dd, $J = 13.9, 10.0$ Hz, 1H, H-12a).

^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD): δ 173.6 (C-29), 173.4 (C-11), 158.3 (C-8), 155.1 (C-19), 151.4 (C-21), 136.8-136.7 (C-1, 16, 13), 131.5 (C-14, 16), 129.7-128.7 (C-2-6, 22-26), 122.0 (C-15, 17), 71.3 (C-20), 67.6 (C-7), 57.8 (C-10), 43.9 (C-28), 38.4 (C-12).

✓ **Cbz-N-Gli-Tir-OH (15):**

Utilizando la técnica descrita previamente se realizó la O-desprotección del dipéptido **13** partiendo de 40 mg de este compuesto (0.104 mmol) diluidos con 2 mL de sistema THF- H_2O -MeOH (25:3:0.1). La solución fue tratada con una solución acuosa de 0.017 g (0.414 mmol) de $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$. Se obtuvieron 36 mg del producto **15**, en forma de polvo blanco soluble en MeOH con p.f. = 126-130 °C y un rendimiento del 94%.

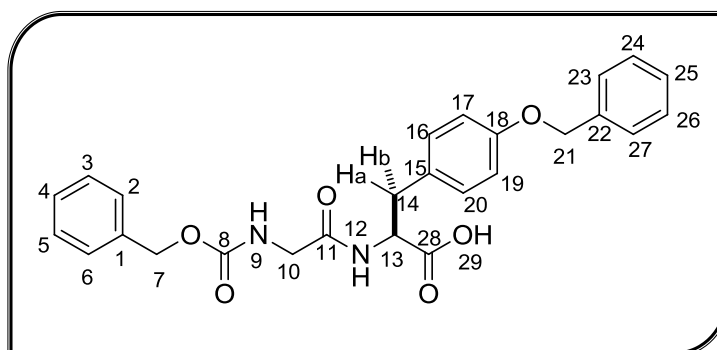


^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 7.87 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-23), 7.31 (m, 5H, H's H-2-6), 7.01 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-16,20), 6.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-17,19), 5.08 (s, 2H, H-7), 4.61 (dd, J = 7.4, 5.4 Hz, 1H, H-13), 3.76 (d, J = 10.2 Hz, 2H, H-10), 3.06 (dd, J = 14.0, 5.3 Hz, 1H, H-14b), 2.91 (dd, J = 13.9, 7.7 Hz, 1H, H-14a).

^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) δ 174.6 (C-22), 171.9 (C-11), 158.9 (C-8), 157.3 (C-18), 138.0 (C-1), 131.4 (C-16, 20), 129.5, 129.0, 128.9, 128.6 (C-2-6), 116.2 (H-17, 19), 67.9 (C-7), 55.1 (C-13), 44.7 (C-10), 37.5 (C-14).

✓ **Cbz-N-Gli-L-Tir(OBn)-OH (2):**

En un matraz balón provisto de agitación y baño de hielo, se colocaron 0.625 g (1.31 mmol) del dipéptido **16** disueltos en la mínima cantidad del sistema THF-H₂O (1:1) y 0.165 g (3.93 mmol) de LiOH•H₂O; la mezcla se dejó reaccionar hasta consumir la materia prima (1 h en promedio, monitoreado por CCP). Posteriormente se concentró el disolvente en rotavapor a presión reducida, el crudo de reacción se resuspendió en H₂O y se acidificó con HCl 1M hasta pH 4, se extrajo con AcOEt (x 3), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó en rotavapor, obteniéndose 0.546 g del producto en forma cristales translúcidos (después de recristalización en una mezcla de disolventes THF-DCM) con p.f. = 130-132 °C, en un rendimiento del 90%.

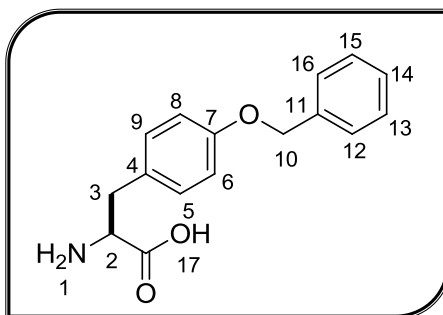


¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7.31 (m, 10H, H-2-6 y H-23-27), 7.10 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-16,20), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-17,19), 5.08 (s, 2H, H-7), 4.98 (s, 2H, H-21), 4.63 (dd, J = 7.6, 5.2 Hz, 1H, H-13), 3.73 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-10), 3.10 (dd, J = 14.0, 5.1 Hz, 1H, H-14b), 2.95 (dd, J = 13.9, 7.7 Hz, 1H, H-14a).

¹³C-RMN (101 MHz, CD₃OD) δ 175.3 (C-28), 172.8 (C-11), 160.1 (C-8), 159.8 (C-18), 139.6 (C-22), 138.9 (C-1), 132.3 (C-16, 20), 131.1 (C-15), 130.4, 130.4, 129.9, 129.8, 129.7, 129.4 (C-2-6, 23-27), 116.8 (C-17, 19), 71.8 (C-21), 68.8 (C-7), 55.9 (C-13), 45.7 (C-10), 38.4 (C-14).

✓ **Tir(OBn) (17):**

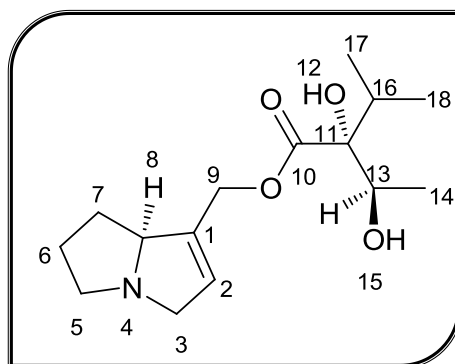
2.2 g del aminoácido *L*-Tirosina (12.14 mmol) se colocaron en un matraz redondo provisto de agitación y fueron disueltos con 12.1 mL de una solución de NaOH 2 N y 13.2 ml de H₂O. Posteriormente se agregaron 1.51 g de CuSO₄•5H₂O (6.07 mmol) disueltos en 6 mL de H₂O. Se observó la formación de un precipitado azul-blancuecino que al agitar se disolvió, quedando una solución azul marino intenso, esta mezcla de reacción se calentó hasta alcanzar 60°C. Posteriormente se enfrió y se le adicionaron 42.35 mL de MeOH y 1.82 mL de NaOH(ac) manteniendo el pH básico. Enseguida se adicionaron 1.44 mL de BrBn (12.14 mmol) y se dejó reaccionar con agitación vigorosa por 3 h (con formación de precipitado azul). Cumplido el tiempo de reacción, la mezcla se filtró al vacío. El precipitado previamente pulverizado se lavó con una mezcla MeOH-H₂O (22:78) y metanol. Posteriormente se hicieron 5 lavados con HCl 1 N para liberar el Cu, quedando un polvo blanco el cual se lavó con H₂O (2 veces). El polvo se dejó secar hasta peso constante, obteniendo así un polvo blanco insoluble en agua, en un rendimiento del 77% con un punto de fusión de 184-188 °C.



¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.45 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-12,16), 7.40 (dd, *J* = 8.0, 6.5 Hz, 2H, H-13,15), 7.34 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-14), 7.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-5,9), 6.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-6,8), 5.05 (s, 2H, H-10), 4.00 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-2), 3.04 (m, 2H, H-3).

✓ **Coromandalinina (24):**

500 g de la raíz molida de la planta *Chromolaena pulchella* se sometió a 3 reflujos con MeOH por 6 h cada uno. El disolvente se concentró en el rotavapor y se dejó secar a temperatura ambiente, obteniendo 25 g de extracto. A este extracto metanólico se le realizó la “extracción selectiva de pirrolizidinas”, obteniéndose 480 mg del producto (Extracto de pirrolizidinas, EP), como una miel amarillo-naranja.

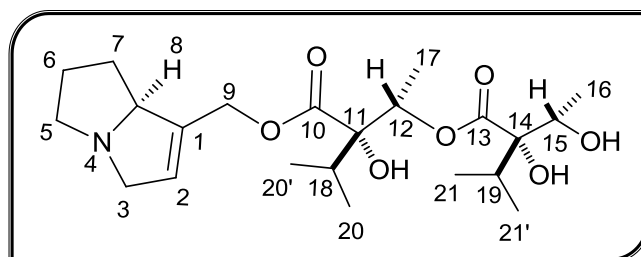


¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.96 (s, 1H, H-2), 4.86 (d, *J* =, 13.6 Hz, 1H, H-9a), 4.77 (d, *J* =, 12.8 Hz, 1H, H-9b), 4.17 (s-a, 1H, H-8), 4.12 (c, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-13), 3.94 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, H-3a) 3.43, (t, *J* = 7.56 Hz, 1H, H-3b), 3.28 (t, *J* = 7.6, 1H, H-5a) 2.74 (ddd, *J* = 11.5, 9.1, 6.4 Hz, 1H, H-5b), 2.10–1.91 (m, 5H, H-6, 7, 16), 1.21 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-14), 0.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-17) 0.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-18).

✓ **Diviridiflorato de Necina (25):**

Se partió de un lote de 550 g de raíz de *Chromolaena pulchella* el cual fue sometido a 3 reflujos con MeOH por 6 h cada uno. El disolvente se concentró en el rotavapor y se dejó secar a temperatura ambiente obteniéndose 29.6 g de extracto metanólico (EM). Este extracto se disolvió con una solución de H₂SO₄ 1 M (296 mL) y se adicionaron 14.8 g de Zn⁰, dejando reaccionar por 24 h, al día siguiente la mezcla se filtró y se adicionó NH₄OH hasta un pH básico (aprox. 12), posteriormente se extrajo con CHCl₃ (3 x 300 mL), se concentró en el rotavapor a sequedad. La purificación del extracto (0.6 g) se llevó a cabo mediante cromatografía en columna

utilizando sistemas DCM-MeOH-NH₄OH en polaridades crecientes obteniendo 0.015 g del alcaloide pirrolizidínico **9** como una miel ámbar.



¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.79 (s, 1H, H-2), 5.31 (c, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-17), 5.07 (s-a, 1H, H-8), 4.81 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, H-9a), 4.72 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, H-9b), 4.56 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, H-3a), 4.03 (c, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-15), 3.80 (ddd, *J* = 11.3, 5.7 Hz, 2H, H-5a), 3.70 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H, H-3b), 2.93 (ddd, *J* = 6.1, 8.0, 11.3 Hz, 1H, H-5b), 2.37 (ddd, *J* = 12.9, 6.5 Hz, 1H, H-7a), 2.15 (sept, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-18), 2.10–1.95 (m, 3H's, H-6,19), 1.85 (ddd, *J* = 13.0, 6.6 Hz, 1H, H-7β), 1.31 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, H-17), 1.18 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-16), 1.00–0.86 (4d's, *J* = 6.97 Hz, 12H, H-20, 20', 21 y 21').

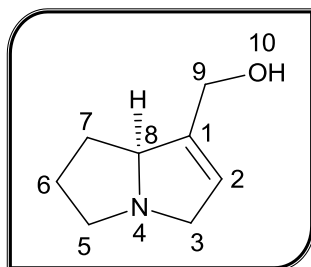
❖ Reacción de hidrólisis de Pirrolizidinas:

Los alcaloides pirrolizidínicos **24**, **25** y **XXII** (en mezcla, EP) se sometieron a reacción de hidrólisis básica empleando NaOH como base y MeOH como disolvente, con radiación de Microondas (MO) a 100 W y 80 °C de temperatura, por 135 min. Después del tiempo de reacción se realizó la extracción con CHCl₃ (x 3) y posterior purificación.

✓ Supinidina (**4**):

Partiendo de 800 mg de Extracto de Pirrolizidinas (EP) se realizó la reacción de Hidrólisis básica en MO, empleando 800 mg de NaOH diluida en 4 mL de H₂O,

y 60 mL de MeOH como disolvente, obteniéndose después de la purificación por cromatografía en columna (polaridad Metanol, 100%) 36 mg del compuesto **4**.

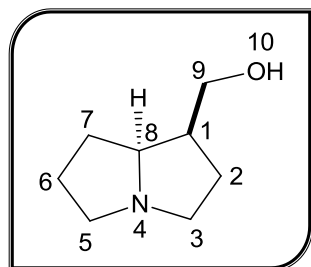


¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.48 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-2), 4.22 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, H-9b), 4.21 (s, 1H, H-8) 4.12 (dd, *J* = 14.7, 1.5 Hz, 1H, H-9a), 3.88 (d-a, *J* = 15.2 Hz, 1H, H-3β), 3.31 (ddd, *J* = 15.2, 4.3, 2.1 Hz, 1H, H-3α), 3.08 (ddd, *J* = 12.0, 5.8 Hz, 1H, H-5α), 2.55 (ddd *J* = 12.0, 6.8, 6.6 Hz, 1H, H-5β), 1.97 (ddd, *J* = 12.5, 9.8, 6.2 Hz, 1H, CH₂-C-8, H-7α), 1.82–1.70 (m, H-6), 1.52 (ddd, *J* = 14.2, 12.3, 7.3 Hz, 1H, H-7β).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 144.1 (C-1), 120.7 (C-2), 71.1 (C-8), 61.8 (C-3), 59.7 (C-9), 56.5 (C-5) 30.3 (C-7) 25.7 (C-6).

✓ **Isorretronecanol (29):**

De las fracciones eluidas en una mezcla MeOH-NH₄OH (1:1) se obtuvieron aprox. 15 mg del compuesto **29**.



¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3.67–3.58 (2 dd, *J* = 12.8, 6.35 Hz, 2H, H-9a y 9b), 3.25 (ddd, *J* = 13.3, 6.4 Hz, 1H, H-8), 3.16 (dddd, *J* = 10.1, 6.9, 3.2 Hz, 1H, H-

3 α), 2.98 (dddd, $J = 10.7, 6.3$ Hz, 1H, H-5 α), 2.61 (ddd, $J = 12.2, 7.3$ Hz, 1H, H-5 β), 2.55 (ddd, $J = 9.8, 6.3$ Hz, 1H, H-3 β), 2.06–1.91 (m, 3H, H-2 α , 7 α y H-1), 1.90–1.71 (m, 2H, H-6 α,β), 1.65 (dddd, $J = 11.4, 9.0, 8.2$ Hz, 1H, H-7 β), 1.54 (dddd, $J = 13.2, 12.64, 7.0, 6.7$ Hz, 1H, H-2 β).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 67.9 (C-8), 65.1 (C-9), 54.7 (C-5), 54.5 (C-3), 48.2 (C-1), 31.8 (C-2), 30.0 (C-7), 25.7 (C-6).

8. REFERENCIAS

1. Cervera V, J. M. J. "Estudio tendientes a la síntesis de péptidos cíclicos quirales". Tesis de licenciatura. Q.F.B.-UMSNH, Morelia, **2010**.
2. Juaristi, E. *Diseño y producción de Fármacos*. México: El Colegio Nacional; **2007**.
3. Gutiérrez R, A.; *et al.* Relevancia de los Productos Naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.* **2009**, *103*, 409-419.
4. Newman, D. y Cragg, G.M. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **2012**, *75*, 311-335.
5. Navas-Méndez, J. Bioquímica estructural y metabólica. Aminoácidos. Universidad de Cantabria [en línea] <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/bioquimica-estructural-y-metabolica/materiales-de-clase/Tema%202.%20Aminoacidos.pdf> [Consulta 7 septiembre 2014]
6. Bailey, P.D. *An introduction to Peptide chemistry*. England: Wiley; **1997**.
7. Sathe, M. y Kaushik M.P. An efficient method for the esterification of amino acids using silica chloride. *Catalysis Communications* **2006**, *7*, 644-646.
8. Fernández G. "Aminoácidos-péptidos-proteínas" 01/02/**2009**. [En línea] <http://www.quimicaorganica.org/aminoacidos-peptidos/525-aminoacidos.html> */533-sintesis-de-peptidos-proteccion-de-grupos.html [Consulta Agosto 2014].
9. Lira-Navarrete, E. *Síntesis de Péptidos*. UNAM-IB. **2007**.
10. Solomons, T. W. G. *Organic Chemistry*, 6th ed. USA: John Wiley & Sons, Inc.; **1996**.
11. Greene, W.T. y Wuts, P.G.M. *Protective groups in Organic Synthesis*. 2nd ed. USA: John Wiley & Sons, Inc; **1991**.

12. Soriano-Mora, J. M. Tesis doctoral "Nuevos reactivos poliméricos para el acoplamiento y protección de aminoácidos". Facultad de Ciencias, **2002**.
13. Albericio, F.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D.; Nájera, C. *Organic Preparations and Procedures International* **2001**, *33*, 203.
14. Griehl, C.; Hoffmann, F.; Brandt, W.; Plass, M. *Peptides 1998. Proceedings of the 25th European Peptide Symposium*, Bajusz, S.; Hudecz, F., Eds., pág. 212, Akadémiai Kiadó, Budapest, **1999**.
15. Joullié, M.M. and Lassen, K. M. Evolution of amide bond formation. *ARKIVOC; Department of Chemistry, University of Pennsylvania* **2010**, *8*, 189-250.
16. Montalbetti, C. A. G. N. y Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
17. Benoiton, N. L. *Chemistry of Peptide Synthesis*. Canada: Taylor and Francis group; **2005**.
18. Xudong, M.; Wu Chunfu; Wang, W.; Li, X. Peptides from plants: A new source from antitumor drug research. *Asian Journal of traditional Medicines*. **2006**.
19. Li, J. L.; Han, S. C.; Yoo, E. S.; Shin, S.; Hong, J.; Cui, Z.; et al. Anti-inflammatory amino acid derivatives from the Ascidian *Herdmania momus*. *Journal of Natural Products* **2011**, *74*, 1792-1797
20. Christen, S.; Petermans, E.; Stocker, R. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **1990**, *87*, 2506-2510.
21. Bitzer-Qintero, O. K.; Dávalos-Marín, A.J.; Gabriel-Ortiz, G.; et al. Antioxidant activity of tryptophan in rats under experimental endotoxic shock. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2010**, *64*(1), 77-81.
22. Seo, Hyo-Suc; Kwak, S. Y.; Lee, Y-S. Antioxidative activities of histidine containing caffeic acid-dipeptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 4266-4272.

23. Anh-Ngo Q, Roussi Fanny, Cormier A, Thoret S, Knossow M, Guenard D, Gueritte F. Synthesis and Biological Evaluation of Vinca alkaloids and Phomopsin Hybrids. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 134-142.
24. Burstein, S.; McQuain, C.; Salmonsén, R.; Seicol, B. N-Amino acid linoleoyl conjugates: Anti-inflammatory activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 872-875.
25. Sharma, C. S.; Nema, R. K.; Sharma, V. K. Synthesis and screening for analgesic and anti-inflammatory activities of some novel amino acid-containing bicyclo compounds. *Pharmaceutical Chemistry* **2009**, 1, 170-174.
26. Sajadi, Z.; Almahmood, M. Antitumor and antiinflammatory agents: N-Benzoyl-Protected Cyanomethyl esters of amino acids. *Journal of Medicinal Chemistry* **1979**, 22 (11), 1419-1422.
27. Toma, W.; Trigo, J. R.; Bensuaski de Dula, A. C.; Monteiro, A. R. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, 95, 345-351.
28. Chen, T.; Nan, M.; Fu, P. P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids, *Journal of Applied Toxicology* **2010**, 30, 183-196.
29. Fattoruso, E., Tagliatela-Scafati. Modern alkaloids. Structure, isolation, synthesis and biology. Alemania: Ed. Wiley-VHC; **2008**.
30. Roeder, E.; Widenfeld, H. Pyrrolizidine alkaloids in medical plants of Mongolia, Nepal, and Tibet. *Pharmazie* **2009**, 64, 699-716.
31. Liddell, J. R. Pyrrolizidine alkaloids. *Natural Products Reports* **1999**, 16, 499-507
32. Nibreta, E.; Sporera, F.; Asresb, K. Antiparasitic and cytotoxic activities of pyrrolizidine alkaloid-producing plants of Ethiopia. *Journal of pharmacy and pharmacology* **2009**, 61, 801-808.
33. Liddell, J. R. Pyrrolizidine alkaloids. *Natural Products Reports* **1997**, 14, 653-660.

34. Zalkow, L. H.; Glinski, J. A.; Gelbaum, L. T.; Fleischmann, T. J.; McGowan, L. S. Synthesis of pyrrolizidine alkaloids indicine, intermidine, lycopsamine and analogos and their *N*-oxydes. Potential antitumoral agents, *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, *28*, 687-694
35. Gómez-Hurtado, M.A.; Torres-Valencia, J.M.; Manriquez-Torres, J.; del Río, R.E.; Motilva, V.; García-Muriño, S.; Avila, J.; Talero, E.; Cerde-García-Rojas, C.M.; Joshep Nathan, P. Absolute configuration of labdanes and *ent*-clerodanes from *Chromolaena pulchella* by vibrational circular dichroism. *Phytochemistry* **2011**, *72* (4-5), 409-414.
36. Gómez H, M. A. Tesis Doctoral "Estudio Químico y Biológico de *Chromolaena pulchella*". UAEH, **2011**.
37. Gómez-Hurtado, M. A.; *et al.* Supinidine Viridiflorates from the Roots of *Chromolaena pulchella*. *Natural products communications* **2013**, *8*(12), 1711-1712.
38. Frankel, M.; Ladkany, D.; Gilon, C.; Wolman, Y. The preparation of alkyloxycarbonyl aminoacids and their *N*-hidroxysuccinimide esters. *Tetrahedron Letters* **1966**, *7* (39), 4765-4768.
39. Chaudhary, A.; Girgis, M.; Prashad, M.; Hu, B.; Har, D.; Repic, O. y Blacklock, T.J. Using mixed anhydrides from amino acids and isobutil chloroformate in *N*-acylations: a case study on the elucidation of mechanism of urethane formation and amino acid liberation using carbon dioxide as the probe. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 5543–5546.
40. Bodansky, M. and Bodansky, A. *The practice of peptide synthesis*, 2nd ed. Germany: Springer-Verleg Berlin Heidelberg; **1994**.
41. Pérez-Castorena, A.L.; Arciniegas, A.; Castro, A.; Villaseñor, J.L.; Toscano, R.A.; Romo de Vivar, A. Pyrrolizidine alcaloids from *Senecio roseus* and *Senecio helodes*. *Journal of Natural Products* **1997**, *60*, 1322-1325.
42. Camps, P.; Pérez, F.; Soldevilla, N. (*R*)- and (*S*)- 3-Hydroxy-4-4-dimethyl-1-phenyl-2-pyrrolidinone as chiral auxiliaries for the asymmetric synthesis of α -hydroxy acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8* (11), 1977-1994.

9. ANEXOS

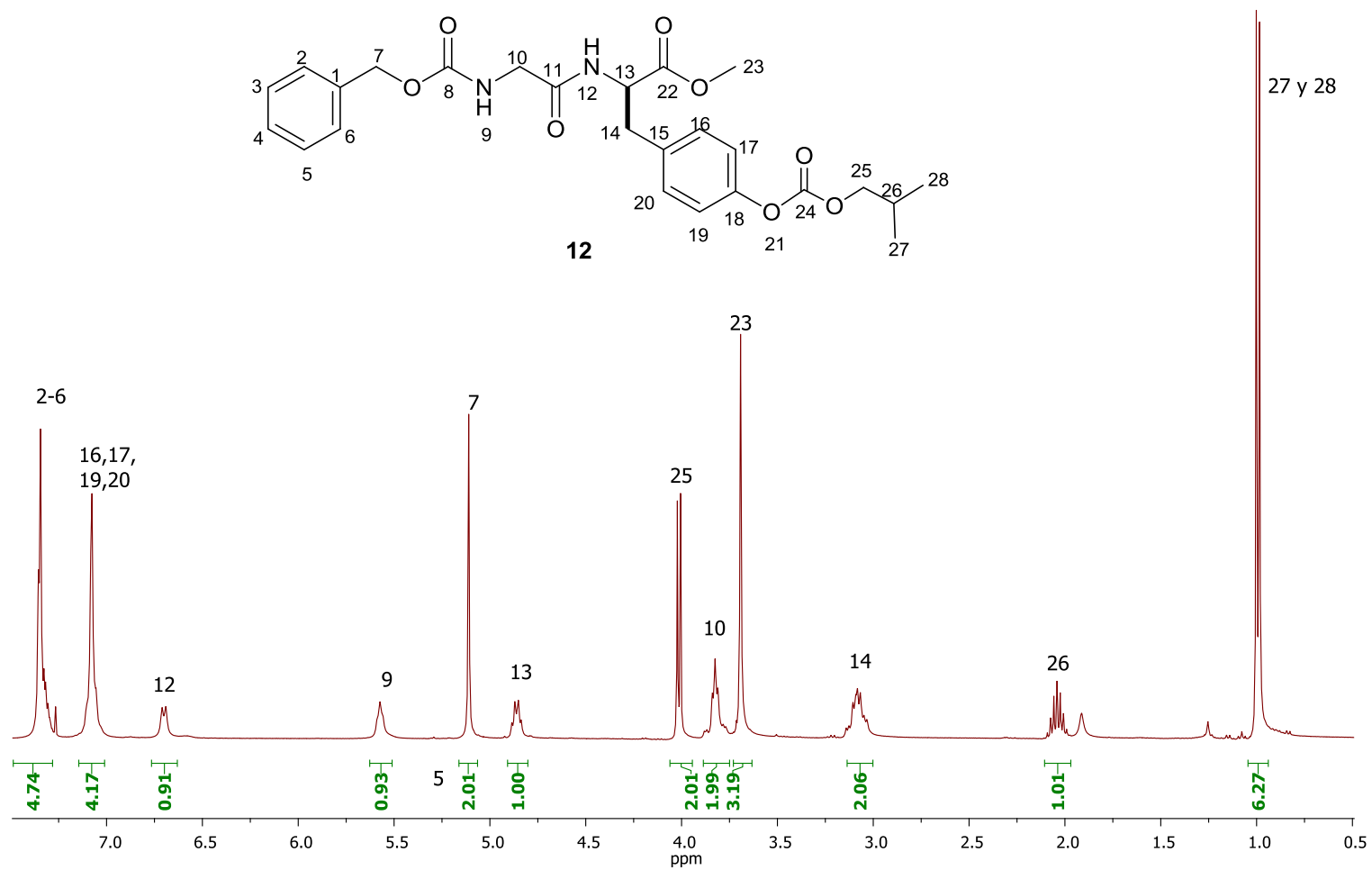


Figura 9.1. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **12** (CDCl_3 , 400 MHz).

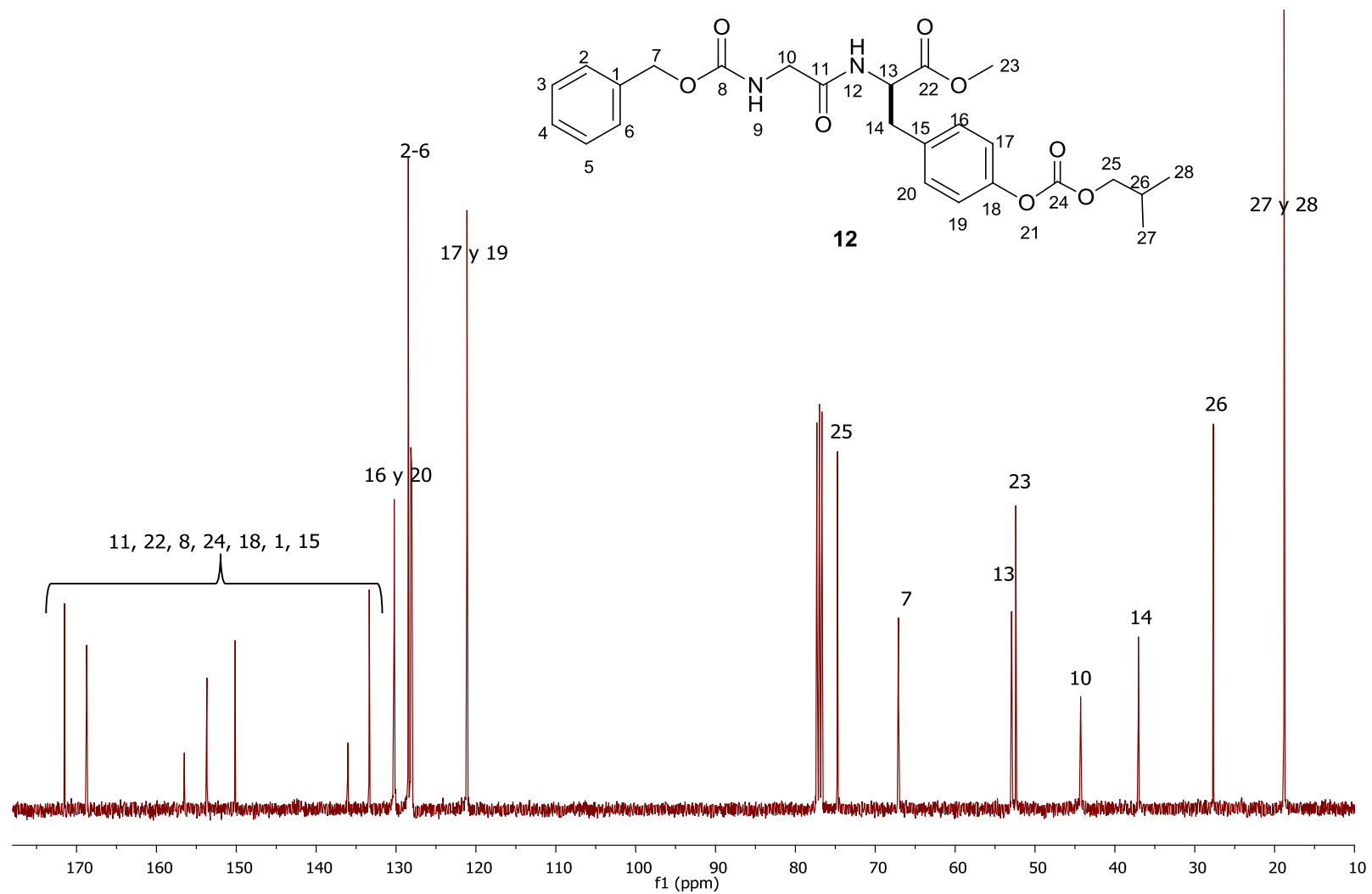


Figura 9.2. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **12** (CDCl_3 , 100 MHz).

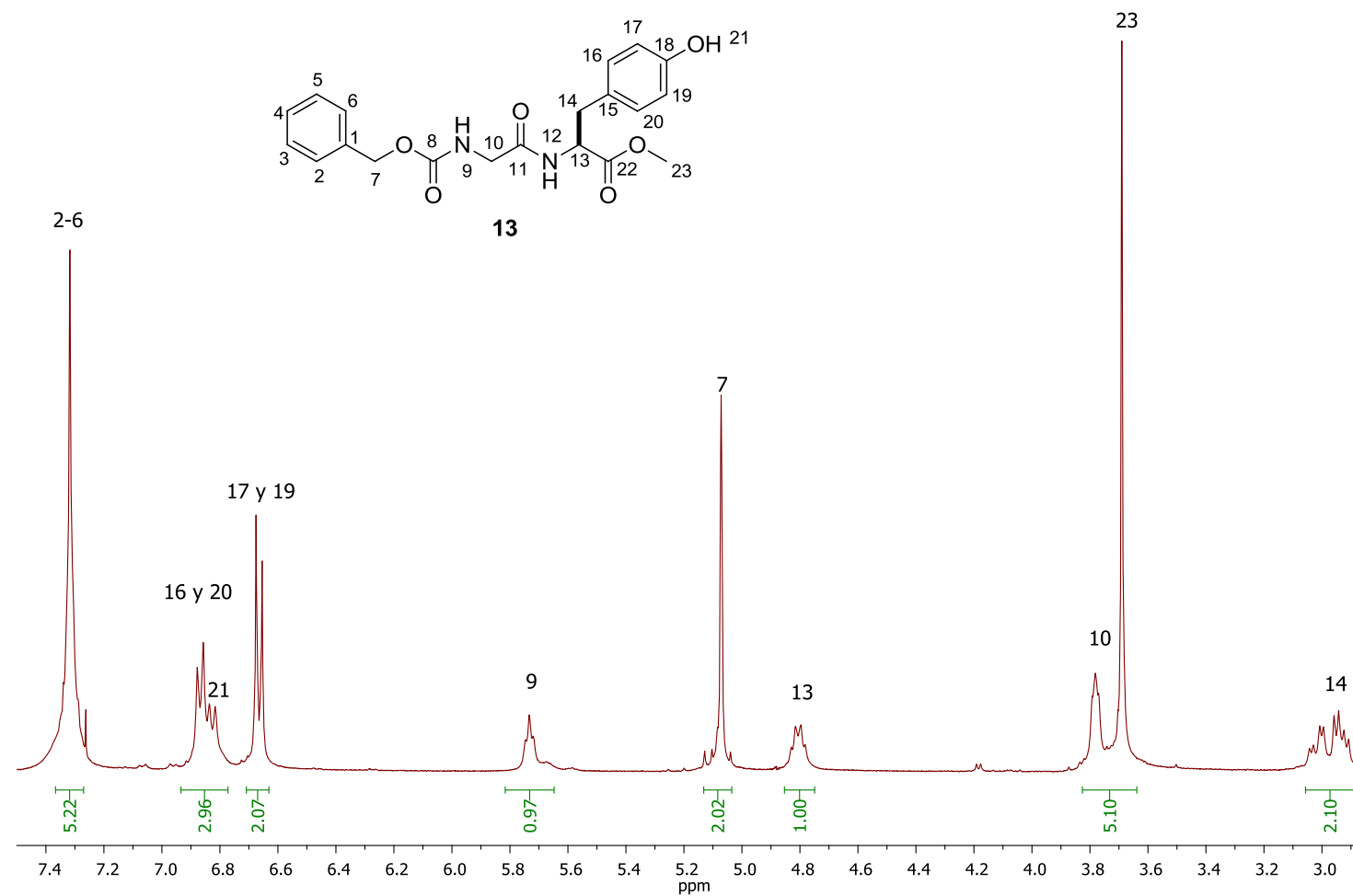


Figura 9.3. Espectro de RMN de ¹H del Dipéptido Cbz-N-Gli-Tir-O-Me (13) (CDCl₃, 400 MHz).

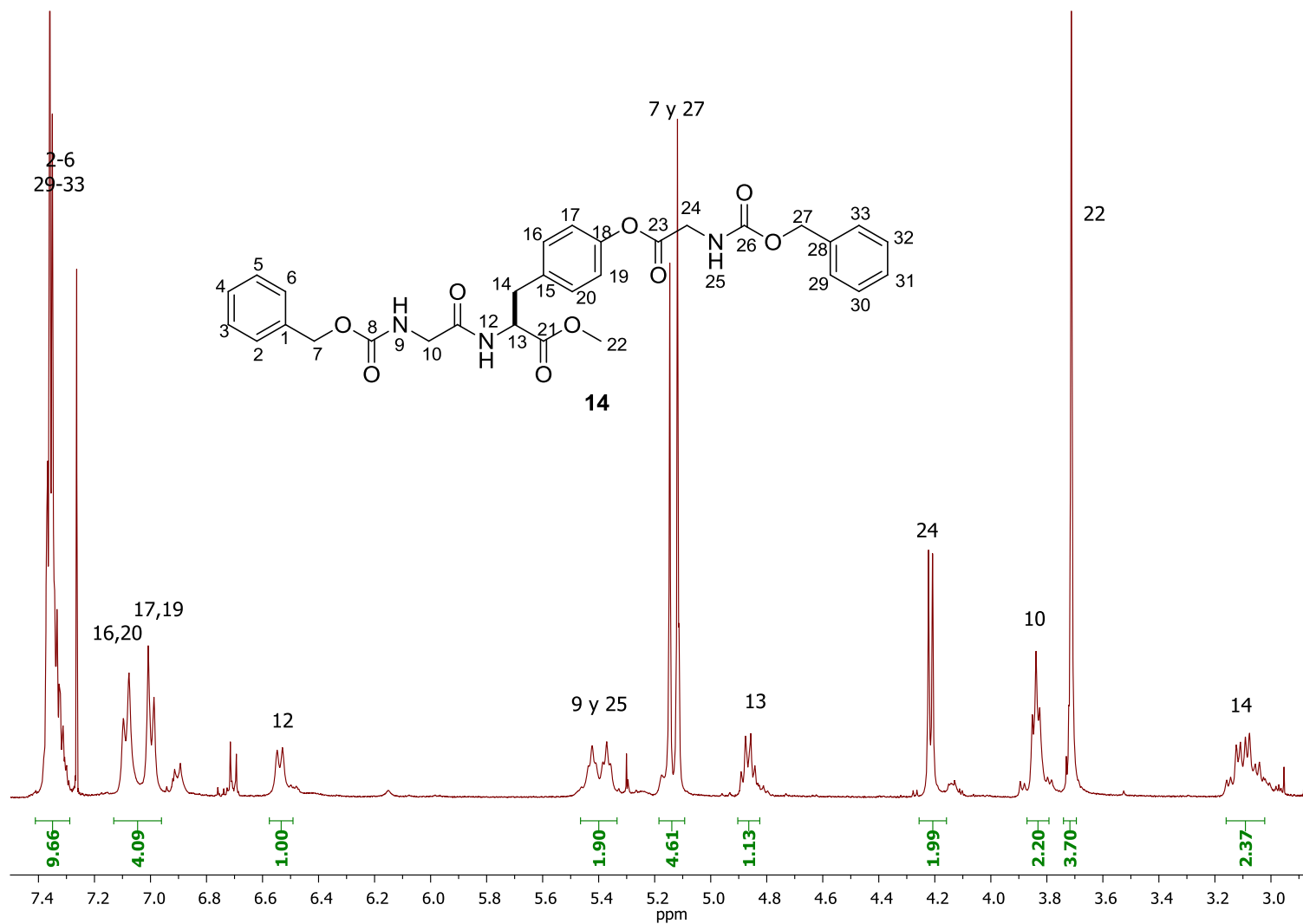


Figura 9.4. Hesppectro de RMN de ¹H del compuesto **14** (CDCl₃, 400 MHz).

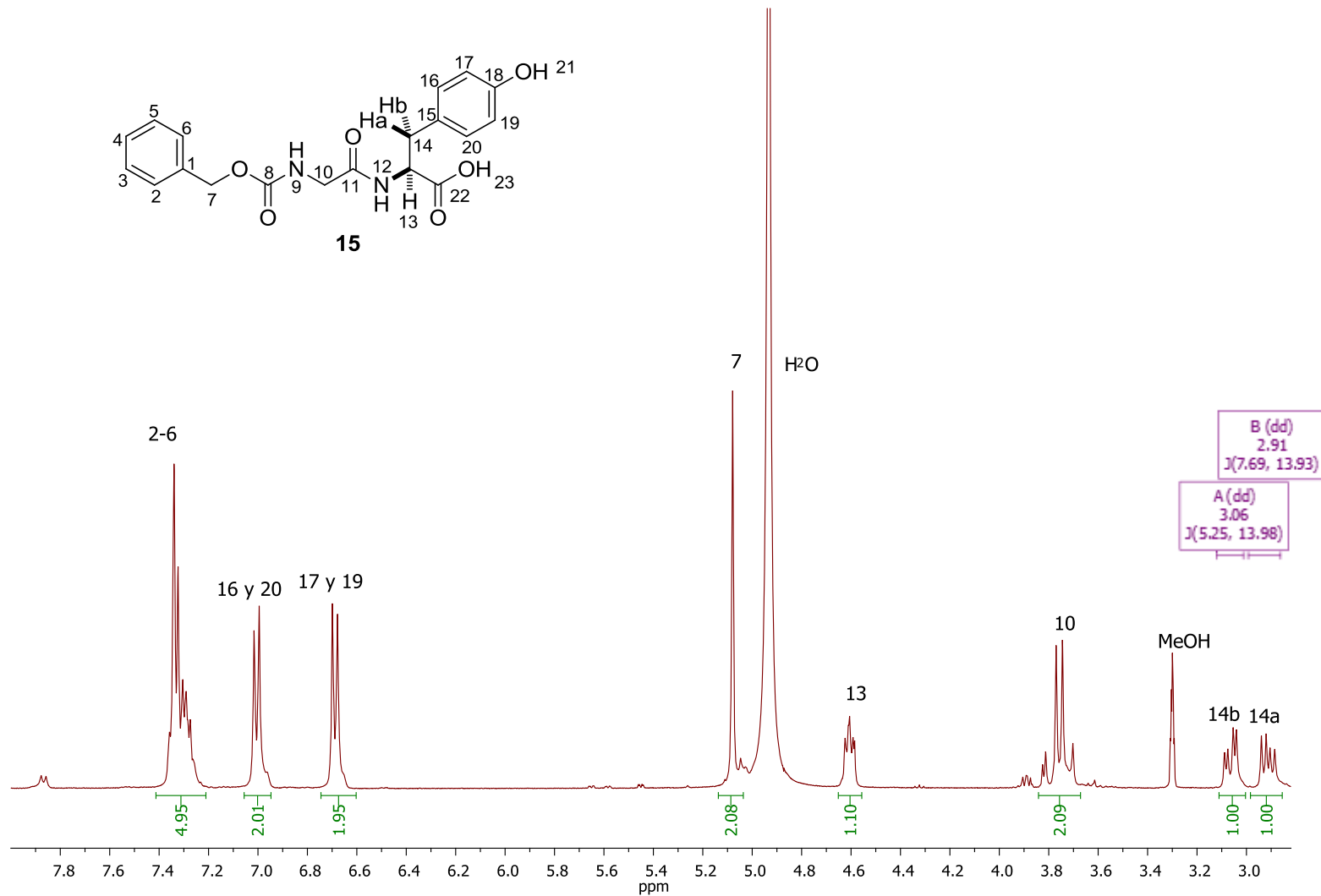


Figura 9.5. Espectro de RMN de ^1H del éster **13** hidrolizado (Ácido **15**) (CD_3OD , 400 MHz).

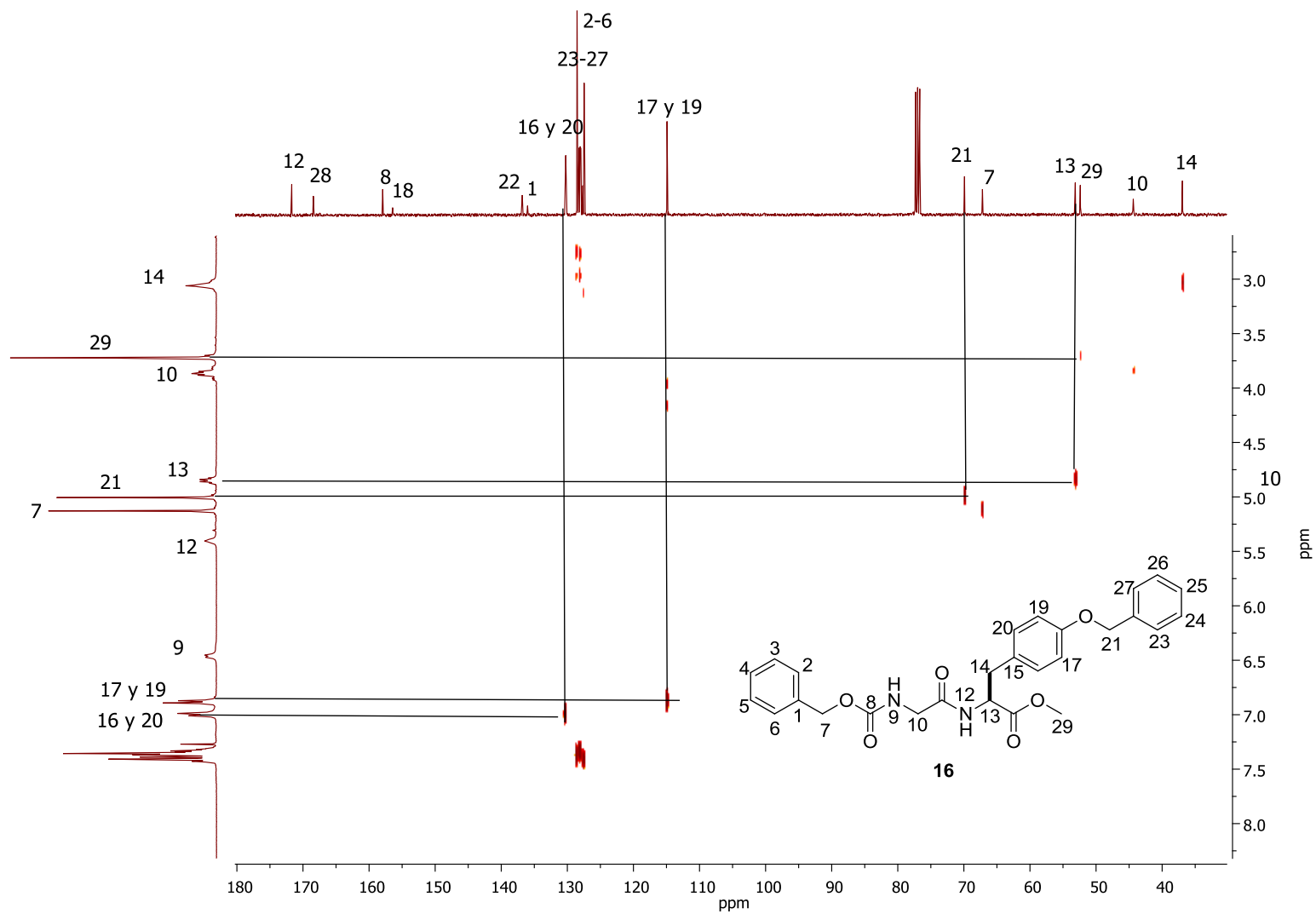


Figura 9.6. Espectro HETCOR del compuesto **16** [Cbz-Gli-Tir(OBn)-OMe] (CDCl_3 , 400 MHz).

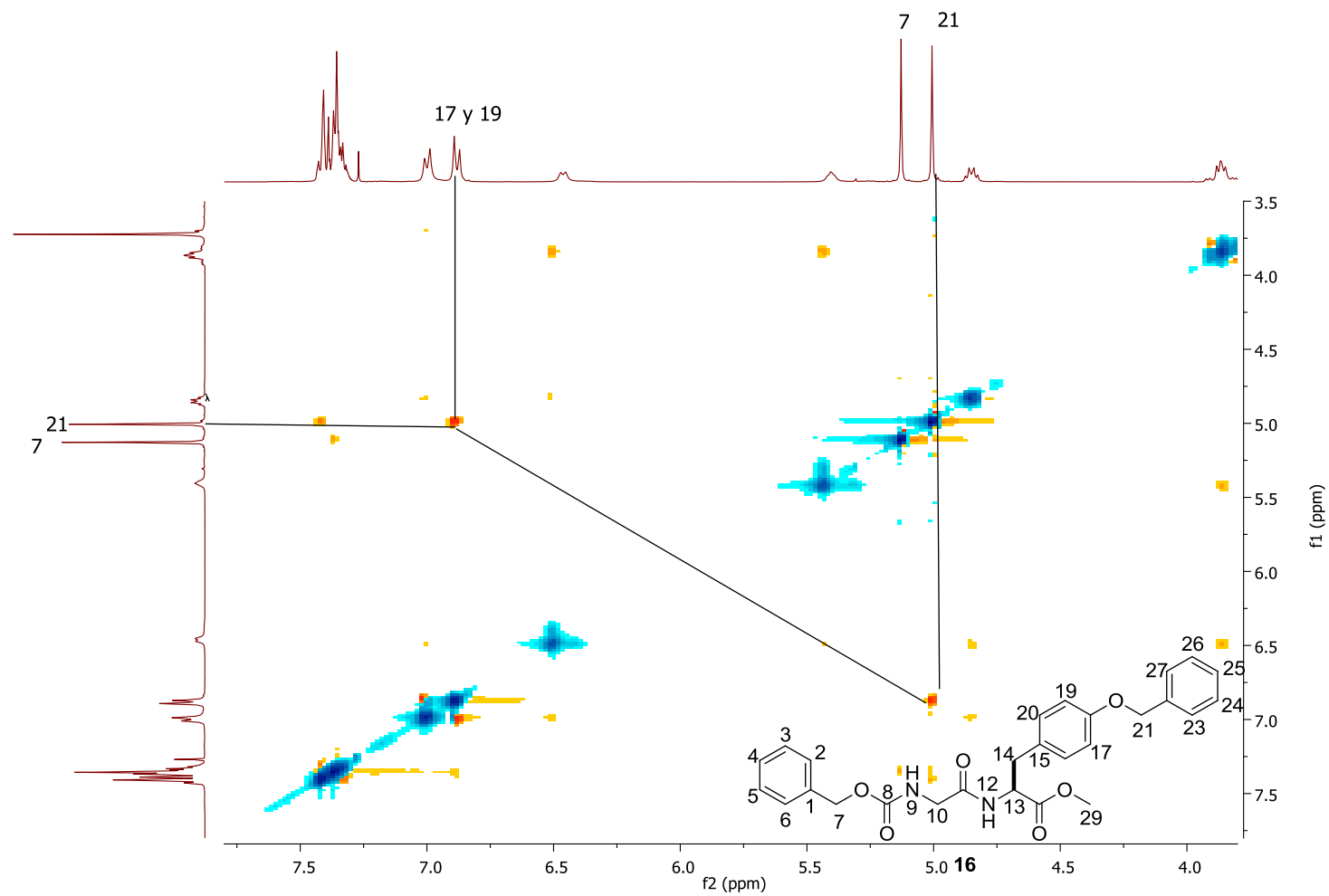


Figura 9.7. Espectro NOESY del Dipéptido **16**. (CDCl₃, 400 MHz). Énfasis en distinguir H-21 de H-7.

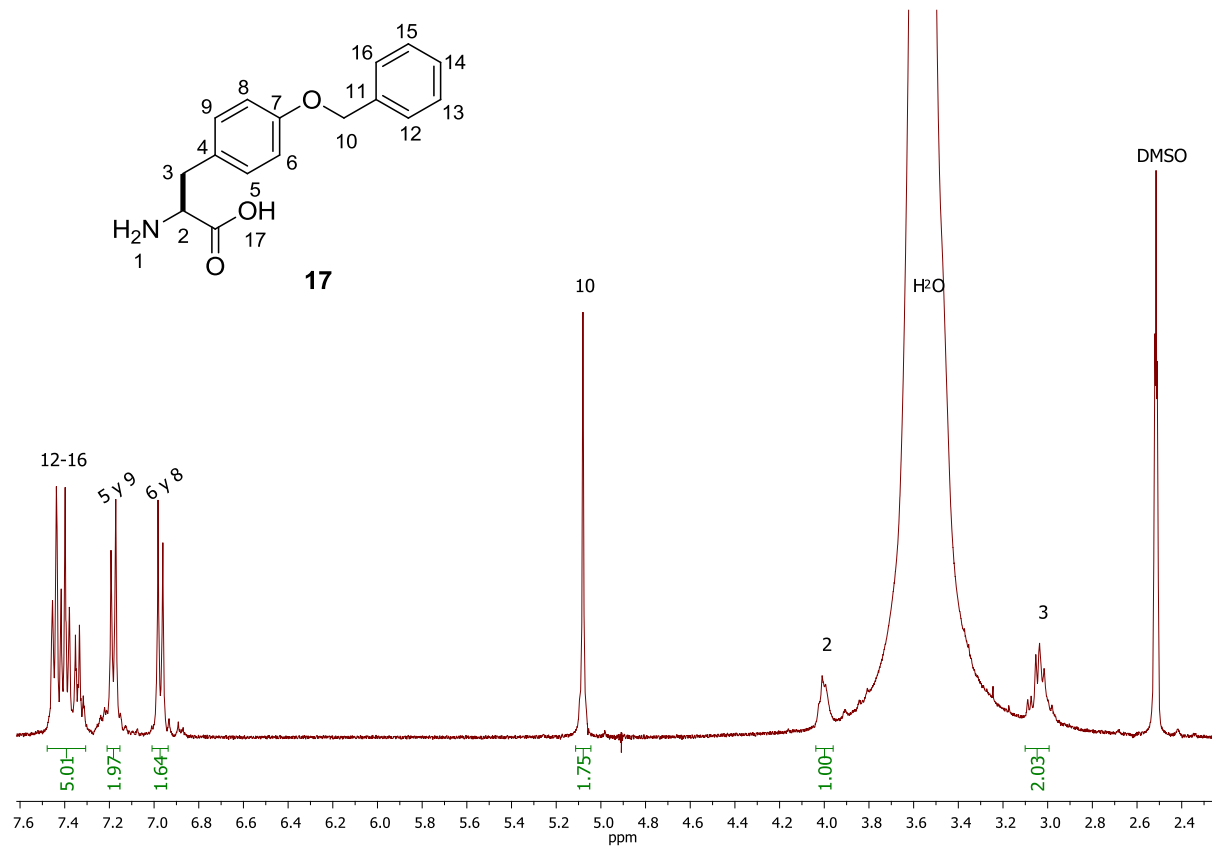


Figura 9.8. Espectro de RMN de ¹H del compuesto Tir(OBn) (**17**) [(CD₃)₂SO, 400 MHz].

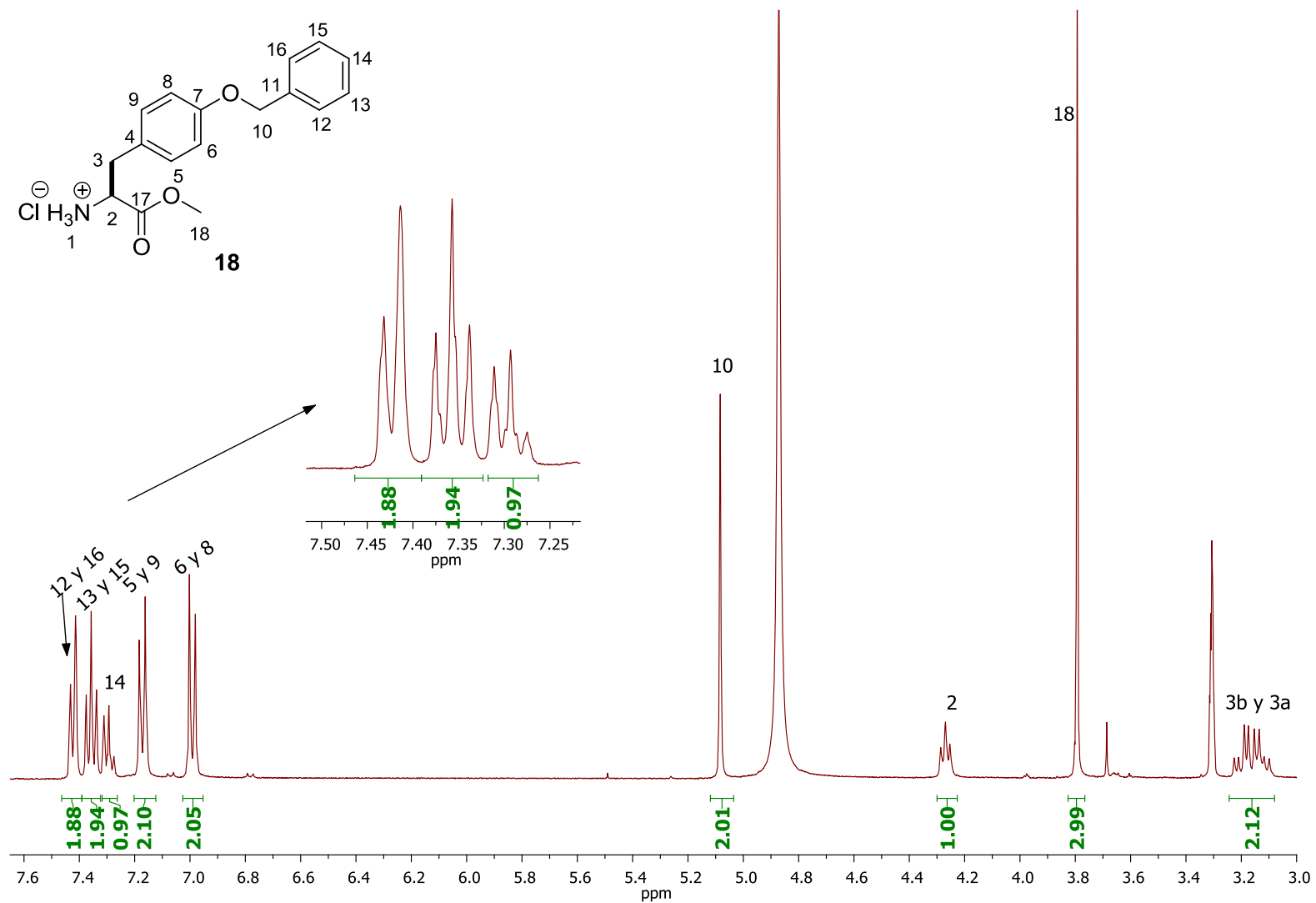


Figura 9.9 Espectro de RMN de ¹H de la Cl-H₃N⁺-Tir(OBn)-OMe (**18**) (CD₃OD, 400 MHz).

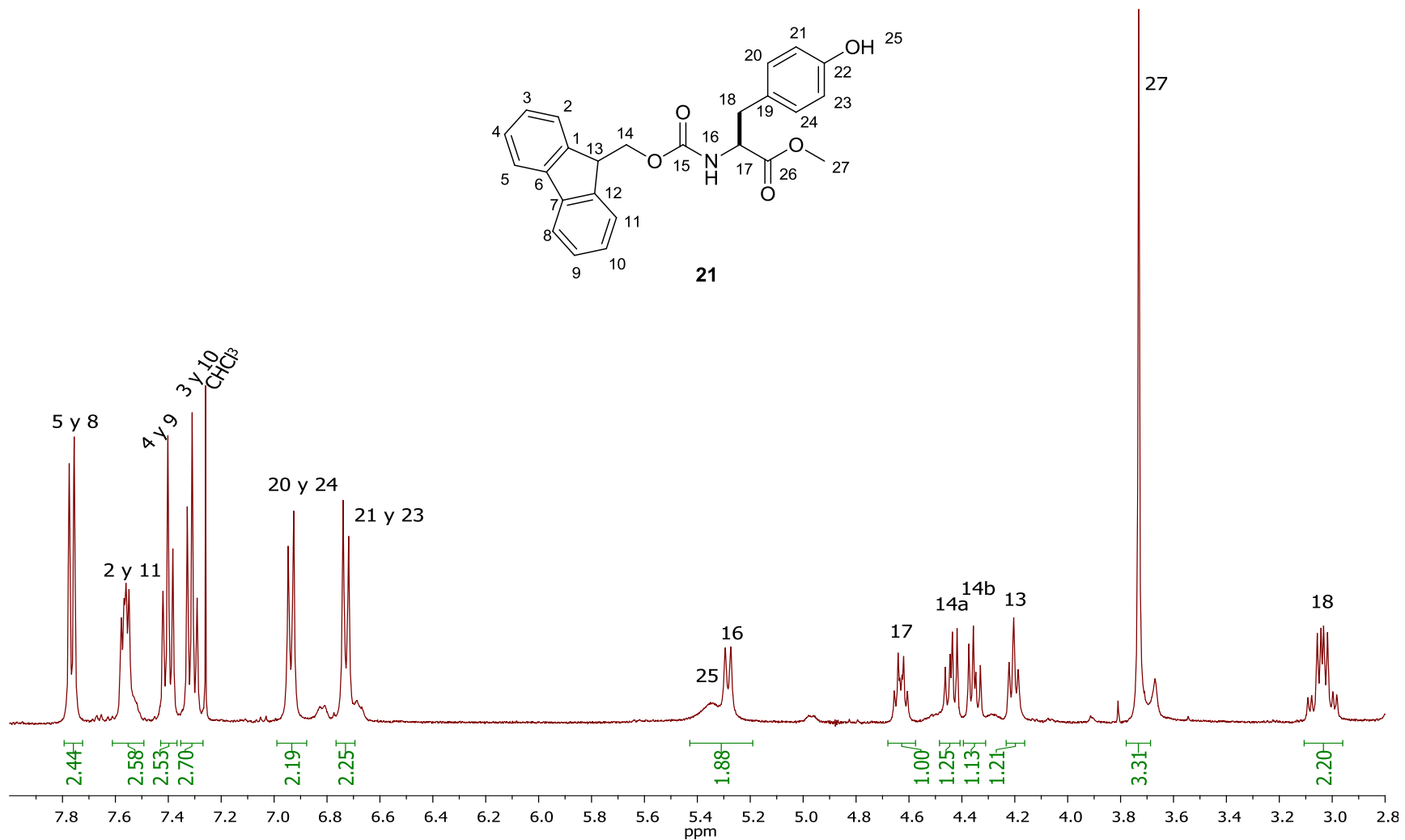


Figura 9.10. Espectro de RMN de ¹H de Fmoc-N-L-Tir-OMe (21) (CDCl₃, 400 MHz).

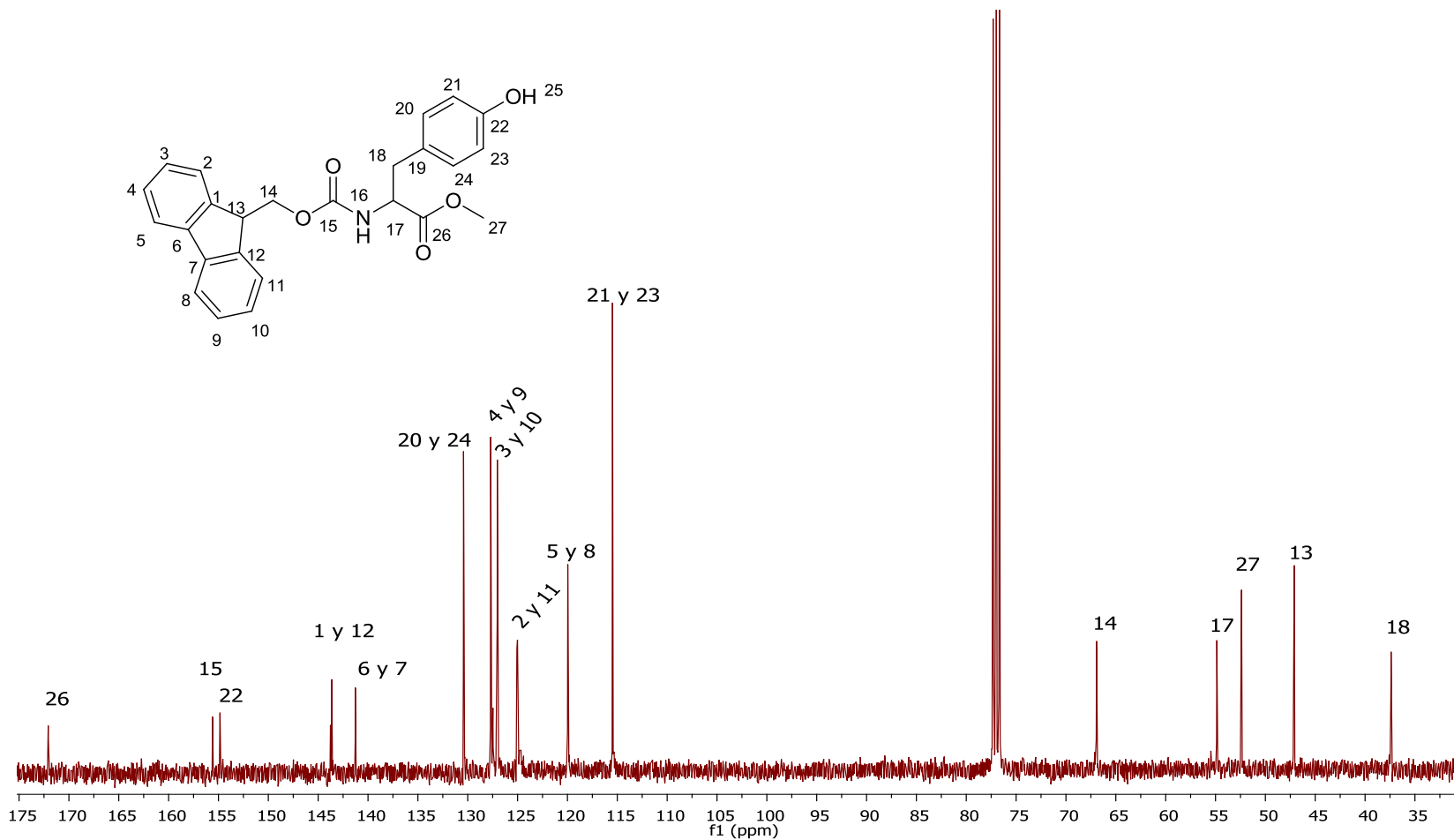


Figura 9.11. Espectro de RMN de ¹³C de Fmoc-N-L-Tir-OMe (21) (CDCl₃, 100 MHz).

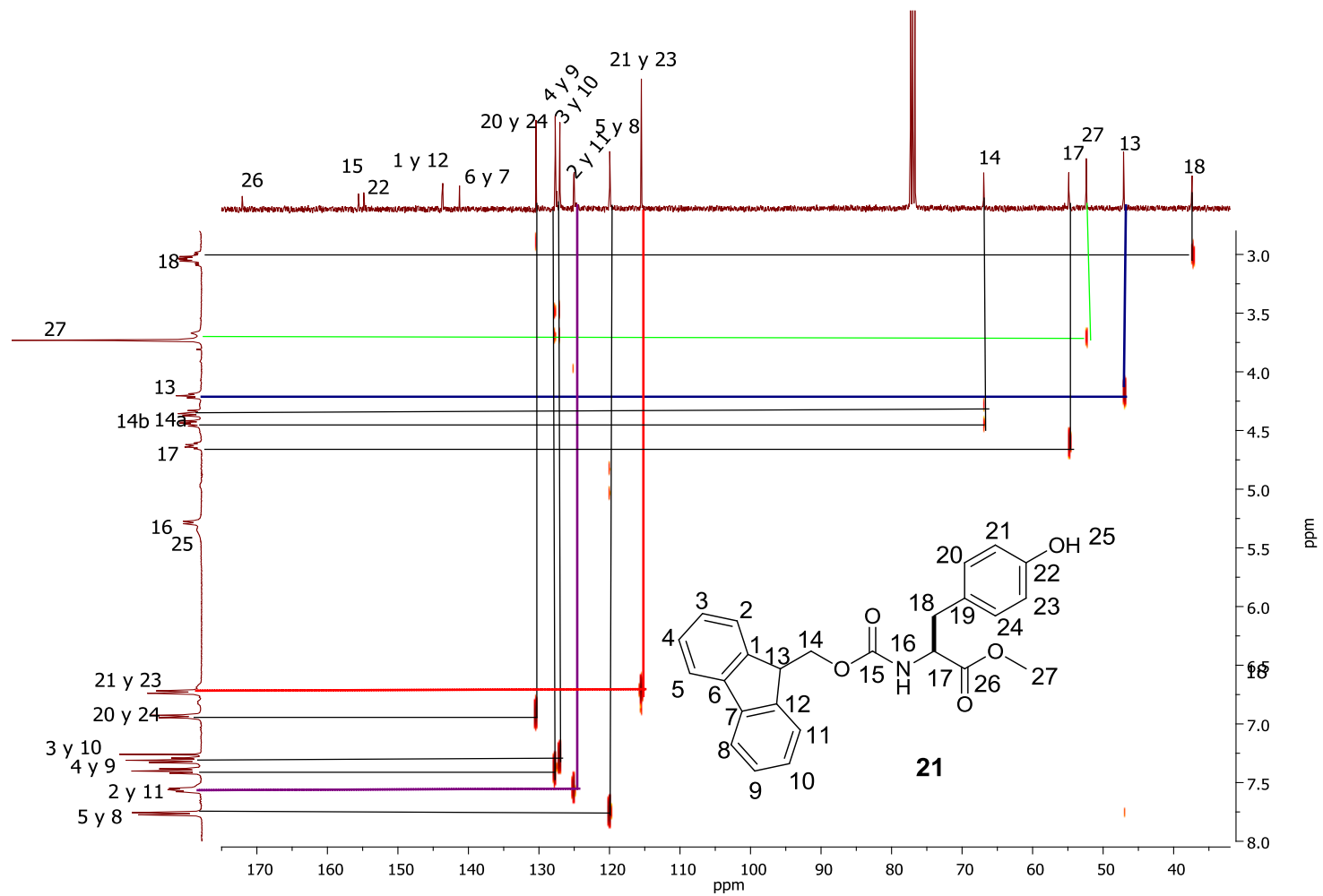


Figura 9.12. Espectro HETCOR de Fmoc-N-Tir-O-Me (21).

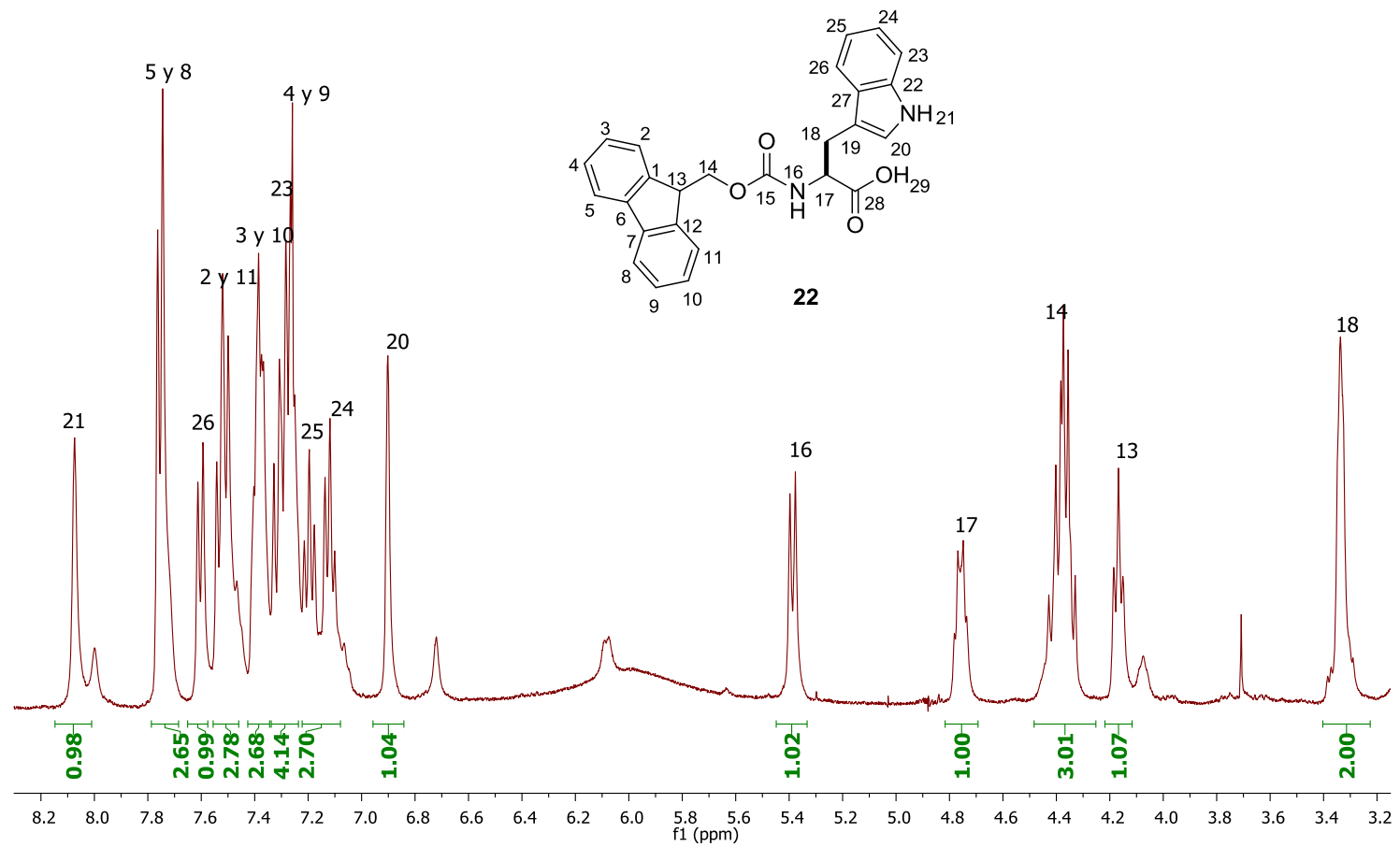


Figura 9.13. Espectro de RMN de ¹H de Fmoc-N-L-Trp (22) (CDCl₃, 100 MHz).

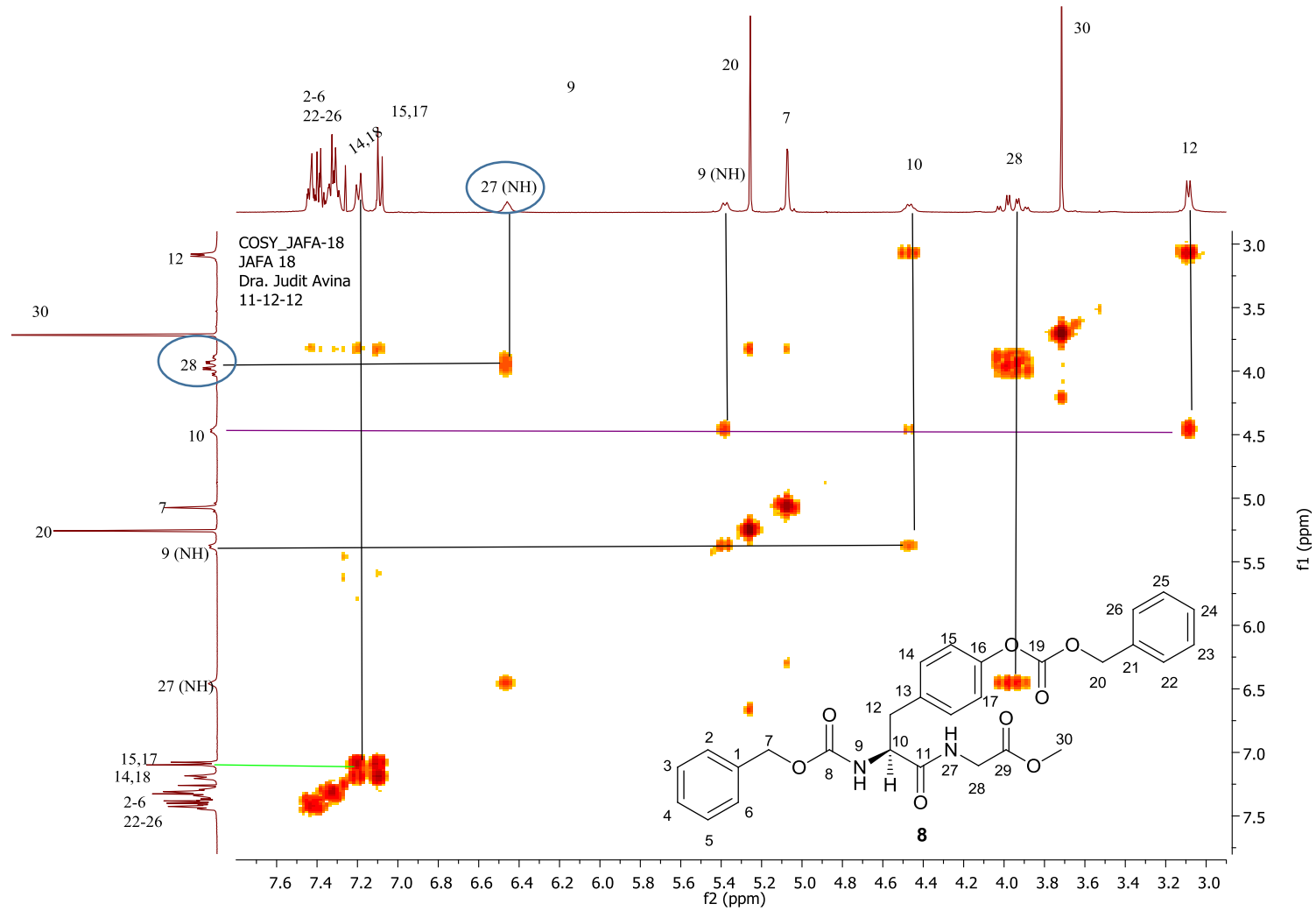


Figura 9.14. Espectro COSY (Cbz)₂-Tir-Gli-OH (**8**). Énfasis en distinguir NH-9 y NH-27.

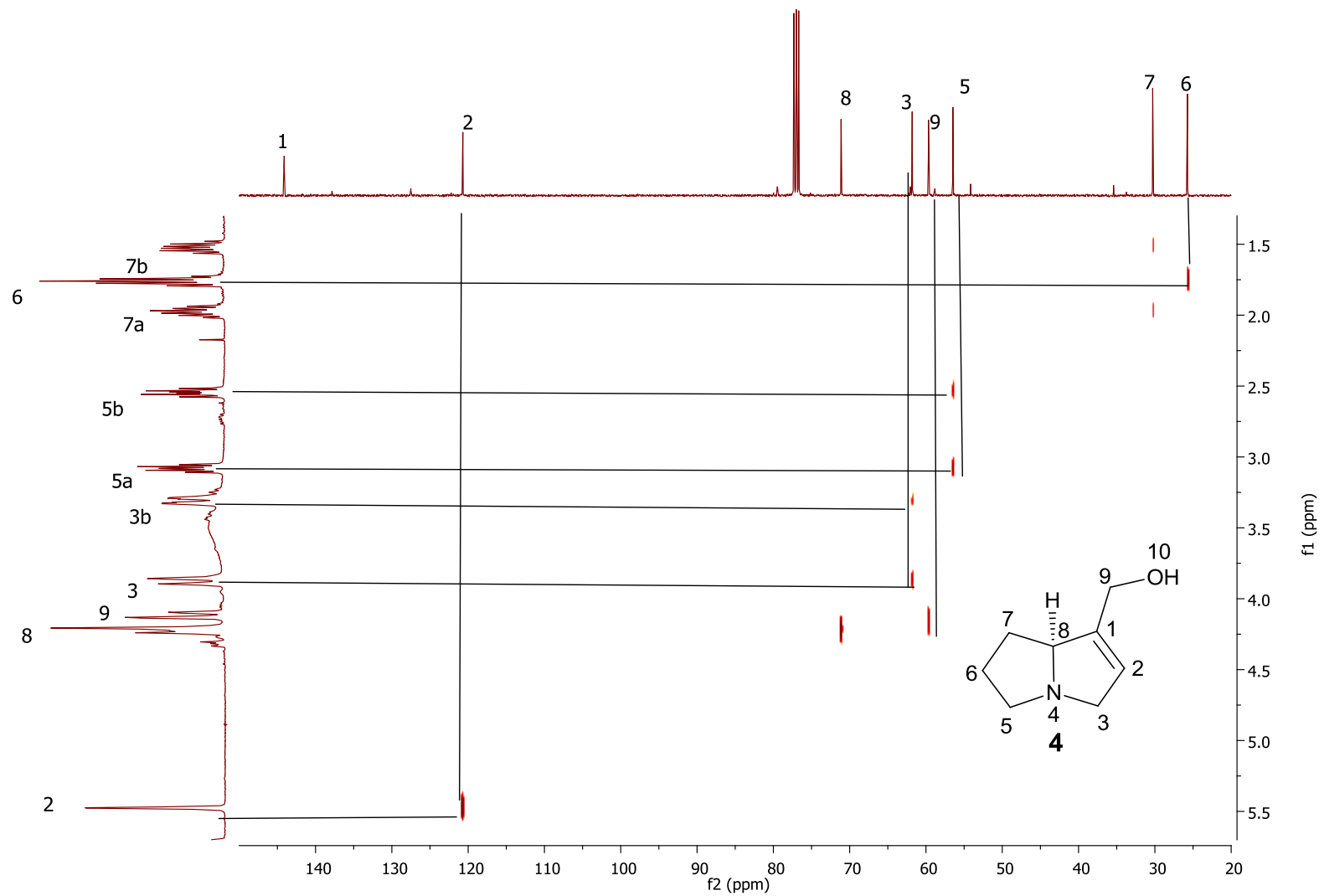


Figura 9.15. Espectro HETCOR de Supinidina (4) (CDCl₃, 400 MHz).

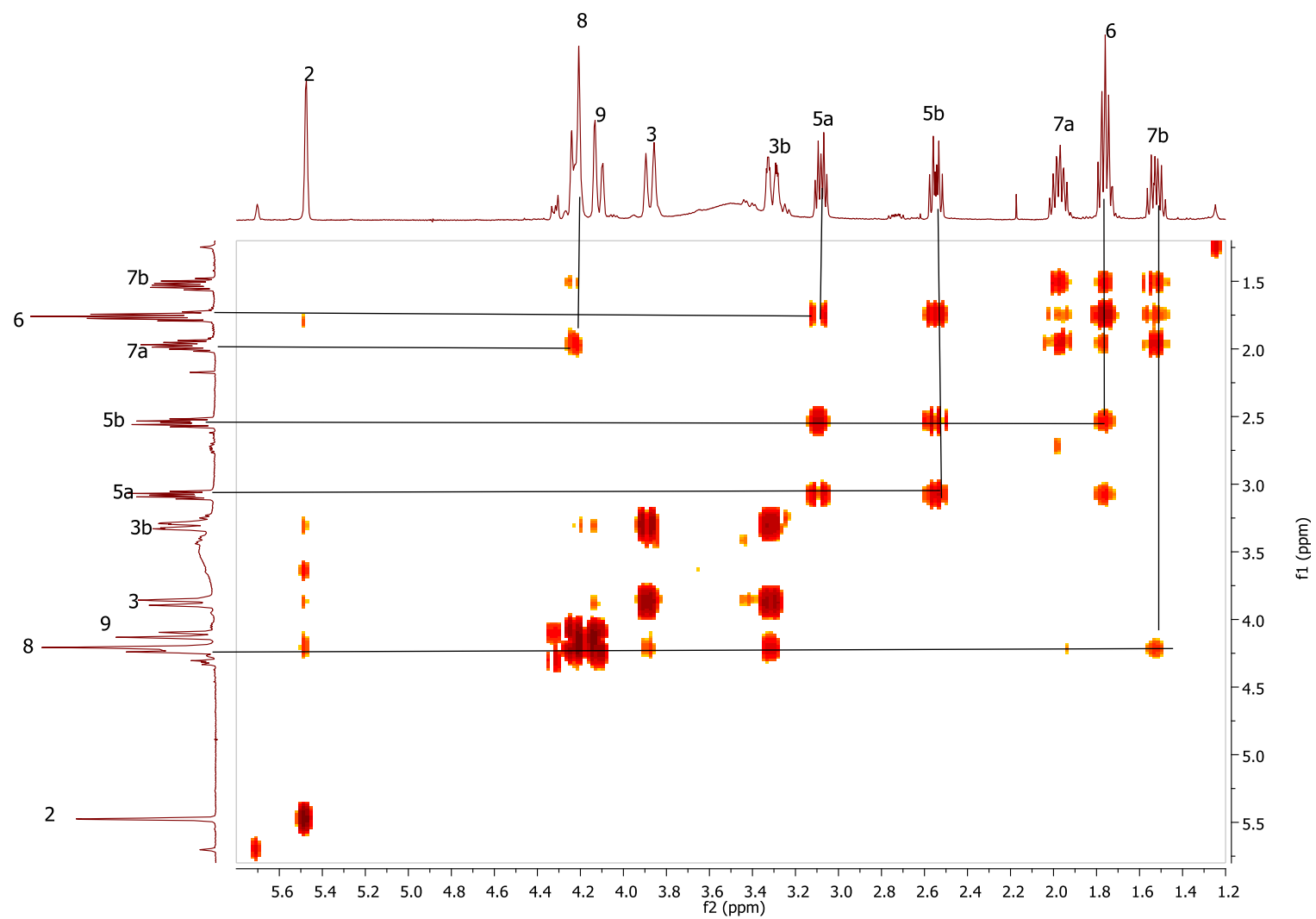


Figura 9.16. Espectro COSY de la Supinidina (**4**).

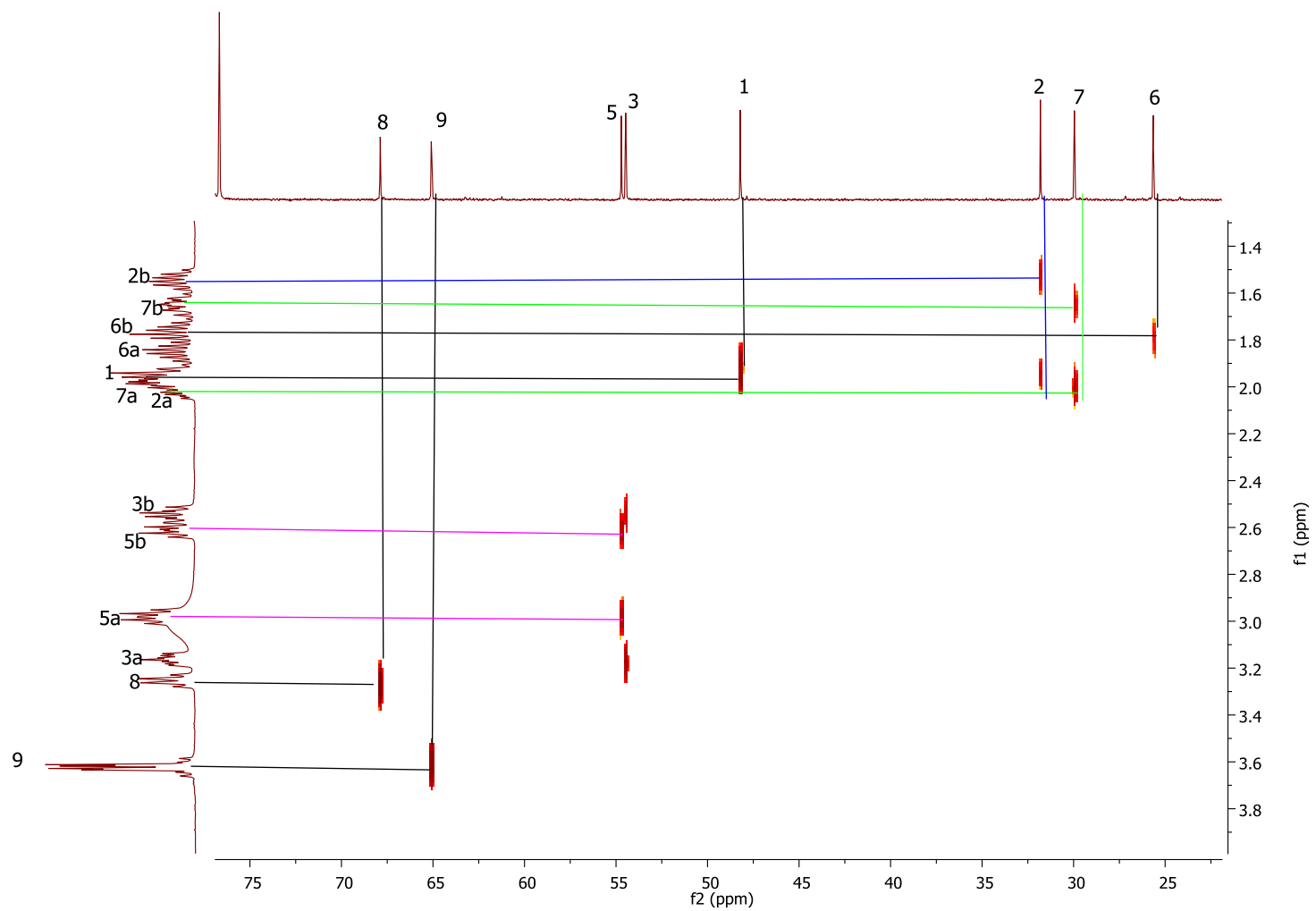
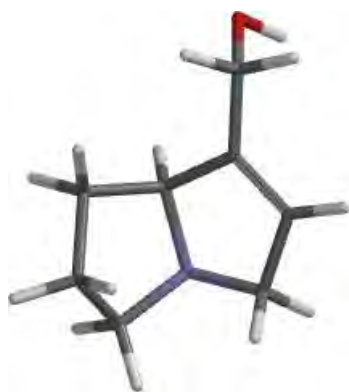


Figura 9.17. Espectro HETCOR del Isorretronecanol (**29**).

Label	E (kJ/mol)	rel. E (kJ/mol)	Boltzmann Dist	E (kcal/mol)
<input checked="" type="checkbox"/> M0001	-33.85	0.00	0.393	-8.09
<input type="checkbox"/> M0002	-33.06	0.79	0.286	-7.90
<input type="checkbox"/> M0003	-31.15	2.69	0.133	-7.45
<input type="checkbox"/> M0004	-31.07	2.78	0.128	-7.43
<input type="checkbox"/> M0005	-27.91	5.94	0.036	-6.67
<input type="checkbox"/> M0006	-26.98	6.86	0.025	-6.45



M0001



M0002



M0003

Figura 9.18. Tabla de los 6 conformeros de la supinidina (**4**) con los valores de Distribución de Boltzmann y E_{rel} .

Label	E (kcal/mol)	rel. E (kcal/mol)	Boltzmann Dist	C. Boltzmann Dist
<input checked="" type="checkbox"/> M0001	-10.8131564	0.000000000	0.363851450	0.363851450
<input type="checkbox"/> M0002	-10.6790218	0.134134627	0.290141317	0.653992767
<input type="checkbox"/> M0003	-10.1004895	0.712666895	0.109287867	0.763280634
<input type="checkbox"/> M0004	-9.98268105	0.830475372	0.0895826156	0.852863250
<input type="checkbox"/> M0005	-9.91874427	0.894412159	0.0804194327	0.933282682
<input type="checkbox"/> M0006	-9.57945987	1.23369656	0.0453608409	0.978643523
<input type="checkbox"/> M0007	-8.38494304	2.42821338	0.00604164261	0.984685166
<input type="checkbox"/> M0008	-8.33937860	2.47377783	0.00559446270	0.990279629
<input type="checkbox"/> M0009	-8.24781892	2.56533751	0.00479346250	0.995073091
<input type="checkbox"/> M0010	-7.79703759	3.01611884	0.00223999623	0.997313087
<input type="checkbox"/> M0011	-7.04036159	3.77279484	0.000624652487	0.997937740
<input type="checkbox"/> M0012	-6.65322574	4.15993068	0.000325001711	0.998262742
<input type="checkbox"/> M0013	-6.59318974	4.21996668	0.000293685168	0.998556427
<input type="checkbox"/> M0014	-6.58273839	4.23041804	0.000288550378	0.998844977
<input type="checkbox"/> M0015	-6.54159900	4.27155742	0.000269195852	0.999114173
<input type="checkbox"/> M0016	-6.43419130	4.37896513	0.000224565710	0.999338739
<input type="checkbox"/> M0017	-6.21158138	4.60157504	0.000154234163	0.999492973
<input type="checkbox"/> M0018	-6.18307555	4.63008087	0.000146989772	0.999639963
<input type="checkbox"/> M0019	-5.95423688	4.85891955	9.98984749e-005	0.999739861
<input type="checkbox"/> M0020	-5.49166578	5.32149064	4.57631020e-005	0.999785624

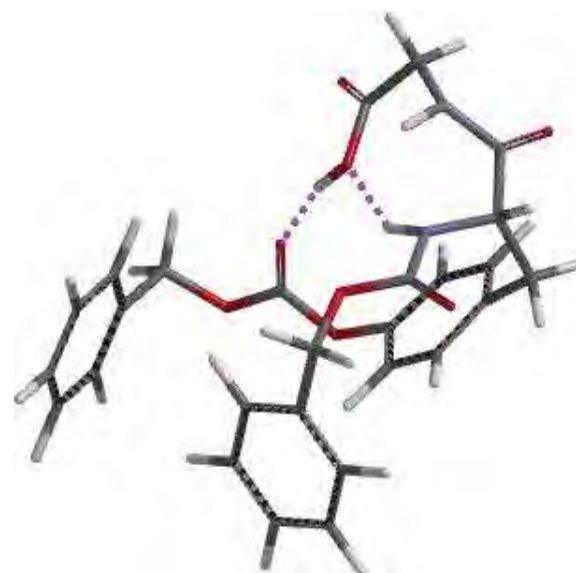


Figura 9.19. Distribución conformacional del Ácido (Z)₂-Tir-Gli-OH (1).

Label	E (kcal/mol)	rel. E (kcal/mol)	Boltzmann Dist	C. Boltzmann Dist
<input checked="" type="checkbox"/> M0001	10.3489979	0.000000000	0.220969381	0.220969381
<input type="checkbox"/> M0002	10.4764561	0.127458186	0.178201392	0.399170774
<input type="checkbox"/> M0003	10.5317621	0.182764243	0.162320843	0.561491616
<input type="checkbox"/> M0004	10.8027377	0.453739821	0.102745217	0.664236833
<input type="checkbox"/> M0005	11.1662297	0.817231826	0.0556337891	0.719870623
<input type="checkbox"/> M0006	11.2582013	0.909203380	0.0476351687	0.767505791
<input type="checkbox"/> M0007	11.2618296	0.912831720	0.0473443655	0.814850157
<input type="checkbox"/> M0008	11.4472464	1.09824849	0.0346231286	0.849473285
<input type="checkbox"/> M0009	11.4721356	1.12313768	0.0331988984	0.882672184
<input type="checkbox"/> M0010	11.7125796	1.36358171	0.0221253028	0.904797487
<input type="checkbox"/> M0011	11.8021643	1.45316636	0.0190207565	0.923818243
<input type="checkbox"/> M0012	11.9674531	1.61845521	0.0143905910	0.938208834
<input type="checkbox"/> M0013	11.9694927	1.62049478	0.0143411415	0.952549976
<input type="checkbox"/> M0014	12.2824762	1.93347831	0.00845631484	0.961006291
<input type="checkbox"/> M0015	12.3542461	2.00524816	0.00749164414	0.968497935
<input type="checkbox"/> M0016	12.4521513	2.10315344	0.00635063358	0.974848568
<input type="checkbox"/> M0017	12.5288306	2.17983273	0.00557974886	0.980428317
<input type="checkbox"/> M0018	12.7463032	2.39730532	0.00386560268	0.984293920
<input type="checkbox"/> M0019	13.0080185	2.65902061	0.00248537490	0.986779295
<input type="checkbox"/> M0020	13.2140403	2.86504236	0.00175544573	0.988534740

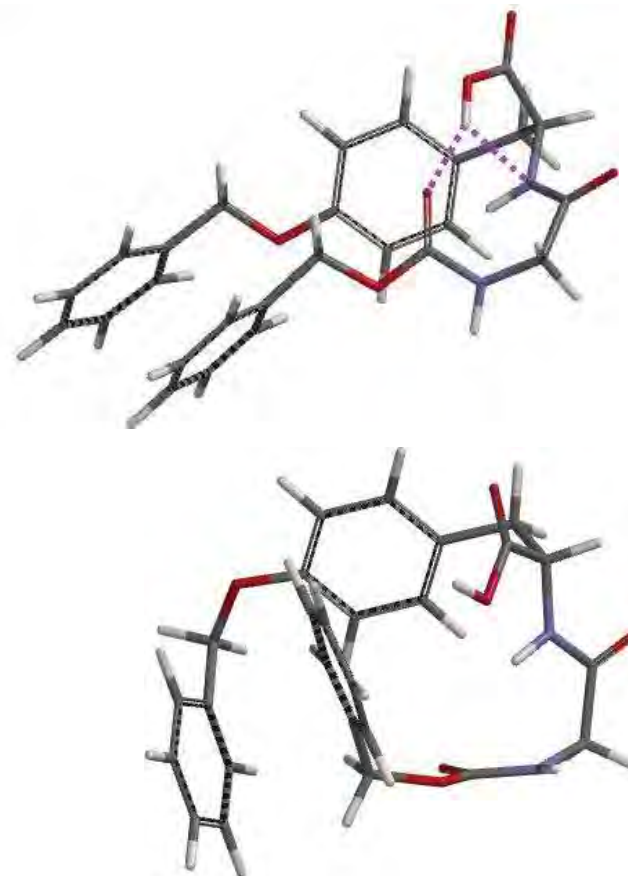


Figura 9.20. Distribución conformacional del Ácido Cbz-Gli-Tir(O-Bn)-OH (2).