



# **UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

## **“OPTIMIZACIÓN SINTÉTICA Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE NUEVOS DERIVADOS PEPTÍDICOS DEL CIPROFLOXACINO”**

**T E S I S**

Que presenta

**Alejandro Huerta Uribe**

Para obtener el título de

**Químico Farmacobiólogo**

Asesora:

**D.C. Judit Araceli Aviña Verduzco**

Co-Asesor:

**D.C. Luis Chacón García**

Morelia, Michoacán, Abril de del 2013

El presente trabajo se realizó 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 la D.C. Judit Araceli Aviña Verduzco y se realizó con financiamiento del proyecto 2.34 de la Coordinación de la Investigación Científica (CIC) y del proyecto 131812 de Ciencia Básica aprobado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Parte de este trabajo fue presentado en el Congreso del XVI Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico llevado a cabo en Nuevo Vallarta, Nayarit.

## ÍNDICE

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                                   | 1  |
| 2. ANTECEDENTES.....                                                                    | 4  |
| 2.1 Las quinolonas como agentes antimicrobianos.....                                    | 4  |
| 2.2 Características químicas de las Quinolonas. ....                                    | 4  |
| 2.3 Clasificación.....                                                                  | 5  |
| 2.4 Relación Estructura-Actividad. ....                                                 | 6  |
| 2.5 Aminoácidos y péptidos.....                                                         | 9  |
| 2.6 Aminoácidos y péptidos como potenciales agentes antimicrobianos.....                | 10 |
| 2.7 Resonancia Magnética Nuclear.....                                                   | 13 |
| 2.8 Propiedades magnéticas del núcleo atómico. ....                                     | 13 |
| 2.9 Origen del fenómeno de RMN. ....                                                    | 15 |
| 2.10 Desplazamiento químico.....                                                        | 16 |
| 2.11 RMN de Hidrógeno (RMN $^1\text{H}$ ).....                                          | 18 |
| 2.12 Desdoblamiento espín-espín en los espectros de RMN $^1\text{H}$ . ....             | 20 |
| 2.13 RMN de carbono (RMN $^{13}\text{C}$ ).....                                         | 21 |
| 2.14 Espectroscopía de RMN $^{13}\text{C}$ DEPT.....                                    | 23 |
| 2.15 Experimentos en dos dimensiones (RMN-2D). ....                                     | 23 |
| 3. OBJETIVO GENERAL .....                                                               | 25 |
| 4. OBJETIVOS PARTICULARES.....                                                          | 25 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                                          | 26 |
| 6. CONCLUSIONES .....                                                                   | 67 |
| 7. PARTE EXPERIMENTAL.....                                                              | 68 |
| 7.1 Aspectos generales.....                                                             | 68 |
| 7.2 Obtención del ciprofloxacino a partir de tabletas comerciales.....                  | 69 |
| 7.3 Procedimiento general para la <i>N</i> -protección de aminoácidos con CbzCl. ....   | 69 |
| 7.3.1 Síntesis de Cbz- <i>N</i> -Pro .....                                              | 70 |
| 7.3.2 Síntesis de Cbz- <i>N</i> -Ala.....                                               | 70 |
| 7.4 Procedimiento general para la <i>O</i> -protección de aminoácidos .....             | 71 |
| 7.4.1 Síntesis de Phe-OMe .....                                                         | 71 |
| 7.5 Procedimiento general para el acoplamiento de aminoácidos vía anhídrido mixto. .... | 72 |

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.5.1 Síntesis del dipéptido Cbz- <i>N</i> -Pro-Phe-OMe .....                                                                                        | 72 |
| 7.6 Procedimiento general para la <i>O</i> -desprotección de aminoácidos y péptidos. ....                                                            | 73 |
| 7.6.1 <i>O</i> -desprotección de Cbz- <i>N</i> -Pro-Phe-OMe.....                                                                                     | 73 |
| 7.7 Procedimiento general para el acoplamiento de aminoácidos o péptidos <i>N</i> -Cbz protegidos<br>con el ciprofloxacino, vía ésteres activos..... | 74 |
| 7.7.1 Síntesis de Cbz- <i>N</i> -Pro- <i>O</i> -Cpx .....                                                                                            | 74 |
| 7.7.2 Síntesis de Cbz- <i>N</i> -Pro-Phe- <i>O</i> -Cpx .....                                                                                        | 75 |
| 7.7.3 Síntesis de Cbz- <i>N</i> -Ala- <i>O</i> -Cpx .....                                                                                            | 76 |
| 7.8 Procedimiento general para la <i>N</i> -desprotección mediante hidrogenación catalítica por<br>transferencia. ....                               | 77 |
| 7.8.1 <i>N</i> -desprotección de Cbz- <i>N</i> -Pro-Cpx.....                                                                                         | 78 |
| 7.8.2 <i>N</i> -desprotección de Cbz- <i>N</i> -Ala-Cpx .....                                                                                        | 79 |
| 7.8.3 <i>N</i> -desprotección de Cbz- <i>N</i> -Pro-Phe- <i>O</i> -Cpx .....                                                                         | 80 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                  | 82 |
| 9. ANEXO.....                                                                                                                                        | 86 |

## ABREVIATURAS

|                   |                                                                                      |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Ala               | Alanina                                                                              |
| AcOEt             | Acetato de etilo                                                                     |
| ADN               | Ácido desoxirribonucleico                                                            |
| <i>c</i>          | Señal cuádruple                                                                      |
| CbzCl             | Cloroformiato de bencilo                                                             |
| CCF               | Cromatografía en capa fina                                                           |
| CDCl <sub>3</sub> | Cloroformo deuterado                                                                 |
| <i>d</i>          | Señal doble                                                                          |
| <i>dd</i>         | Señal doble de dobles                                                                |
| <i>ddd</i>        | Señal doble de doble de dobles.                                                      |
| DCM               | Diclorometano                                                                        |
| DIEA              | Diisopropiletilamina                                                                 |
| DMF               | Dimetilformamida                                                                     |
| Cpx               | Ciprofloxacino                                                                       |
| EMAR              | Espectrometría de masas de alta resolución                                           |
| Et <sub>2</sub> O | Dietil éter                                                                          |
| EtOH              | Etanol                                                                               |
| HBTU              | Hexafluorofosfato de <i>O</i> -benzotriazol-1-il- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio |
| HOBt              | 1-hidroxibenzotriazol                                                                |
| IBCF              | Cloroformiato de isobutilo                                                           |
| <i>i</i> -BuOH    | Isobutanol                                                                           |
| <i>i</i> -PrOH    | Isopropanol                                                                          |
| IR                | Espectroscopía de infrarrojo                                                         |
| LiOH              | Hidróxido de litio                                                                   |
| <i>m</i>          | Señal múltiple                                                                       |
| MeOH              | Metanol                                                                              |
| MeOD              | Metanol deuterado                                                                    |
| M <sub>w</sub>    | Microondas                                                                           |

|                |                              |
|----------------|------------------------------|
| <i>J</i>       | Constante de acoplamiento    |
| PAM            | Péptido antimicrobiano       |
| Pd/C           | Paladio sobre carbono        |
| Phe            | Fenilalanina                 |
| Pro            | Prolina                      |
| R <sub>f</sub> | Factor de retención          |
| RMN            | Resonancia magnética nuclear |
| <i>s</i>       | Señal simple                 |
| <i>t</i>       | Señal triple                 |
| TEA            | Trietilamina                 |
| THF            | Tetrahidrofurano             |
| TMS            | Tetrametilsilano             |
| u.m.a          | Unidades de masa atómica     |

## 1. INTRODUCCIÓN

El surgimiento de resistencia bacteriana frente a los agentes quimioterapéuticos disponibles en la actualidad es uno de los grandes desafíos a los que se enfrenta el sector salud, no sólo en México sino en todo el planeta.<sup>1</sup> Tan sólo en Estados Unidos de América se estiman alrededor de 100,000 decesos anuales causados por cuadros infecciosos que no pueden ser tratados.<sup>2</sup> A este ritmo, no es exagerado pensar que llegará el día en el que la humanidad se enfrente a las infecciones bacterianas como lo hacía antes del descubrimiento de los antibióticos.

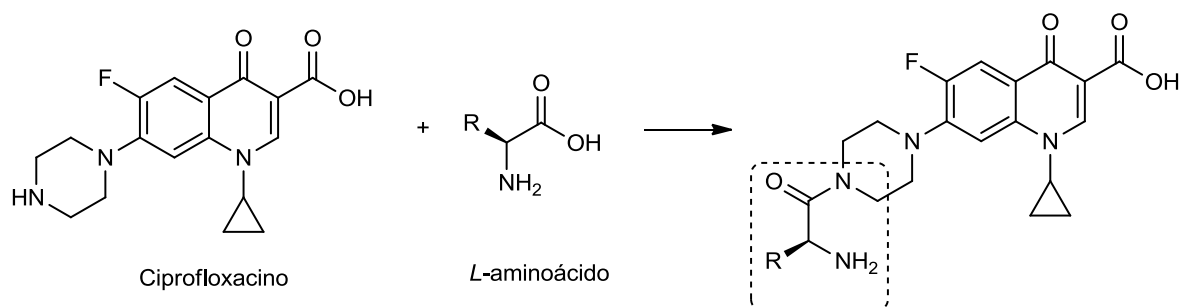
Si bien es cierto que su uso irracional y desmesurado ha contribuido al rápido desarrollo de resistencia microbiana, no es la única causa.<sup>3</sup> Las bacterias superan en número al ser humano y han existido desde mucho tiempo antes que él, lo que demuestra su elevada capacidad de adaptación al medio que las rodea. Por lo tanto no es de sorprender que desarrollen mecanismos de defensa frente a sus agresores; es sólo cuestión de tiempo.

En el afán de enmendar esta situación, diversas medidas han sido tomadas. Entre ellas está la concientización del personal sanitario en cuanto al uso apropiado de esta clase de fármacos, que si bien no es una solución definitiva, permitirá ganar tiempo para encontrar nuevas alternativas. La otra es impulsar la investigación en el campo de los antimicrobianos, ya que durante los últimos años el sector farmacéutico se ha enfocado en el desarrollo de otro tipo de fármacos, especialmente para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, dejando descuidada esta importante área.

En el año 2010, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (Infectious Diseases Society of America) lanzó su iniciativa 10 x '20, la cual hace un llamado a nivel internacional para lograr el objetivo de contar con diez nuevos antibióticos para el año 2020.<sup>4</sup> Parece una tarea sencilla, pero no lo es. El proceso de desarrollo de un nuevo fármaco es largo, costoso y multidisciplinario. Dicho proceso se puede resumir en las siguientes etapas:<sup>5,6</sup>

1. Planteamiento del problema y formación del equipo de trabajo.
2. Síntesis u obtención de fuentes naturales de los compuestos con potencial actividad farmacológica.
3. Evaluación de la eficacia y seguridad mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, usando animales como modelos biológicos. Los resultados de dichas pruebas determinarán si el compuesto es un buen candidato, y por ende la continuidad del proyecto.
4. Optimización de la metodología sintética o de obtención para producirlo a gran escala; aspectos farmacotécnicos (forma farmacéutica, estabilidad, etc.) y estudios de toxicidad crónica en animales.
5. Solicitud de permiso ante las autoridades pertinentes para iniciar los estudios clínicos, los cuales se clasifican en 4 fases. Los resultados de dichos estudios determinarán si se puede o no comercializar el fármaco.

En la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas y conscientes de la problemática actual, en el año 2010 se reportó la síntesis y actividad antimicrobiana de nuevos derivados del ciprofloxacino funcionalizados con *L*-aminoácidos y péptidos en el nitrógeno piperazínico<sup>7,8</sup> (Esquema 1). De la serie de compuestos sintetizados, algunos mostraron actividad antimicrobiana similar o superior al ciprofloxacino, por lo que resulta de interés continuar estudiando dichos compuestos.



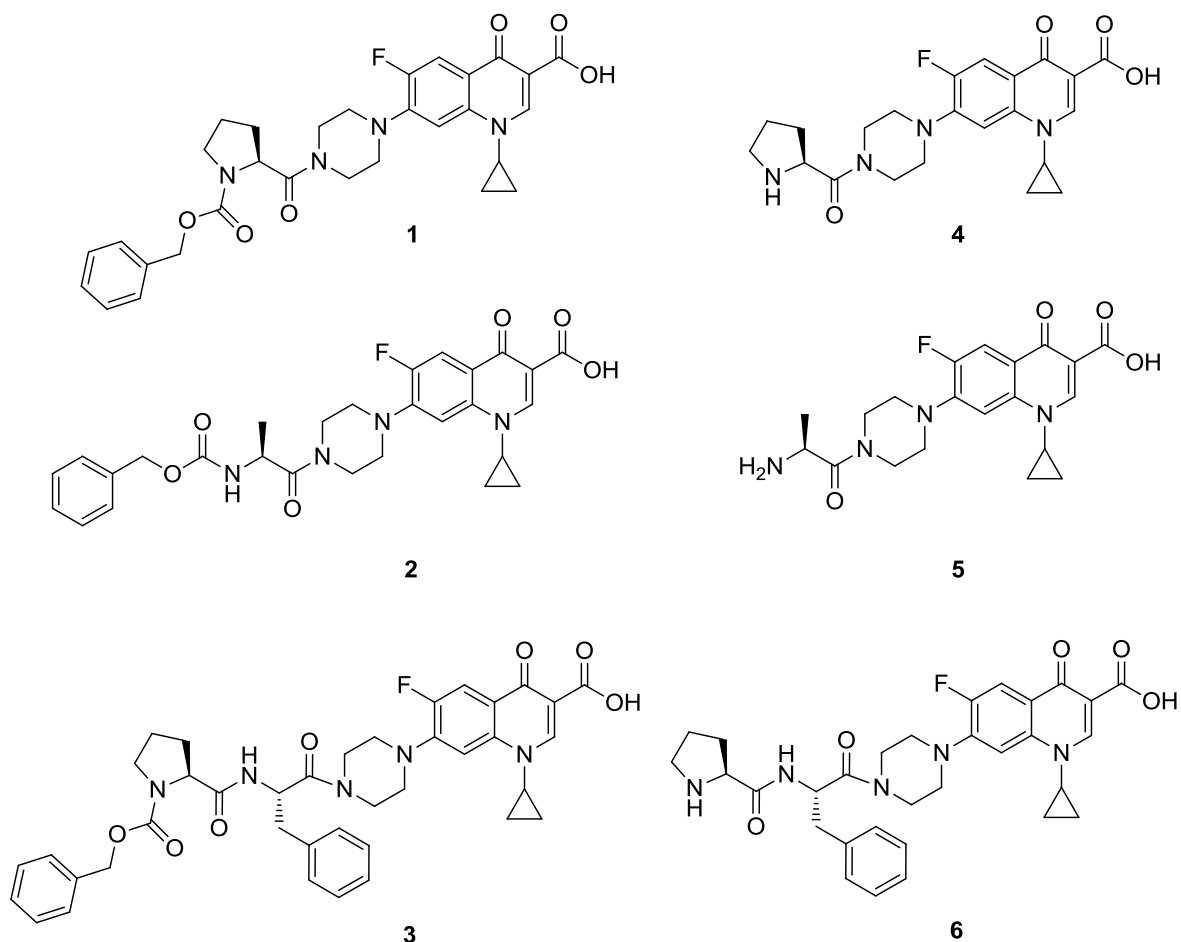
**Esquema 1.** Funcionalización del nitrógeno piperazínico del ciprofloxacino con *L*-aminoácidos

Durante el proceso de desarrollo de un nuevo fármaco, resulta complicado sintetizar en forma totalmente pura y en grandes cantidades los compuestos que se someten a la evaluación biológica inicial, ya que la mayor parte de ellos son descartados en esta etapa.<sup>9</sup>

Es por eso que una vez identificados los compuestos con actividad prometedora, el Químico Orgánico se encarga de diseñar metodologías de síntesis que sean eficientes, seguras, reproducibles, ecológicas y económicas. A su vez, auxiliándose de la Química Analítica, se encarga de la purificación y caracterización de los mismos.<sup>10</sup>

La caracterización estructural de un compuesto se puede lograr fácilmente si se cuenta con todos los datos espectroscópicos. La información más relevante de la estructura molecular se obtiene de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y de las técnicas complementarias como espectroscopía en el infrarrojo (IR), en el ultravioleta (UV), espectrometría de masas (EM) y análisis elemental.<sup>11</sup>

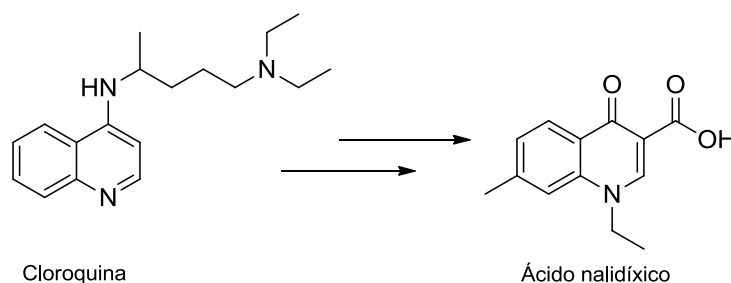
En el presente trabajo se describe la optimización sintética y caracterización espectroscópica de los siguientes derivados del ciprofloxacino *N*-piperazinil sustituidos.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Las quinolonas como agentes antimicrobianos.

Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos numeroso y químicamente muy heterogéneo.<sup>12</sup> A diferencia de los primeros antibióticos descubiertos a inicios del siglo pasado, las quinolonas no fueron aisladas a partir de organismos vivos. Su origen fue totalmente sintético.<sup>13</sup> Fue en el año de 1962 cuando Lesher y colaboradores descubrieron el ácido nalidíxico, un producto secundario formado durante la síntesis de cloroquina, un fármaco antimalárico (Esquema 2).<sup>14</sup>



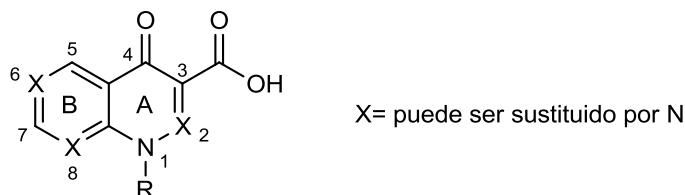
**Esquema 2.** Ácido nalidíxico.

El ácido nalidíxico mostró actividad frente a bacterias Gram negativas por lo que fue utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario. Sin embargo, debido a sus propiedades farmacocinéticas y a la rápida aparición de resistencia bacteriana, su utilidad fue limitada.

Durante los años posteriores, partiendo de la estructura del ácido nalidíxico, se sintetizaron nuevos derivados quinolónicos que mostraron mejoras significativas, tanto en su farmacocinética como en su farmacodinamia, dando origen a lo que hoy conocemos como quinolonas.

### 2.2 Características químicas de las Quinolonas.

Estructuralmente consisten de un anillo A constituido por un ácido 1-sustituido-1,4-dihidro-4-oxopiridin-3-carboxílico (Figura 1) fusionado con un anillo aromático o heteroaromático B.<sup>12</sup>



**Figura 1.** Estructura general de las quinolonas.

Esta estructura básica origina cuatro grupos diferentes de quinolonas, según el número y la posición de los átomos de nitrógeno de la molécula.<sup>16</sup> Estos grupos son los siguientes:

1. *Benzopiridonas*: Contienen un único átomo de nitrógeno en la posición 1. Es el núcleo más utilizado en la síntesis de quinolonas.
2. *Naftiridinas*: Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 8.
3. *Piridopirimidinas*: Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1, 6 y 8.
4. *Cinolinas*: Contienen un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 2.

### 2.3 Clasificación.

Las quinolonas se han clasificado por generaciones, tomando en cuenta su época de aparición y su espectro antibacteriano.<sup>15</sup>

| <b>Tabla 1.</b> Clasificación de las quinolonas. |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Generación                                       | Fármacos                                                        | Características                                                                                                                                                                                                                  |
| Primera<br>(1960, 1970)                          | Ácido nalidíxico<br>Ácido oxolínico<br>Cinoxacino<br>Flumequina | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activos frente a ciertas bacterias Gram negativas.</li> <li>○ Alta unión a proteínas plasmáticas, causando baja biodisponibilidad.</li> <li>○ Tiempo de vida media muy corto</li> </ul> |
| Segunda<br>(1980)                                | Norfloxacin<br>Ciprofloxacino<br>Ofloxacin<br>Enoxacin          | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Menor unión a proteínas plasmáticas (50%)</li> <li>○ Tiempo de vida media más prolongado que la generación previa.</li> <li>○ Actividad mejorada frente a Gram negativos.</li> </ul>    |
| Tercera<br>(1990)                                | Levofloxacin<br>Esfarfloxacino<br>Tosufloxacin<br>Grepafloxacin | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activos frente a Gram negativos y Gram positivos.</li> </ul>                                                                                                                            |
| Cuarta<br>(2000)                                 | Gatifloxacin<br>Gemifloxacin<br>Moxifloxacin<br>Garenoxacin     | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activos frente a Gram negativos y Gram positivos, ampliando su espectro contra anaerobios y algunas bacterias atípicas</li> </ul>                                                       |

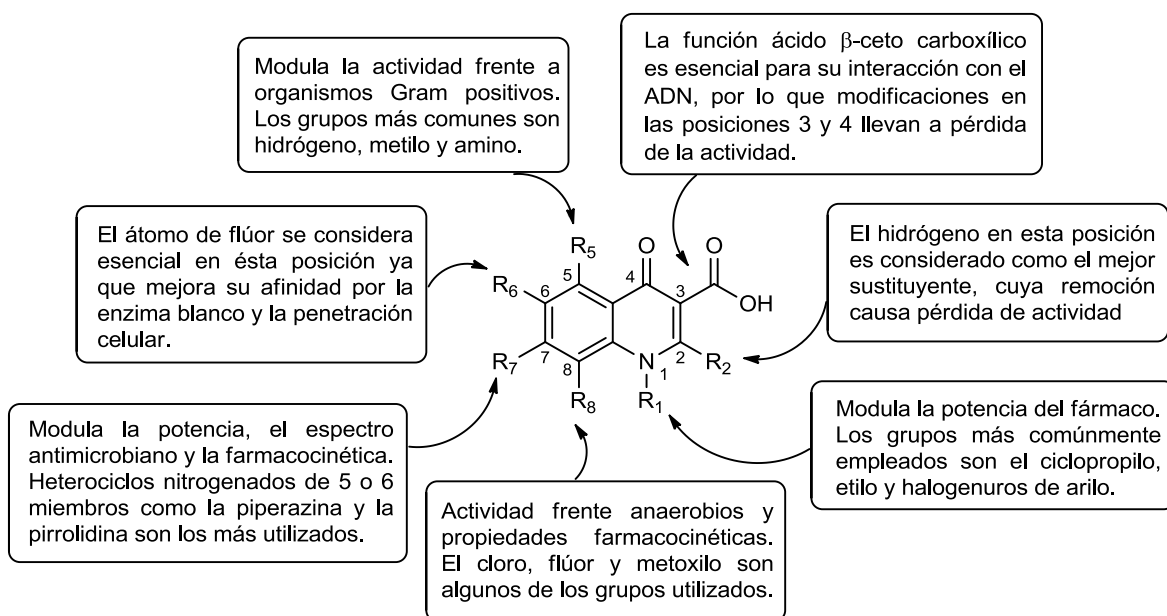
## 2.4 Relación Estructura-Actividad.

El mecanismo de acción de las quinolonas ha sido ampliamente estudiado. Actúan sobre la ADN girasa en organismos Gram negativos y la topoisomerasa IV en organismos Gram positivos. Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN donde la inhibición de estas funciones conduce a la muerte celular.<sup>12</sup>

El principio de los estudios de relación estructura-actividad en el descubrimiento de nuevos fármacos establece que todos aquellos compuestos con estructura química similar a la de un compuesto con actividad farmacológica comprobada pueden también presentar actividad, la cual puede ser mejor a la del compuesto original, o bien, ser totalmente distinta.<sup>5</sup>

Estos estudios consisten en realizar modificaciones mínimas sobre una estructura base o “cabeza de serie” con la finalidad de producir análogos, en los cuales se evalúa el efecto que tienen estos cambios estructurales sobre la actividad.

Años de investigación en torno a las quinolonas han permitido obtener conclusiones respecto a su relación estructura-actividad, como se muestra en la Figura 2.<sup>14, 17, 18.</sup>



**Figura 2.** Relación estructura-actividad de las quinolonas.

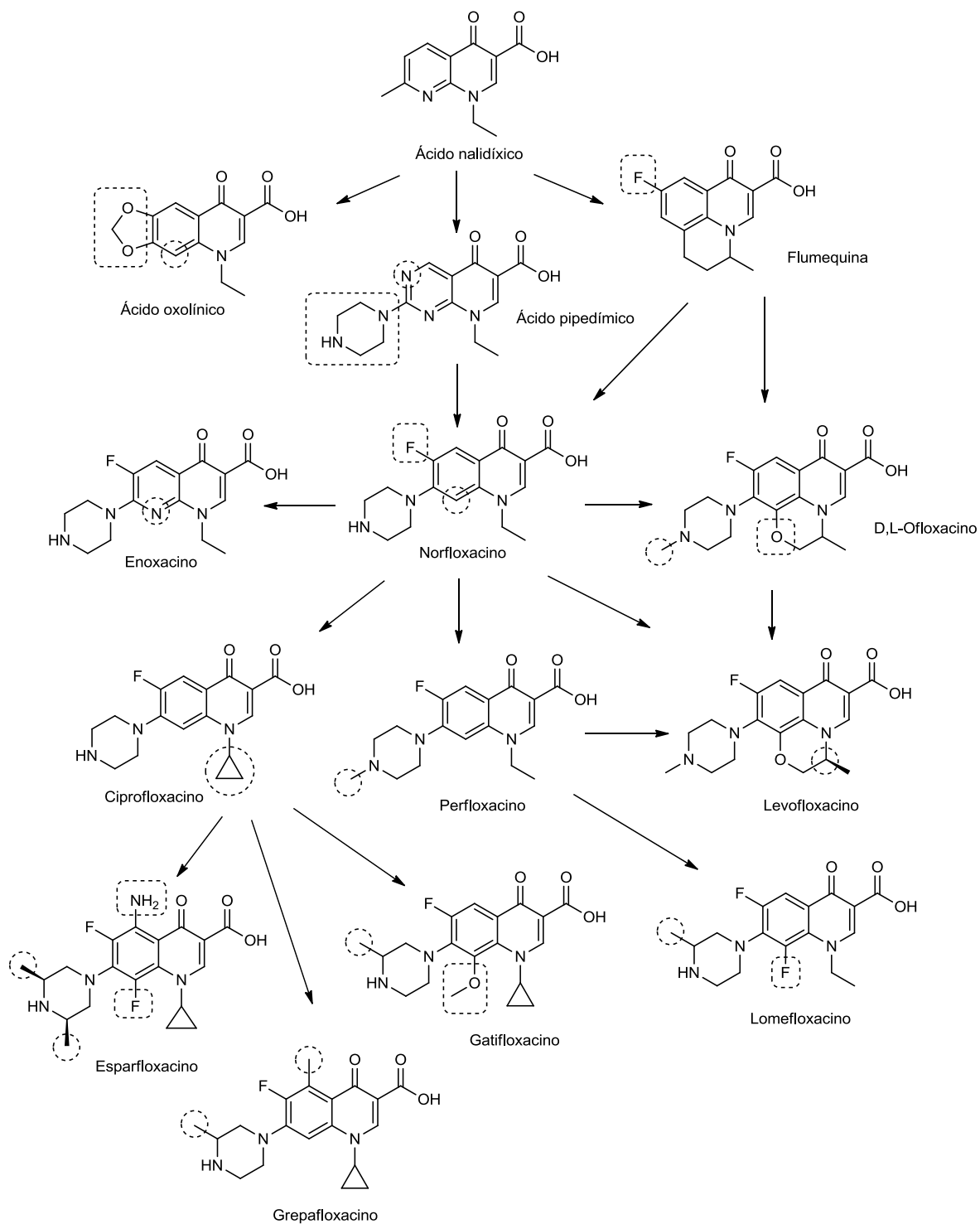
Como se puede observar en el Esquema 3, la adición del átomo de flúor en la posición 6 y de un anillo de piperazina en la posición 7 fueron las primeras modificaciones y también las más trascendentales. El flúor mejoró 10 veces la afinidad por la enzima girasa y su penetración en la célula microbiana.<sup>14</sup> Fue así que surgieron las denominadas 7-piperazinilfluoroquinolonas o quinolonas fluoradas.

En los últimos años, la investigación hecha en torno a la síntesis de nuevas fluoroquinolonas se ha enfocado en 2 objetivos principales: mejorar las propiedades farmacocinéticas de los nuevos derivados y aumentar o mejorar la actividad frente a bacterias Gram positivas, anaerobios y frente a cepas que ya presentan resistencia a esta clase de compuestos.<sup>7, 8, 14, 19.</sup>

Recientemente se ha puesto especial atención en la modificación del grupo piperazinil localizado en la posición 7 por los siguientes motivos:

- Por su naturaleza, es un grupo lábil a manipulaciones químicas.
- El sustituyente en la posición 7 juega un rol importante en el ingreso de la quinolona a la célula bacteriana y en la inhibición de la DNA girasa o topoisomerasa IV; ambos eventos determinan la potencia antimicrobiana.<sup>20</sup>
- Se ha observado que la presencia de sustituyentes voluminosos en esta posición ayuda a impedir la salida de la quinolona a través de proteínas de membrana por el denominado mecanismo de “eflujo”, presente en algunas bacterias resistentes.<sup>17</sup>

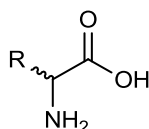
En este contexto, dada la importancia que tiene el sustituyente en la posición 7, surgió la idea de sintetizar nuevos derivados del ciprofloxacino funcionalizados en el nitrógeno piperazínico con L-aminoácidos y péptidos. Pero, ¿por qué usar aminoácidos?, ¿qué características estructurales y funcionales pueden aportar a las quinolonas? Para responder estas preguntas es necesario entender qué son los aminoácidos y péptidos, y algunas de sus propiedades biológicas.



**Esquema 3.** Evolución estructural de las 7-piperazinilquinolonas a partir del ácido nalidíxico, su precursor. Se resaltan las modificaciones estructurales más relevantes, (Modificado de Emami, 2005).

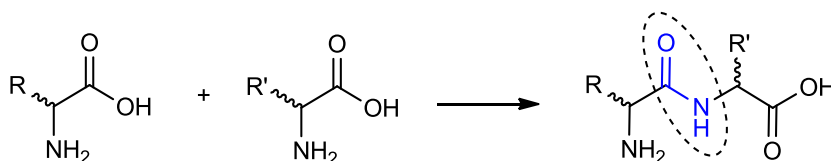
## 2.5 Aminoácidos y péptidos.

Se considera aminoácido a cualquier molécula que contenga un grupo amino y un grupo ácido carboxílico en su estructura (Figura 3).<sup>21</sup> Éste término casi siempre se usa para hacer referencia a los  $\alpha$ -aminoácidos, es decir, todos aquellos en los que el grupo amino se encuentra unido al átomo de carbono  $\alpha$ . Además de la función amino, el carbono  $\alpha$  posee otro sustituyente denominado cadena lateral, el cual condiciona las propiedades fisicoquímicas de cada aminoácido.



**Figura 3.** Estructura básica de un  $\alpha$ -aminoácido

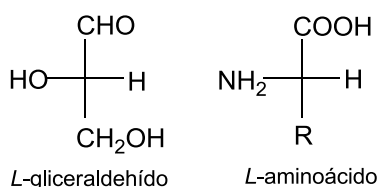
Los aminoácidos tienen un papel muy importante en los seres vivos. Son los precursores de los péptidos y proteínas, biomoléculas indispensables que desempeñan innumerables funciones. Su valor como bloques de construcción se debe al hecho de que pueden asociarse entre sí en cadenas largas formando enlaces amida entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo ácido de otro (Esquema 4).<sup>22</sup>



**Esquema 4.** Formación del enlace peptídico.

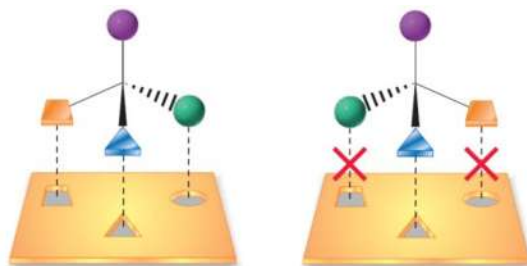
Veinte son los aminoácidos que forman las proteínas en los organismos vivos y se les conoce como “aminoácidos estándar”. A excepción de la glicina, el resto de estos son quirales. Sin embargo, ante la posibilidad de encontrar enantiómeros, casi todos los aminoácidos encontrados en la naturaleza poseen estereoquímica (*S*). A estos se les denomina típicamente *L*-aminoácidos debido a que cuando se representan con proyecciones

de Fisher, cumple con las características de configuración *L* tal cual se asigna a los carbohidratos *L* (Esquema 5).



**Esquema 5.** Similitud entre la configuración de los *L*-aminoácidos con los *L*-carbohidratos.

Cabe destacar la importancia que tiene la estereoquímica de las moléculas que componen o interactúan con los seres vivos. Por ejemplo, muy a menudo sucede que sólo uno de los estereoisómeros de un fármaco puede unirse al receptor farmacológico y ejercer su efecto. Como se recordará, un receptor es una proteína que al estar conformada por moléculas quirales (aminoácidos), sólo puede interactuar con aquellas moléculas que posean una configuración espacial complementaria a él, tal como se ilustra en la Figura 5.



**Figura 5.** Interacción fármaco receptor. *Izq.*: interacción favorable; *Der.*: interacción no favorable.

## 2.6 Aminoácidos y péptidos como potenciales agentes antimicrobianos.

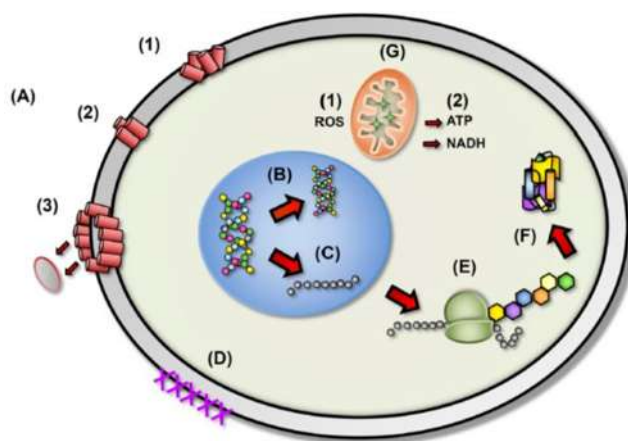
Recientemente se ha puesto especial atención a una clase de compuestos denominados péptidos antimicrobianos (PAM's), los cuales constituyen un mecanismo de defensa natural frente a bacterias, hongos y virus, tanto en organismos procariotas como en eucariotas.<sup>23</sup> Debido a estas cualidades, se han llegado a considerar como un potencial nuevo grupo de agentes antimicrobianos.

Se trata de moléculas pequeñas (de 6 a 100 aminoácidos), generalmente cargadas positivamente (catiónicas), de naturaleza anfipática y de composición química variable.<sup>24,25</sup>

Entre las cualidades que hacen atractivos a los PAM's para ser usados en terapéutica se encuentran:

- ✓ Amplio espectro de actividad, ya que además de su actividad antimicrobiana son activos frente a hongos y algunos virus.<sup>26</sup>
- ✓ Pueden ser utilizados solos o en combinación con antibióticos convencionales, para obtener un efecto sinérgico. Se ha reportado actividad sinérgica frente a *Escherichia coli* mediante el uso concomitante de eritromicina con ciertos péptidos pequeños.<sup>27</sup>
- ✓ A diferencia de los antibióticos convencionales, poseen más de una diana biológica, disminuyendo así la incidencia de resistencia microbiana.<sup>26</sup>
- ✓ Son activos frente a cepas bacterianas multiresistentes como *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente y *Pseudomonas aeruginosa*, cualidad destacable dada la actual problemática.<sup>26</sup>

Como ya se mencionó, la actividad de los PAM's se debe a diversos mecanismos, como se ilustra en la Figura 6.



**Figura 6.** Mecanismos de acción asociados a los péptidos antimicrobianos (Tomado de Peters, 2010).

**A. Interacciones con membrana.** Se considera el principal mecanismo. Alteraciones en la membrana provocan la salida del contenido intracelular. Puede ocurrir en tres formas:

1. Inserción al azar en la membrana, causando disrupción.
2. Alineación de secuencias hidrofóbicas, originando un poro hidrofílico.
3. Remoción de secciones de la membrana, formando poros.

**B.** *Inhibición de la síntesis del DNA.*

**C.** *Bloqueo en la síntesis del RNA.*

**D.** *Inhibición de enzimas implicadas en la formación de la membrana celular.*

**E.** *Inhibición de síntesis proteica.*

**F.** *Bloqueo de proteínas chaperonas, necesarias para el plegado de proteínas.*

**G.** *Daños a nivel mitocondrial:*

- 1) Inhibición de la respiración celular y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)
- 2) Alteraciones de la membrana mitocondrial

Una vez analizadas las propiedades que poseen tanto los aminoácidos como los péptidos antimicrobianos, se formularon algunas conclusiones que podrían justificar la funcionalización de las quinolonas con este tipo de compuestos:

- 1) A pH fisiológico, el grupo amino de los aminoácidos acoplados a la quinolona estaría cargado positivamente (especialmente aquellos con cadena lateral básica), lo cual podría favorecer su interacción con la pared y membrana celular, dando como resultado alteraciones a nivel membrana, o bien, promoviendo su entrada a la célula bacteriana.<sup>28</sup>
- 2) Al ser sustituyentes voluminosos, podrían impedir la salida de la quinolona a través del denominado mecanismo de eflujo presente en algunas cepas resistentes.<sup>17</sup>
- 3) Por su naturaleza, algunos aminoácidos podrían mejorar la solubilidad de las quinolonas en agua, mejorando así sus propiedades farmacocinéticas.<sup>29</sup>
- 4) Además, en vista de que algunos péptidos antimicrobianos pueden interaccionar con los ácidos nucleicos como el buforín II aislado del sapo *Bufo bufo gargarizans* o la indolicidina derivada de neutrófilos bovinos, la funcionalización de quinolonas con aminoácidos y péptidos puede influir positivamente en su ya conocido mecanismo de acción.<sup>25</sup>

## 2.7 Resonancia Magnética Nuclear.

La Espectroscopía es la disciplina encargada de estudiar las interacciones que tienen lugar entre la materia y la radiación electromagnética. Los métodos analíticos espectroscópicos se fundamentan en medir la cantidad de radiación que producen o absorben las especies moleculares o atómicas de interés.<sup>30</sup>

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es un tipo de espectroscopía que se basa en la absorción de ondas de radiofrecuencia. Desde el desarrollo del espectrómetro de RMN de alta resolución en la década de 1950, la RMN se ha convertido en la principal herramienta para estudiar los compuestos orgánicos tanto de origen sintético como de origen natural.<sup>31</sup> A continuación se mencionan las bases teóricas de dicha técnica.

## 2.8 Propiedades magnéticas del núcleo atómico.

Como se recordará, todos los núcleos atómicos están cargados positivamente. En algunos núcleos esta carga “gira” sobre su propio eje, propiedad conocida como espín nuclear (Figura 7). Éste movimiento giratorio genera un dipolo magnético a lo largo del eje. Cualquier núcleo que posea número másico o número atómico impar o ambos es magnéticamente activo.<sup>32</sup>



Figura 7.

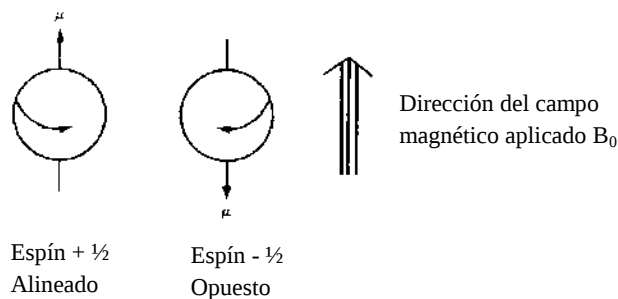
El momento angular del núcleo puede ser descrito en términos de su número cuántico espín,  $I$ ; éste número tiene valores de 0, 1/2, 1, 3/2 y así sucesivamente ( $I = 0$ , indica ausencia de espín). La magnitud del dipolo generado puede ser expresada en términos del momento magnético nuclear,  $\mu$ .<sup>32</sup>

Para cada núcleo con espín, el número de estados de espín permitidos que puede adoptar está cuantizado y es determinado por  $I$ . Éste número es una constante física y hay  $2I + 1$  estados de espín permitidos, con diferencias integrales desde  $+I$  a  $-I$ , como se puede observar en la Tabla 2.

| Tabla 2. Propiedades de algunos núcleos. |                |                |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                      |                       |
|------------------------------------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| Elemento                                 | $^1_1\text{H}$ | $^2_1\text{H}$ | $^{12}_6\text{C}$ | $^{13}_6\text{C}$ | $^{14}_7\text{N}$ | $^{16}_8\text{O}$ | $^{17}_8\text{O}$ | $^{19}_9\text{F}$ | $^{31}_{15}\text{P}$ | $^{35}_{17}\text{Cl}$ |
| Número cuántico espín                    | $\frac{1}{2}$  | 1              | 0                 | $\frac{1}{2}$     | 1                 | 0                 | $\frac{5}{2}$     | $\frac{1}{2}$     | $\frac{1}{2}$        | $\frac{3}{2}$         |
| Número de estados de espín               | 2              | 3              | 0                 | 2                 | 3                 | 0                 | 6                 | 2                 | 2                    | 4                     |

A fines prácticos, son de interés aquellos núcleos con  $I = \frac{1}{2}$  ya que éstos tienen la carga distribuida uniformemente en forma esférica. Es por eso que el  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  son los núcleos más estudiados en RMN.

En ausencia de un campo magnético externo, los estados de espín de un núcleo dado se orientan al azar y son energéticamente equivalentes (degenerados); sin embargo, cuando se someten a un campo magnético externo, dejan de ser energéticamente equivalentes. Por ejemplo, el átomo de hidrógeno puede tener dos estados de espín:  $+\frac{1}{2}$  y  $-\frac{1}{2}$ , y por lo tanto los momentos magnéticos nucleares para ambos casos estarán orientados en direcciones opuestas, ya sea alineado con el campo magnético aplicado ( $B_0$ ) en contra (Figura 8).<sup>33</sup>



**Figura 8.** Estados de espín posibles para el átomo de hidrógeno.

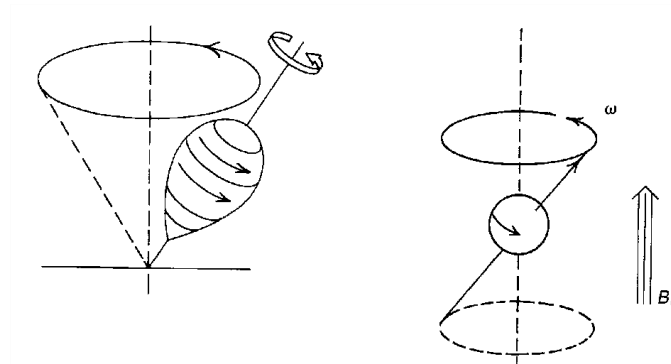
El estado de espín  $+\frac{1}{2}$  ( $\alpha$ ) es de menor energía, ya que está alineado con el campo magnético, mientras que el estado  $-\frac{1}{2}$  ( $\beta$ ) es de mayor energía por oponerse a él.

Cuantitativamente la cantidad de núcleos en ambos estados es casi igual, con un ligero exceso de  $\alpha$ .

## 2.9 Origen del fenómeno de RMN.

El fenómeno de RMN ocurre cuando un núcleo alineado con el campo magnético externo absorbe energía del orden de radiofrecuencia, invirtiendo la orientación de su espín al estado de mayor energía ( $\beta$ ). La absorción de energía es un proceso cuantizado, es decir, debe igualar la diferencia energética entre ambos estados de espín.

Para entender este fenómeno, la analogía con un trompo de juguete es útil. Los protones absorben energía porque comienzan a “preceder” bajo la influencia de un campo magnético. El fenómeno de precesión es similar al de un trompo girando. Debido a la fuerza de gravedad, la parte superior del trompo comienza a inclinarse con respecto a su eje (Figura 9). Un núcleo magnéticamente activo se comporta de manera similar pero por la acción del campo magnético externo.

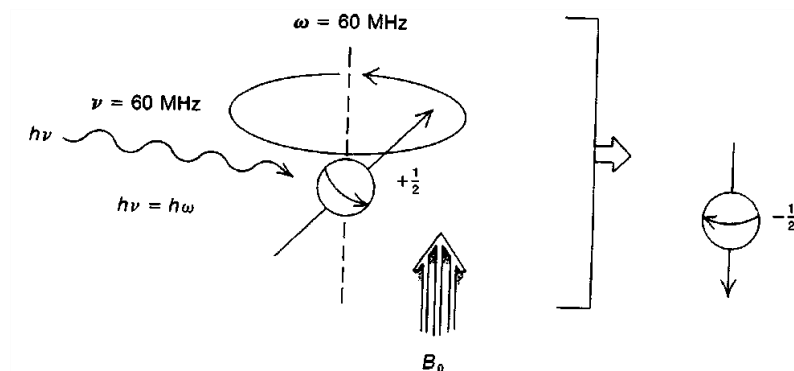


**Figura 9.** Precesión del núcleo por acción del campo magnético externo.

La frecuencia a la cual el núcleo precede es conocida como frecuencia angular ( $\omega$ ) o frecuencia de Larmor, y es directamente proporcional a la intensidad del campo magnético aplicado. Entre más fuerte sea el campo, mayor es la frecuencia angular.<sup>33</sup>

Como el núcleo está cargado, la precesión genera un campo eléctrico oscilante de la misma frecuencia. Entonces, cuando se expone el núcleo a ondas de radiofrecuencia de la misma frecuencia que el campo eléctrico generado por el núcleo, ambos campos se acoplan

y existe absorción de energía, dando como resultado la inversión del espín (Figura 10). A esto se le denomina *resonancia*, y se dice que el núcleo está en resonancia con la radiación aplicada.



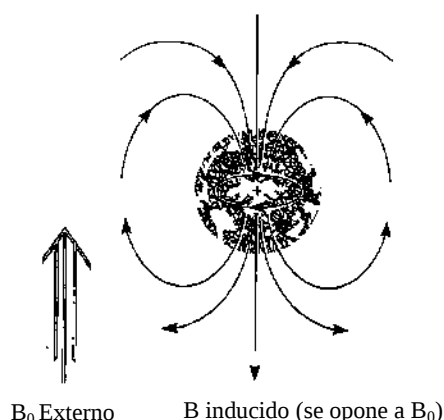
**Figura 10.** Fenómeno de RMN

En la actualidad, los espectros de RMN son comúnmente obtenidos mediante espectrómetros con transformada de Fourier. En éste tipo de espectrómetros, los núcleos presentes en la muestra son irradiados con un pulso corto de radiofrecuencia que abarca un amplio rango de frecuencias. De esta manera, todos los núcleos se excitan en un solo paso. Después, el espectrómetro detecta la radiación que emiten los núcleos al regresar a su estado inicial. Como la molécula posee diferentes tipos de núcleos, diversas frecuencias de radiación electromagnética son emitidas simultáneamente. A ésta emisión, denominada caída libre de la inducción o FID (*free induction decay*), se le aplican una serie de operaciones matemáticas conocidas como transformadas de Fourier, dando como resultado una gráfica en donde el eje  $x$  representa la frecuencia a la que ocurre la transición de espín y en el eje  $y$  la intensidad asociada a esta transición.<sup>34</sup>

## 2.10 Desplazamiento químico.

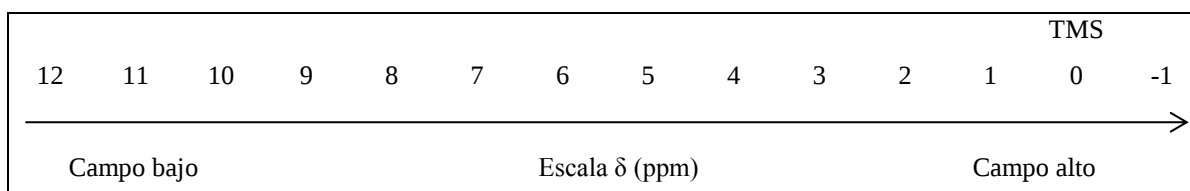
La utilidad de RMN en la caracterización estructural viene dada por el hecho de que no todos los núcleos presentes en la molécula entran en resonancia a la misma frecuencia, ya que cada núcleo tiene un ambiente electrónico diferente según su naturaleza. De ésta manera, se puede ver una señal distinta para cada uno de los núcleos presentes en la molécula estudiada. Pero, ¿cómo afecta el ambiente electrónico al fenómeno de resonancia?

Al igual que los núcleos atómicos, los electrones son partículas cargadas en movimiento. Bajo la influencia del campo magnético aplicado, los electrones de valencia comienzan a circular. Ésta circulación electrónica, también conocida como corriente local diamagnética, genera un campo magnético que se opone al aplicado, “protegiendo” al núcleo del campo externo. A este fenómeno se le denomina anisotropía diamagnética (Figura 11). Entre mayor sea la densidad electrónica, mayor será la protección o apantallamiento del núcleo y viceversa.



**Figura 11.** Anisotropía diamagnética

Como el efecto del campo magnético externo es menor en los núcleos con alta densidad electrónica, su frecuencia angular es menor, ocasionando que absorba energía a bajas frecuencias. Lo contrario ocurre en los núcleos con densidad electrónica baja. De ésta manera, el espectro de RMN se divide en dos regiones: campo alto, donde aparecen las señales de los núcleos “protegidos” o apantallados y campo bajo, donde aparecen las señales de los núcleos “desprotegidos” o desapantallados (Figura 12).



**Figura 12.** Escala de un espectro de RMN de  $^1\text{H}$

La posición en la gráfica en la cual absorbe un núcleo se denomina desplazamiento químico. Éste desplazamiento arroja información acerca del ambiente electrónico y magnético de cada núcleo, permitiendo así su identificación. En la actualidad existen tablas

bien elaboradas que indican en qué región del espectro pueden aparecer las señales de RMN según el tipo de núcleo.

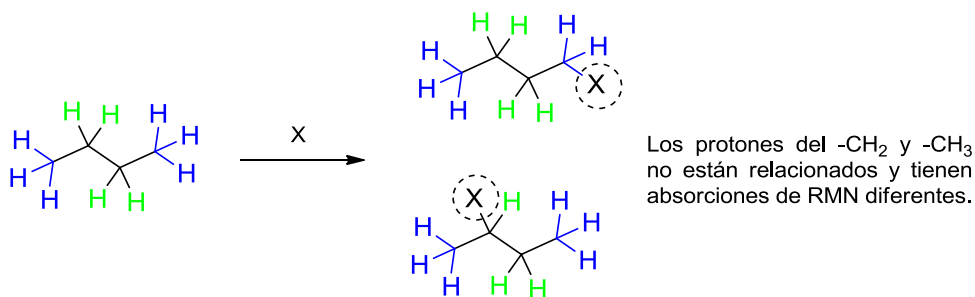
Para definir la posición de una absorción, es necesario usar una sustancia de referencia. En la práctica se usa el tetrametilsilano (TMS) y su desplazamiento se considera como el punto cero. Las gráficas de RMN se calibran utilizando una escala arbitraria llamada escala delta ( $\delta$ ), donde 1  $\delta$  es igual a 1 parte por millón (ppm) de la frecuencia de operación de espectrómetro. El desplazamiento químico de una absorción de RMN en unidades  $\delta$  es constante, independiente de la frecuencia de operación de espectrómetro.<sup>35</sup>

## 2.11 RMN de Hidrógeno (RMN $^1\text{H}$ ).

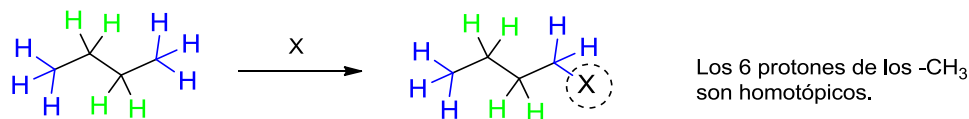
Debido a que cada hidrógeno electrónicamente distinto en una molécula tiene su absorción característica, la principal finalidad de la RMN  $^1\text{H}$  es determinar cuántos tipos de hidrógenos electrónicamente no equivalentes o diferentes están presentes en una molécula. A su vez, como el área bajo la señal de RMN es proporcional al número de protones que la generan, es posible conocer también su número.

En caso de existir duda de la equivalencia o no equivalencia de dos protones, puede determinarse comparando las estructuras que se formarían si se reemplazara cada hidrógeno por un grupo X. Existen 4 posibilidades:<sup>36</sup>

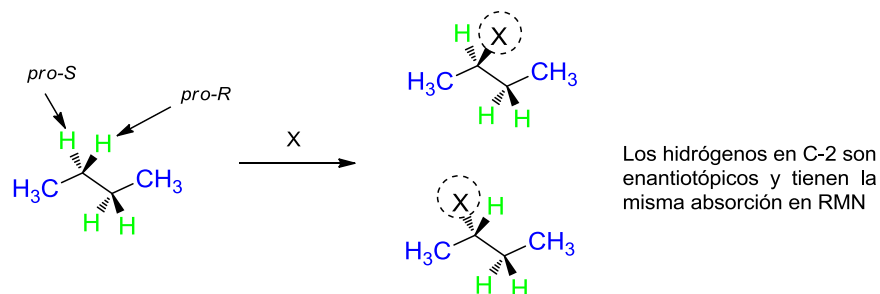
1. Cuando el reemplazo de H por X genera como productos isómeros constitucionales, se dice que los protones no son químicamente equivalentes, por lo que se espera señales diferentes en el espectro de RMN. Ejemplo:



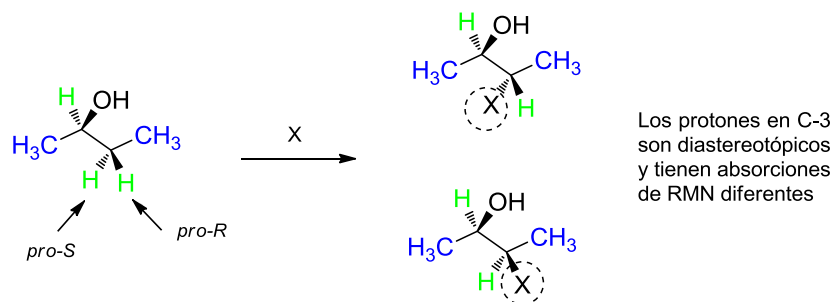
2. Cuando el reemplazo de H por X genera el mismo producto, sin importar cual H se remueva, se dice que los protones son química y electrónicamente equivalentes (*homotópicos*), por lo que se espera una sola señal para esos protones en el espectro de RMN. Ejemplo:



3. Cuando el reemplazo de H por X genera un nuevo centro de quiralidad y por lo tanto da como resultado enantiómeros diferentes dependiendo de si se reemplaza el hidrógeno *pro-R* o *pro-S*, se dice que los protones son *enantiotópicos*. Aun cuando este tipo de protones no son idénticos, son equivalentes electrónicamente y por lo tanto tienen la misma absorción de RMN. Ejemplo:

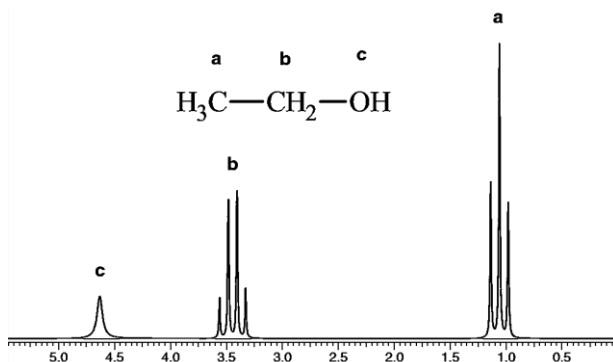


4. Cuando el reemplazo de H por X genera un segundo centro de quiralidad dando como resultado diastereómeros diferentes dependiendo si se reemplaza el hidrógeno *pro-R* o *pro-S*, se dice que los protones son *diastereotópicos*. Éste tipo de hidrógenos no son ni química ni electrónicamente equivalentes, por lo que presentan absorciones de RMN diferentes. Ejemplo:



## 2.12 Desdoblamiento espín-espín en los espectros de RMN $^1\text{H}$ .

Cuando se obtiene un espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se observa cómo algunas señales se desdoblan o “dividen” en lugar de aparecer como un solo pico. Éste fenómeno, conocido como acoplamiento espín-espín, se debe a que los protones que no son químicamente y magnéticamente equivalentes interaccionan entre sí magnéticamente. Generalmente ésta interacción se da en aquellos protones separados por dos, tres y ocasionalmente cuatro enlaces. Para ejemplificar éste fenómeno, en la Figura 13 se muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del etanol.

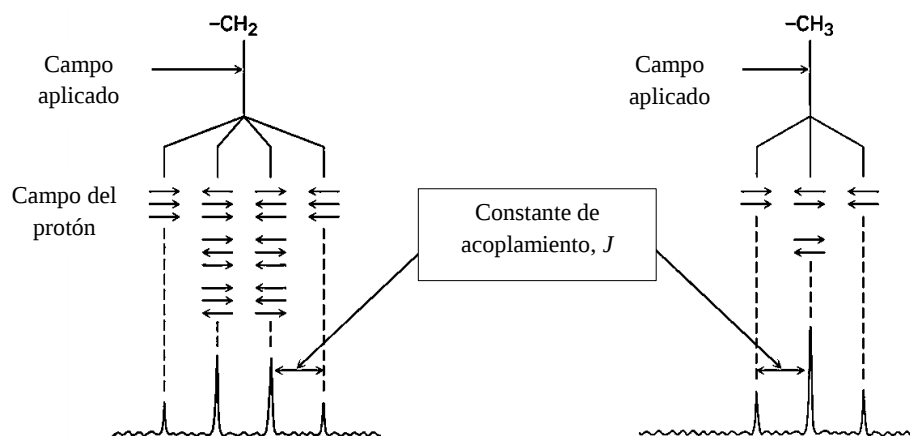


**Figura 13.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del etanol a 90 MHz.

Como se puede observar, los protones del grupo metilo (**a**) aparecen como una señal triple, los del metileno (**b**) como una cuádruple y el del oxidrilo (**c**) como una simple. Existe una regla general, llamada regla  $n + 1$  que indica que los protones que tienen  $n$  protones vecinos equivalentes muestran  $n + 1$  señales. Por ejemplo, para el grupo metilo sería  $2 + 1 = 3$ , tres señales y para el metileno  $3 + 1 = 4$ , cuatro señales.

Pero, ¿por qué pasa esto? En la Figura 14 se muestran los posibles estados espín de ambos grupos. Para el caso del metileno, los protones pueden estar alineados con el campo aplicado, en contra de él, o bien, uno a favor y el otro en contra. De ésta manera, los protones del grupo metilo experimentarán diferentes campos magnéticos dependiendo de la orientación de los protones metilénicos. Cuando ambos protones del  $-\text{CH}_2$  están alineados con el campo externo, el campo efectivo total sentido por los protones del  $-\text{CH}_3$  es ligeramente mayor, desplazando la señal a campo bajo. Cuando uno está alineado y el otro

en contra, no hay efecto neto sobre los protones del metilo. Finalmente, cuando ambos protones del  $-\text{CH}_2$  están en contra del campo aplicado, el campo efectivo sentido por los protones del  $-\text{CH}_3$  es ligeramente menor, desplazando la señal a campo alto. La explicación anterior también aplica para el desdoblamiento de los protones metilénicos.



**Figura 14.** Desdoblamiento espín-espín de los grupos metilo y metileno del etanol.

La probabilidad de que un protón del  $-\text{CH}_2$  esté alineado con el campo externo y el otro en contra, es mayor que la probabilidad de que estén ambos alineados o en contra. Es por eso que la intensidad relativa de las señales de los protones del  $-\text{CH}_3$  es 1:2:1. Como se observa en la figura 18, la constante de acoplamiento es la distancia entre las señales en un multiplete y se denota por  $J$ . Estas constantes se miden en Hertz y por lo general caen en el intervalo de 0 a 18 Hz. Debido a que el acoplamiento espín-espín es una interacción recíproca entre dos grupos adyacentes de protones, algunas veces es posible decir cuáles multipletes están relacionados, es decir, si son grupos adyacentes.

### 2.13 RMN de carbono (RMN $^{13}\text{C}$ ).

La RMN de  $^{13}\text{C}$  permite determinar el número de carbonos no equivalentes presentes, así como su tipo (metilo, metileno, metino, aromático, carbonilo, etc.), aportando valiosa información acerca del esqueleto de carbono del compuesto estudiado.

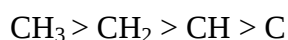
Desafortunadamente, el isótopo de carbono más abundante ( $^{12}\text{C}$ ) no es magnéticamente activo; sin embargo el  $^{13}\text{C}$  sí lo es, pero su abundancia natural es tan sólo

del 1.1%; por lo tanto, 1 de cada 100 carbonos en una muestra es observable por RMN, lo que dificulta su detección. Afortunadamente, este problema ha sido resuelto por el uso del promedio de la señal y los espectrómetros con transformada de Fourier (TF-RMN).

La mayor parte de las resonancias de  $^{13}\text{C}$  están entre 0 y 220 ppm hacia el campo bajo a partir de la línea de resonancia de TMS. Al igual que en la RMN de protón, el desplazamiento químico de cada carbono es dependiente de su ambiente electrónico.

A diferencia de la RMN  $^1\text{H}$ , en los espectros de carbono no se observa el desdoblamiento espín-espín *homonuclear*, es decir, por la interacción entre átomos de carbono adyacentes. Esto se debe a la escasa abundancia del  $^{13}\text{C}$ , por lo que es muy poco probable encontrar dos  $^{13}\text{C}$  en una misma molécula y aún menos probable encontrar dos  $^{13}\text{C}$  adyacentes. Sin embargo, existe acoplamiento espín-espín *heteronuclear*, es decir, entre el  $^{13}\text{C}$  y otros núcleos magnéticamente activos como el  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , etc. El acoplamiento entre el  $^1\text{H}$  y el  $^{13}\text{C}$  complica dramáticamente el espectro de carbono haciendo difícil su interpretación, por lo que usualmente se “desacopla”. El desacoplamiento se logra irradiando todos los protones de la molécula con un amplio espectro de frecuencias. Esto causa que los protones estén en constante cambio de espín, es decir, de su estado  $\alpha$  a su estado  $\beta$  y viceversa. Estos cambios rápidos desacoplan cualquier interacción espín-espín  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ , dando como resultado una señal simple por cada átomo de carbono no equivalente.

Cuando se obtiene un espectro de  $^{13}\text{C}$  desacoplado, la intensidad de las señales aumenta significativamente en comparación con los acoplados. A este fenómeno se le conoce como efecto nuclear Overhauser (NOE) y su explicación es la siguiente: al irradiar los protones para desacoplarlos del carbono, se genera un exceso de éstos en el estado excitado ( $\beta$ ); al ocurrir esto, los núcleos de carbono “sienten” el desequilibrio energético y para compensarlo, comienzan a ajustar su espín al estado de menor energía ( $\alpha$ ). De esta manera, entre más átomos de hidrógeno estén unidos al carbono, mayor será la intensidad de la señal de RMN, como se muestra a continuación:



## 2.14 Espectroscopía de RMN $^{13}\text{C}$ DEPT.

La RMN DEPT (por ampliación sin distorsión por transferencia de polarización) es una técnica muy valiosa de RMN de carbono, ya que permite determinar el número de hidrógenos unidos a cada átomo de carbono. Por lo general, un experimento DEPT se hace en tres etapas. La primera etapa consiste en obtener el espectro de  $^{13}\text{C}$  desacoplado para localizar los desplazamientos químicos de todos los carbonos. Después se obtiene un segundo espectro denominado DEPT-90 utilizando condiciones especiales bajo las que sólo aparecen señales debidas a los metinos (CH); están ausentes las señales de los metilenos, metilos y carbonos cuaternarios. Finalmente se obtiene un tercer espectro llamado DEPT-135 en el cual aparecen resonancias de los metilos ( $\text{CH}_3$ ) y metinos (CH) como señales positivas (hacia arriba de la línea base) y las señales de los metilenos ( $\text{CH}_2$ ) aparecen como señales negativas (hacia debajo de la línea base). Este tipo de espectros aporta información muy importante que permite asignar las señales de los carbonos de una manera más precisa.<sup>36</sup>

## 2.15 Experimentos en dos dimensiones (RMN-2D).

Existe un tipo de experimentos denominados RMN en dos dimensiones, los cuales facilitan la elucidación estructural de moléculas complejas. Entre ellos se encuentran COSY (correlación espectroscópica), el cual se divide en HOMCOR (correlación homonuclear) y HETCOR (correlación heteronuclear), NOESY (espectroscopía de intercambio y mejoramiento nuclear Overhauser), entre otros.

El experimento COSY establece la correlación entre el desplazamiento químico de un núcleo con el desplazamiento de otro. Cuando el experimento se realiza con un sólo núcleo, se llama COSY homonuclear u HOMCOR, y cuando se realiza con núcleos diferentes se llama COSY heteronuclear o HETCOR. La principal aplicación del COSY homonuclear es establecer la correlación entre protones a dos o tres enlaces, es decir, permite conocer cuál protón se acopla con cuál. En cuanto al HETCOR, éste permite establecer la correlación entre un núcleo que se observa a baja frecuencia, como el  $^1\text{H}$ , con otro de alta frecuencia, como el  $^{13}\text{C}$ . En este tipo de espectros se establece la conectividad a

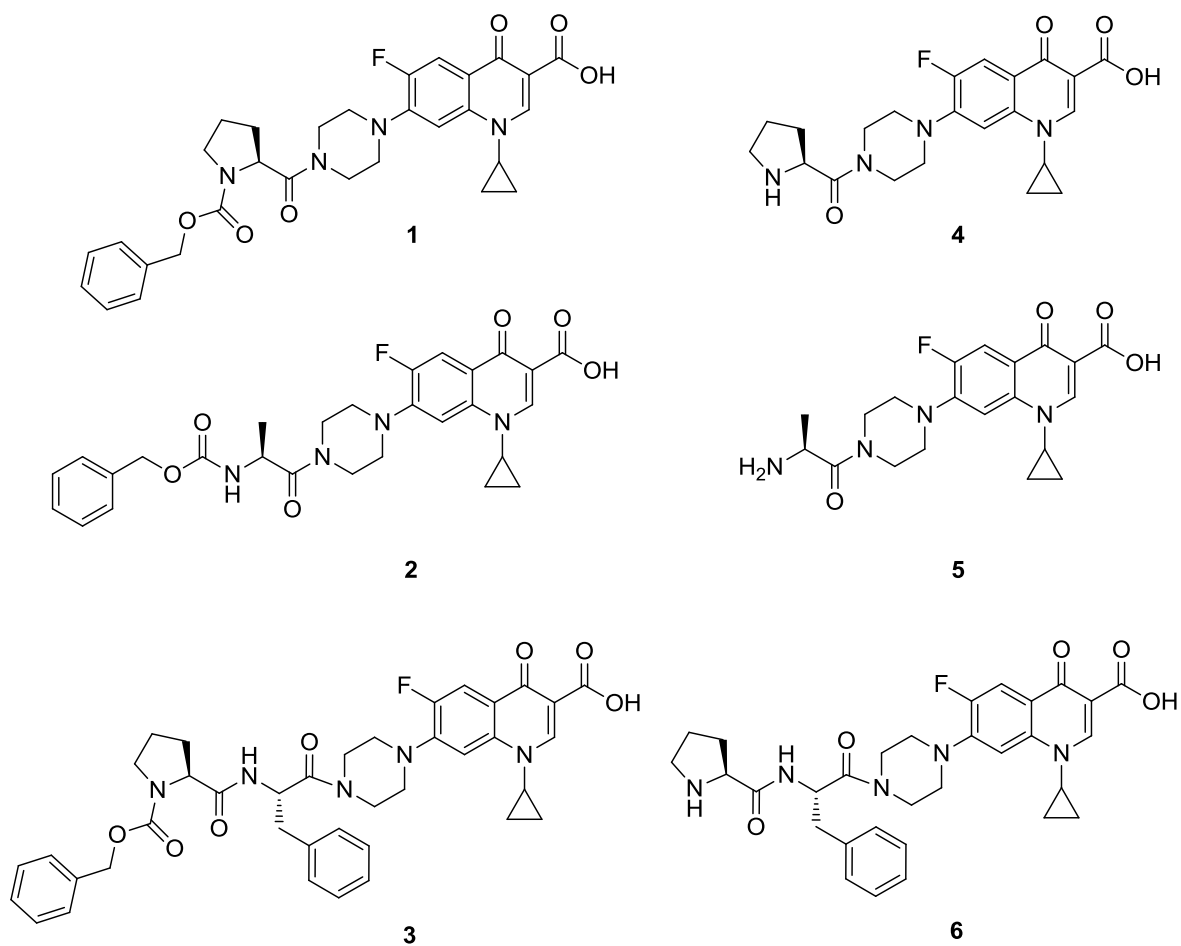
un enlace, es decir, cuál hidrógeno está unido a cuál carbono.<sup>33</sup> Sin duda la información obtenida mediante éstas técnicas facilita enormemente la caracterización estructural de los compuestos orgánicos.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Caracterización estructural mediante Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones de nuevos derivados del ciprofloxacino funcionalizados en la posición 7 con *L*-aminoácidos y péptidos, así como la optimización de la metodología sintética para su obtención.

### 4. OBJETIVOS PARTICULARES

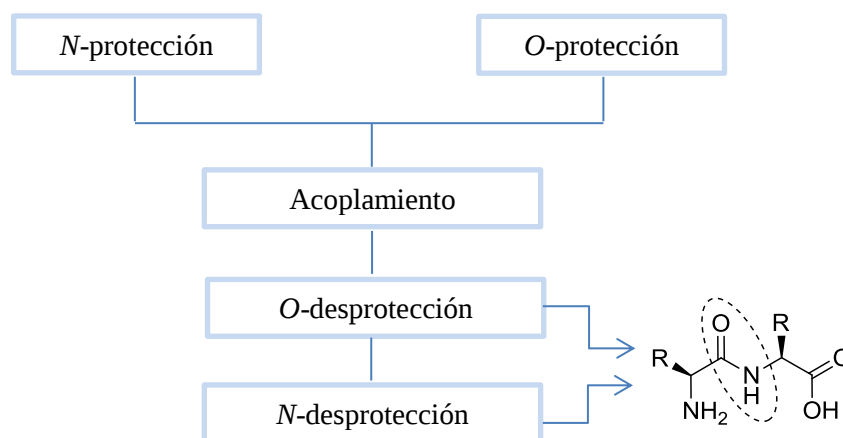
I. Sintetizar los compuestos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** y **6**.



II. Caracterización estructural de los compuestos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** y **6** mediante Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones y espectrometría de masas.

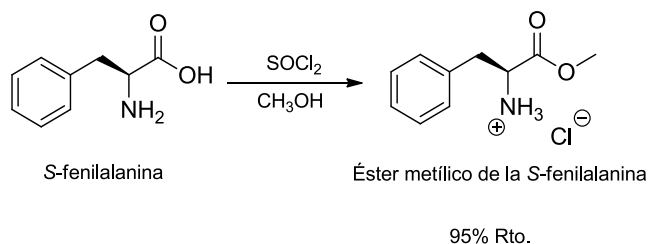
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obtención del dipéptido (*S,S*)-prolilfenilalanina se llevó a cabo mediante el protocolo para síntesis de péptidos en solución (Esquema 6). Dada la bifuncionalidad de los aminoácidos, es imprescindible la protección de los grupos funcionales cuya reactividad es indeseada, con el fin de obtener sólo el producto buscado. A esto, le sigue la formación del enlace peptídico y finalmente la remoción de los grupos protectores.



**Esquema 6.** Protocolo para la síntesis de péptidos en solución.

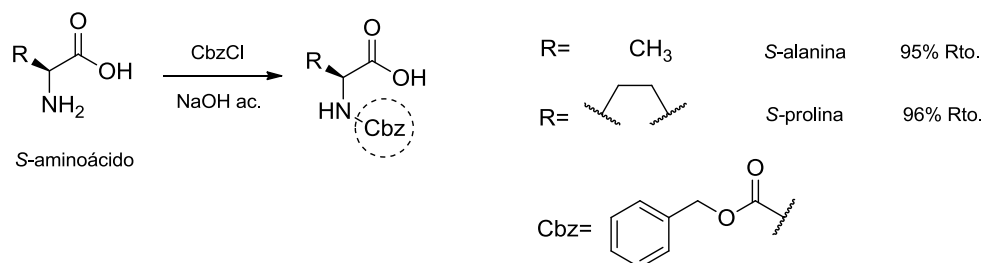
Se comenzó con la protección del grupo ácido de la *S*-fenilalanina mediante una reacción de esterificación con metanol usando cloruro de tionilo, obteniendo el éster metílico correspondiente en forma de clorhidrato en rendimientos casi cuantitativos. (Esquema 7).



**Esquema 7.** O-protección de la *S*-fenilalanina.

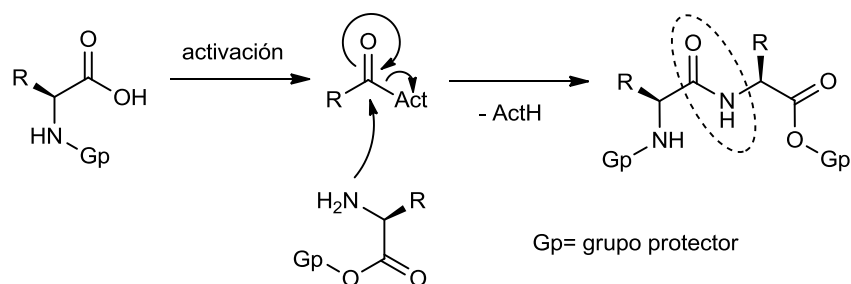
Después se realizó la *N*-protección de la *S*-prolina y *S*-alanina mediante una reacción de acilación con cloroformiato de bencilo en medio básico, obteniendo

rendimientos por arriba del 90% (Esquema 8). El uso del grupo Cbz en síntesis peptídica tiene como ventajas la obtención de productos *N*-protegidos en muy buenos rendimientos, supresión de la racemización durante la formación del enlace peptídico y su fácil remoción mediante hidrogenación catalítica.<sup>37</sup>



**Esquema 8.** *N*-protección de aminoácidos.

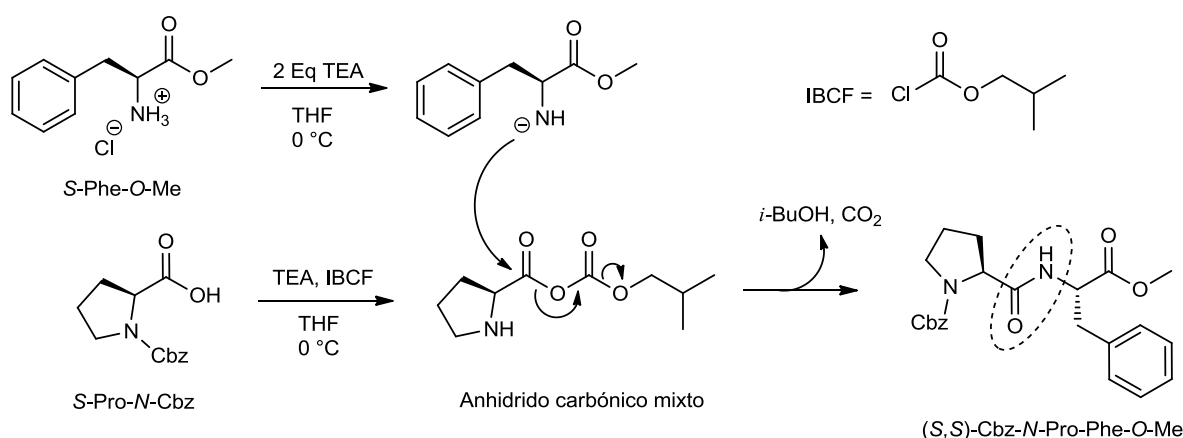
El siguiente paso consistió en la formación del enlace amida entre la *S*-prolina y la *S*-fenilalanina. La reacción entre el grupo ácido de un aminoácido y el grupo amino de otro no procede espontáneamente a temperatura ambiente; únicamente ocurre a temperaturas superiores a 200 °C, condiciones que comprometen la integridad estructural de los aminoácidos.<sup>38</sup> Debido a esto, es necesario el uso de “agentes activantes”, compuestos que convierten al –OH del grupo ácido en un buen grupo saliente, promoviendo así la formación del enlace peptídico (Esquema 9).



**Esquema 9.** Principio del proceso de activación para la formación del enlace amida.

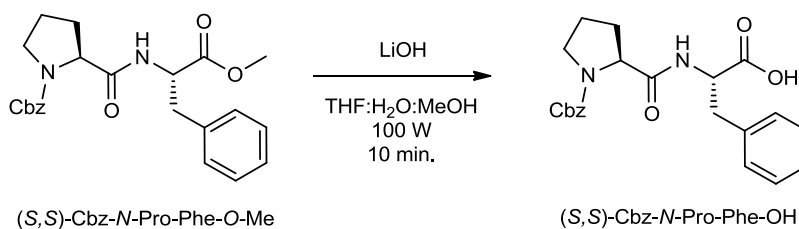
En este caso, se utilizó cloroformiato de isobutilo (IBCF) como agente activante. El IBCF se utiliza ampliamente en la síntesis de péptidos en solución a gran escala. Los acoplamientos de este tipo involucran la previa activación del grupo carboxilo con el IBCF en presencia de una base amínica terciaria (TEA o DIEA) dando origen al anhídrido carbónico mixto correspondiente, el cual reacciona con el componente amina.

En el Esquema 10 se muestra la reacción de acoplamiento para obtener el dipéptido (S,S)-prolilfenilalanina. La reacción se llevó a cabo en THF a baja temperatura y en presencia de TEA. Debido a que el éster metílico de la fenilalanina se encuentra en forma de clorhidrato, es necesario utilizar un equivalente de base extra para que el grupo amino se convierta en una especie más nucleofílica para que así pueda reaccionar con el anhídrido mixto formado entre el grupo ácido de la prolina y el IBCF. El resultado final es la formación del enlace peptídico entre ambos aminoácidos.



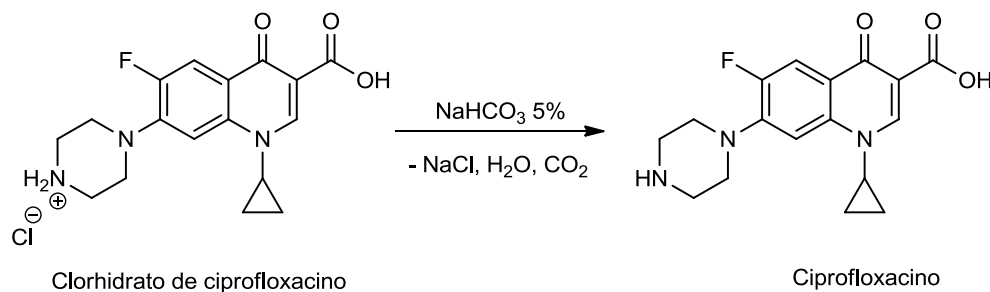
**Esquema 10.** Síntesis del dipéptido (S,S)-prolilfenilalanina.

Como la función ácido del dipéptido (S,S)-Cbz-N-Pro-Phe-O-Me se encuentra bloqueada, el siguiente paso fue la O-desprotección mediante hidrólisis alcalina asistida por microondas con LiOH en THF-H<sub>2</sub>O-MeOH (25:3:0.1) (Esquema 11). El uso de LiOH como base permite obtener condiciones de reacción más suaves, protegiendo la integridad del centro estereogénico.



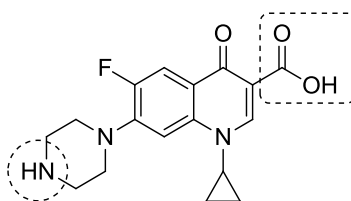
**Esquema 11.** O-desprotección del dipéptido (S,S)-prolilfenilalanina.

Una vez obtenido el dipéptido y los aminoácidos N-protegidos, el siguiente paso fue su acoplamiento con el ciprofloxacino, el cual fue extraído de tabletas comerciales al tratarlas con una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> al 5% (Esquema 12).



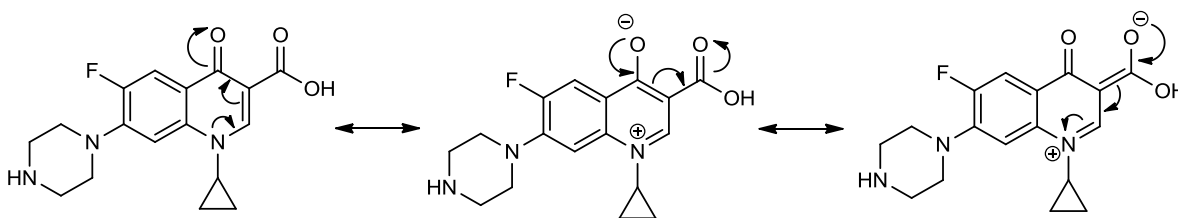
**Esquema 12.** Obtención del ciprofloxacino a partir de la sal comercial.

Si se analiza la estructura química del ciprofloxacino, se puede observar que posee un grupo amino y un grupo ácido carboxílico, tal como los aminoácidos (Figura 15). Como consecuencia, para establecer el enlace amida entre el nitrógeno piperazínico y los aminoácidos, puede utilizarse el protocolo de síntesis de péptidos antes descrito.



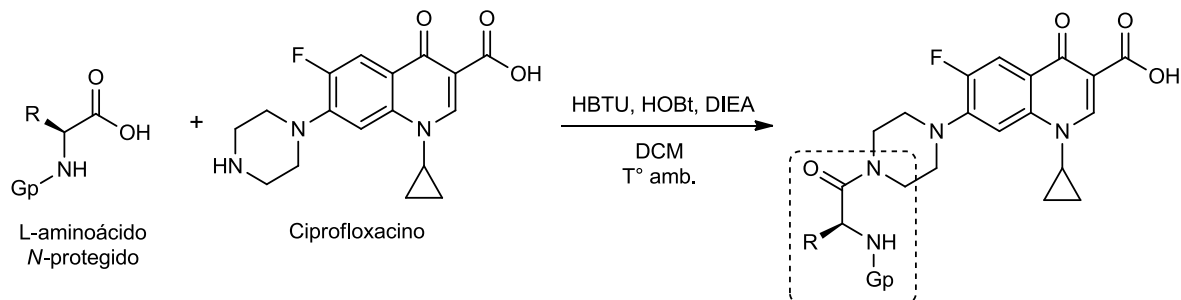
**Figura 15.** Bifuncionalidad del ciprofloxacino.

Podría considerarse como necesaria la *O*-protección del ciprofloxacino para evitar reacciones colaterales durante la reacción de acoplamiento. Sin embargo, debido a la deslocalización de electrones promovida por el nitrógeno en la posición 1 y el grupo cetona en la posición 4, la nucleofilicidad del grupo ácido está considerablemente disminuida, haciendo innecesaria su protección (Esquema 13).



**Esquema 13.** Deslocalización de los electrones del grupo ácido del ciprofloxacino.

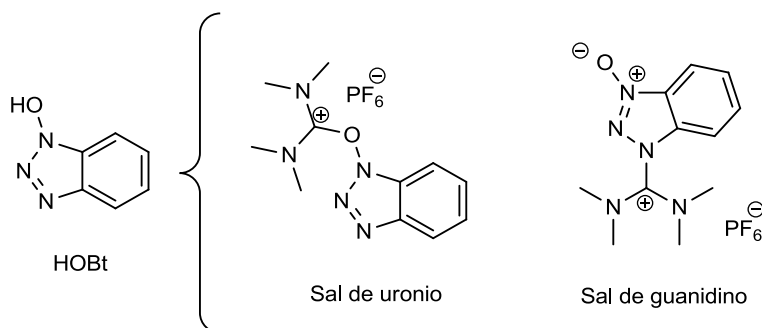
Recientemente nuestro equipo de trabajo reportó una metodología para concertar dicho acoplamiento usando HBTU como agente activante, HOBt como aditivo y DIEA como base (Esquema 14).<sup>7</sup>



**Esquema 14.** Metodología reportada para el acoplamiento entre aminoácidos y piperazinilquinolonas.<sup>7</sup>

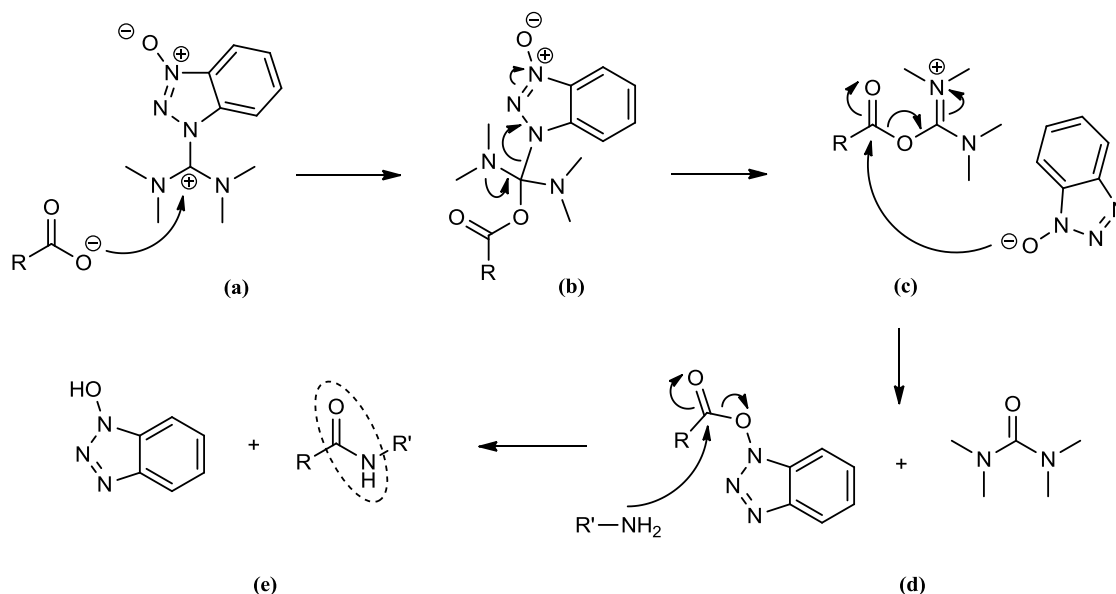
La técnica indicaba la adición simultánea de los reactantes a temperatura ambiente, empleando DCM como disolvente. El producto buscado se obtenía, sin embargo, la formación de subproductos hacía necesaria su purificación mediante cromatografía en columna. En la búsqueda de soluciones para optimizar ésta reacción, se hizo una revisión en la literatura acerca del uso y propiedades del HBTU como agente activante.

El HBTU es un derivado del HOBt utilizado ampliamente en síntesis peptídica. Pertenece al grupo de compuestos conocido como sales de uronio/guanidino. Éste tipo de sales poseen un carbono positivo y en sus inicios se les asignó una estructura de tipo uronio. Sin embargo, estudios recientes de difracción de rayos X y RMN en solución y estado sólido, han demostrado que la estructura correcta de algunos de estos compuestos, entre ellos el HBTU, es el isómero guanidino (Figura 16).<sup>39</sup>



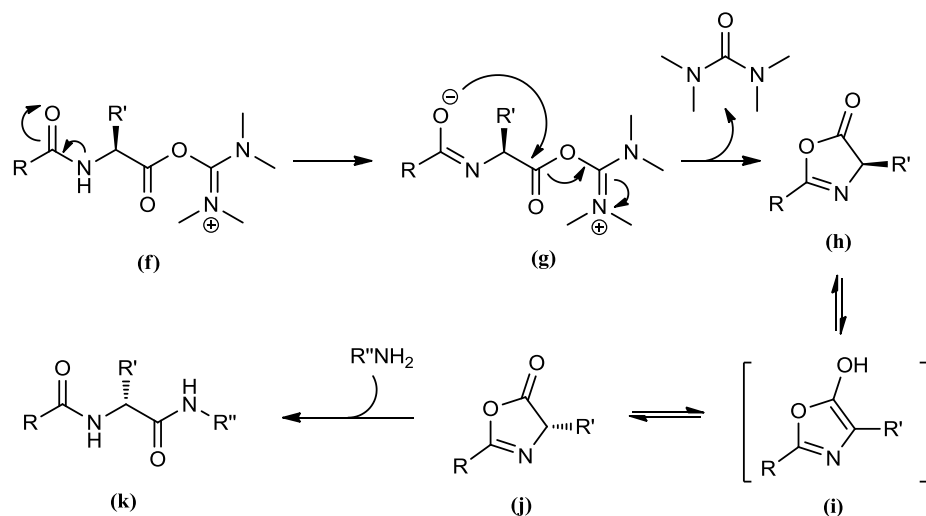
**Figura 16.** N- y O- isómeros del HBTU, agente activante derivado del HOBt.

Mecanísticamente, la activación se da mediante el ataque nucleofílico por parte del ión carboxilato sobre el carbocatión del HBTU (**a**), lo cual da origen al intermediario aciluronio (**c**) altamente reactivo que posteriormente se convierte en un éster activo al reaccionar con el HOBT (**d**); este último intermediario sufre aminólisis por parte del componente amino, dando como resultado la formación del enlace peptídico (**e**) (Esquema 15)



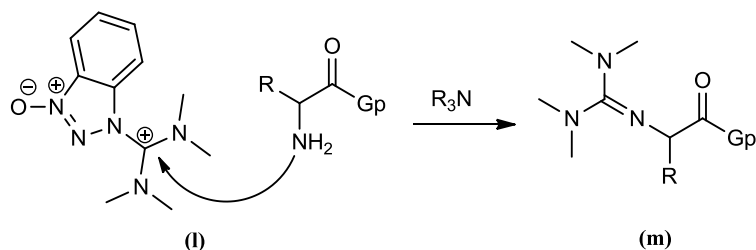
**Esquema 15.** Mecanismo de reacción de la activación del grupo ácido mediada por el HBTU.

Desafortunadamente, el proceso de activación no está exento de reacciones colaterales. Durante la reacción de acoplamiento, el intermediario aciluronio (**f**) puede convertirse en una oxazol-5(4*H*)-ona (**h**), hecho indeseable ya que a través de su tautomerismo ceto-enólico (**i**) conduce a la racemización del centro estereogénico (**j**) (Esquema 16).



**Esquema 16.** Formación del intermediario oxazolona y sus consecuencias en la integridad del centro estereogénico.

Otra de las posibles reacciones colaterales asociadas al uso de sales de uronio/guanidino es la formación de bases de Schiff (**m**) por la reacción del componente amino con el agente activante (Esquema 17).



**Esquema 17.** Formación de bases de Schiff como subproductos.

Afortunadamente, las reacciones secundarias pueden ser evitadas si se toman algunas precauciones. Entre las medidas disponibles para minimizar la racemización por la formación de oxazolonas se encuentran el uso de solventes poco polares, el empleo de la mínima cantidad de base necesaria, a bajas temperaturas de reacción y el uso de carbamatos como grupos protectores.<sup>40</sup> En cuanto a la formación de bases de Schiff, se debe poner especial atención en el orden de adición de los reactantes, así como en las cantidades empleadas. El componente ácido debe ser sometido a previa activación antes de la adición del componente amino y deben emplearse cantidades equimolares de ambos componentes.

El protocolo experimental comúnmente empleado para acoplamientos peptídicos usando sales de uronio/guanidino involucra el uso de 2 equivalentes molares de una base amínica terciaria como la DIEA o TEA: un equivalente es para desprotonar el grupo ácido del aminoácido *N*-protegido y el segundo equivalente para neutralizar el HOBt generado, lo cual evita un descenso en el pH del sistema y por tanto, una disminución en la velocidad de reacción. Un exceso de base puede acelerar el acoplamiento; sin embargo, también compromete la integridad del centro estereogénico.

Por otro lado, el solvente influye tanto en la reactividad del agente activante como en el grado de racemización. La DMF es el solvente más comúnmente utilizado debido a la buena solubilidad que presentan éste tipo de sales (HBTU: 0.5 mol L<sup>-1</sup>). Sin embargo, el uso de solventes poco polares como el DCM disminuye el riesgo de racemización; incluso se ha reportado el uso de mezclas binarias como DCM-DMF 1:1 para reducir el grado de epimerización en acoplamientos de fragmentos peptídicos.<sup>41</sup>

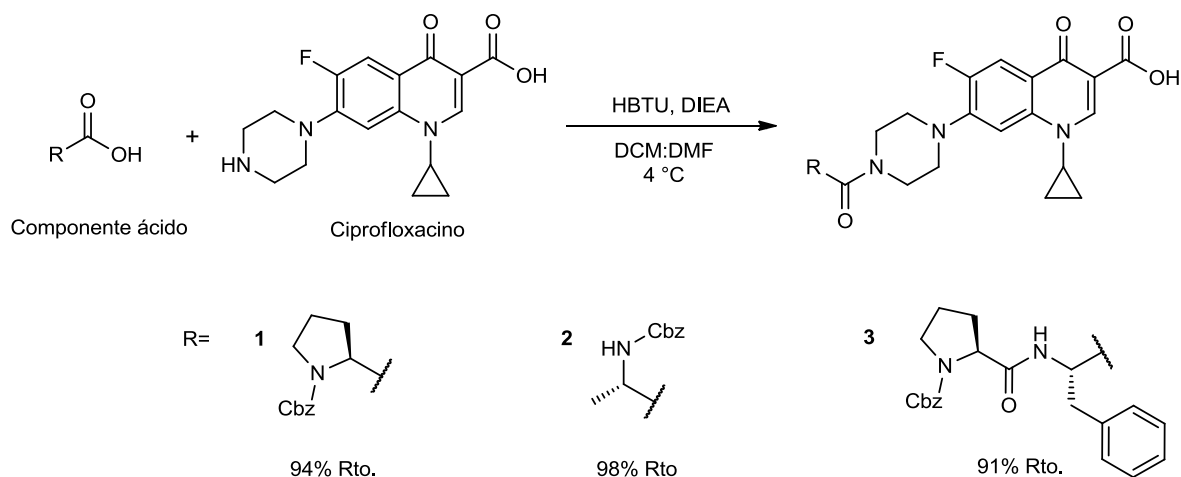
El uso de aditivos como el HOBt en éste tipo de acoplamientos ha sido objeto de debate. Si bien su adición en los acoplamientos mediados por carbodiimidas ayuda a disminuir el grado racemización,<sup>38</sup> su uso es cuestionable cuando se emplean derivados del HOBt como agentes activantes. Se cree que la adición de un equivalente extra de este compuesto acelera la formación del éster activo, disminuyendo el tiempo de reacción y la formación de productos secundarios. Sin embargo, dicha afirmación no está del todo clara. De hecho, se ha demostrado que su inclusión puede ocasionar bajos rendimientos debido a la pérdida de alcalinidad del sistema.<sup>41</sup> Aunado a esto, recientemente el HOBt fue retirado del mercado debido a sus características explosivas, haciendo difícil su adquisición.

De esta manera, con el fin de evitar reacciones colaterales, se decidió aplicar las siguientes modificaciones a la metodología sintética:

- 1) Activar el aminoácido *N*-protegido por un periodo de tiempo razonable antes de la adición del ciprofloxacino, a fin de evitar la formación de subproductos,
- 2) Utilizar como solvente la mezcla DCM-DMF (7:3) para favorecer la solubilización del HBTU y la activación del grupo ácido,
- 3) Omitir el HOBt del sistema de acoplamiento,

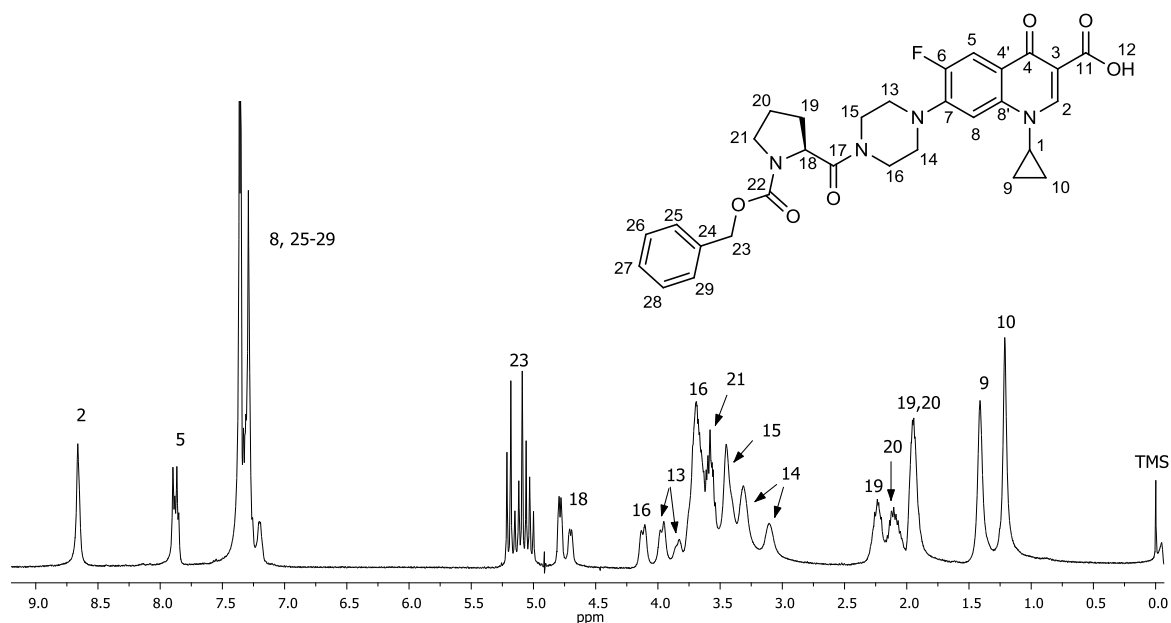
4) Ejecutar la reacción a baja temperatura.

Dichas modificaciones mostraron buenos resultados, ya que se obtuvieron los compuestos **1**, **2** y **3** en muy buenos rendimientos (Esquema 18).



**Esquema 18.** Síntesis de los derivados del Ciprofloxacino *N*-piperazinil sustituidos.

En la Figura 17 se muestra el espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto **1** (Cbz-*N*-Pro-Cpx). Se puede observar una señal simple en 8.66 ppm correspondiente a H-2, una señal doble en 7.87 ppm ( $J = 12.4$  Hz) correspondiente a H-5, una señal múltiple en 7.32 ppm correspondiente a los hidrógenos aromáticos H-8 y H-25-29, dos señales dobles en 5.19 y 5.07 ppm ( $J = 12.0$  Hz) y dos señales dobles en 5.13 y 5.00 ppm ( $J = 12.0$  Hz) correspondientes a H-23, dos señales dobles en 4.79 y 4.70 ppm ( $J = 5.8$  Hz) correspondientes a H-18, dos señales múltiples en 4.1 y 3.6 correspondientes a H-16, dos señales múltiples en 3.95 y 3.83 ppm correspondientes a H-13, una señal múltiple en 3.58 ppm correspondiente a H-21, una señal múltiple en 3.45 ppm correspondiente a H-15, dos señales múltiples en 3.31 y 3.11 correspondientes a H-14, dos señales múltiples en 2.24 y 1.94 ppm correspondientes a H-19, dos señales múltiples en 2.10 y 1.95 ppm correspondientes a H-20, una señal simple en 1.41 ppm correspondiente a H-9 y finalmente una señal simple en 1.21 ppm correspondiente a H-10.

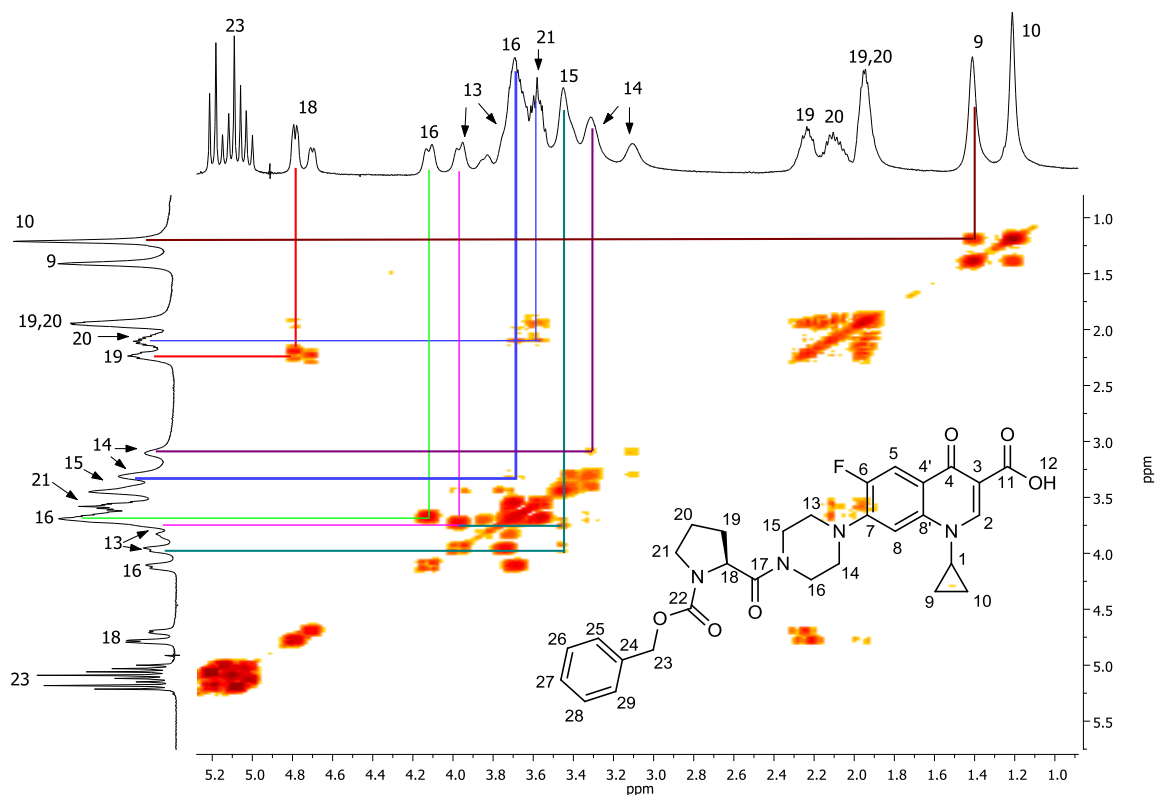


**Figura 17.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **1**.

Como se puede observar en la figura 18, la mayoría de las señales se muestran ensanchadas y con un patrón de multiplicidad complejo. Esto en parte a la naturaleza del compuesto pero principalmente a fenómenos dinámicos que involucran el intercambio de los núcleos entre uno o más sitios magnéticamente distintos, lo cual hace difícil su análisis y asignación.<sup>42</sup>

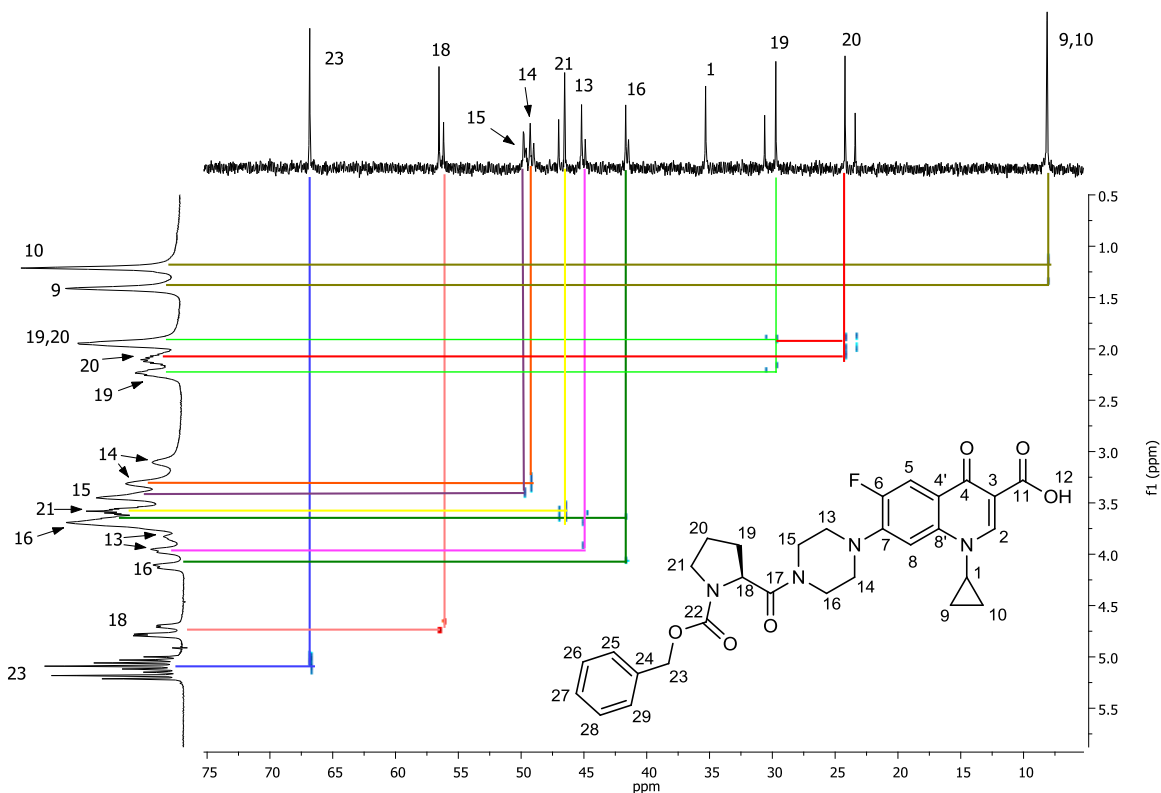
Por ejemplo, para H-23 se observan cuatro señales dobles cuando idealmente deberían ser sólo dos y para H-18 dos señales dobles cuando se esperarían una. Tal multiplicidad es debida a la baja velocidad de interconversión entre dos conformeros y como consecuencia las señales de cada uno alcanzan a ser detectadas por el espectrómetro.

Afortunadamente este problema puede resolverse mediante el empleo de técnicas de RMN en dos dimensiones, como el experimento COSY y HETCOR. En la Figura 18 se muestra el espectro COSY del compuesto **1**. Como se recordará, éste experimento permite determinar la correlación entre protones a dos o tres enlaces. De esta manera, se puede observar el acoplamiento geminal de H-16; después en 3.95 ppm se aprecia el acoplamiento geminal de los protones H-13 y el acoplamiento vecinal de éstos con H-15, el acoplamiento vecinal entre los protones de H-21 y H-20 y el acoplamiento geminal de los protones H-14. Finalmente se observa el acoplamiento vecinal de H-9 con H-10.



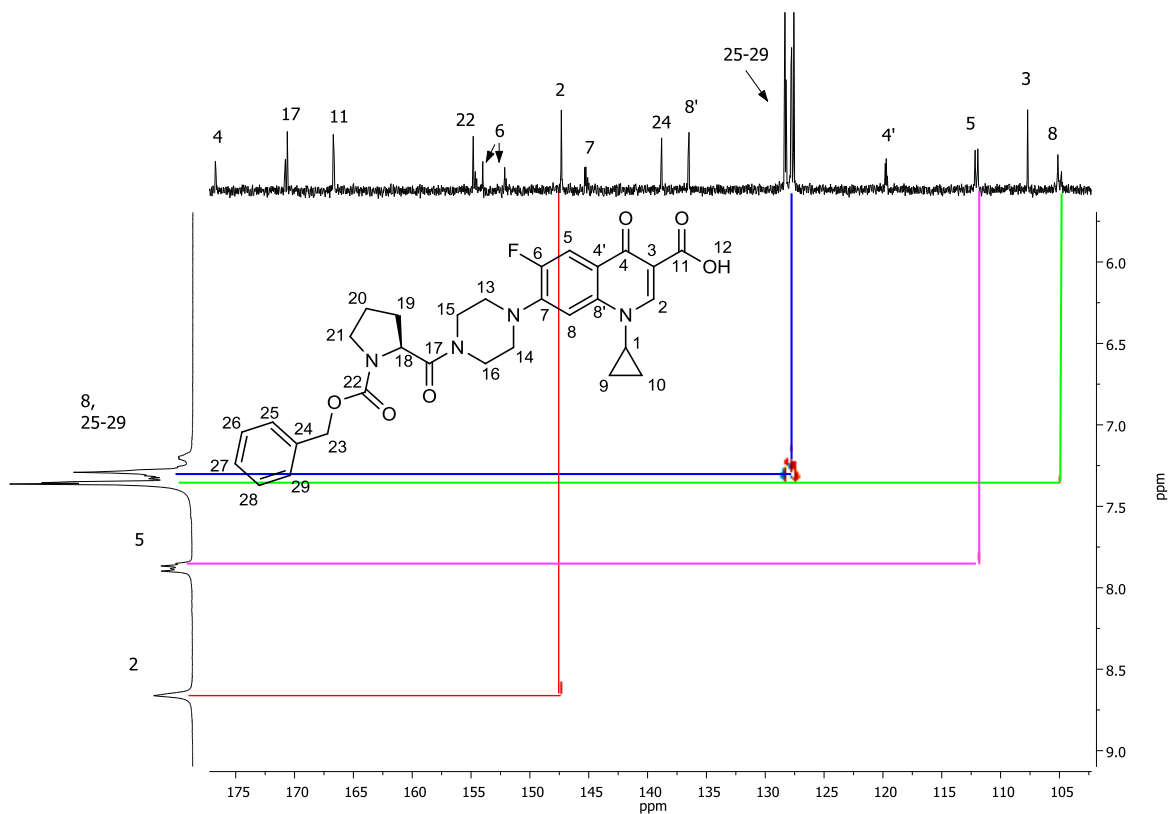
**Figura 18.** Ampliación del espectro de RMN-COSY en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz para el compuesto **1**.

En la Figura 19 se muestra la región de campo alto del espectro HETCOR del compuesto **1**. Con éste experimento se establece la conectividad a un enlace, es decir, cuál hidrógeno está unido a cuál carbono. Así, se puede observar en 66.87 ppm la señal correspondiente al metileno en C-23, en 56.54 y 56.17 ppm aparecen dos señales correspondientes a C-18, en 49.82 ppm una señal para el metileno C-15, en 49.21 ppm una señal para C-14, en 47.01 y 46.53 ppm dos señales correspondientes a C-21, en 45.19 y 44.90 dos señales para C-13, en 41.67 y 41.45 ppm dos señales para C-16; en 35.31 ppm aparece una señal para el metino C-1 del ciclopropilo, en 30.61 y 29.72 ppm dos señales correspondientes a C-19 y en 24.21 y 23.40 ppm dos señales para C-20. Finalmente en 8.12 ppm aparece una señal para los dos metilenos del ciclopropilo C-9 y C-10.



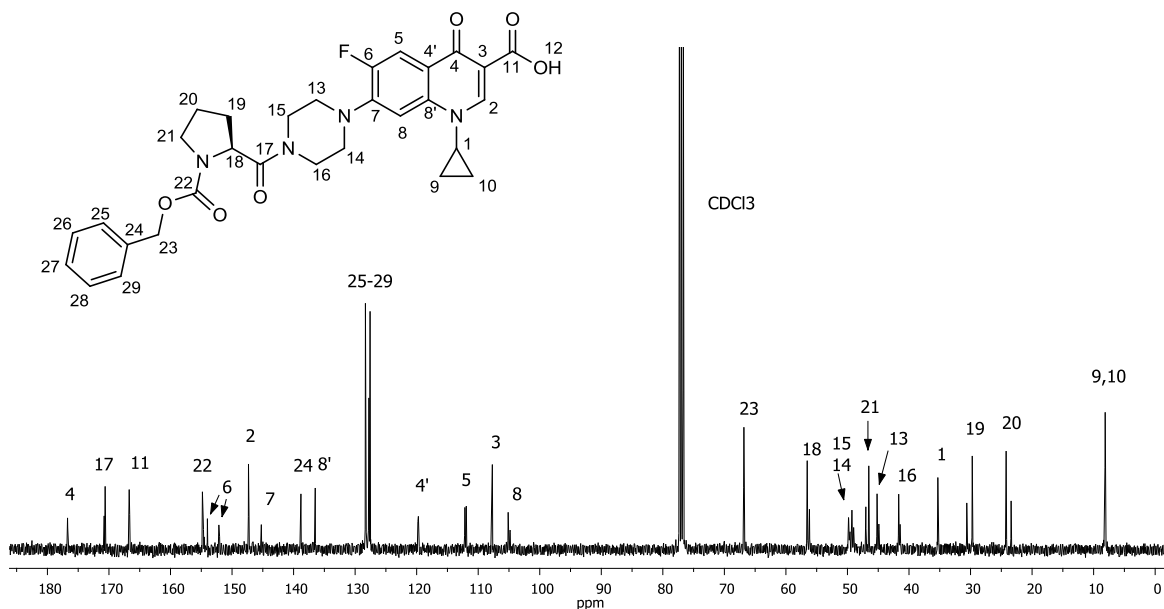
**Figura 19.** Ampliación del espectro HETCOR en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **1**.

Resulta interesante el hecho de que las señales correspondientes a los carbonos del anillo de pirrolidina y piperazina aparezcan “dobleteadas”, hecho atribuible a fenómenos dinámicos como se explicó anteriormente. A continuación se muestra la región a campo alto del espectro HETCOR (Figura 20). Como se puede observar, las señales de los grupos carbonilo de las posiciones 4, 17, 11 y 22 aparecen en 176.73, 170.78, 166.71 y 154.81 ppm, respectivamente. Después aparecen dos señales para el carbono aromático C-6 en 154.0 y 152.14 ppm cuyo desdoblamiento es debido a su acoplamiento con  $^{19}\text{F}$ ; en 147.23 ppm aparece la señal del carbono vinílico C-2, en 145.34 ppm la señal del carbono aromático C-7, en 138.81 ppm la señal del carbono ipso C-24, en 136.56 ppm las señal del carbono cuaternario C-8' y de 128.33 a 127.57 aparecen cinco señales correspondientes a los carbonos aromáticos C-25 a C-29. Posteriormente, en 119.80 ppm se observa la señal del grupo cuaternario C-4', en 112.16 y 111.93 ppm se observan dos señales para C-5 debido también a su acoplamiento con  $^{19}\text{F}$ , en 107.70 ppm la señal del carbono cuaternario C-3, en 105.13 ppm la señal del carbono aromático C-8.



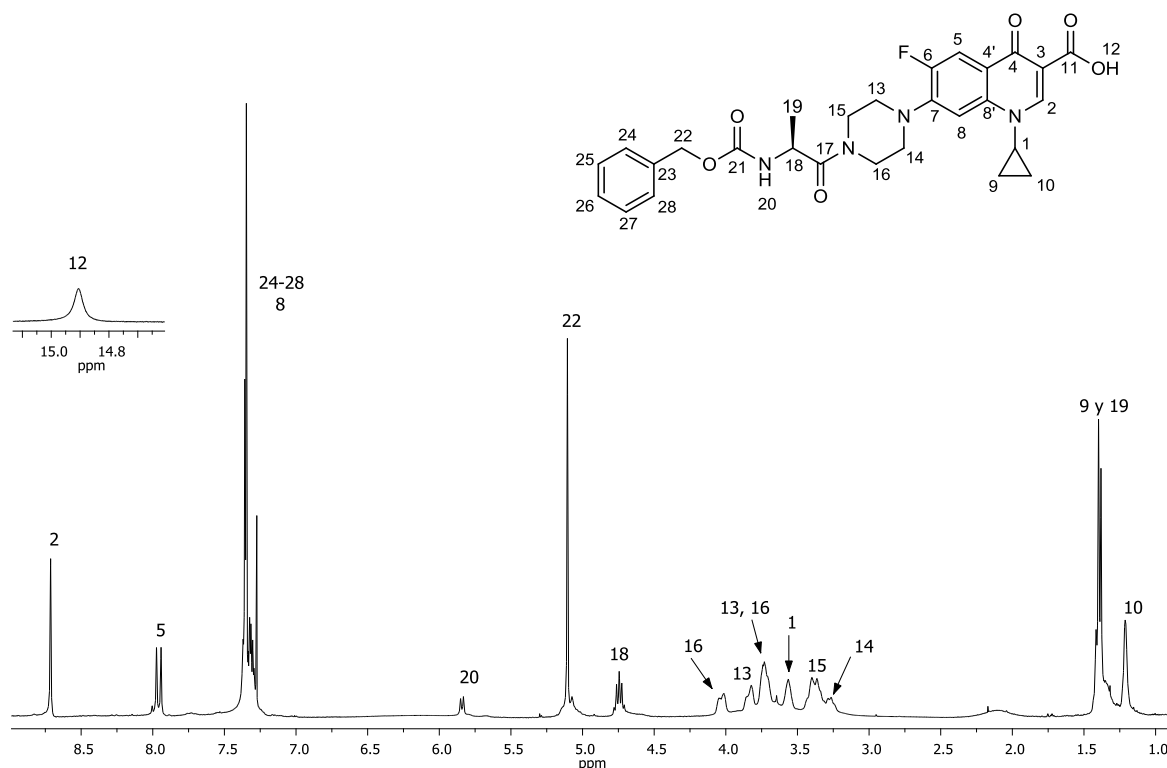
**Figura 20.** Ampliación del espectro HETCOR en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **1**.

Es importante mencionar que la interpretación de los espectros de RMN en dos dimensiones no debe hacerse por separado; el análisis simultáneo permite efectuar la elucidación estructural de una manera más fácil y precisa. Así, una vez integrados los resultados de los espectros COSY y HETCOR, el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto **1** queda como se muestra en la Figura 21.



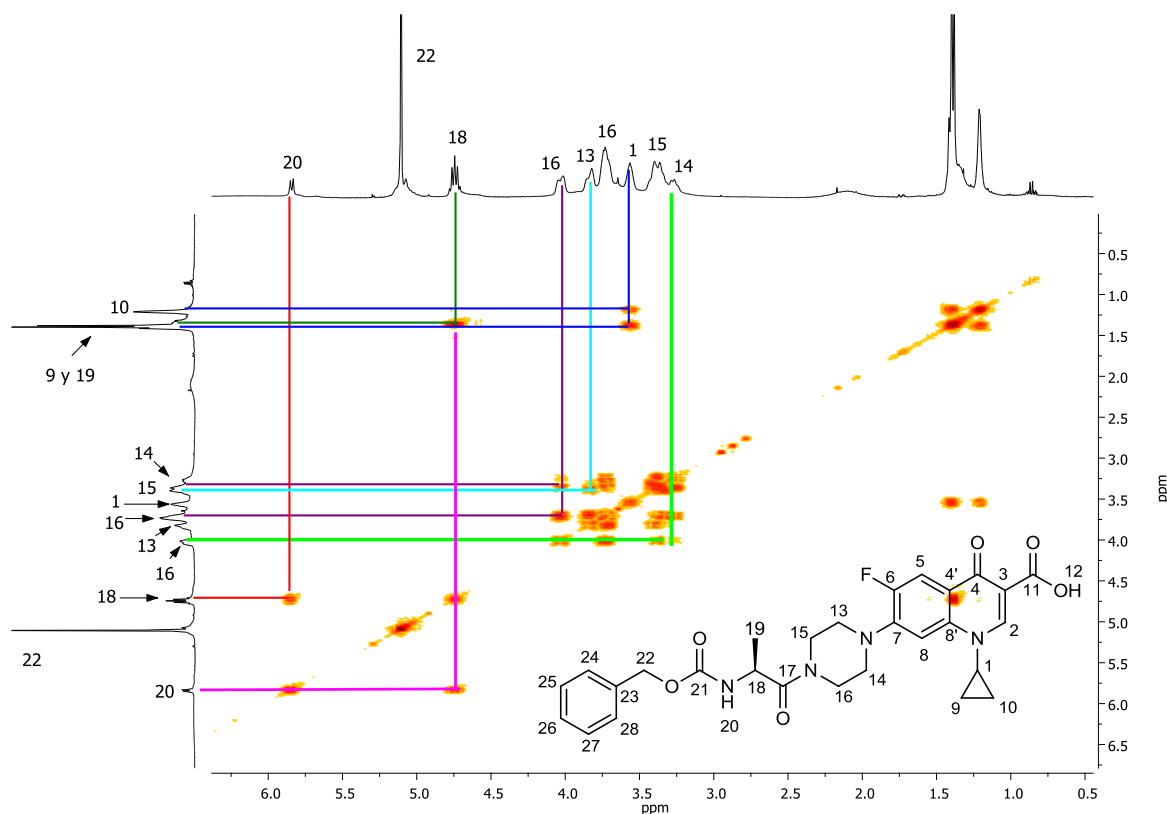
**Figura 21.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **1**.

En cuanto al compuesto **2** (Cbz-*N*-Ala-Cpx), en la Figura 22 se muestra su espectro de RMN- $^1\text{H}$ . En 14.91 ppm se aprecia una señal simple correspondiente al hidrógeno ácido H-12, en 8.71 ppm una señal simple para el protón vinílico H-2, en 7.96 ppm una señal doble ( $J = 12.7$  Hz) correspondiente a H-5, de 7.36 a 7.32 ppm una señal múltiple correspondiente a los hidrógenos aromáticos del grupo benciloxycarbonil H-24 a H-28, en 5.84 ppm una señal doble ( $J = 7.8$  Hz) para el protón amídico H-20, en 5.11 ppm una señal simple para los hidrógenos de H-22, en 4.74 una señal múltiple para H-18, en 4.03 ppm y en 3.72 ppm dos señales múltiples para los hidrógenos H-16, en 3.82 y 3.74 ppm dos señales múltiples para los hidrógenos de H-13, en 3.56 una señal múltiple para el metino H-1, en 3.40 una señal múltiple correspondiente a los hidrógenos de H-15 y en 3.28 una señal múltiple para los hidrógenos de H-14. Finalmente en 1.39 ppm aparece una señal doble ( $J = 6.8$  Hz) correspondiente a los hidrógenos del metilo H-19 y en 1.42 y 1.21 ppm dos señales simples anchas para H-9 y H-10.



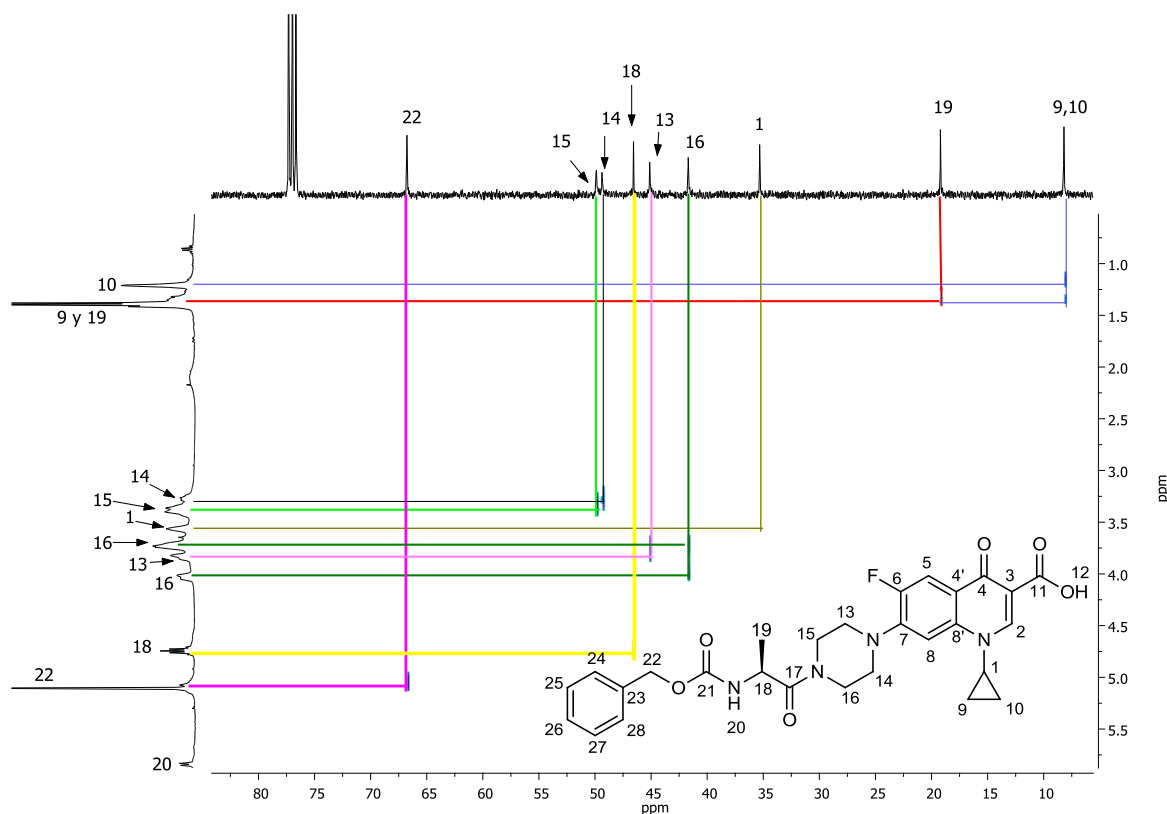
**Figura 22.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **2**.

Las asignaciones hechas en el espectro de la Figura 22 se hicieron con ayuda de RMN en dos dimensiones. En la Figura 23 se muestra una ampliación del espectro COSY del compuesto **2**. Como se puede observar, H-20 muestra acoplamiento vecinal con H-18, existe acoplamiento geminal entre los hidrógenos H-15 y éstos se acoplan con H-13; a su vez, también se puede observar acoplamiento vecinal entre el metino H-1 y los metilenos H-9 y H-10; los hidrógenos de H-16 muestran acoplamiento geminal y con H-14.



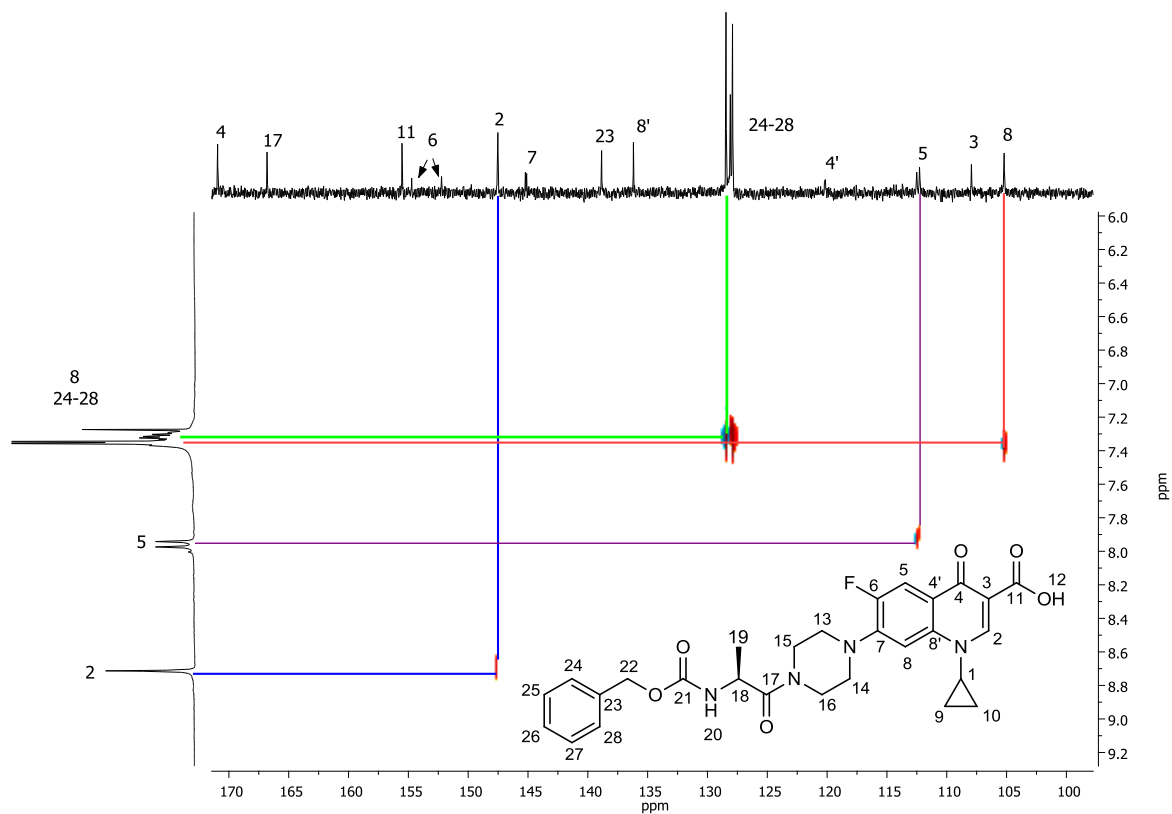
**Figura 23.** Ampliación del espectro COSY en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto 2.

Ahora, en la Figura 24 se muestra el espectro HETCOR a campo alto. En 66.77 ppm se observa la señal de C-22, en 49.87 y 49.38 ppm se observan dos señales correspondientes los metilenos C-15 y C-14, respectivamente, en 46.57 ppm se observa la señal correspondiente al metino C-18, en 45.12 la señal del metileno C-13 y en 41.69 ppm la señal del metileno C-16. Posteriormente en 35.32 ppm se observa la señal del metino C-1, en 19.21 ppm la señal del metilo C-19 y finalmente en 8.19 ppm una señal correspondiente a los dos metilenos C-9 y C-10 del ciclopropilo.



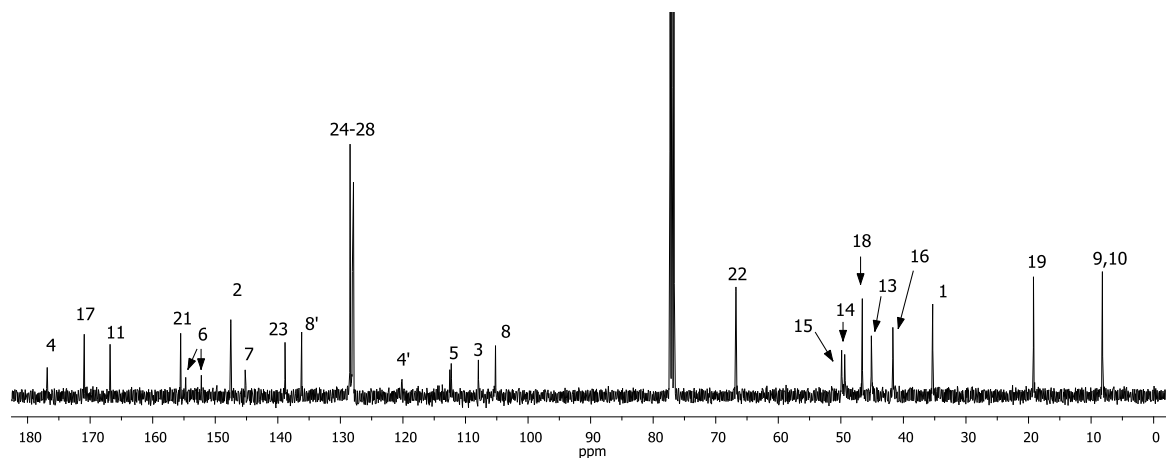
**Figura 24.** Ampliación del espectro HETCOR en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **2**.

En la Figura 25 se muestra la región a campo bajo del espectro HETCOR. En 176.86, 170.94, 166.81 y 155.53 ppm se observan las señales de los grupos carbonilos C-4, C-17, C-11 y C-21, respectivamente. Posteriormente se observan dos señales en 154.58 y 151.71 ppm correspondientes al carbono aromático C-6 (desdoblamiento debido al  $^{19}\text{F}$ ), en 147.52 ppm se observa la señal de C-2, en 145.22 la señal del carbono cuaternario C-7, en 138.85 ppm la señal del carbono *ipso* 23, en 136.19 ppm la señal del carbono cuaternario C-8' y en 128.15 ppm un conjunto de señales correspondientes a los carbonos aromáticos C-24 a C-28. Finalmente en 119.86 ppm aparece la señal de C-4', en 112.39 ppm la señal del carbono aromático C-5, en 107.94 ppm la señal de C-3 y en 105.20 ppm la señal correspondiente a C-8.



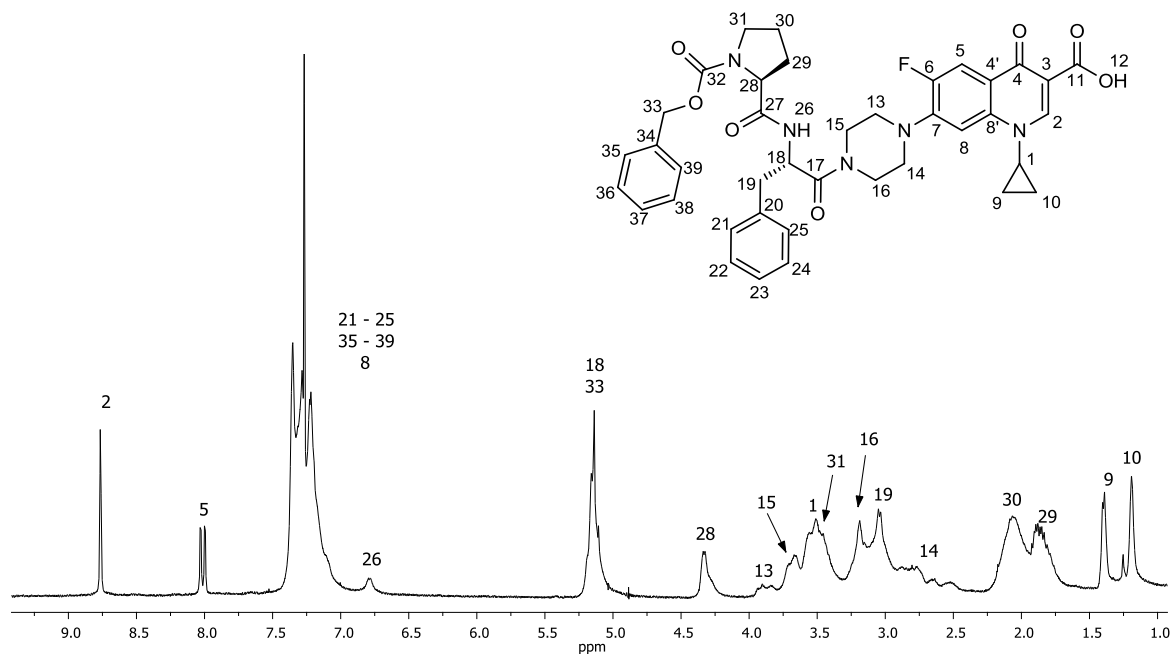
**Figura 25.** Ampliación del espectro HETCOR en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto 2.

Una vez integrados los resultados de los espectros COSY y HETCOR, el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto 2 queda de la siguiente manera (Figura 26).



**Figura 26.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto 2.

En lo que respecta al compuesto **3**, en la Figura 27 se muestra el espectro de RMN- $^1\text{H}$ . En 8.76 ppm se observa una señal simple para H-2, en 8.01 ppm una señal doble de dobles ( $J = 12.8, 2.9 \text{ Hz}$ ) correspondiente a H-5, una señal múltiple en 7.27 ppm correspondiente a los protones aromáticos H-21 a H-25, H-35 a H-39 y H-8. Después aparece una señal simple ancha en 6.79 ppm correspondiente al protón amídico H-19, en 5.11 una múltiple correspondiente a H-18 y H-33, una señal múltiple en 4.34 ppm al metino H-28, una señal múltiple en 3.90 y 3.19 correspondientes al metileno H-13, una señal múltiple en 3.63 para el metileno H-15, una señal múltiple en 3.52 ppm perteneciente al metino H-1 y al metileno H-31, en 3.63 y 3.19 ppm una señal múltiple perteneciente a H-16, una señal múltiple en 3.05 ppm perteneciente al metileno H-19, una señal múltiple en 2.65 ppm del metileno H-14, dos señales múltiples en 2.08 y 1.85 correspondientes a los metilenos H-30 y H-29, respectivamente. Finalmente en 1.40 y 1.20 ppm se observan dos señales simples anchas pertenecientes a los metilenos H-9 y H-10.

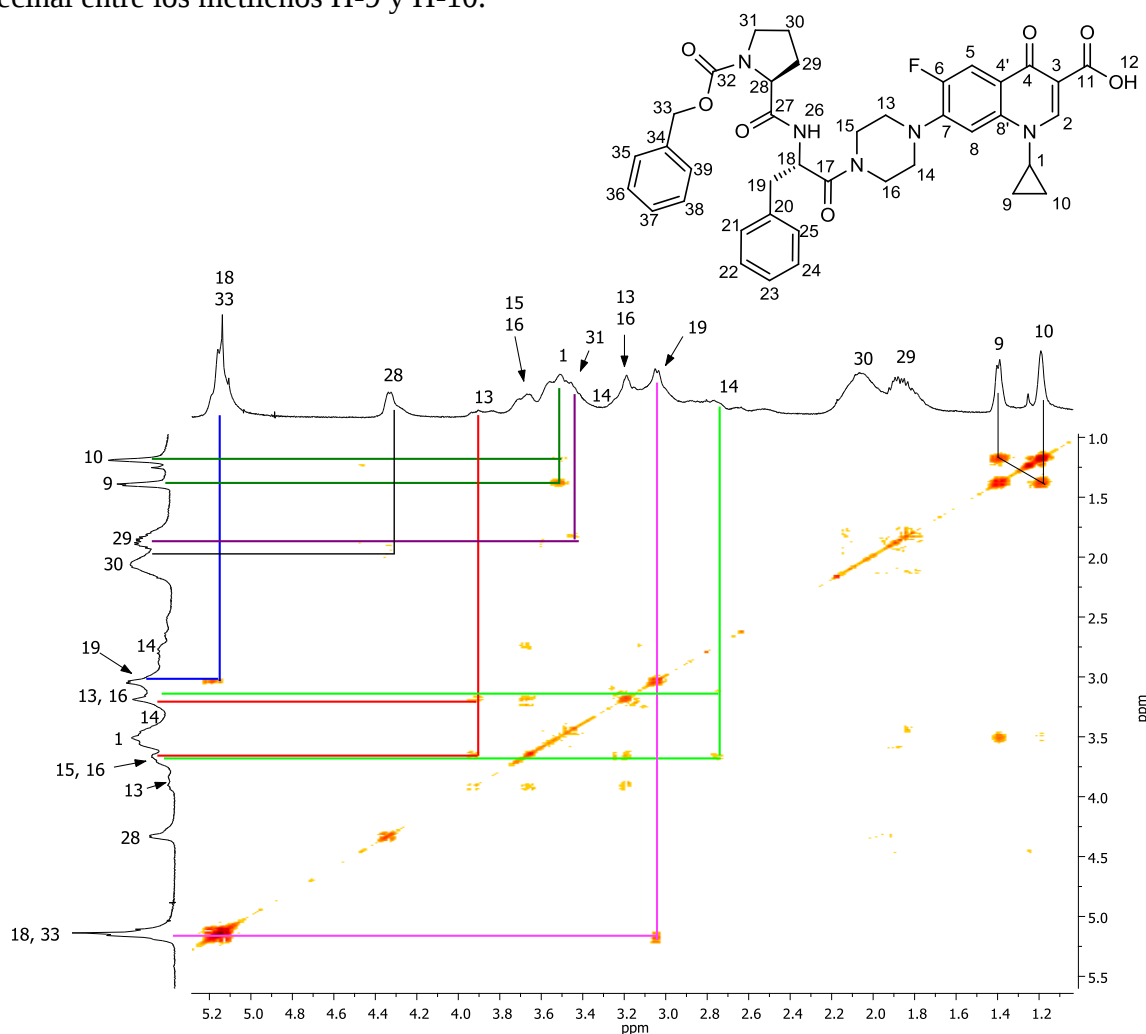


**Figura 27.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto **3**.

Es importante mencionar que la asignación de las señales para este compuesto presentó más dificultades en comparación con los compuestos **1** y **2** debido a fenómenos dinámicos y a la complejidad de la molécula. La asignación de las señales se facilitó

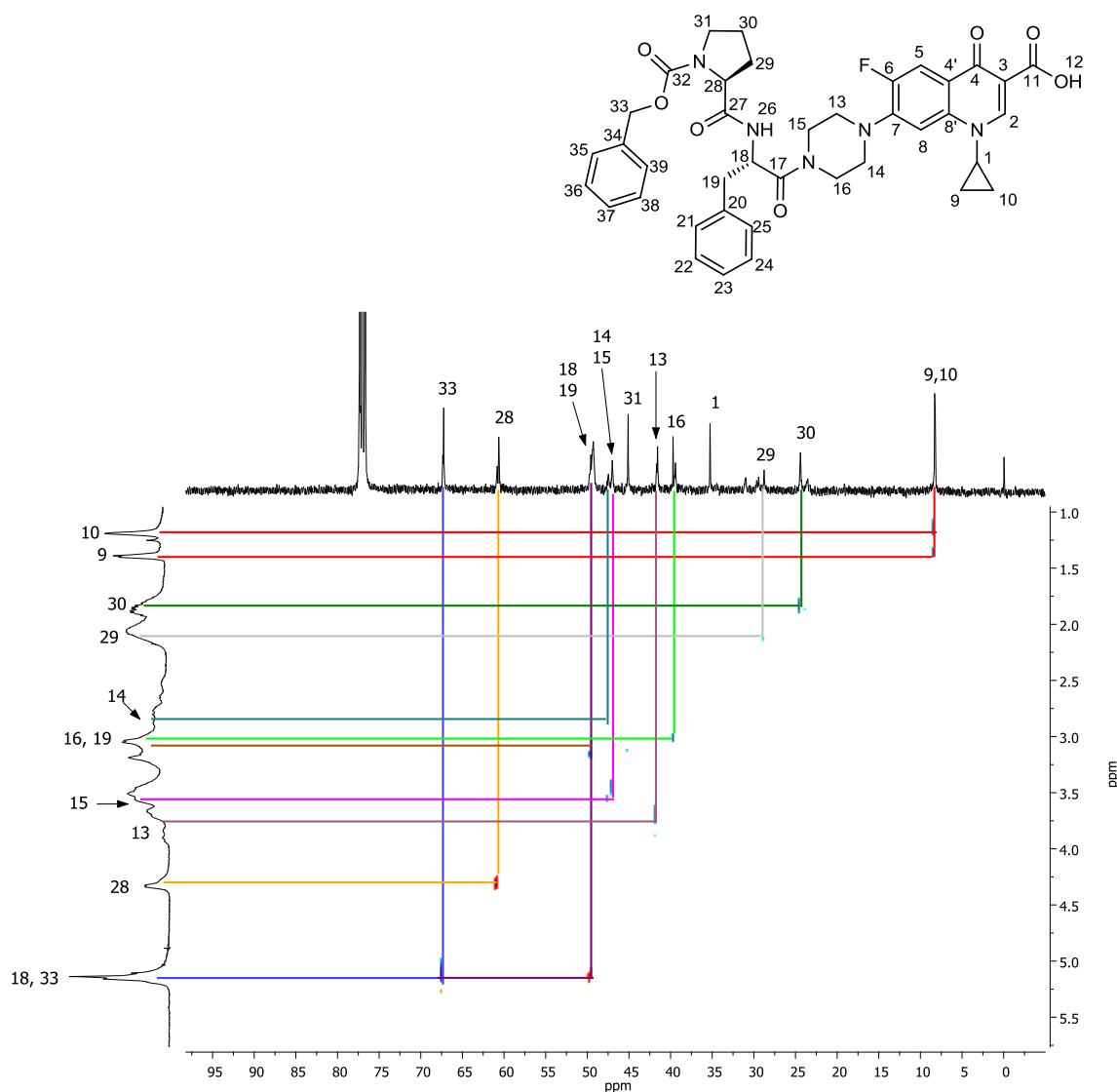
enormemente mediante el uso de técnicas de RMN en dos dimensiones, como se verá más adelante.

Ahora en la Figura 28 se muestra un fragmento del espectro COSY del compuesto **3**. Se puede observar el acoplamiento vecinal entre H-18 y H-19, el acoplamiento vecinal entre los protones H-28 y H-29 del anillo de pirrolidina, el acoplamiento tanto vecinal como geminal de los hidrógenos H-13, H-14, H-15 y H-16 pertenecientes al anillo de piperazina, el acoplamiento vecinal entre el metino H-1 y los metilenos H-9 y H-10, el acoplamiento vecinal entre el metino H-18 y el metileno H-19 y finalmente el acoplamiento vecinal entre los metilenos H-9 y H-10.



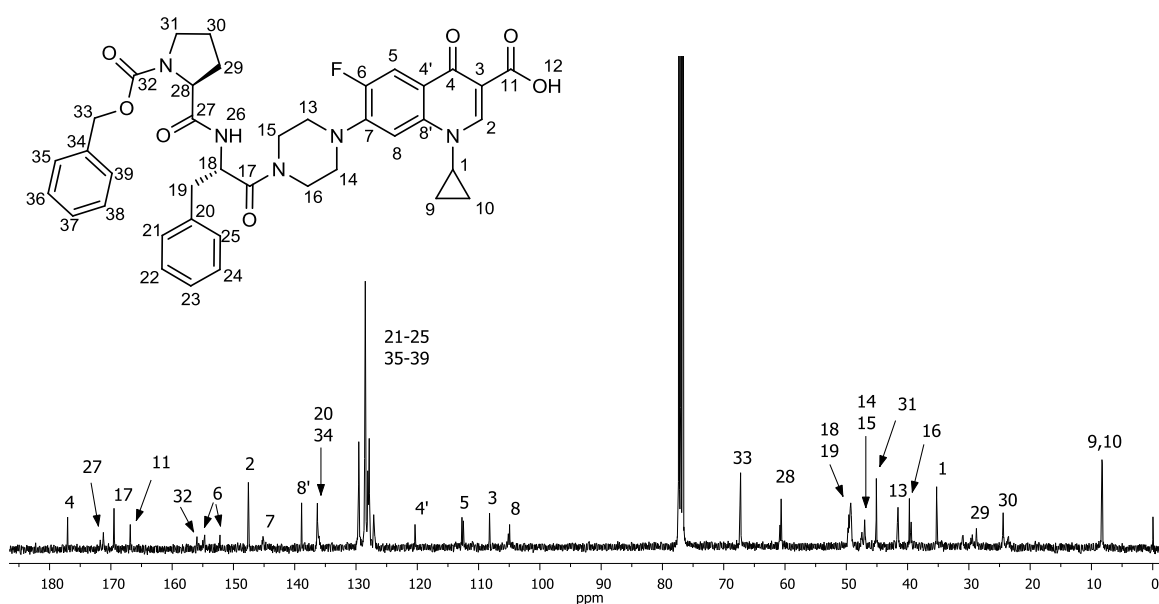
**Figura 28.** Ampliación del espectro COSY en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **3**.

En la Figura 29 se observa una ampliación del espectro HETCOR del compuesto **3**. Se puede observar en 67.22 ppm la señal de C-33, en 60.54 ppm la señal del metino C-28, en 49.27 ppm una señal que corresponde tanto al metino C-18 como al metileno C-19, en 47.0 ppm la señal correspondiente a los metilenos C-14 y C-15, en 45.10 ppm la señal del metileno C-31, en 41.56 ppm la señal del metileno C-13, en 39.56 ppm la señal del metileno C-16, en 35.26 ppm la señal del metino C-1, en 28.77 ppm la señales de C-29, en 24.41 ppm la señal de C-30 y finalmente en 8.26 ppm la señal de los metilenos C-9 y C-10.



**Figura 29.** Ampliación a campo alto del espectro HETCOR en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **3**.

En la Figura 30 se muestra el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto **3**. En 177.06 y 171.22 ppm aparecen las dos señales de los grupos carbonilos C-4 y C-27, respectivamente. Después se observa la señal del carbonilo C-17 en 169.48 ppm, en 166.83 y 157.30 ppm dos señales correspondientes a C-11 y C-32, en 154.59 y 151.96 ppm dos señales correspondientes al carbono aromático C-6, en 147.56 ppm la señal del carbono vinílico C-2, en 145.32 ppm la señal del carbono aromático C-7, en 138.89 ppm la señal del carbono *ipso* C-8', en 136.30 ppm la señal de los carbonos C-20 y C-34, de 129.48 a 127.01 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos tanto del grupo benciloxicarbonil como del fenilo de la fenilalanina, en 120.33 ppm se observa la señal del carbono aromático C-4', en 112.33 y 112.10 ppm dos señales correspondientes a C-5, en 108.86 ppm la señal de C-3 y en 105.12 ppm la señal de C-8. Posteriormente en 67.22 ppm se encuentra la señal del metileno C-33, en 60.54 ppm la señal del metino C-28, en 49.27 ppm una señal que corresponde tanto al metino C-18 como al metileno C-19, en 47.0 ppm la señal correspondiente a los metilenos C-14 y C-15, en 45.10 ppm la señal del metileno C-31, en 41.56 ppm la señal del metileno C-13, en 39.56 ppm la señal del metileno C-16, en 35.26 ppm la señal del metino C-1, en 28.77 ppm la señales de C-29, en 24.41 ppm la señal de C-30 y finalmente en 8.26 ppm la señal de los metilenos C-9 y C-10.



**Figura 30.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto **3**.

El siguiente paso en la ruta sintética consistió en la *N*-desprotección de los compuestos **1**, **2** y **3**. Existen diferentes métodos para la remoción del grupo Cbz, entre ellos acidólisis con HBr/AcOH, reducción metálica mediante el empleo de Na<sup>0</sup> o Li<sup>0</sup> y bien hidrogenación catalítica con H<sub>2</sub> (g) en presencia de Pd/C. Éste último método es el más empleado debido a las condiciones suaves, evitando la formación de subproductos y por tanto buenos rendimientos.<sup>40</sup>

De esta manera, Machuca reportó la remoción del grupo Cbz mediante hidrogenación catalítica empleando H<sub>2</sub> (g) y Pd/C al 10% como catalizador en MeOH, a presión atmosférica, temperatura ambiente y durante un periodo de tres horas. El compuesto *N*-desprotegido era obtenido. Sin embargo, la formación de subproductos, la dificultad para su purificación y los bajos rendimientos, mostraron ser una limitante.

Con el fin de mejorar los resultados se intentó reproducir la técnica cambiando variables como tiempo, cantidad de catalizador, solvente y tiempos de reacción, manteniendo constante la atmósfera de hidrógeno y monitoreando la reacción mediante CCF (Tabla 3). A pesar de las variables ensayadas, se continuaba apreciando materia prima sin reaccionar y formación de subproductos, obteniendo bajos rendimientos.

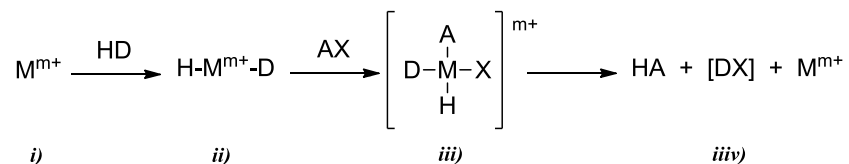
**Tabla 3.** Condiciones de reacción probadas para la *N*-desprotección.

| Ensayo | Condiciones                                                 | Producto(s)                        |
|--------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1      | 10 % Pd/C, MeOH, 3 h, t.a., atm de H <sub>2</sub>           | <b>1</b> + <b>4</b> + subproductos |
| 2      | 10% Pd/C, DCM-MeOH (1:1), 28 h, t.a., atm de H <sub>2</sub> | <b>1</b> + <b>4</b> + subproductos |
| 3      | 10% Pd/C, MeOH, 24 h, t.a., atm de H <sub>2</sub>           | <b>3</b> + <b>6</b> + subproductos |
| 4      | 20% Pd/C, EtOH, 24 h, t.a., atm de H <sub>2</sub>           | <b>3</b> + <b>6</b> + subproductos |
| 5      | 20 % Pd/C, EtOH, 6 días, t.a., atm de H <sub>2</sub>        | <b>3</b> + <b>6</b> + subproductos |

\* t.a.= temperatura ambiente

Probablemente la baja velocidad de reacción sea debido al tamaño molecular de los compuestos **1**, **2** y **3**, ya que se sabe que el impedimento estérico influye notablemente en este tipo de reacciones, lo cual conlleva al uso de grandes cantidades de catalizador o presiones elevadas.<sup>43</sup> En cuanto a la formación de subproductos, la razón puede ser la presencia de grupos lábiles a reducción como el doble enlace presente en la posición 2 o el enlace C-N en la posición 1.

En el afán de solucionar estos problemas y mejorar el rendimiento, se decidió utilizar una metodología distinta: *hidrogenación catalítica por transferencia*. El principio de ésta reacción es prácticamente el mismo, el hidrógeno actúa como agente reductor en presencia de un catalizador metálico.<sup>44</sup> La diferencia es el empleo de una sustancia que *cede* el hidrógeno en lugar de emplearlo en su forma gaseosa. En el Esquema 19 se muestra la reacción general.



**Esquema 19.** Reacción general de la hidrogenación catalítica de transferencia.

En presencia del catalizador metálico **i)**, el agente donador (HD) cede el hidrógeno **ii)**; posteriormente la sustancia aceptora (AX) interacciona con el catalizador **iii)** y ocurre el proceso de transferencia, dando como resultado el compuesto reducido (HA), el catalizador intacto y los productos de descomposición del donador [DX] **iiiv)**.

Esta reacción, además de evitar los riesgos que acompañan el uso de hidrógeno gaseoso, posee numerosas ventajas, entre las que destacan:<sup>45</sup>

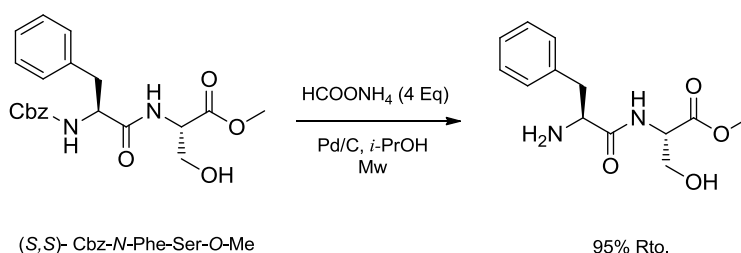
- ✓ Bajo costo.
- ✓ Rapidez.
- ✓ Condiciones de reacción suaves.
- ✓ Selectividad.
- ✓ Operación simple.
- ✓ Aplicable a un gran número de sustratos.

Existe una gran variedad de sustancias donadoras de hidrógeno y de catalizadores que pueden ser empleados. Sin embargo, es importante considerar que su elección condiciona la velocidad y especificidad de la reacción.<sup>44</sup>

Generalmente, los donadores de hidrógeno son moléculas sencillas en las que el hidrógeno se encuentra unido a elementos con un valor de electronegatividad similar.

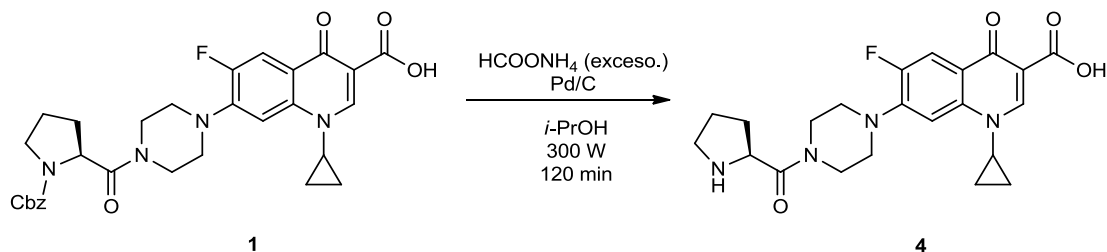
Además, cuando los productos de descomposición del donador poseen valores de entalpía de formación negativos (p.e. CO<sub>2</sub> del ácido fórmico o N<sub>2</sub> de la hidrazina), se ve promovido el fenómeno de transferencia.<sup>43</sup> Algunos ejemplos son el ácido fórmico y formatos, hidrazina, isopropanol, ciclohexeno, 1,4-ciclohexadieno, ácido fosfínico, entre otros.

En el 2001, Daga y colaboradores reportaron un método para la desprotección de compuestos *N*-Cbz y *N*-Bn protegidos mediante hidrogenación catalítica por transferencia asistida por radiación de microondas. Ellos emplearon formato de amonio (HCOONH<sub>4</sub>) como donador de hidrógeno, Pd/C al 10% como catalizador e *i*-PrOH como solvente.<sup>46</sup> La técnica fue aplicada a una gran variedad de sustratos, entre ellos el dipéptido (*S,S*)-Cbz-*N*-Phe-Ser-*O*-Me, cuya desprotección se completó en 3 ciclos de 1 minuto a 600 W, utilizando un horno de microondas convencional (Esquema 20).



**Esquema 20.** *N*-desprotección del dipéptido (*S,S*)-Cbz-*N*-Phe-Ser-OMe

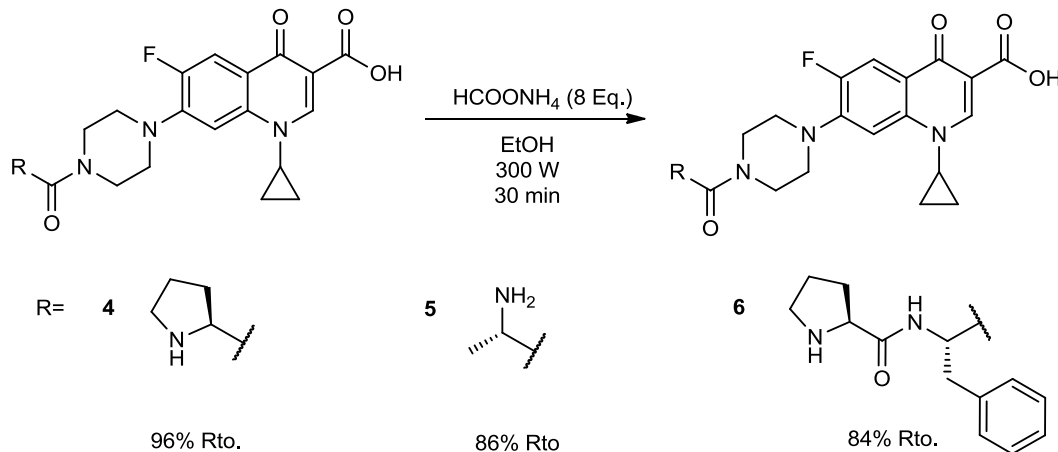
Se intentó reproducir la metodología descrita por Daga con el compuesto **1** (Esquema 21) usando la misma cantidad de formato de amonio (4 Eq.) pero 50% p/p de catalizador. La mezcla de reacción se sometió a 300 W por ciclos de 10 minutos, monitoreando la reacción mediante CCF entre cada ciclo. Debido a que se seguía apreciando materia prima en la CCF, se adicionaba formato de amonio entre cada ciclo, dando como resultado el empleo de una gran cantidad del mismo (hasta 88 Eq.). La reacción se completó a los 120 min (12 ciclos).



**Esquema 21.** N-desprotección de **1** empleando la técnica descrita por Daga.

Al analizar el producto mediante RMN-<sup>1</sup>H, se verificó la obtención del compuesto **4**. Sin embargo, el uso de una gran cantidad de formato de amonio motivó a buscar condiciones de reacción más adecuadas.

Debido a la poca solubilidad que presentó el compuesto **1** en *i*-PrOH, se decidió cambiar el solvente por EtOH. Al hacer este cambio, se observó una gran mejoría en cuanto al tiempo de reacción y a la cantidad de formato de amonio utilizado. Los compuestos N-desprotegidos se obtuvieron en forma pura y en buenos rendimientos (Esquema 22).



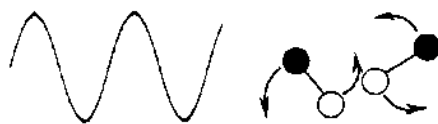
**Esquema 22.** Obtención de los compuestos N-desprotegidos **4**, **5** y **6**.

La elección del solvente adecuado en éste tipo de reacciones es particularmente importante, ya que al estar implicado un metal como catalizador (Pd), el solvente puede coordinarse con él, afectando su rendimiento.<sup>44</sup> Además, es claro que la total solubilización del compuesto favorece su interacción con el catalizador y por tanto la reacción.

Cabe mencionar que el uso de radiación de microondas con el fin de acelerar las reacciones orgánicas comenzó en la década de 1980. Sin embargo, no fue hasta mediados de los años noventa cuando su uso se hizo más extenso, hecho que se reflejó en el número de publicaciones realizadas en torno al tema. Además, la fácil adquisición de equipo diseñado especialmente para el laboratorio impulsó enormemente ésta práctica.<sup>47</sup>

La aceleración de las reacciones orgánicas mediante radiación de microondas se atribuye a dos fenómenos: *efecto térmico* y *efectos específicos de las microondas*.

El efecto térmico, también conocido como calentamiento dieléctrico, es resultado de las interacciones dipolo-dipolo entre moléculas polares y el campo electromagnético. A este fenómeno se le conoce como polarización dipolar.<sup>48</sup> Cuando una molécula dipolar interactúa con el componente eléctrico de las microondas, trata de alinearse con dicho campo mediante movimientos de rotación (Figura 31).



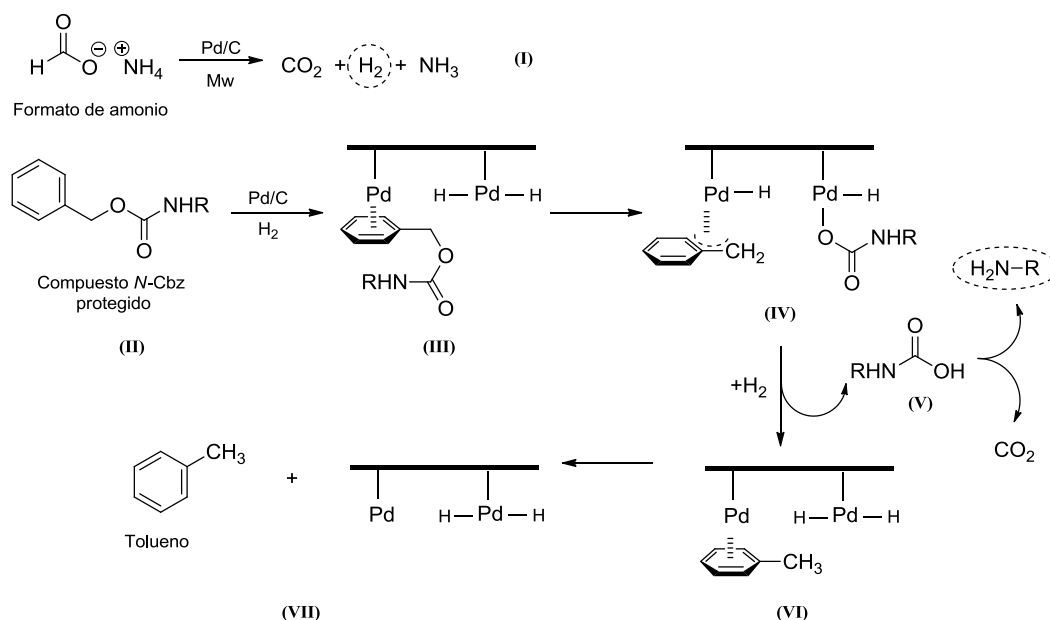
**Figura 31.** Interacción entre una molécula con momento dipolar y radiación electromagnética.

Dichos movimientos causan fricción intermolecular, lo que da como resultado la generación de calor en el seno del líquido. Este tipo de calentamiento es rápido y homogéneo, a diferencia de otros medios como los baños de arena o de aceite, lo cual permite evitar la descomposición de los reactantes y la formación de subproductos.<sup>47</sup>

En cuanto a los efectos específicos de las microondas se encuentran el aumento en la probabilidad de colisiones intermoleculares, o bien, disminución en la energía de activación.<sup>48</sup>

En el Esquema 23 se muestra el mecanismo de reacción sugerido para la hidrogenación catalítica por transferencia. En presencia de Pd/C y por influencia de la radiación de microondas, el formato de amonio se descompone en dióxido de carbono, amoniaco e hidrógeno<sup>50</sup> (**I**); éste último se adsorbe en la superficie del catalizador. Después, el compuesto *N*-Cbz protegido (**II**) interacciona con el Pd a través de una

interacción tipo  $\pi$  (III), seguido de la escisión del enlace C-O (IV), dando como resultado un derivado de ácido carbámico (V), el cual sufre descarboxilación para convertirse en el compuesto *N*-desprotegido. A su vez, se genera tolueno como subproducto (VI) y se regenera el catalizador (VII), quedando disponible para otro ciclo catalítico.

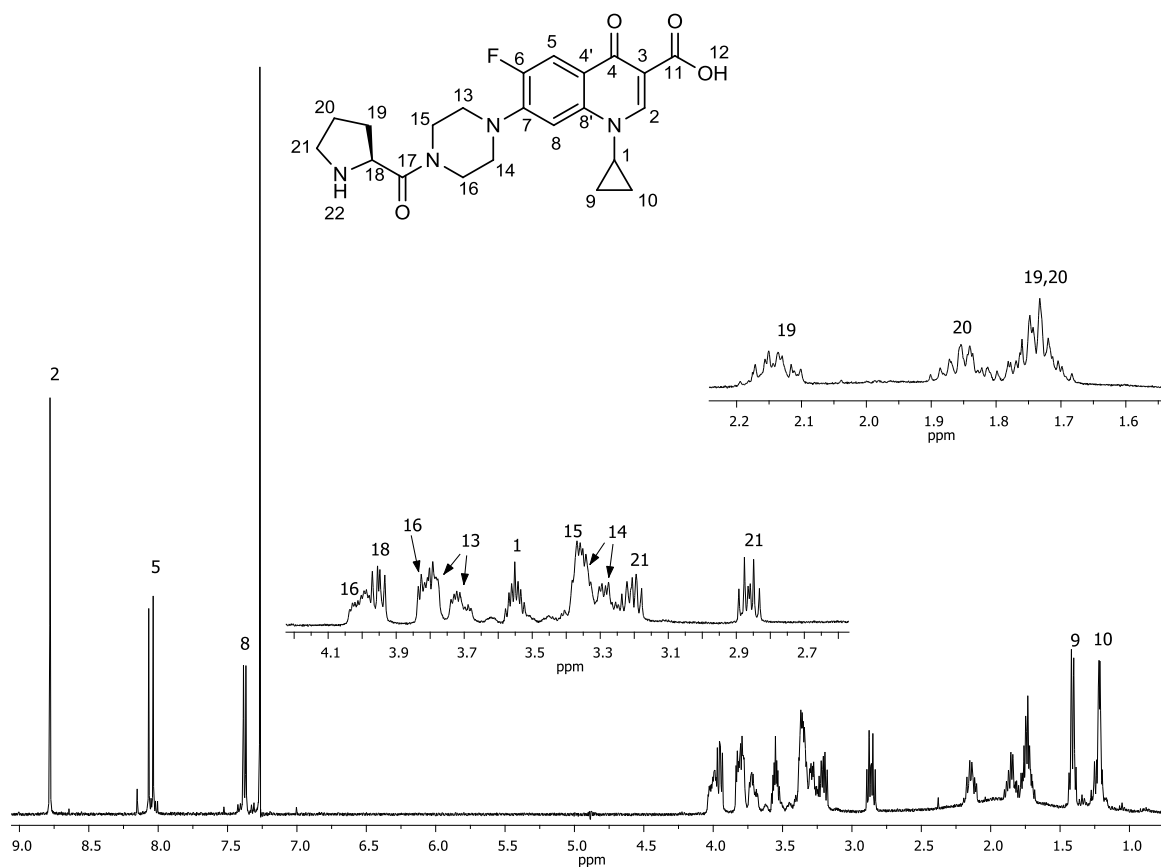


**Esquema 23.** Mecanismo de reacción propuesto para la desprotección de compuestos *N*-Cbz protegidos mediante hidrogenación catalítica por transferencia (Modificado de Kocieński, 2005).

Cabe mencionar que a pesar de los compuestos **4**, **5** y **6** se observaron puros en CCF, al analizarlos por RMN se observó que no lo estaban en su totalidad por lo que se procedió a purificarlos mediante cromatografía en columna, eluyendo con polaridades ascendentes: Hexano, AcEOEt, AcOEt-MeOH 9:1 y MeOH-NH<sub>4</sub>OH 9:1. Se utilizó hidróxido de amonio para recuperar los compuestos debido a la elevada polaridad de los mismos. Así mismo, los compuestos **4**, **5** y **6** también fueron caracterizados por espectroscopía de RMN en una y dos dimensiones.

En la Figura 32 se muestra el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **4**. A campo bajo se observa una señal simple en 8.72 ppm correspondiente al hidrógeno vinílico H-2, una señal doble ( $J= 12.8$  Hz) en 8.05 ppm correspondiente al hidrógeno aromático H-5 y una señal doble ( $J= 7.0$  Hz) en 7.38 ppm para el protón aromático H-8. Después se observan dos señales múltiples en 4.1 y 3.83 ppm correspondientes a los dos protones de H-16, una

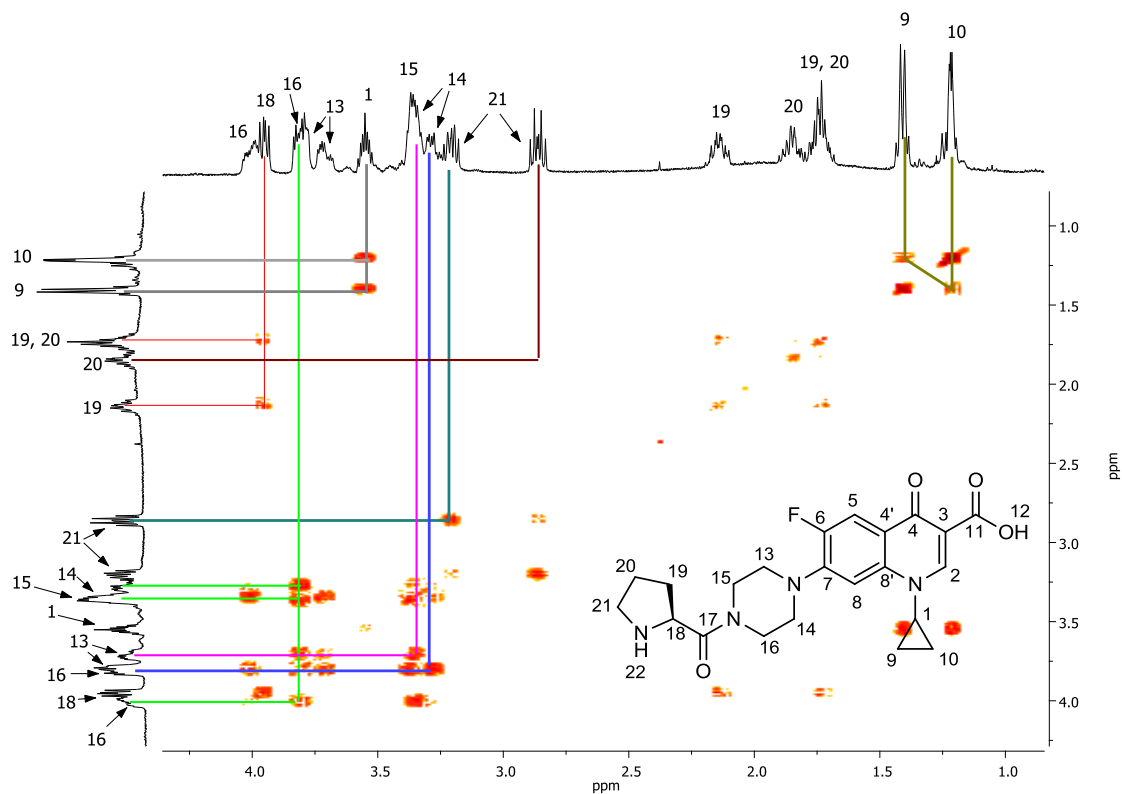
señal doble de dobles ( $J_{1,2}=8$ ,  $J_{2,3}=8$  Hz) en 3.95 ppm del metino H-18, una señal múltiple en 3.79 y 3.71 ppm correspondiente a los hidrógenos del metileno H-13, una señal múltiple en 3.55 ppm para el metino H-1, una señal múltiple en 3.36 ppm correspondiente a los hidrógenos de H-15, dos señales múltiples en 3.34 y 3.28 ppm para H-14, dos señales dobles de dobles de dobles ( $J_{1,2}=4$ ,  $J_{1,3}=8$ ,  $J_{1,4}=16$  Hz) en 3.21 y 2.86 ppm pertenecientes a los hidrógenos del metileno H-21. Posteriormente se observan dos señales múltiples en 2.14 y 1.75 ppm para el metileno H-19 y dos señales múltiples en 1.85 y 1.75 ppm para el metileno H-20. Finalmente se aprecian dos señales simples anchas en 1.41 y 1.22 ppm para los metilenos H-9 y H-10, respectivamente.



**Figura 32.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **4**.

En la Figura 33 se muestra una expansión del espectro COSY del compuesto **4**. Se observa el acoplamiento geminal entre los protones H-15 y el acoplamiento vecinal de éstos con H-13 del anillo de piperazina; también se encuentra el acoplamiento de H-18 con los

protones de H-19 del anillo de pirrolidina. El metino H-1 se acopla con los metilenos H-9 y H-10 del ciclopropilo; los protones del metileno H-16 se acoplan con H-14 del anillo de piperazina, se aprecia el acoplamiento vecinal entre los protones H-21 y H-20. Finalmente se observa el acoplamiento entre los dos metilenos H-9 y H-10.



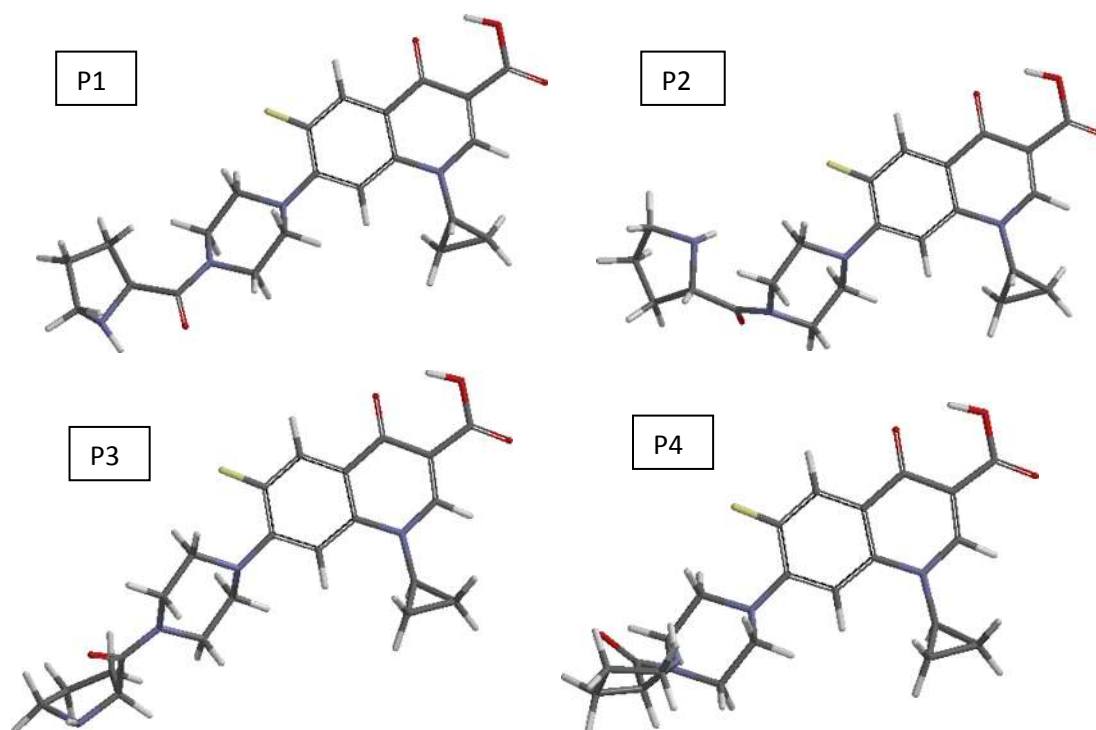
**Figura 33.** Ampliación espectro COSY en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto **4**.

Cabe destacar el particular comportamiento que presentan los protones del anillo de piperazina en el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ . Dada su naturaleza, podría esperarse una equivalencia química entre H-13 y H-14 así como entre H-15 y H-16. Sin embargo, por los resultados obtenidos en RMN se puede inferir que esto no sucede. Pero, ¿cómo se puede explicar éste fenómeno? En este tipo de casos resulta muy útil el uso de herramientas auxiliares como la química computacional, disciplina que permite analizar el comportamiento molecular de una manera más tangible. Así, se recurrió al uso del software de modelado molecular Spartan '08, el cual mediante un análisis conformacional por mecánica molecular, permitió predecir el conformero energéticamente más estable de la

molécula en estudio. Esto resulta increíblemente útil en la interpretación de espectros de RMN ya permite explicar fenómenos que de otra manera serían difíciles de entender. Así, para el compuesto **4** se encontraron un total de 100 conformémeros. En la Tabla 4 se muestran los valores energéticos de los primeros seis.

| <b>Tabla 4. Análisis conformacional del compuesto 4.</b> |                           |                                 |
|----------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| <b>Confórmero</b>                                        | <b>Energía (kcal/mol)</b> | <b>Energía. rel. (kcal/mol)</b> |
| <b>P1</b>                                                | 116.03                    | 0.00                            |
| <b>P2</b>                                                | 116.15                    | 0.12                            |
| <b>P3</b>                                                | 116.55                    | 0.52                            |
| <b>P4</b>                                                | 116.64                    | 0.61                            |
| <b>P5</b>                                                | 116.65                    | 0.62                            |
| <b>P6</b>                                                | 116.67                    | 0.64                            |

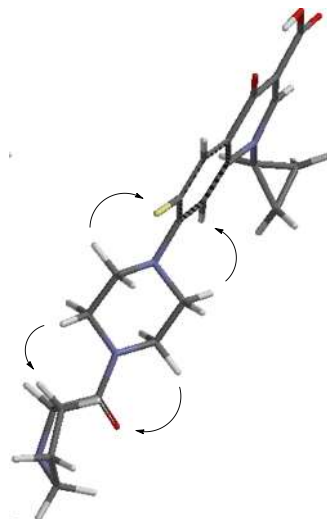
Cabe mencionar que en estos conformémeros (**P2-P6**), el anillo de piperazina presenta ligeros movimientos pero no hay un cambio significativo en su conformación molecular, conservándose la falta de equivalencia química (Figura 34).



**Figura 34.** Conformémeros de menor energía del compuesto **4**.

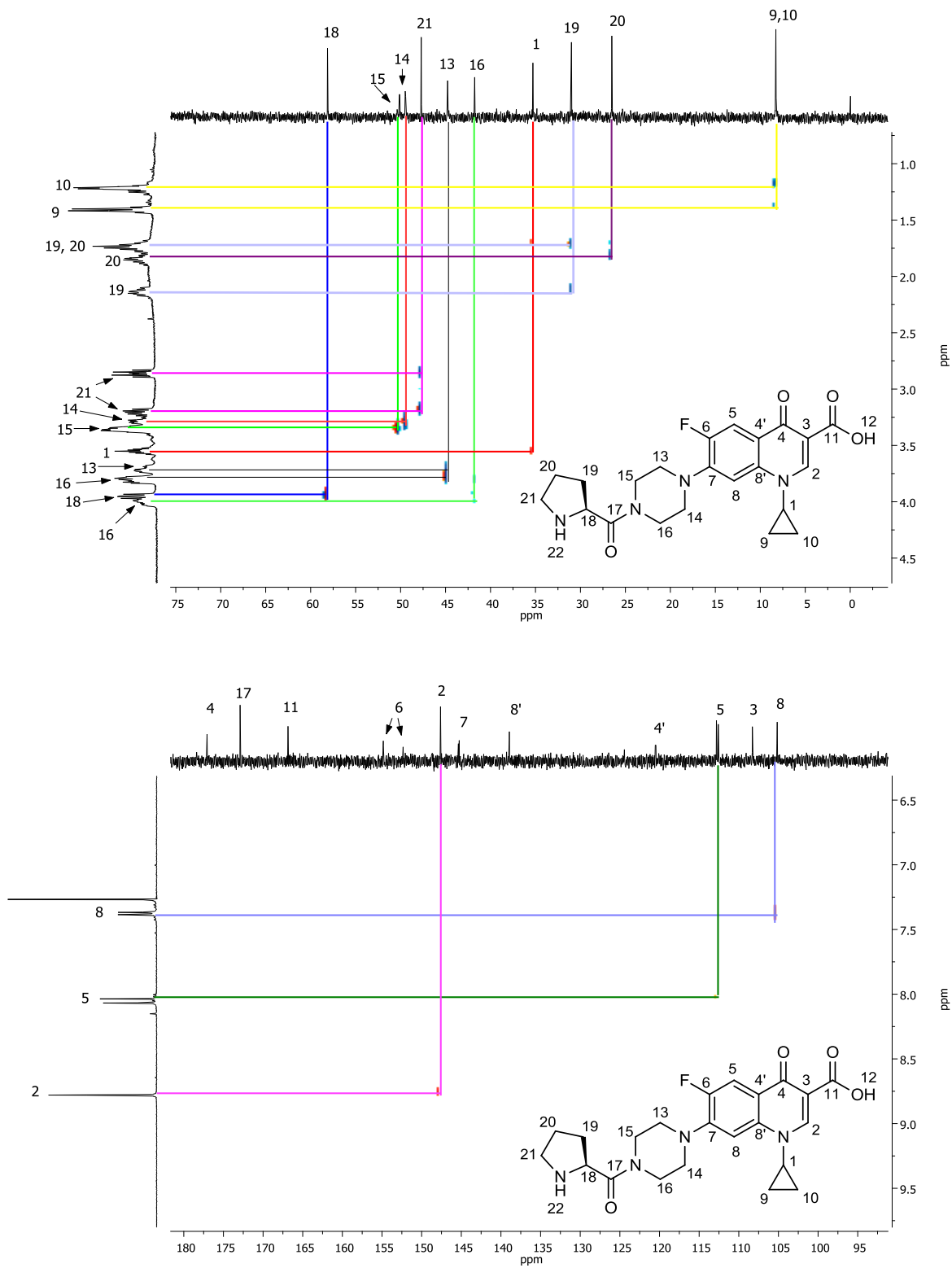
Basta con analizar el conformémero **P1** de menor energía (116.03 kcal/mol) para explicar los resultados obtenidos en RMN. Cómo se puede observar en la Figura 35, el

ambiente químico de los cuatro metilenos piperazínicos es completamente diferente, dado el acomodo espacial que adquiere ésta parte de la molécula con respecto al anillo de quinolona (plano).



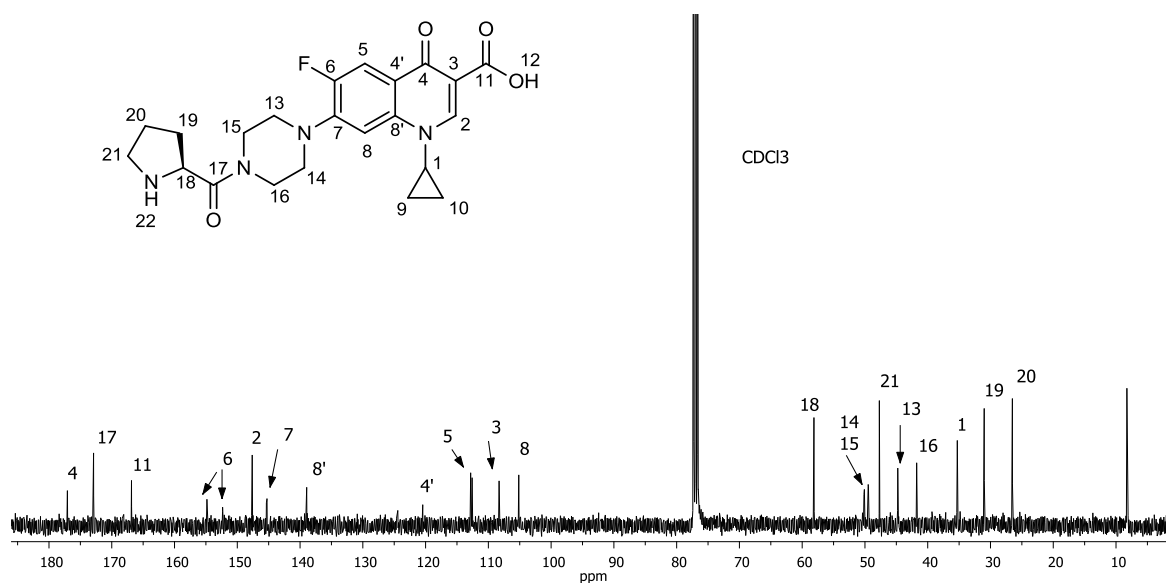
**Figura 35.** Estructura del conformero **P1**, calculada por Spartan '08.

Por otro lado, en la Figura 36 se muestra el espectro HETCOR del compuesto **4**. Como se puede observar, a campo alto en 177.07, 172.90 y 166.85 ppm aparecen las señales para los tres grupos carbonilo presentes en la molécula C-4, C-17 y C-11, respectivamente. Después aparecen dos señales en 155.05 y 152.32 ppm correspondientes al carbono aromático C-6; en 147.62 ppm la señal del carbono vinílico C-2, en 144.91, 138.94 y 120.86 las señales de los carbonos cuaternarios aromáticos C-7, C-8' y C-4', respectivamente. En 122.70 ppm aparece la señal del carbono aromático C-5, en 108.29 ppm la señal de C-3 y finalmente en 105.15 ppm la señal del carbono aromático C-8. A campo bajo en 58.13 ppm se encuentra la señal correspondiente al metino C-18, en 50.09 y 49.48 ppm dos señales correspondientes a los metilenos piperazínicos C-15 y C-14, respectivamente; en 47.71 ppm la señal del metileno C-21, en 44.77 ppm aparece la señal del metileno C-13 seguida de la señal de C-16 en 41.76 ppm. Después, en 31.0 y 26.51 ppm se observan las señales de los metilenos del anillo de pirrolidina C-19 y C-20, respectivamente. Finalmente en 8.27 ppm se observa una señal que corresponde a los dos metilenos del ciclopropilo C-9 y C-10.



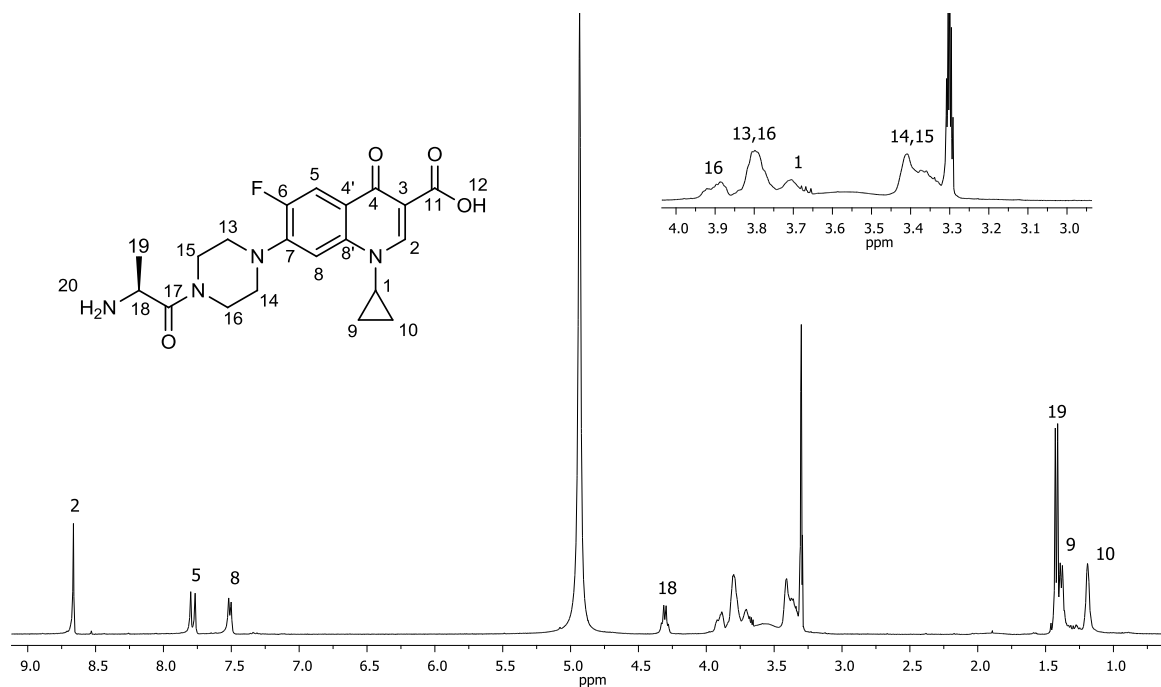
**Figura 36.** Espectro HETCOR en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto 4.

Una vez integrados los resultados de los espectros COSY y HETCOR, el espectro de  $^{13}\text{C}$  quedó asignado como se muestra en la Figura 37.



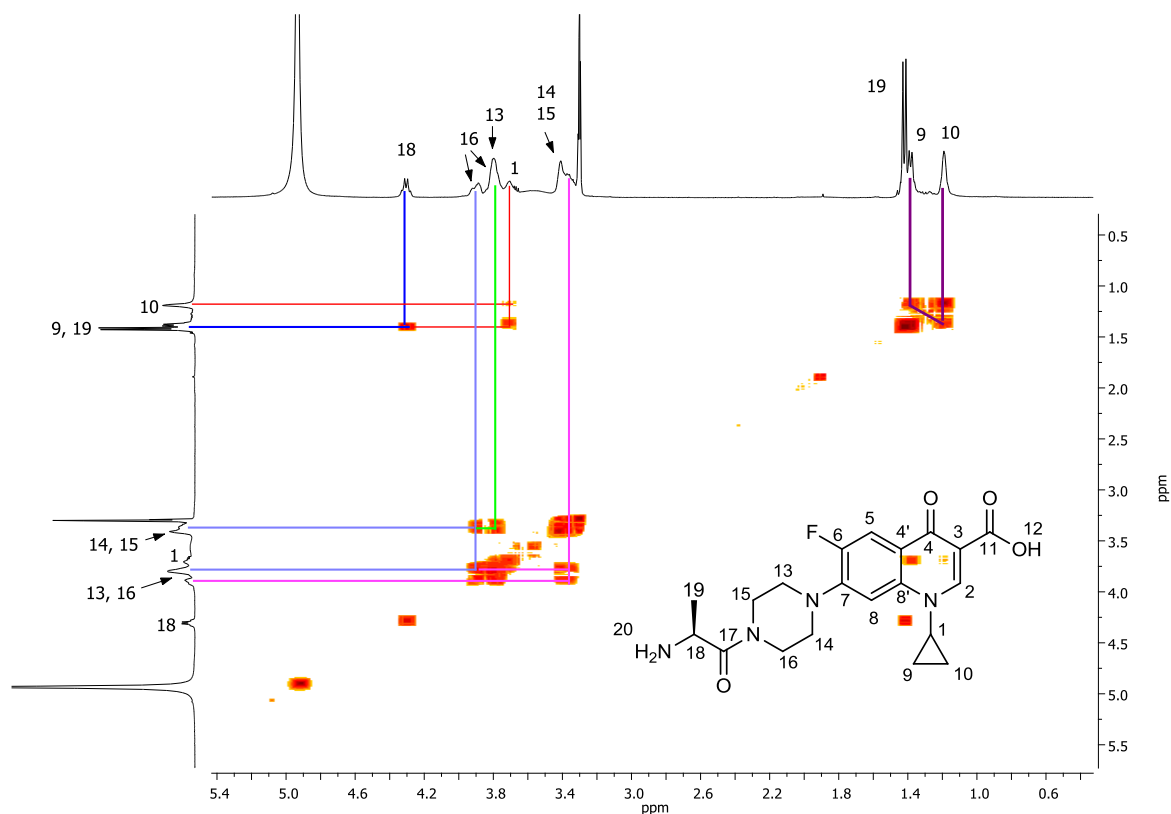
**Figura 37.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz del compuesto 4.

En cuanto al compuesto 5, en la Figura 38 se muestra su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN. En 8.60 ppm se observa una señal simple correspondiente a H-2, en 7.78 una señal doble ( $J = 13.2$  Hz) correspondiente al protón aromático H-5, en 7.51 ppm una señal doble ( $J = 7.2$  Hz) del protón H-8, en 4.30 ppm una señal cuádruple ( $J = 6.6$  Hz) correspondiente al metino H-18, en 3.90 y 3.80 ppm dos señales múltiples correspondientes al metileno H-16, en 3.80 una señal múltiple correspondiente a H-13, en 3.70 ppm la señal del metino H-1, en 3.36 ppm una señal múltiple correspondiente a los metilenos H-14 y H-15, en 1.42 ppm una señal doble ( $J = 6.9$  Hz) correspondiente al metilo H-19 y finalmente en 1.38 y 1.19 ppm dos señales simples anchas pertenecientes a los metilenos H-9 y H-10.



**Figura 38.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 5.

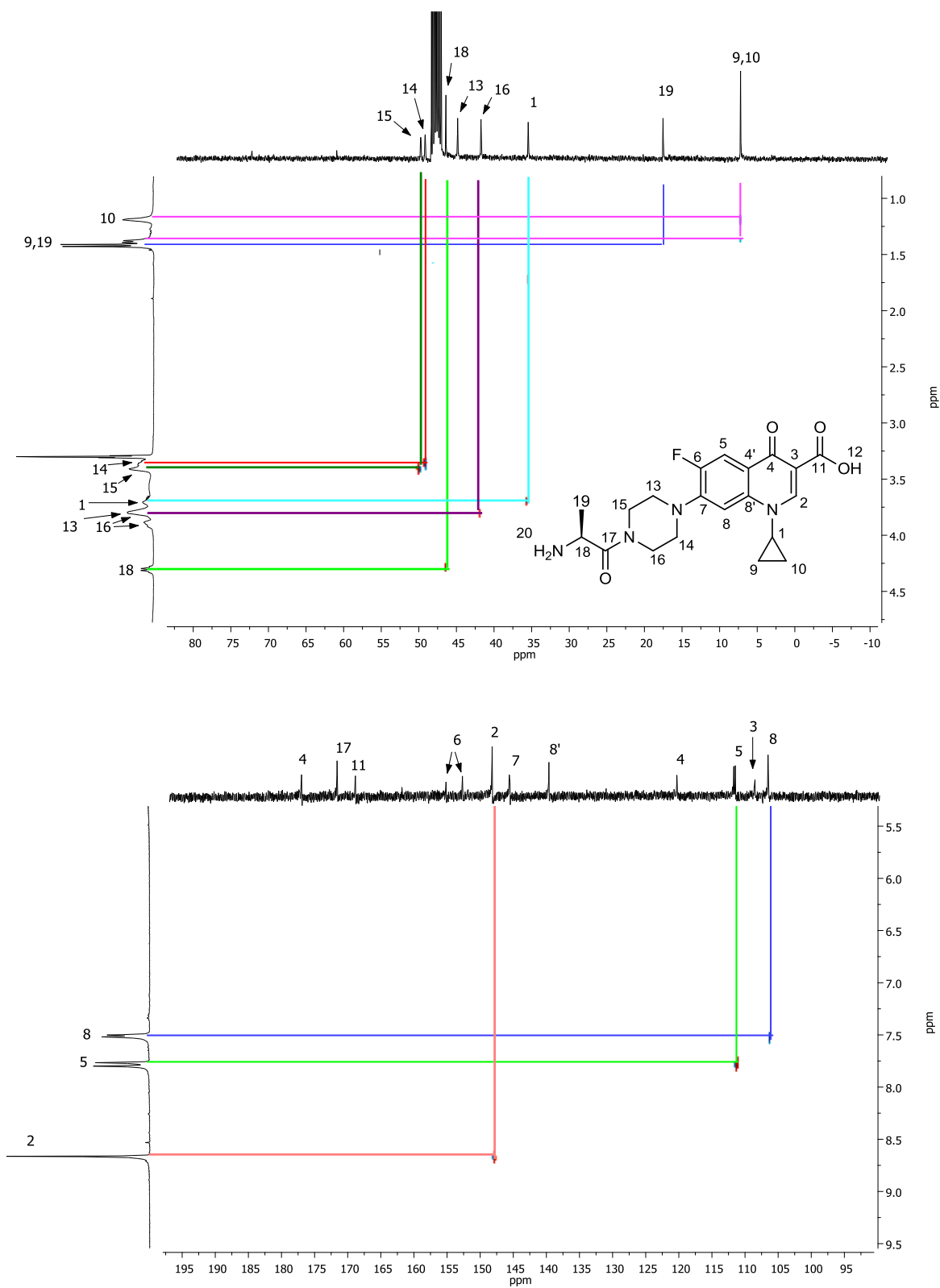
En la Figura 39 se muestra una ampliación del espectro COSY del compuesto 5. Se puede observar el acoplamiento vecinal entre el metino H-18 y el metilo H-19, el acoplamiento geminal de cada uno de los metilenos del anillo de piperazina así como también acoplamiento vecinal entre H-15 y H-13 y entre H-14 y H-16. También el metino H-1 muestra acoplamiento vecinal con H-9 y H-10 y éstos últimos también.



**Figura 39.** Espectro de COSY a 400 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 5.

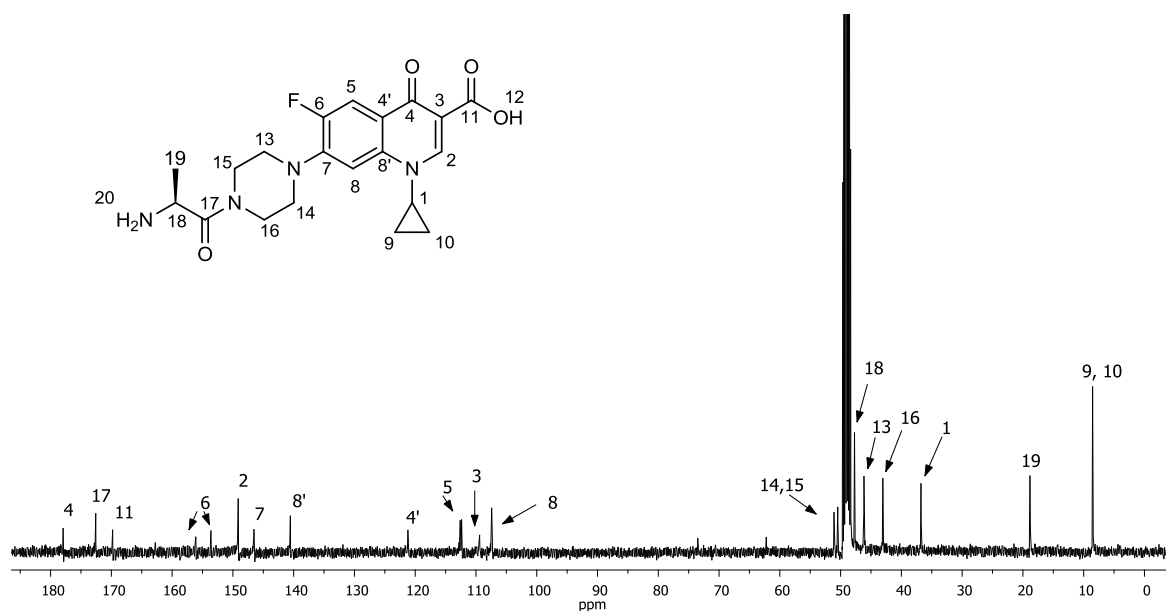
En la Figura 40 se muestra el espectro HETCOR del compuesto 5. A campo bajo se observa en 177.93, 172.57 y 169.79 ppm las tres señales de los grupos carbonilos C-4, C-17 y C-11, respectivamente; en 156.09 y 153.62 ppm dos señales correspondientes al carbono aromático C-6 debido a su acoplamiento con  $^{19}\text{F}$ , en 149.13 ppm aparece la señal del carbono aromático C-7, en 146.53 ppm la señal del carbono vinílico C-2, en 140.54 la señal del carbono aromático C-8', en 121.20 ppm la señal de C-4', en 112.48 ppm dos señales para el carbono aromático C-5, en 109.32 ppm la señal del carbono cuaternario C-3 y finalmente en 107.42 ppm la señal del carbono aromático C-8.

A campo alto en 51.09 y 50.46 ppm se observan las señales correspondientes a los metilenos C-15 y C-14, respectivamente. Después en 47.71 ppm aparece la señal del metino C-18, en 46.15 ppm la señal del metileno C-13, en 43.05 ppm la señal del metileno C-16, en 36.77 ppm la señal del metino C-1, en 18.84 ppm la señal del metilo C-19 y finalmente en 8.53 ppm la señal correspondiente a los dos metilenos C-9 y C-10 del ciclopropilo.



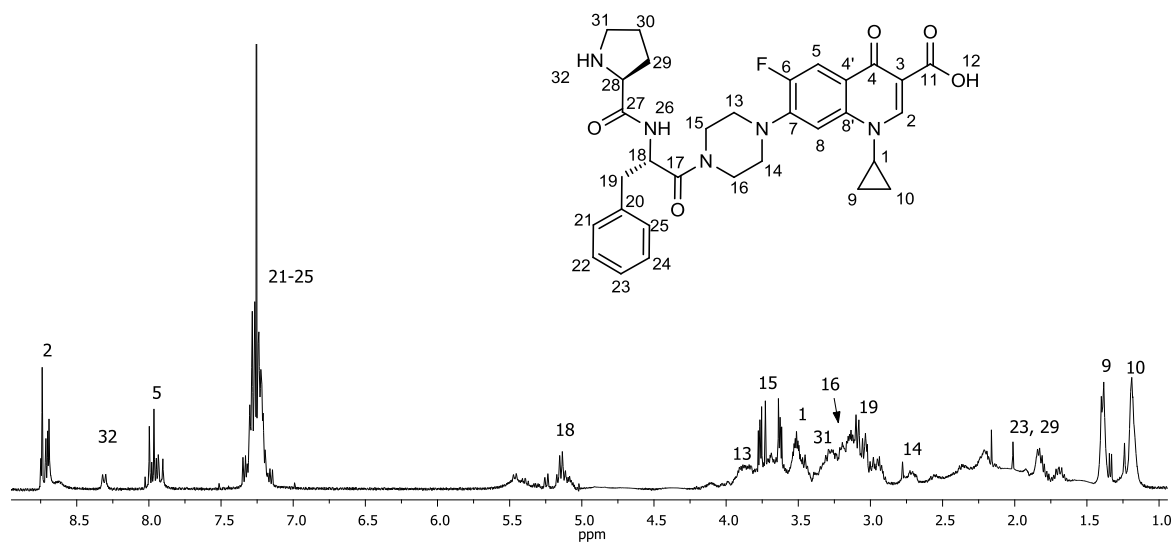
**Figura 40.** Ampliaciones del espectro HETCOR a 400 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 5.

Finalmente en la Figura 41 se muestra el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto 5.



**Figura 41.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  a 400 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 5.

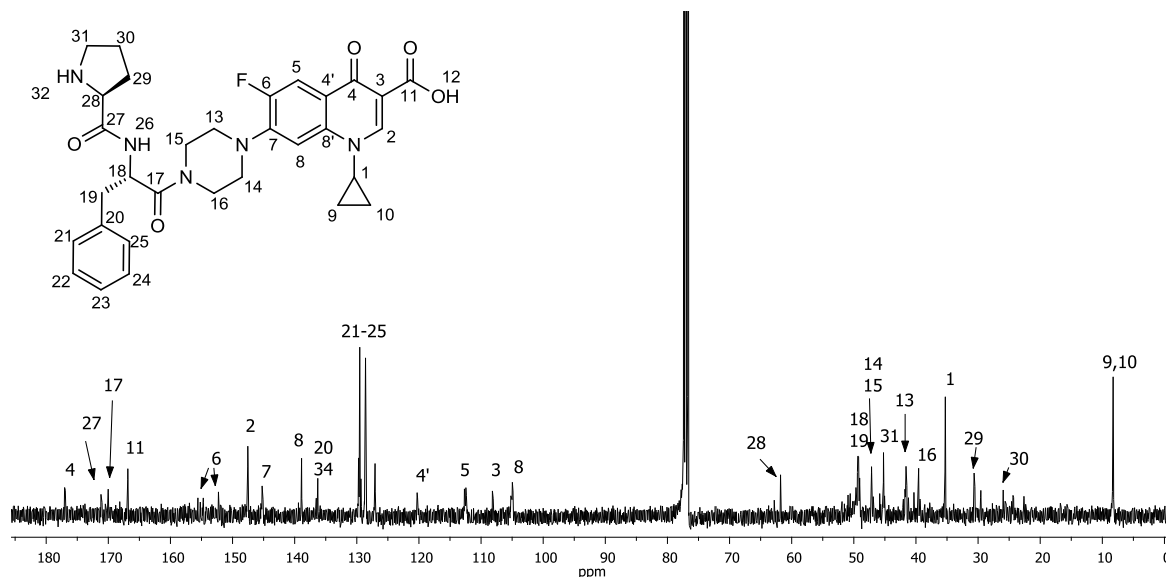
La caracterización del compuesto **6** ( $\text{H}_2\text{N-Pro-Phe-Cpx}$ ) resultó ser más compleja que los anteriores debido a fenómenos dinámicos y a su baja solubilidad en diferentes solventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{MeOD}$ ) lo cual dio origen a espectros diluidos y con señales adicionales. En la Figura 42 se muestra el espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto **6**.



**Figura 42.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 6.

Se puede observar una señal múltiple en 8.72 ppm correspondiente al protón vinílico H-2 cuando idealmente se esperaría una señal simple; en 8.31 ppm se observa una señal doble ( $J = 8.4$  Hz) perteneciente al grupo amino H-32, en 7.95 ppm una señal múltiple correspondiente al protón aromático H-5, en 7.25 ppm una señal múltiple para los protones aromáticos H-8 y H-21 a H-25, en 5.13 ppm se observa una señal múltiple para el metino H-18, en 3.84 ppm una señal múltiple para el metileno H-13, en 3.76 una señal múltiple para el metileno H-15, una señal múltiple en 3.49 ppm para el metino H-1 y metileno H-31, una señal múltiple en 3.28 correspondiente al metileno H-16, en 3.05 ppm una señal múltiple del metileno de la fenilalanina H-19, en 2.70 ppm una señal múltiple para H-14, en 2.03 y 1.69 ppm dos señales múltiples pertenecientes a los metilenos H-29 y H-30, respectivamente. Finalmente en 1.39 y 1.19 ppm se observan dos señales simples anchas correspondientes a los metilenos del ciclopropilo H-9 y H-10.

En la Figura 43 se observa el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto **6**. A campo bajo en 177.04, 171.18, 170.01 y 166.85 aparecen las señales correspondientes a los cuatro grupos carbonilo C-4, C-27, C-17 y C-11, respectivamente. Después en 154.59 y 151.75 ppm aparecen dos señales para el carbono aromático C-6, en 147.55 ppm la señal del carbono vinílico C-2, en 145.24 ppm la señal de C-7, en 138.89 ppm la señal del carbono *ipso* C-8', en 136.29 ppm la señal del carbono cuaternario C-20, en 128.80 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos C-21 a C-25, en 120.29 ppm la señal de C-4', en 112.44 ppm la señal del carbono aromático C-5, en 108.23 ppm la señal de C-3 y en 104.97 ppm la señal del carbono aromático C-8. A campo alto se observa la señal del metino C-28 en 61.28 ppm, en 49.37 ppm la señal de C-18 y C-19, en 47.15 ppm la señal de C-14 y C-15, en 45.22 la señal de C-31, 41.60 ppm aparece la señal del metileno C-13, en 39.59 la señal de C-16, en 35.27 ppm la señal perteneciente al metino C-1, en 30.64 la señal de C-29, en 25.65 ppm la señal de C-30. Finalmente en 8.26 ppm aparece la señal de los metilenos del ciclopropilo C-9 y C-10.



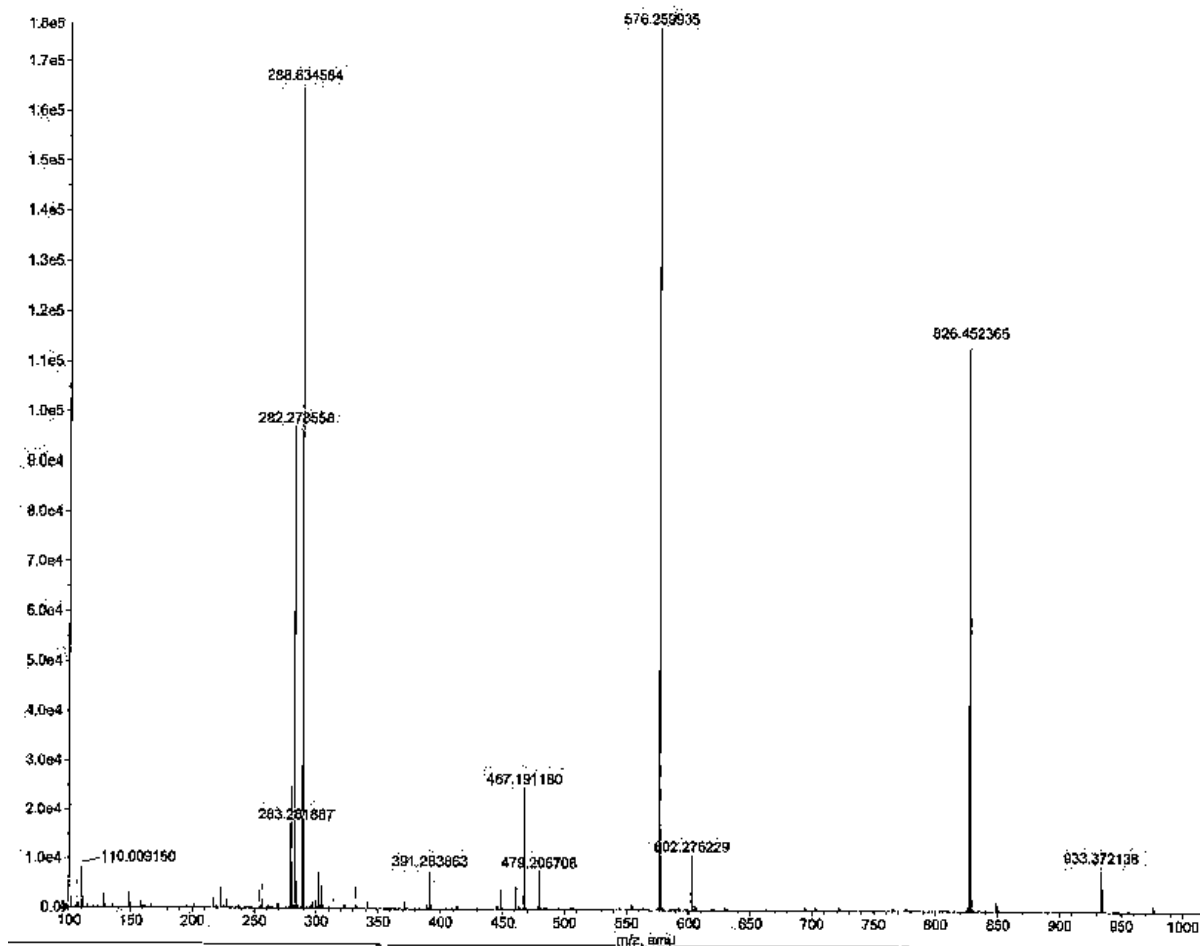
**Figura 43.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto **6**.

La desaparición de las señales características del grupo benciloxicarbonil tanto en el espectro de protón como en el de carbono indica que el producto buscado fue obtenido. Sin embargo, debido a la dificultad que presentó su elucidación estructural por RMN, se decidió recurrir a técnicas espectroscópicas auxiliares. De esta manera el compuesto **6** se analizó mediante espectrometría de masas de alta resolución (EMAR).

La espectrometría de masas junto con la RMN son las técnicas espectroscópicas más usadas en la industria farmacéutica para caracterizar intermediarios y productos de una ruta sintética. Mediante la EMAR se pueden extraer conclusiones sobre la composición elemental y la estructura del compuesto ya que esta técnica es capaz de determinar la masa del ión molecular con cuatro o más cifras de exactitud. Como cada elemento tiene una masa exacta que no es entera, la masa exacta es diferente para cada combinación de elementos. Así, si se dispone de una medida de masas exactas, es posible distinguir entre compuestos que tienen la misma masa nominal pero diferente composición elemental.

A continuación se citan los resultados obtenidos para el compuesto **6** (Figura 44).

EMAR calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{O}_5\text{N}_5\text{F}$  ( $\text{M}^+ + 1$ ): 576.2616 u.m.a.; encontrado: 576.2599 u.m.a.

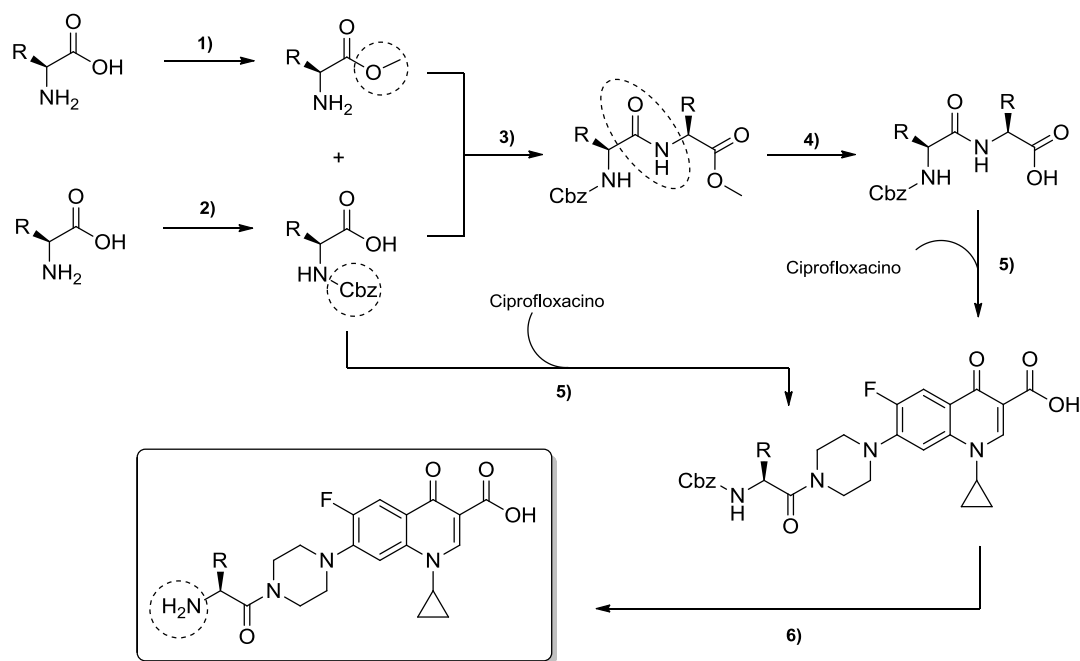


**Figura 44.** Espectro de masas de alta resolución del compuesto 6.

Como se puede observar en la Figura 44, el pico base corresponde al ion molecular (576.2599 u.m.a.); además se observan algunos picos de fragmentación y otros picos con un valor de masa mayor al ion molecular, probablemente debido a la formación de aductos. Así, una vez analizados los espectros de RMN y de masas, se pudo comprobar la obtención del compuesto **6**, lo cual permitió concluir que la ruta sintética planteada es adecuada y eficiente.

## 6. CONCLUSIONES

1.- Se optimizó la metodología sintética para la obtención de nuevos derivados peptídicos del ciprofloxacino (Esquema 24).



1)  $\text{SOCl}_2$ , MeOH    2) CbzCl, NaOH ac.    3) IBCF, TEA, THF    4) LiOH, THF:MeOH:H<sub>2</sub>O, Mw  
5) HBTU, DIEA, DCM:DMF    6)  $\text{HCOONH}_4$ , Pd/C, EtOH, Mw.

**Esquema 24.** Ruta sintética obtenida.

2.- La ruta de síntesis resultó ser más eficiente, económica y sencilla que la descrita en los reportes anteriores y puede ser aplicada para obtener compuestos análogos de otras 7-piperazinilquinolonas, los cuales podrían resultar útiles tanto para realizar estudios de relación estructura-actividad como para ampliar el panel de compuestos candidatos a nuevos agentes antibacterianos.

3.- Se caracterizaron estructuralmente los derivados peptídicos del ciprofloxacino *N*-Cbz protegidos **1**, **2** y **3** y los *N*-desprotegidos **4**, **5** y **6** mediante Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones. Asimismo se utilizó la espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas de alta resolución como técnicas auxiliares para tal fin.

## 7. PARTE EXPERIMENTAL

### 7.1 Aspectos generales.

Previa realización de los procedimientos aquí descritos, el material fue lavado perfectamente, enjuagado con *i*-PrOH y secado en estufa a 78 °C.

Solventes como el Hexano, AcOEt, MeOH y DCM fueron purificados mediante destilación fraccionada. Los demás reactivos fueron adquiridos en forma pura de la casa comercial Aldrich.

La monitorización de las reacciones se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatofolios Merck de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Se usó luz UV y vapores de yodo como reveladores.

La purificación de los compuestos se realizó mediante cromatografía en columna usando sílica gel 70-230 Mesh como fase estacionaria y diferentes mezclas binarias de solventes orgánicos como fase móvil.

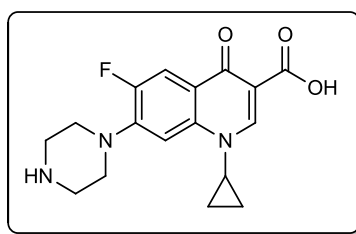
Las reacciones asistidas por radiación de microondas se llevaron a cabo en un reactor CEM Discover Focussed Microwave System.

Los espectros de RMN en una y dos dimensiones fueron obtenidos en un espectrómetro Varian Mercury a 200 y 400 MHz, empleando solventes deuterados como el CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, DMSO y TMS como referencia interna. La multiplicidad está indicada como *s*, *d*, *dd*, *t*, *c* y *m*.

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrómetro Perkin-Elmer modelos FT-IR 16 F PC. El espectro de masas de alta resolución (EMAR) fue obtenido en Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

## 7.2 Obtención del ciprofloxacino a partir de tabletas comerciales.

En un mortero se trituraron las tabletas de clorhidrato de ciprofloxacino hasta obtener un polvo fino, el cual fue transferido a un matraz balón provisto de agitación magnética y suspendido en agua destilada. La suspensión se sometió a agitación por un periodo de 1 hora para permitir la solubilización del fármaco. Posteriormente, se filtró para eliminar los excipientes y al filtrado se le adicionó solución de bicarbonato de sodio al 5%, apreciándose la formación de un precipitado blanco correspondiente al ciprofloxacino. Se filtró y, cuando fue necesario, se siguió tratando el filtrado con el álcali hasta que no se formó más precipitado. Se obtuvo un sólido blanco soluble en DMF, el cual se almacenó en un recipiente bien cerrado, protegido de la luz.



Ácido-1-ciclopropil-6-fluoro-7-(piperazín-1-il)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

$^1\text{H-RMN}$  (DMSO, 200 MHz)  $\delta$  1.16, 1.29 (s,  $\text{CH}_2$  ciclopropilo), 2.88, 3.22 (m,  $\text{CH}_2$  piperazina), 3.81 (m, CH ciclopropilo), 7.51 (d,  $J = 7.7$  Hz, CH aromático), 7.84 (d,  $J = 13.56$  Hz, CH aromático), 8.62 (s, CH vinílico).

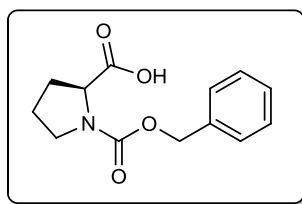
## 7.3 Procedimiento general para la *N*-protección de aminoácidos con CbzCl.

En un matraz balón provisto de agitación magnética y en baño de hielo, se disolvió 1 equivalente del aminoácido en NaOH 1 N. Posteriormente, se adicionaron 1.12 equivalentes de CbzCl. Ésta mezcla se dejó en agitación 1 h en baño de hielo y 12 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se verificó que el pH de la mezcla de reacción sea igual o mayor a 10; en caso de no ser así, se adicionó la cantidad de álcali necesaria para ajustarlo. Después, se le realizaron dos lavados con DCM el cual fue desechado. La fase acuosa se acidificó con HCl 1 N hasta un pH aproximado de 3. El

aminoácido *N*-protegido se extrajo con DCM, al cual se le adicionó un poco de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro para eliminar humedad. Finalmente, se concentró en rotavapor a presión reducida.

### 7.3.1 Síntesis de Cbz-*N*-Pro

Siguiendo el procedimiento general para la *N*-protección de aminoácidos antes descrito, se sometieron a reacción 0.5 g (4.34 mmol) de *S*-prolina en 20 mL de NaOH 1 N con 0.68 mL (4.86 mmol) de CbzCl. Se obtuvieron 1.0466 g (97% de rendimiento) en forma de un aceite transparente, soluble en DCM y con un  $R_f = 0.33$  (Hexano-AcOEt 1:1).



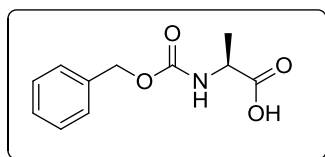
Ácido (S)-1-(benciloxycarbonil)pirrolidín-2-carboxílico

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  1.83-2.35 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.52 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 4.38 (m, 1H, CH), 5.14 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.3 (m, 5H).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  23.66 ( $\text{CH}_3$ ), 29.83 ( $\text{CH}_2$ ), 46.82 ( $\text{CH}_2$ ), 58.92 (CH), 67.39 ( $\text{CH}_2$ ), 127.87, 128.13, 128.63 (CH aromáticos), 136.57 (C *ipso*), 154.81 (CONH), 176.64 (CO).

### 7.3.2 Síntesis de Cbz-*N*-Ala

Siguiendo el procedimiento general para la *N*-protección de aminoácidos antes descrito, se sometieron a reacción 0.5 g (5.61 mmol) de *S*-Ala en 20 mL de NaOH 1 N con 0.88 mL de CbzCl. Se obtuvieron 1.18 g (95% de rendimiento) en forma de un sólido blanco, soluble en DCM.



Ácido (S)-2-carbamoyl(benciloxi)propanoico

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  1.46 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.41 (c,  $J$  = 7.14 Hz, 1H, CH), 5.12 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.53 (d,  $J$  = 6.59 Hz, 1H, NH), 7.05-7.36 (m, 5H).

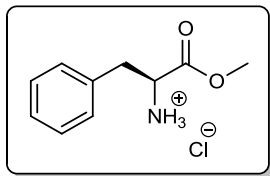
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  18.35 (CH<sub>3</sub>), 49.42 (CH), 67.1 (CH<sub>2</sub>), 128.11, 128.25, 128.53 (CH, aromáticos), 136.03 (C ipso), 155.81 (CONH), 177.07 (CO).

#### 7.4 Procedimiento general para la O-protección de aminoácidos

En un matraz balón provisto de agitación magnética y en baño de hielo, se colocó 1 equivalente del aminoácido suspendido en 25 mL MeOH. A ésta solución se le adicionó lentamente 1.2 equivalentes de cloruro de tionilo (SOCl<sub>2</sub>) y se dejó en agitación por 12 h. Transcurrido este tiempo, se le practicaron 3 lavados con DCM en rotavapor, auxiliándose de una trampa de hidróxido de sodio para neutralizar el ácido clorhídrico formado durante la reacción.

##### 7.4.1 Síntesis de Phe-OMe

Siguiendo el procedimiento general para la O-protección de aminoácidos antes descrito, se sometieron a reacción 0.5 g (3.02 mmol) de S-fenilalanina en 12.5 mL de metanol con 0.26 mL (3.63 mmol) de cloruro de tionilo. Se obtuvieron 0.62 g (95.62% de rendimiento) en forma de cristales blancos solubles en MeOH (Si es necesario, se pueden purificar recristalizando con MeOH:DCM)



Clorhidrato de (S)-2-amino-3-fenil-propanoato de metilo

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  3.09 (dd,  $J$  = 7.51, 14.48 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.23 (dd,  $J$  = 5.86, 14.29 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.31 (dd,  $J$  = 6.32, 7.33 Hz, 1H, CH), 7.13-7.53 (m, 5H).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  35.72 ( $\text{CH}_2$ ), 53.72 ( $\text{CH}_3$ ), 54.25 ( $\text{CH}$ ), 128.27, 128.44, 128.53, ( $\text{CH}$ , aromáticos), 133.87 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ ), 170.2 ( $\text{CO}_2\text{H}$ )

## 7.5 Procedimiento general para el acoplamiento de aminoácidos vía anhídrido mixto.

Mezcla A: En un matraz balón provisto de agitación magnética se colocó el aminoácido *O*-protegido en THF a una concentración 0.2 M. A continuación, se adicionaron 2 equivalentes de TEA y se dejó en agitación por un periodo de 1 h a temperatura ambiente.

Mezcla B: En otro matraz balón provisto de agitación magnética y en baño de hielo se colocó el aminoácido *N*-protegido y en THF a una concentración 0.2 M. En seguida, se adicionó 1 equivalente de TEA y se dejó en agitación por un periodo de 30 min. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 1.05 equivalentes de IBCF disueltos en THF a una concentración 0.2 M y se dejó reaccionar por un periodo de 20 minutos.

Después se adicionó muy lentamente la Mezcla A a la Mezcla B. Finalizada la adición, se dejó en agitación 1 h en el baño de hielo y 12 h más a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se filtró para eliminar las sales formadas y se concentró en rotavapor a presión reducida, a una temperatura no mayor de 50 °C.

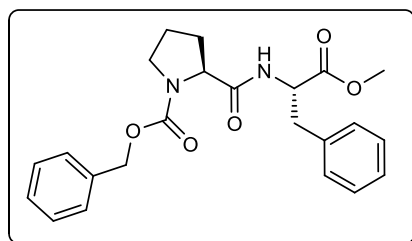
### 7.5.1 Síntesis del dipéptido Cbz-*N*-Pro-Phe-OMe

Siguiendo el procedimiento general para el acoplamiento de aminoácidos vía anhídrido mixto antes descrito:

Mezcla A: se disolvieron 0.57 g (2.64 mmol) del éster metílico de *L*-fenilalanina en 13.23 mL de THF y se le adicionaron 0.78 mL (6.63 mmol) de TEA.

Mezcla B: Se disolvieron 0.6 g (2.40 mmol) de Cbz-*N*-Prolina con 12.03 mL de THF y se le adicionaron 0.36 mL (2.64 mmol) de TEA y 0.33 mL (2.52 mmol) de IBCF disueltos en 12.63 mL de THF.

Para concertar el acoplamiento entre ambos aminoácidos, se enfrió la Mezcla A y se adicionó a la Mezcla B. El producto se purificó mediante cromatografía en columna usando sílica gel como fase estacionaria y Hexano-AcOEt 6:4 como eluente, obteniendo 0.87 g (88 % de rendimiento) en forma de un aceite amarillo claro soluble en DCM.



(S,S)-2-carbamoyl-1-(benzyloxycarbonyl)pyrrolidín-3-fenilpropanoato de metilo

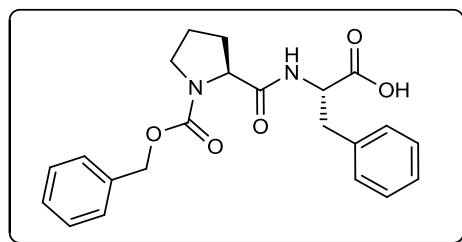
## 7.6 Procedimiento general para la O-desprotección de aminoácidos y péptidos.

En un matraz balón provisto de agitación magnética se disolvió el aminoácido o péptido O-protégido en una mezcla de THF-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>OH (25:3:0.1). En seguida se adicionaron 3 equivalentes de LiOH monohidratado disueltos en agua destilada a una concentración 2 M. A continuación, la mezcla se sometió a radiación de microondas bajo las siguientes condiciones: 100 Watts, presión atmosférica, por 10 minutos, a reflujo. Concluido el tiempo de reacción, se concentró la mezcla en rotavapor a presión reducida. Una vez concentrado, se resuspendió en un volumen pequeño de agua destilada y se acidificó con HCl 1 N hasta un pH aproximado de 3. Después, el compuesto se extrajo con DCM y a la fase orgánica resultante se le adicionó un poco de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para eliminar humedad. Finalmente se concentró nuevamente en rotavapor a presión reducida.

### 7.6.1 O-desprotección de Cbz-N-Pro-Phe-OMe

Siguiendo el procedimiento general para la O-desprotección de aminoácidos y péptidos antes descrito, se sometieron a reacción 0.87 g (2.04 mmol) del dipéptido Cbz-N-Pro-Phe-O-Me en 8.71 mL de THF-H<sub>2</sub>O-MeOH con 0.26 g (6.19 mmol) de LiOH disueltos en 3.18 mL de H<sub>2</sub>O destilada. La mezcla resultante fue sometida a radiación de microondas

bajo las condiciones descritas. Se obtuvieron 0.76 g (91 % de rendimiento) en forma de un sólido blanco ceroso, soluble en DCM y con un  $R_f = 0.1$  (Hexano-AcOEt 1:1)



Ácido (S,S)-2-(carbamoyl-1-(benzyloxycarbonyl)pirrolidín)-3-fenilpropanoico

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  1.73-1.89 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ , ciclopropilo), 2.86-3.16 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.27 (m, 1H, CH), 5.02 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.12-7.38 (m, 10H, CH).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  24.33 ( $\text{CH}_2$  pirrolidina), 30.99 ( $\text{CH}_2$  pirrolidina), 38.21 ( $\text{CH}_2$ ), 47.98 (CO,  $\text{CON}$ ), 55.13 ( $\text{CHCH}_2$ ), 61.56 (CH, pirrolidina), 68.04 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 127.88-130.18 (CH, aromáticos).

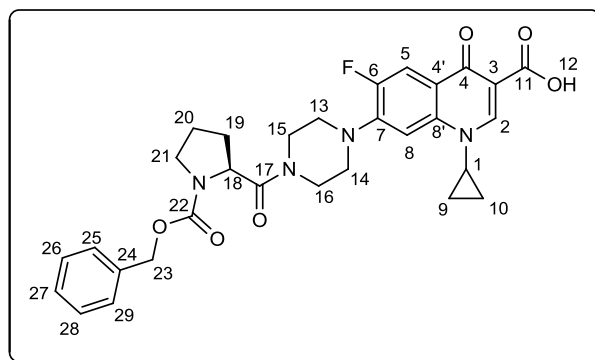
## 7.7 Procedimiento general para el acoplamiento de aminoácidos o péptidos *N*-Cbz protegidos con el ciprofloxacino, vía ésteres activos.

En un matraz balón provisto de agitación magnética y en baño de hielo, se colocó 1 equivalente del aminoácido o péptido *N*-Cbz-prottegido y se disolvió en una mezcla de DCM-DMF en una proporción 7:3. A continuación se adicionaron 2.0 equivalentes de DIEA y se dejó reaccionar por 10 minutos. Después se adicionó 1 equivalente de HBTU y se dejó reaccionar por 10 minutos. En seguida, se adicionó lentamente el ciprofloxacino finamente pulverizado y se dejó en agitación 1 h en baño de hielo y 12 h a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de reacción, se le efectuaron 4 lavados suaves con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Finalmente, la fase orgánica se filtró con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró en rotavapor a presión reducida, a una temperatura no mayor de 40 °C.

### 7.7.1 Síntesis de Cbz-*N*-Pro-O-Cpx

Siguiendo el procedimiento general para el acoplamiento de aminoácidos o péptidos *N*-Cbz protegidos vía ésteres activos antes descrito, se sometieron a reacción 0.14 g (0.57

mmol) de Cbz-*N*-Pro en 5 mL de DCM-DMF con 0.20 mL (1.15 mmol) de DIEA, 0.219 g (0.57 mmol) de HBTU y 0.9 g (0.57 mmol) de ciprofloxacino. El producto se purificó mediante recristalización por par de disolventes usando DCM-Hexano y se obtuvieron 0.16 g (94% de rendimiento) de un polvo blanco ligeramente amarillento, soluble en DCM. El compuesto presentó un  $R_f = 0.53$  (AcOEt-MeOH 9:1) y un punto de fusión de 216 °C.



Ácido (S)-7-(4-(1-(benciloxycarbonil)pirrolidín-2-oxo)piperazín-1-il-1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidro-quinolín-3-carboxílico

**$^1\text{H}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.66 (s, H-2), 7.87 (d, 12.4 Hz, H-8), 7.32 (m, H-8, H-25 a H-29), 5.19, 5.13, 5.07, 5.00 (4d,  $J = 12.0$  Hz, H-23), 4.79, 4.70 (2d,  $J = 5.6$  Hz, H-18), 4.1, 3.6 (m, H-16), 3.95, 3.83 (m, H-13), 3.58 (m, H-21), 3.45 (m, H-15), 3.31, 3.11 (m, H-14), 2.24, 1.94 (m, H-19), 2.10, 1.95 (m, H-20), 1.41 (s, H-9), 1.21 (s, H-10).

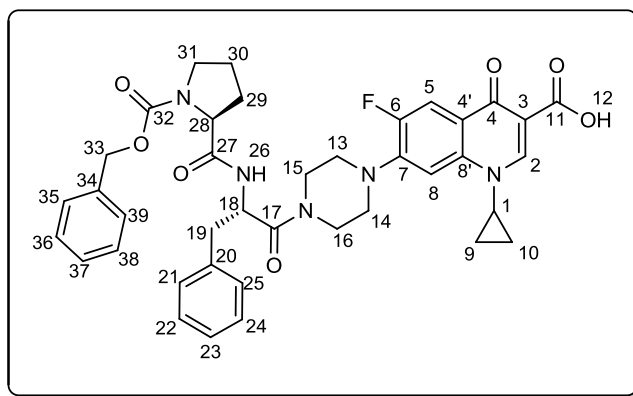
**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  176.73 (C-4), 170.78 (C1-11), 166.71 (C-11), 154.81 (C-22), 154.0, 152.14 (C-6), 147.23 (C-2), 145.34 (C-7), 138.81 (C-24), 136.56 (C-8'), 128.33-127.57 (C-25 a C-29), 119.80 (C-4'), 112.16, 111.93 (C-5), 107.70 (C-3), 105.13 (C-8), 66.87 (C-23), 56.54, 56.17 (C-18), 49.82 (C-15), 49.21 (C-14), 47.01, 46.53 (C-21), 45.19, 44.90 (C-13), 41.67, 41.45 (C-16), 35.31 (C-1), 30.61, 29.72 (C-19), 24.21, 23.40 (C-20), 8.12 (C-9 y C-10).

**IR** ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ): 1703, 1628 (CO), 1419 (aromáticos), 1024 (CF).

### 7.7.2 Síntesis de Cbz-*N*-Pro-Phe-O-Cpx

Siguiendo el procedimiento general para el acoplamiento de aminoácidos o péptidos *N*-Cbz protegidos vía ésteres activos antes descrito, se sometieron a reacción 0.059 g (0.15 mmol) de Cbz-*N*-Pro-Phe-COOH en 5 mL de DCM-DMF, con 0.052 mL (0.30 mmol) de

DIEA, 0.057 g (0.15mmol) de HBTU y 0.050 g (0.15 mmol) de ciprofloxacino. El producto se purificó mediante recristalización en dos disolventes usando DCM:Hexano obteniendo 0.097 g (91 % de rendimiento) de un sólido blanco ligeramente amarillo, soluble en DCM. El compuesto presentó un  $R_f = 0.68$  (AcOEt-MeOH 9:1) y un punto de fusión de 125 °C.



Ácido (S,S)-7-(4-(3-fenil-2-carbamoyl-1-(benzylloxycarbonyl)pirrolidín)propanoíl-1-oxo)piperazín-1-il)-1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolín-3-carboxílico

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.76 (s, H-2), 8.01 (dd,  $J = 12.8, 2.9$  Hz, H-5), 7.27 (m, H-8, H-21 a H-25 y H-35 a H-39), 6.79 (s, H-19), 5.11 (m, H-18 Y H-33), 4.34 (m, H-28), 3.90, 3.19 (m, H-13), 3.63 (m, H-15), 3.52 (m, H-1y H-31), 3.63, 3.19 (m, H-16), 3.05 (m, H-19), 2.65 (m, H-14), 2.08 (m, H-29), 1.85 (m, H-30), 1.40 (s, H-9), 1.20 (s, H-10).

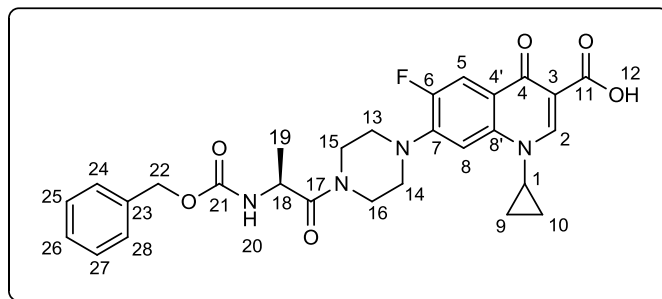
$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  177.06 (C-4), 171.22 (C-27), 169.48 (C-17), 166.83 (C-11), 157.30 (C-32), 154.59, 151.96 (C-6), 147.56 (C-2), 145.32 (C-7), 138.79 (C-8'), 136.30 (C-20 y C-34), 129.48-127.01 (C-21 a C-25 y C-35 a C-39), 120.33 (C-4'), 112.33, 112.10 (C-5), 108.86 (C-3), 105.12 (C-8), 67.22 (C-33), 60.54 (C-28), 49.27 (C-18 y C-19), 47.0 (C-14 y C-15), 45.10 (C-31), 41.56 (C-13), 39.56 (C-16), 35.26 (C-1), 28.77 (C-29), 24.41 (C-30), 8.26 (C-9 y C-10).

IR ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ): 1702, 1624 (CO), 1453 (aromáticos), 1023 (CF).

### 7.7.3 Síntesis de Cbz-N-Ala-O-Cpx

Siguiendo el procedimiento general para el acoplamiento de aminoácidos o péptidos *N*-Cbz protegidos vía ésteres activos antes descrito, se sometieron a reacción 0.10 g (0.45 mmol) de Cbz-*N*-Ala en 5 mL de DCM-DMF con 0.15 mL (0.90 mmol) de DIEA, 0.1717 g

(0.45 mmol) de HBTU y 0.15 g (0.45 mmol) de ciprofloxacino. Se obtuvieron 0.24 g (98 % de rendimiento) de un sólido blanco ligeramente amarillo, soluble en DCM. El compuesto presentó un  $R_f = 0.64$  (AcOEt-MeOH 9:1) y punto de descomposición de 230 °C.



Ácido (S)-7-(4-(3-carbamoyl(benciloxi)propanoíl-1-oxo)piperazín-1-il)-1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolín-3-carboxílico

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  14.91 (s, H-12), 8.71 (s, H-2), 7.96 (d,  $J = 12.7$  Hz, H-5), 7.36-7.32 (m, H-8, H-24 a H-28), 5.84 (d,  $J = 7.8$  Hz, H-20), 5.11 (s, H-22), 4.74 (m, H-18), 4.03, 3.72 (m, H-16), 3.82, 3.74 (m, H-13), 3.56 (m, H-1), 3.40 (m, H-15), 3.28 (m, H-14), 1.39 (d,  $J = 6.8$  Hz, H-19), 1.42 (s, H-9), 1.21 (s, H-10).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  176.86 (C-4), 170.94 (C-17), 166.81 (C-11), 155.53 (C-21), 154.58, 151.71 (C-6), 147.52 (C-2), 145.22 (C-7), 138.85 (C-23), 136.19 (C-8'), 128.15 (C-24 a C-28), 119.86 (C-4'), 112.39 (C-5), 107.94 (C-3), 105.20 (C-8), 66.77 (C-22), 49.87 (C-15), 49.38 (C-14), 46.57 (C-18), 45.12 (C-13), 41.69 (C-16), 35.32 (C-1), 19.21 (C-19), 8.19 (C-9 y C-10).

IR ( $\nu_{\text{máx}}$  cm<sup>-1</sup>): 1716, 1626 (CO), 1445 (aromáticos), 1022 (CF).

## 7.8 Procedimiento general para la N-desprotección mediante hidrogenación catalítica por transferencia.

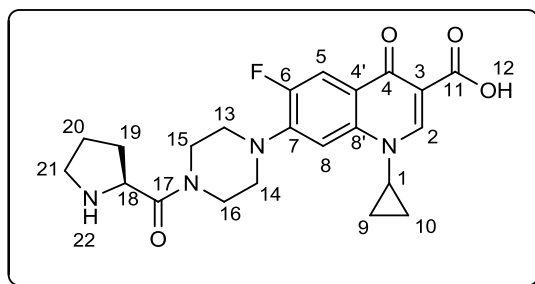
En un matraz balón provisto de agitación magnética, se colocó el compuesto N-Cbz protegido, 50% w/w de Pd/C al 10%, 8 equivalentes de formato de amonio (previamente secado en estufa a 78 °C) y se suspendió en EtOH al 96%. La mezcla se sometió a radiación de microondas bajo las siguientes condiciones: 300 Watts de potencia, presión atmosférica, por 40 minutos. Concluido el tiempo de reacción, se filtra al vacío mediante un

embudo de Hirsch, se concentra en rotavapor a presión reducida y a una temperatura no mayor a 45 °C.

OBSERVACIONES: la temperatura alcanzada en el reactor de microondas usando las condiciones descritas oscila en 37-47 °C; debido a la formación de NH<sub>3</sub> (g) y CO<sub>2</sub> (g), es necesario ejecutar el procedimiento en campana de extracción de gases.

### 7.8.1 *N*-desprotección de Cbz-*N*-Pro-Cpx

Siguiendo el procedimiento general para la *N*-desprotección mediante hidrogenación catalítica por transferencia antes descrito, se sometieron a reacción 0.040 g (0.07 mmol) de Cbz-*N*-Pro-Cpx con 0.008 g de Pd/C al 10% y 0.0358 g (0.56 mmol) de formato de amonio en 6 mL de EtOH. Se sometieron a radiación de microondas por 40 minutos bajo las condiciones previamente descritas. Se obtuvieron 0.0294 g (96% de rendimiento) de un polvo blanco que fue purificado por cromatografía en columna utilizando como eluentes Hexano, AcOEt, AcOEt-MeOH (9:1) y MeOH-NH<sub>4</sub>OH (9:1). Posteriormente fue recrystalizado usando MeOH:Et<sub>2</sub>O. El compuesto fue soluble en MeOH, parcialmente soluble en DCM, presentó un punto de descomposición de 228 °C.



Ácido (S)-1-ciclopropil-6-fluoro-7-(4-(pirrolidín-2-oxo)piperazín-1-il)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico

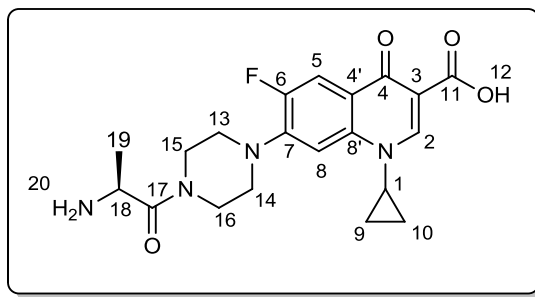
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.72 (s, H-2), 8.05 (d, *J* = 12.8 Hz, H-5), 7.38 (d, *J* = 7.0 Hz, H-8), 4.1, 3.83 (*m*, H-16), 3.95 (*dd*, *J*<sub>1,2</sub> = 8, *J*<sub>2,3</sub> = 8 Hz, H-18), 3.79, 3.71 (*m*, H-13), 3.55 (*m*, H-1), 3.36 (*m*, H-15), 3.34, 3.28 (*m*, H-14), 3.21 y 2.86 (*ddd*, *J*<sub>1,2</sub> = 4, *J*<sub>1,3</sub> = 8, *J*<sub>1,4</sub> = 16 Hz, H-21), 2.14, 1.75 (*m*, H-19), 1.85, 1.75 (*m*, H-20), 1.41 (s, H-9), 1.22 (s, H-10).

**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  177.07 (C-4), 172.90 (C-17), 166.85 (C-11), 155.05, 152.32 (C-6), 147.62 (C-2), 144.91 (C-7), 138.94 (C-8'), 120.86 (C-4'), 122.70 (C-5), 108.29 (C-3), 105.15 (C-8), 58.13 (C-18), 50.09 (C-15), 49.48 (C-14), 47.71 (C-21), 44.77 (C-13), 41.76 (C-16), 31.0 (C-19), 26.51 (C-20), 8.27 (C-9 Y C-10).

**IR** ( $\nu_{\text{máx}} \text{cm}^{-1}$ ): 1733, 1620, 1579 (CO), 1483 (aromáticos), 1023 (CF).

## 7.8.2 *N*-desprotección de Cbz-*N*-Ala-Cpx

Siguiendo el procedimiento general para la *N*-desprotección mediante hidrogenación catalítica por transferencia antes descrito, se sometieron a reacción 0.081 g (0.15 mmol) de Cbz-*N*-Ala-Cpx con 0.0405 g de Pd/C al 10% y 0.0761 g (1.20 mmol) de formato de amonio en 6 mL de EtOH. Dicha mezcla se sometió a radiación de microondas por 40 minutos bajo las condiciones previamente descritas. Se obtuvieron 0.0522 g (86% de rendimiento) de un polvo blanco que fue purificado por cromatografía en columna utilizando como eluentes Hexano, AcOEt, AcOEt-MeOH (9:1) y MeOH-NH<sub>4</sub>OH (9:1). Posteriormente fue recrystalizado usando MeOH:Et<sub>2</sub>O. El compuesto fue parcialmente soluble en MeOH, poco soluble en DCM, presentó un punto de fusión de 214 °C.



### Ácido (S)-1-ciclopropil-6-fluoro-7-(4-(2-aminopropanoíl-1-oxo)piperazín-1-il)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico

**$^1\text{H}$ -RMN** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  8.60 (s, H-2), 7.78 (d,  $J$  = 13.2 Hz, H-5), 7.51 (d,  $J$  = 7.2 Hz, H-8), 4.30 (c,  $J$  = 6.6 Hz, H-18), 3.90, 3.80 (m, H-16), 3.80 (m, H-13), 3.70 (m, H-1), 3.36 (m, H-14 y H-15), 1.42 (d,  $J$  = 6.9 Hz, H-19), 1.38 (s, H-9), 1.19 (s, H-10).

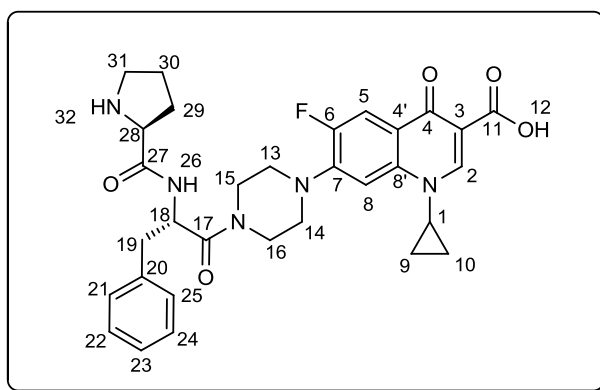
**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  177.93 (C-4), 172.57 (C-17), 169.70 (C-11), 156.09, 153.62 (C-6), 149.13 (C-2), 146.53 (C-7), 140.54 (C-8'), 121.20 (C-4'), 112.48 (C-5), 109.32 (C-3), 107.42 (C-8),

51.09 (C-15), 50.46 (C-14), 47.71 (C-18), 46.15 (C-13), 43.05 (C-16), 36.77 (C-1), 18.84 (C-19), 8.53 (C-9 Y C-10).

**IR ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ):** 1701, 1615, 1576 (CO), 1477 (aromáticos), 1023 (CF).

### 7.8.3 *N*-desprotección de Cbz-*N*-Pro-Phe-*O*-Cpx

Siguiendo el procedimiento general para la *N*-desprotección mediante hidrogenación catalítica por transferencia antes descrito, se sometieron a reacción 0.050 g (0.07 mmol) de Cbz-*N*-Pro-Phe-*O*-Cpx con 0.0347 g de Pd/C al 10% y 0.035 g (0.55 mmol) de formato de amonio en 6 mL de EtOH. Dicha mezcla se sometió a radiación de microondas por 1 hora bajo las condiciones previamente descritas. Se obtuvieron 0.0347 g (84% de rendimiento) de un polvo blanco que fue purificado por cromatografía en columna utilizando como eluentes Hexano, AcOEt, AcOEt-MeOH (9:1) y MeOH-NH<sub>4</sub>OH (9:1) y finalmente recristalizado usando MeOH:Et<sub>2</sub>O. El compuesto presentó punto de fusión de 182 °C.



Ácido (*S,S*)-1-ciclopropil-6-fluoro-7-(4-(3-fenil-2-carbamoíl(pirrolidín)propanoíl-1-oxo)piperazín-1-il)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  8.72 (s, H-2), 8.31 (d,  $J$  = 8.4 Hz, H-32), 7.95 (m, H-5), 7.25 (m, H-8, H-21 a H-25), 5.13 (m, H-18), 3.88 (m, H-13), 3.70 (m, H-15), 3.49 (m, H-1 y H-31), 3.28 (m, H-16), 3.05 (m, H-19), 2.70 (m, H-14) 2.03, 1.69 (m, H-29 y H-30), 1.39, 1.19 (s, H-9 y H-10).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  177.04 (C-4), 171.18 (C-27), 170.18 (C-17) 166.85 (C-11), 154.59, 151.75 (C-6), 147.55 (C-2), 145.24 (C-7), 138.89 (C-8'), 136.29 (C-20), 128.80 (C-21 a C-25),

120.29 (C-4'), 112.44 (C-5), 108.23 (C-3), 104.97 (C-8), 61.82 (C-28), , 49.37 (C-18 y C-19), 47.15 (C-14 y C-15), 45.22 (C-31), 41.60 (C-13), 39.57 (C-16), 35.27 (C-1), 30.64 (C-29), 25.65 (C-30), 8.26 (C-9 y C-10).

**IR ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ):** 1731, 1621, 1581 (CO), 1486 (aromáticos), 1021 (CF).

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mendoza A. El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista de la Facultad Medicina de la UNAM*. **2011**; 54(1): 18-27
2. Ortiz IFJ, Morales MI, Gil AA, Reyna FJ, et al. El reto de la resistencia bacteriana en México: los beneficios de contar con una nueva alternativa de manejo antimicrobiano eficaz. *Medicina Interna de México* **2009**; 25(5): 361-71
3. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Beucher HW, Scheld WM, et al. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **2008**; 46: 155-64
4. Infectious Diseases Society of America. The 10 x '20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. *Clinical Infectious Diseases*. **2010**; 50 (8): 1081-1083.
5. Thomas G. Medicinal Chemistry, an Introduction. 2a ed. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd; **2007**
6. Galbis JA. Panorama Actual de la Química Farmacéutica. 2a ed. Sevilla, España: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla; **2004**
7. Machuca E. Síntesis y evaluación como agentes antimicrobianos de nuevas aminoacil fluoroquinolonas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, **2010**
8. Valencia Y. Síntesis y actividad antimicrobiana de nuevos derivados de fluoroquinolona sustituidos en la posición 7. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, **2010**
9. Görög S. New safe medicines faster: the role of analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**; 22 :407-415
10. Lombardino JG, Lowe JA. The Role of the Medicinal Chemist in Drug Discovery – Then and Now. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2004**; 3 :853-862

11. Ariza A, Bakhmutov V, Conteras R, Farfan N, Flores A, Gordillo B, Juaristi E, Paz A, Rosales MJ, Santillán RL. Ejemplos Prácticos del Uso de la Resonancia Magnética Nuclear en Química. México, D.F.: Serie de Textos CINVESTAV; **2006**
12. Leyva S, Leyva E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Boletín de la Sociedad Química de México*. **2008**; 2(1) :1-13
13. Andriole V. T. The quinolones: past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases* **2005**; 41: S113–9
14. Emami S, Shafiee A, Foroumadi A. Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. *IJPR* **2005**, 3: 123-136
15. Bruguera M, García M, Díaz R. Actualidad de las quinolonas. *Revista Cubana de Farmacia* **2005**; 39(1)
16. Tálens R. Actividad antimicrobiana *in vitro* de nuevas 6-fluoroquinolonas de administración por vía oral. Relación estructura-actividad. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, **2001**
17. Peterson L. R. Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clinical Infectious Diseases* **2001**; 33 Suppl 3:S180–6
18. Andersson M, MacGowan A. Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2003**; 51, Suppl. S1:1–11
19. Barbosa SG. Obtención de Nuevos Complejos Quinolona Bi(III) y Estudios de su Actividad Frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, **2007**
20. Letafat B, Emami S, Mohammadhosseini N, et al. Synthesis and Antibacterial Activity of New N-[2-(Thiophen-3-yl)ethyl] Piperaziny Quinolones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2007**; 55(6): 894-898
21. Wade LG. Química Orgánica. 5a ed. Madrid: Pearson Educación; **2004**
22. Bailey, PD. An Introduction to Peptide Chemistry. John Wiley & Sons; New York, **1997**

23. Castañeda J, Ortega JA, Venegas AM, et al. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* **2009**; 18(1) :16-29
24. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? *PLoS Pathog* **2010**; 6(10) :1-4
25. Téllez G, Castaño J. Péptidos antimicrobianos. *Infectio*. **2010**; 14(1) :55-67
26. Marr A, Gooderham W, Hancock R. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, **2006**; 6: 468-472
27. Ulvatne H, Karoliussen S, Stiberg T, Rekdal O, Svendsen J. Short antibacterial peptides and erythromycin act synergically against *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2001**; 48: 203-208
28. Lavery G, Gorman SP, Gilmore BF. The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *International Journal of Molecular Sciences*. **2011**; 12 :6566-6596
29. Venkat Lingaiah BP, Yakaiah T, Chandra Shekhar A, Ravi Kumar A, et al. Synthesis of novel  $\alpha$ -amino acid functionalized 6-fluoroquinolones, their antibacterial activity and molecular docking studies. *Indian Journal of Chemistry*. **2012**; 51B: 969-980.
30. Skoog D, West D, James Holler F, Crouch S. Fundamentos de Química Analítica. 8a ed. México: Thomson; **2005**
31. Holzgrabe U, Diehl BWK, Wawer I. NMR Spectroscopy in Pharmacy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **1998**; 17 :557-616
32. Silverstein MR, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7a ed. Estados Unidos de América: John Wiley & Sons; **2005**
33. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. Introduction to Spectroscopy. 3a ed. Estados Unidos de América: Thomson Learning; **2001**
34. Richards SA, Hollerton JC. Essential Practical NMR for Organic Chemistry. Inglaterra: John Wiley & Sons; **2011**
35. Anderson RJ, Bendell DJ, Groundwater PW. Organic Spectroscopic Analysis. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; **2004**
36. McMurry J. Química Orgánica. 7a ed. México, D.F.: Cengage Learning; **2008**

37. Pearson AJ, Roush WR. Activating Agents and Protecting Groups. Inglaterra: John Wiley & Sons; **1999**
38. Valeur E, Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*. **2009**; 38 :606-631
39. Carpino LA, Imazumi H, El-Faham A, Ferrer FJ, Zhang C, Lee Y, Foxman BM, et al. The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salts. *Angew. Angewandte Chemie International Edition*. **2002**; 41(3) :441-445
40. Greene TW, Guts P. Protective Groups in Organic Synthesis. 3a ed. Estados Unidos de América: John Wiley & Sons; **1999**
41. Goodman M, Moroder L, Toniolo C, Felix A. Houben-Weyl: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics. 4a ed. Estados Unidos de América: Thieme; **2003**
42. Juaristi E. Fisicoquímica Orgánica. México, D.F.: Editorial CINVESTAV; **1998**
43. Murata M, Hara T, Mori K, Ooe M, et al. Efficient deprotection of *N*-benciloxy carbonyl group from amino acids by hydroxyapatite-bound Pd catalyst in the presence of molecular hydrogen. *Tetrahedron Letters*. **2003**; 44: 4981-4984
44. Johnstone R, Wilby A, Entwistle I. Heterogeneous Catalytic Transfer Hydrogenation and Its Relation to Other Methods for Reduction of Organic Compounds. *Chemical Reviews*. **1985**; 85: 129-170
45. Gowda DC, Abiraj K. Heterogeneous catalytic transfer hydrogenation in peptide synthesis. *Letters in peptide synthesis*. **2002**; 9: 153-165
46. Daga MC, Taddei M, Varchi G. Rapid microwave-assisted deprotection of *N*-Cbz and *N*-Bn derivatives. *Tetrahedron Letters*. **2001**; 42 :5191-5194
47. Lidström P, Tierney J, Wathey B, Westman J. Microwave assisted organic synthesis, a review. *Tetrahedron*. **2001**; 57: 9225-9283
48. Loupy A. Microwaves in Organic Synthesis. Francia: Wiley-VCH; **2002**
49. Kociński PJ. Protecting Groups. 3a ed. Alemania: Thieme; **2005**
50. Björn L, Boddien A, Gärtner F, Junge H, Beller M. Catalytic generation of hydrogen from formic acid and its derivatives: useful hydrogen storage materials. *Top Catal*. **2010**; 53: 902-014

## **9. ANEXO**

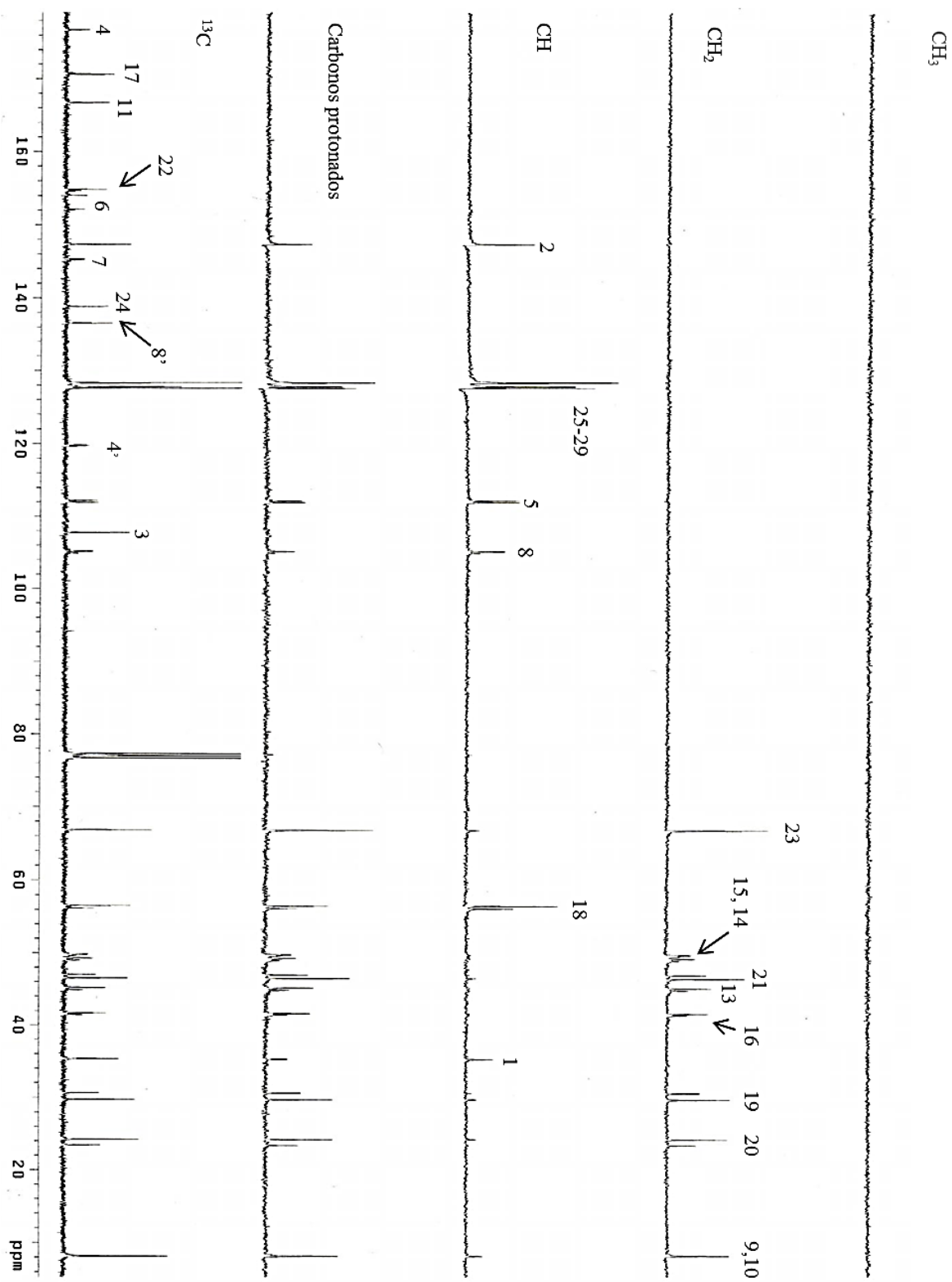


Figura 45. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT del compuesto 1.

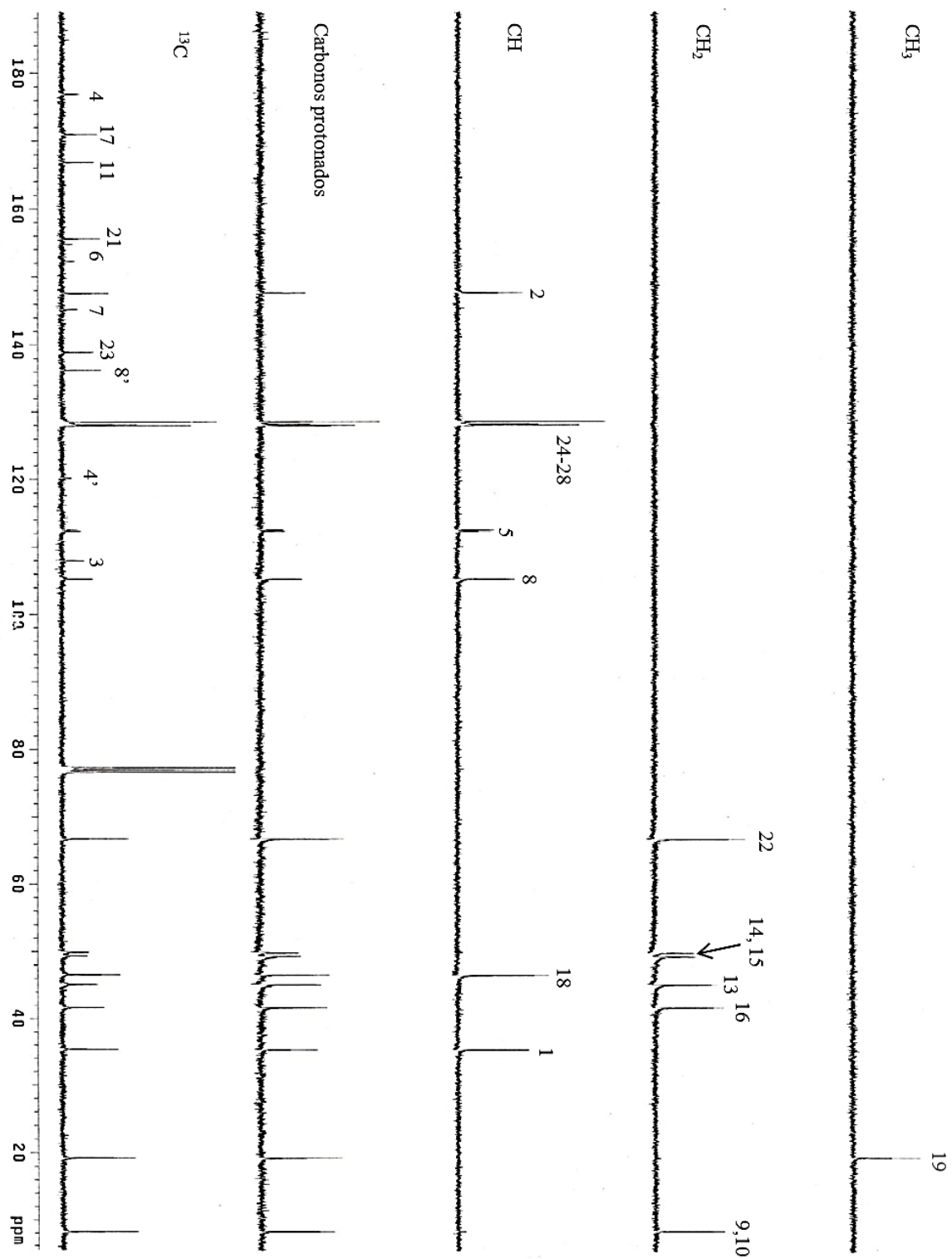


Figura 46. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT del compuesto 2

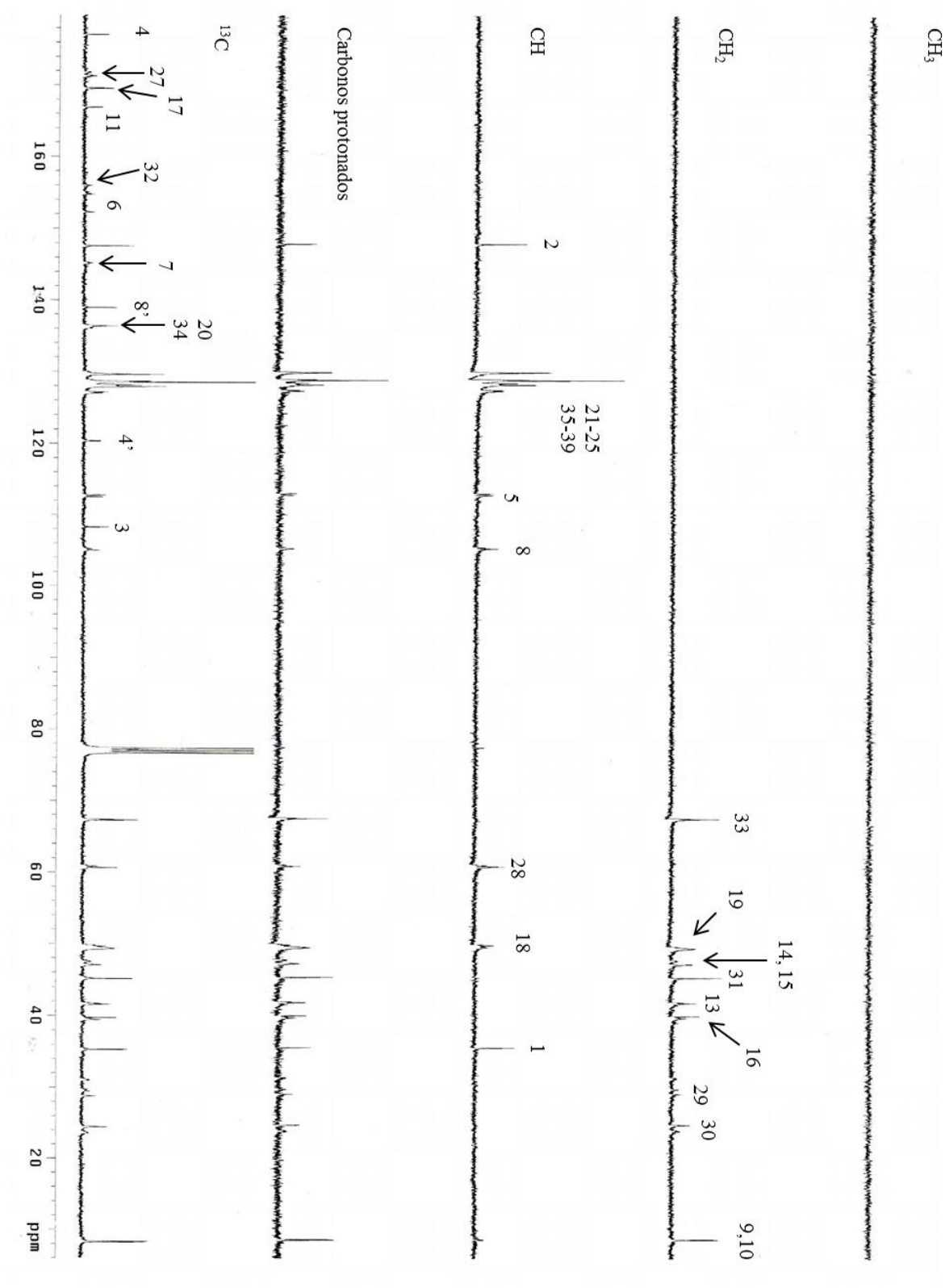


Figura 47. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT del compuesto 3

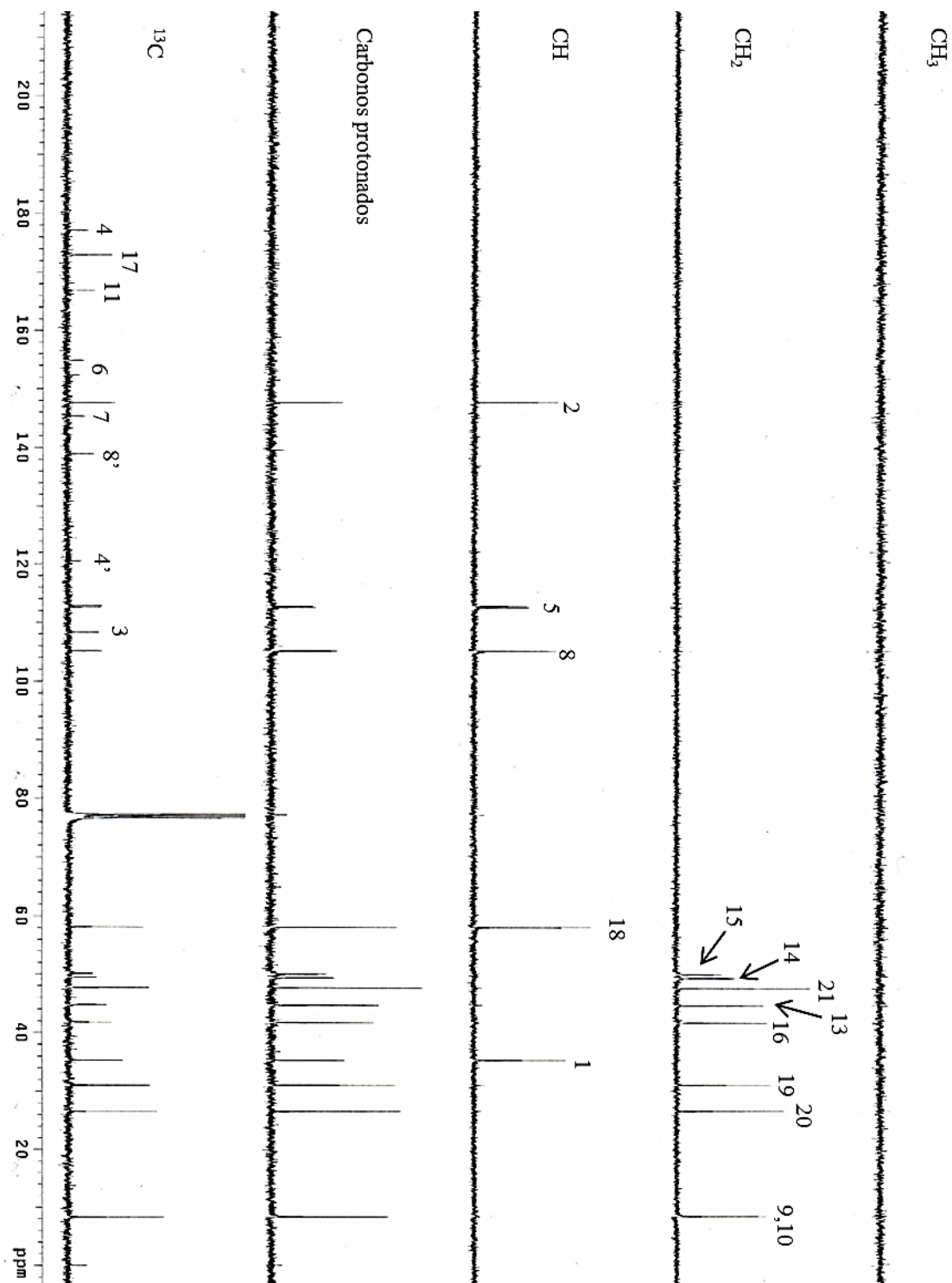


Figura 48. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT del compuesto 4

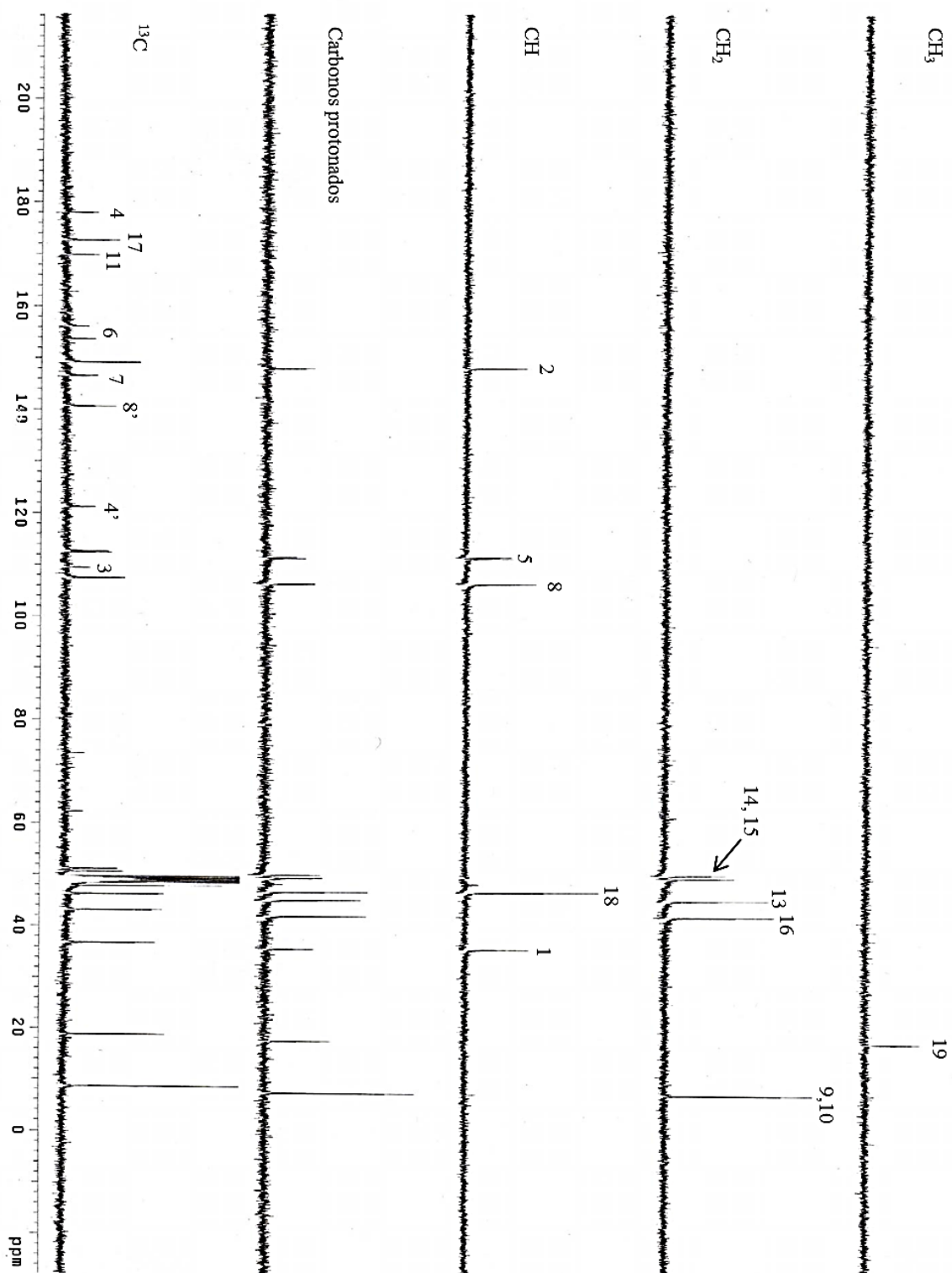
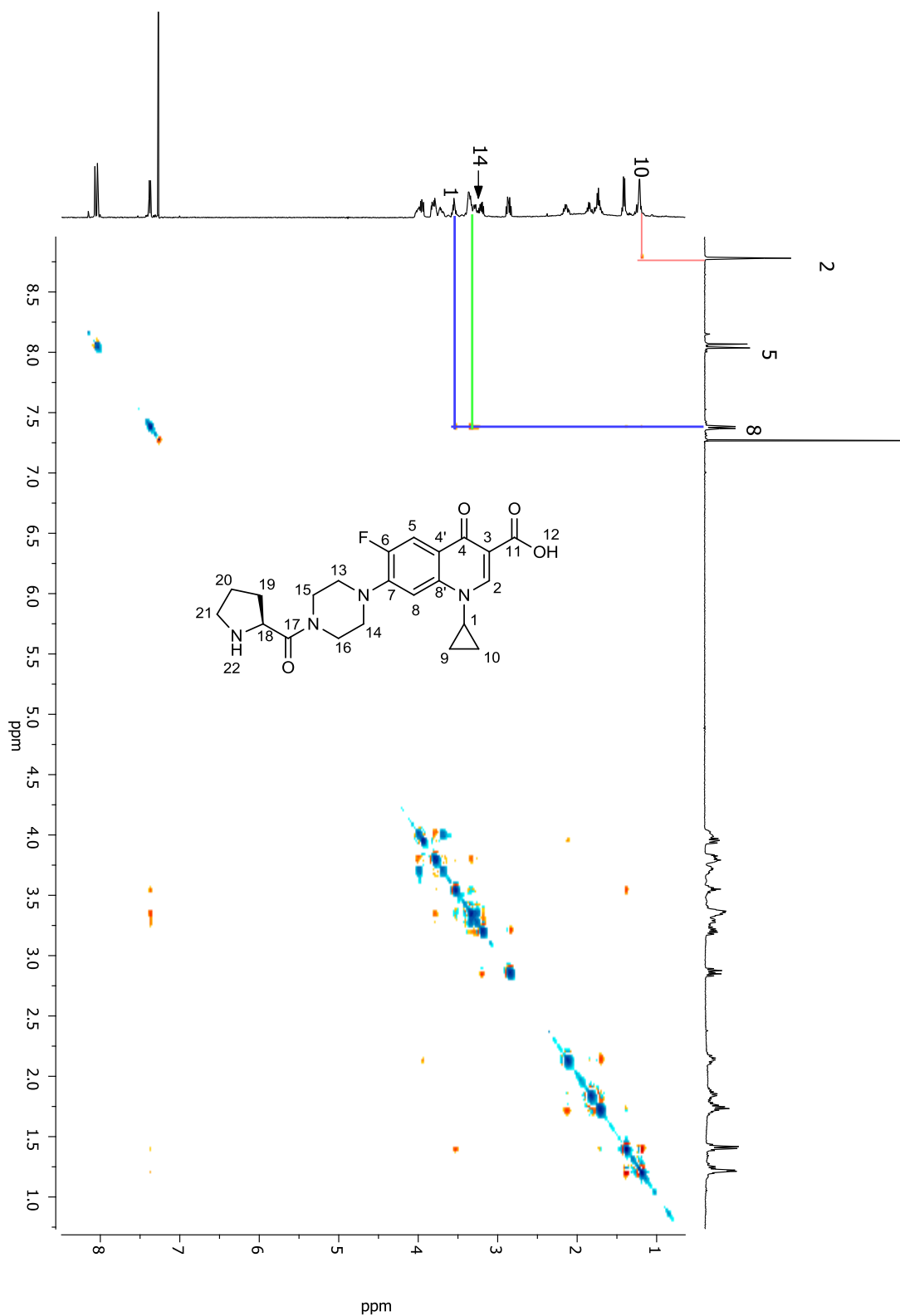


Figura 49. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT del compuesto 5.



**Figura 50.** Espectro NOESY del compuesto 4.

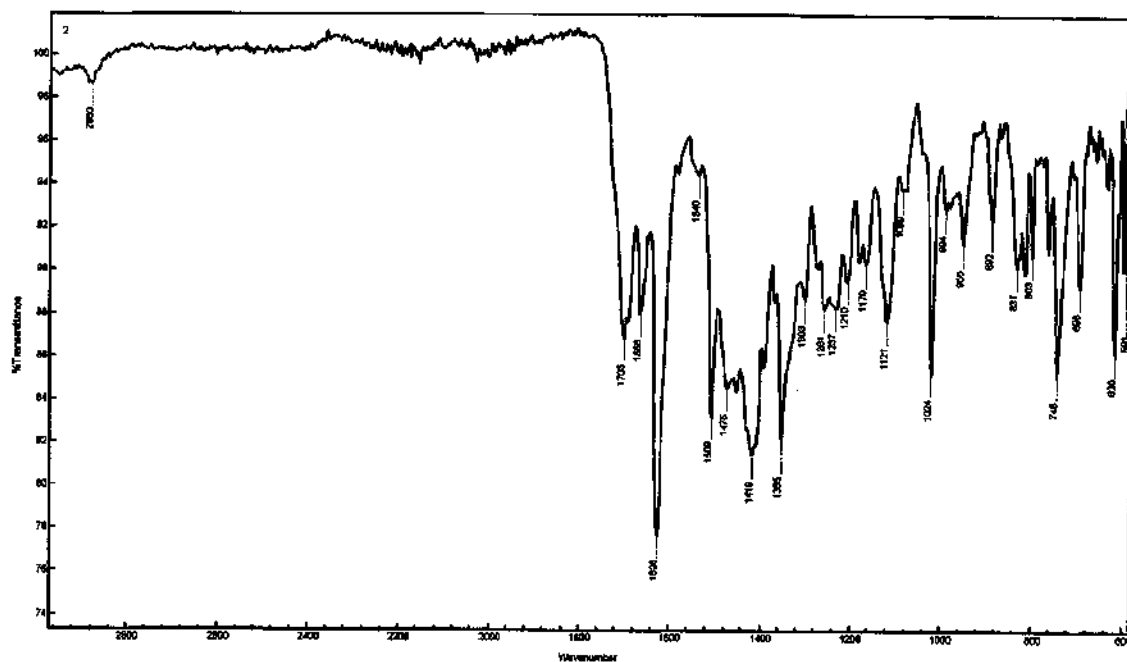


Figura 51. Espectro de IR del compuesto 1

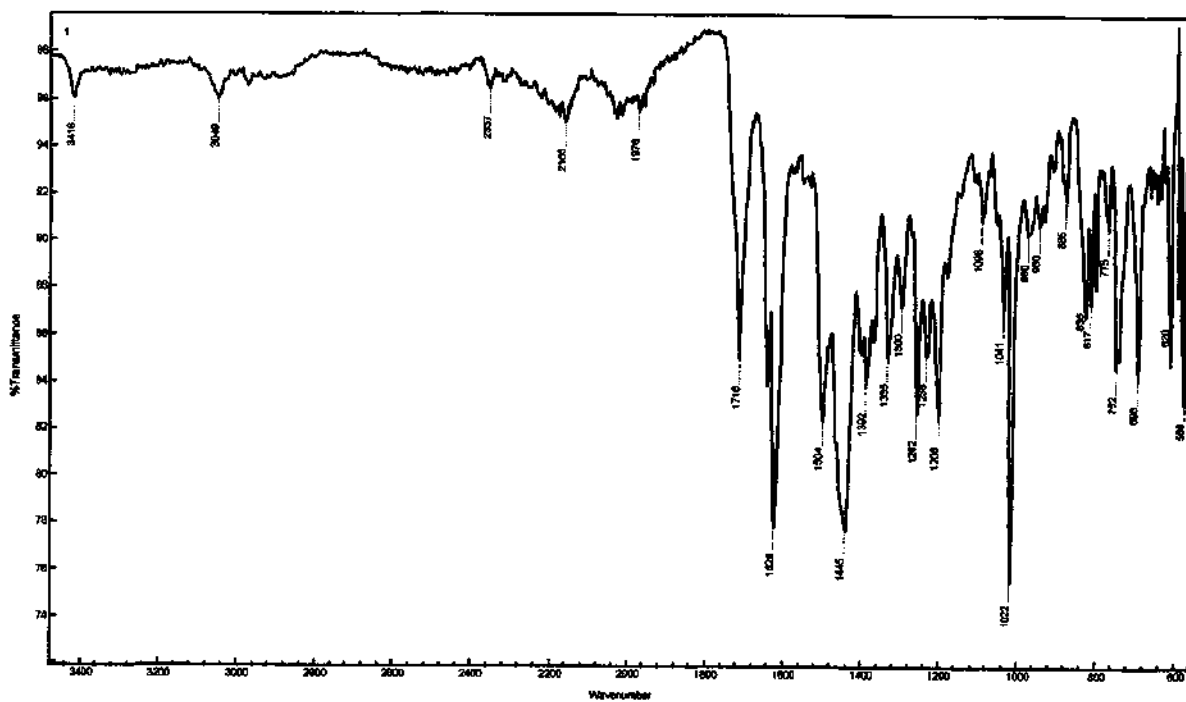


Figura 52. Espectro IR del compuesto 2

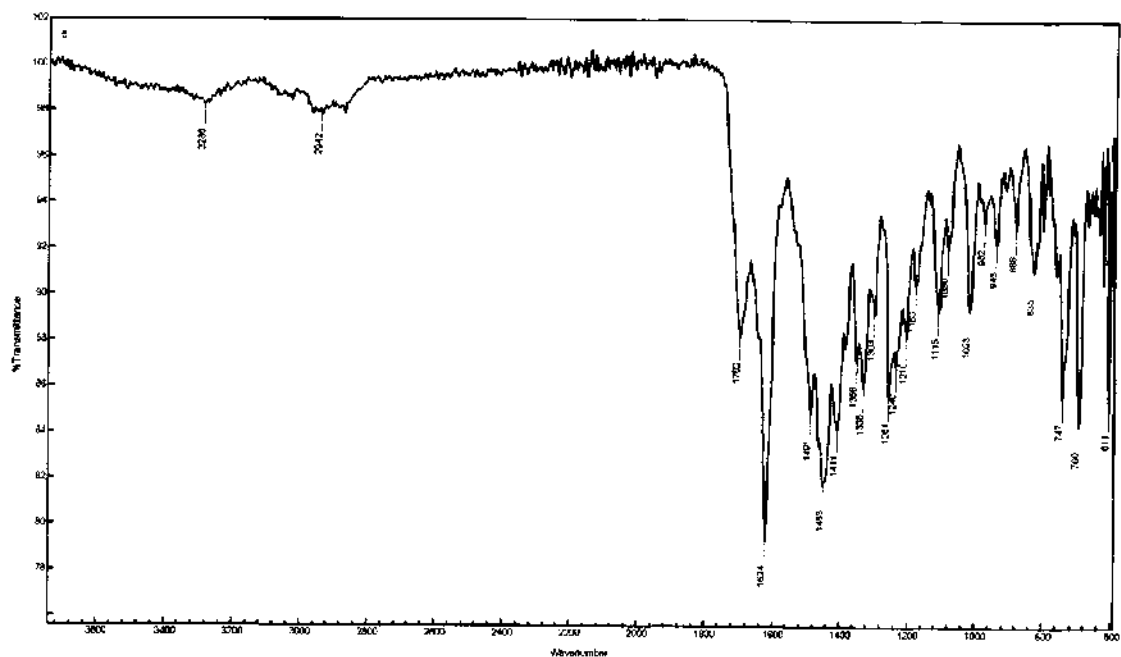


Figura 53. Espectro de IR del compuesto 3

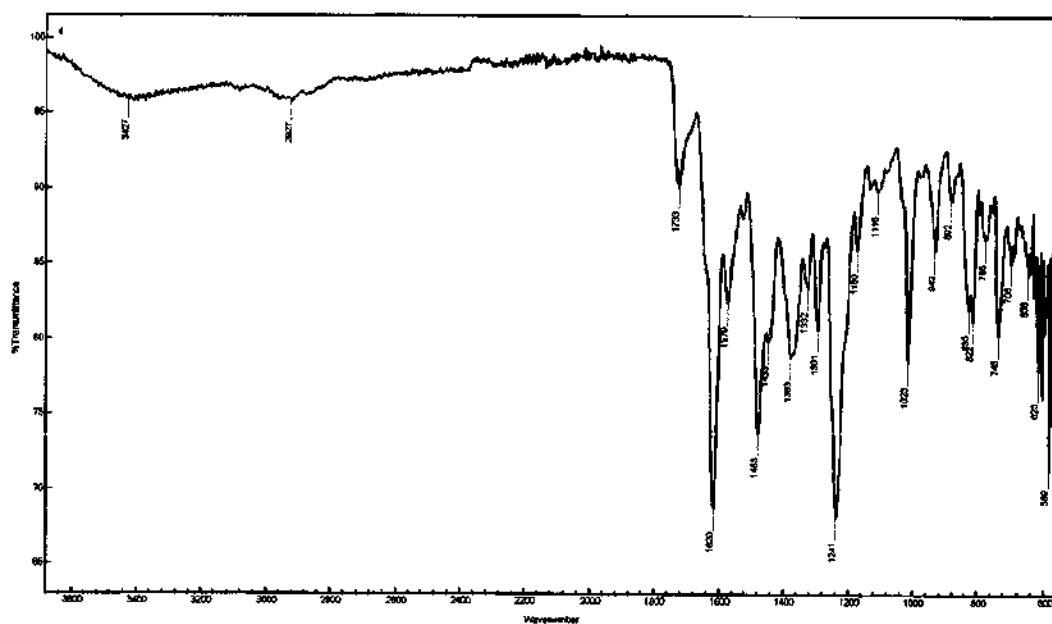


Figura 54. Espectro de IR del compuesto 4

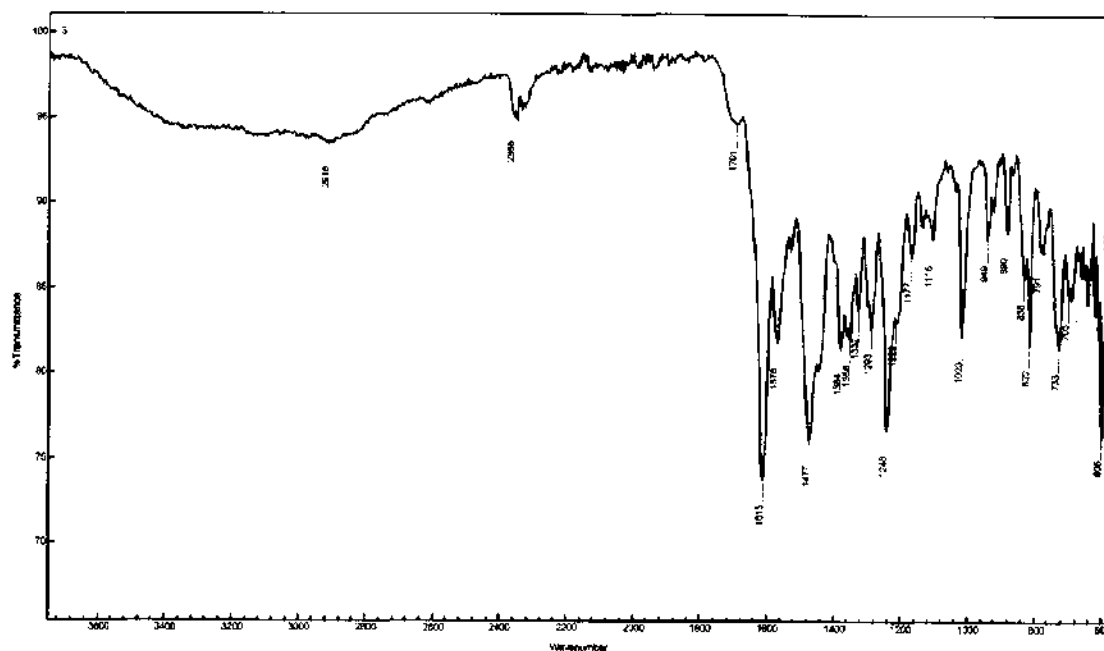


Figura 55. Espectro de IR del compuesto 5

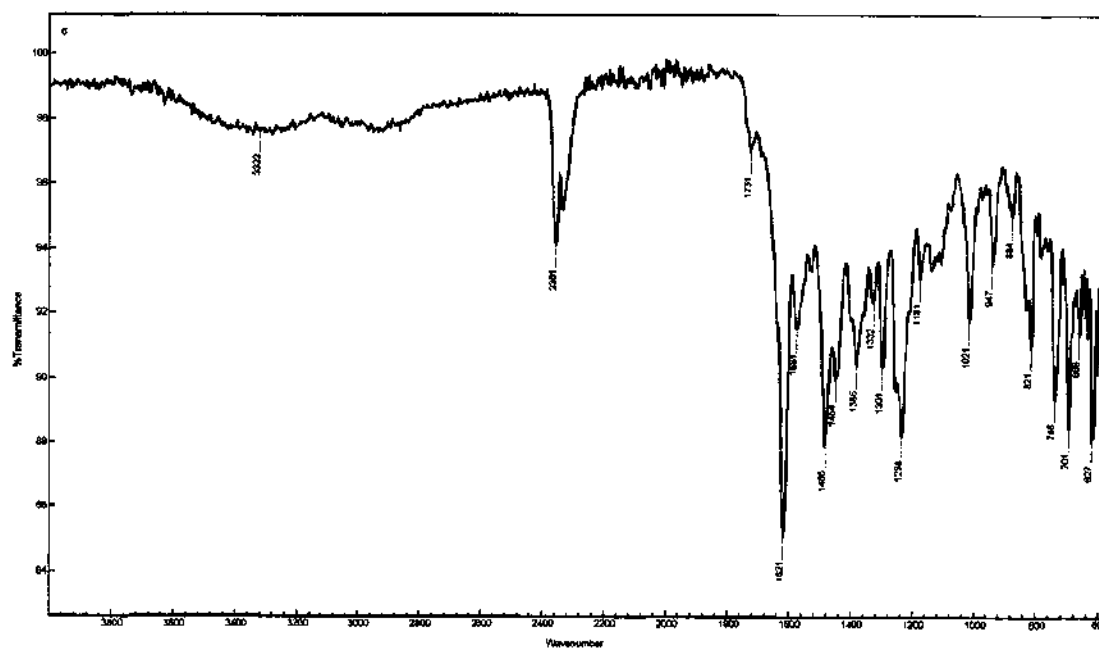


Figura 56. Espectro de IR del compuesto 6