



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

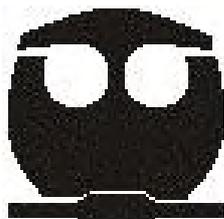
FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN DE DIPÉPTIDOS INTERMEDIARIOS EN
LA SÍNTESIS DE LAS ULONGAMIDAS A, B Y C.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO

PRESENTA
GERARDO HERNÁNDEZ BAUTISTA



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

Al Dr. Ángel Guzmán S. por todo el apoyo brindado a este proyecto y por sus valiosas contribuciones, un gran ejemplo como investigador.

Al M. en C. Cuauhtémoc Alvarado S., solo me resta darte las gracias por tu ayuda invaluable en este proyecto y sobre todo por inculcarme ese espíritu de búsqueda.

Al Dr. Eduardo Díaz T. por su valiosa contribución e interés para que este proyecto llegara a su fin, así como por su ayuda en la parte de RMN.

A los miembros de jurado por el tiempo dedicado en la revisión del manuscrito.

A mis padres y hermana por todo el amor, cariño y paciencia, por estar siempre dándome alientos para terminar mis proyectos, y sobre todo por creer en mí. A mis sobrinos por hacerme ver de nuevo la vida de otra forma.

Al equipo de trabajo con el cual tuve una gran convivencia y me hicieron agradable la estancia: Enrique, Javier, Mauricio, MAVR, MAMU, a la señora Violeta y Flor. Como recordaré esas charlas con café antes de iniciar el trabajo.

Al personal del Instituto de Química por las determinaciones espectroscópicas: Q. Elizabeth Huerta, Q. Ángeles Peña, Dr. B. Quiroz, M. C. Héctor Ríos, M. C. Nieves Zavala, Q. Rocío Patiño, M. C. Javier Pérez, I. Q. Luis Velasco.

A mis amigos y compañeros, en donde para no herir susceptibilidades mencionaré de acuerdo a como creo los fui conociendo, así que no protesten:

- Ángeles y Alejandro por soportarme tanto tiempo y permitirme crecer a su lado, no tienen idea de la enorme satisfacción que la vida me dio al llegar a conocerlos. Las piedras rodando se encuentran....

- Ángel, gracias por contagiarme esas ganas de hacer bien las cosas. Por los caminos recorridos y por los que faltan.

- A Hilda y Ces por sus regaños y consejos, por soportar mis berrinches y mal humor, por el millón de tazas de café.

- A mi primer grupo de amigos que tuve en esta facultad y por los cuales estoy muy agradecido: Paola, Daniel, musgo; no los cambiaría. A mis otros compañeros de primer semestre que conforme fui conociendo se convirtieron en mis amigos también Rebeca, Marlene, Silvia e Irazema.

- A toda la banda de químicos que la carrera me permitió conocer y que me han dejado algo especial: QMoy, Elizabeth, Elisa, Daniel Inge, Esteban, Jessica, Malva, Play, Poncho, Paulina, Mariana, Ferny, Karen, Ariel, Alan, George, la Güera, Lucia, Areli, Claudia, Alejandro, Rubén, Ahmed, Chucho, Manuel, Sandra, Selene, Víctor, Uriel, Paty y Noemí.

- A no podemos olvidar a Karla, América, Alfredo y Nelida.

- A los integrantes del lab 209: Ruy, Edgar e Israel.

Bueno si se me fue algún nombre ya lo pondremos después en la segunda edición de la tesis.

Abreviaturas.

Las abreviaturas para los aminoácidos y los péptidos derivados son los recomendados por la Comisión sobre Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.¹ Esto surge como un intento para llevar a cabo una amplia sistematización de varios tipos de abreviaturas que están en uso.

Los símbolos elegidos son derivados de los nombres triviales o de los nombres químicos de los compuestos y también representan su fórmula estructural.

Símbolos para aminoácidos

Phe	Fenilalanina
Val	Valina
Tyr	Tirosina

Las abreviaturas de los aminoácidos denotan la configuración **L** a menos que se indique lo contrario al anteponer las letras **D** o **DL** seguido de un guión.

Aminoácidos *N*-alquilados.

Los *N*-alquilaminoácidos cada vez son más comunes (p. ej. en un gran grupo de depsi péptidos) y por ello se requieren símbolos especiales.

<i>N</i> -Metilvalina	MeVal
<i>N</i> -Metilfenilalanina	MePhe

La unión entre aminoácidos se da con guiones que representan el enlace peptídico, por ejemplo: Phe-Val

Símbolos sugeridos para designar grupos sustituyentes (o protectores) comunes en aminoácidos, péptidos y química de proteínas:

Z- o Cbz-	Benciloxicarbonil-
Boc-	t-Butoxicarbonil-
-OMe	éster metílico
-OtBu	éster terbutílico

Otras abreviaturas:

DCC	<i>N, N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio
BOP-Cl	Cloruro de <i>N, N'</i> -bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfinilo
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HMPA	Hexametilfosforamida

Índice general.

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Productos marinos naturales	3
2.2 Vía metabólica secundaria	5
2.3 Aminoácidos	7
2.4 <i>N</i> -metilaminoácidos y métodos de <i>N</i> -metilación	9
2.5 Síntesis de péptidos	12
2.6 Protección del grupo amino	13
2.7 Protección del grupo carboxilo	14
2.8 Protección del grupo hidroxilo de la tirosina	16
2.9 Formación de enlaces peptídicos	17
2.10 Agentes acoplantes	19
2.11 Formación de dicetopiperazinas a partir de dipéptidos protegidos como ésteres	22
3. Planteamiento del problema	23
4. Objetivos	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos particulares	26
5. Parte experimental	27
5.1 Métodos generales	27
5.2 Secado de disolventes	28
5.3 Rutas de síntesis	29
5.4 Métodos de síntesis	34
6. Discusión de resultados	51
6.1 Análisis de los métodos de síntesis	51
6.2 Análisis de resonancia magnética nuclear	59
7. Conclusiones	78
8. Anexo A: espectros selectos de RMN ¹ H de derivados de aminoácidos	79
9. Anexo B: espectros de RMN de los dipéptidos sintetizados	84
10. Bibliografía	106

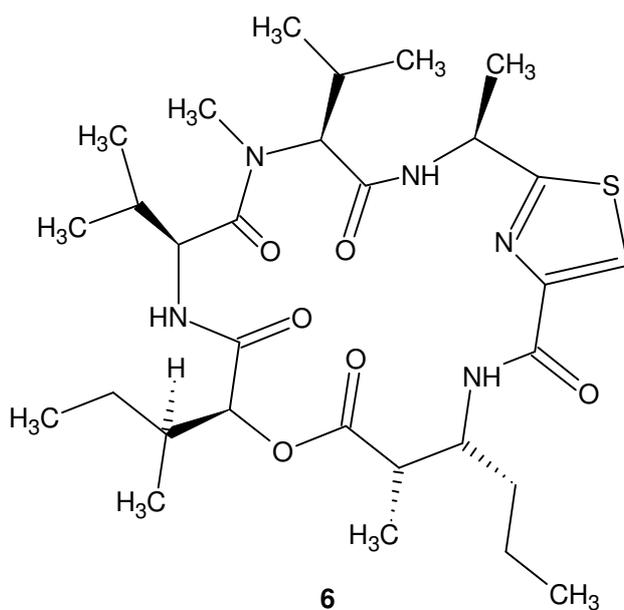
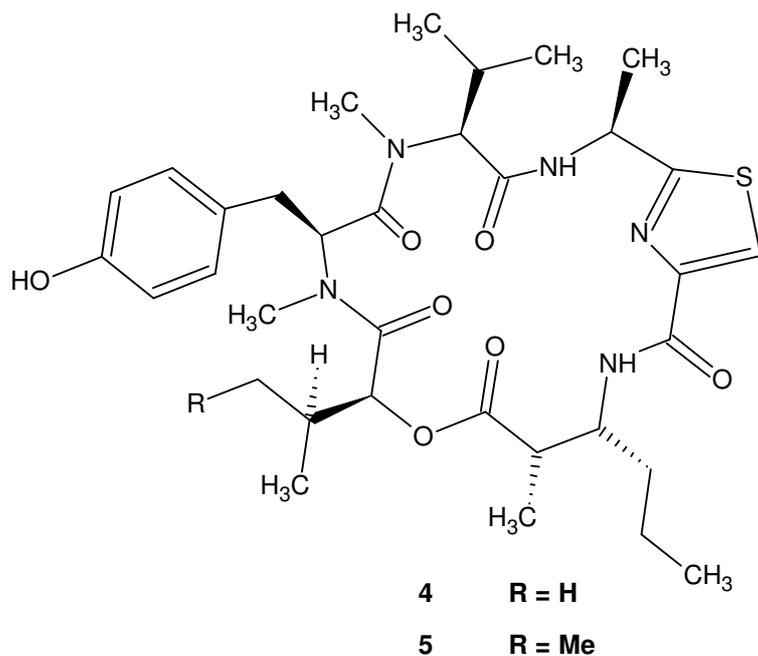


Figura 1. Continuación Ulongamidas D-F (4-6).

Todos estos compuestos con excepción del depsipéptido **6**, el cual carece de un aminoácido de tipo aromático, muestran actividad citotóxica contra líneas de células KB (carcinoma epidérmico) y LoVo (adenocarcinoma de colon) con valores de IC_{50} de 1 μ M y 5 μ M respectivamente.⁴

2. Antecedentes.

2.1 Productos marinos naturales.

La búsqueda de productos naturales que poseen actividad biológica tuvo sus primeros estudios sobre plantas y microorganismos terrestres de los cuales se obtuvo resultados fructíferos de los más notables son la aspirina, la penicilina y el taxol.

El rumbo contemporáneo para el descubrimiento de fármacos de fuentes naturales se ha dirigido al medio marino que produce numerosos, aunque con frecuencia, complejos compuestos químicos. Esto no debe de sorprendernos si tomamos en cuenta que más del 70% de la superficie terrestre es agua y con los océanos siendo más del 95% de la biosfera.

A partir de 1975 se han tomado tres vías paralelas para la búsqueda de productos naturales marinos: toxinas marinas, bioproductos marinos y ecología química marina. Hasta el año 2001 tan solo se tiene determinada la estructura química de cerca de 13,000 nuevos compuestos.

Los microorganismos marinos tales como actinomicetos y cierto tipo de hongos son bien conocidos por su producción de metabolitos bioactivos. Las cianobacterias también han sido identificadas como uno de los grupos de microorganismos biológicamente más prometedores de los cuales se pueden aislar nuevos productos naturales que son bioquímicamente activos. Las cualidades medicinales de las cianobacterias fueron apreciadas desde 1500 A.C., cuando la especie *Nostoc* fue usada en el tratamiento de gota y varias formas de cáncer. No obstante hasta antes de 1990 se tienen investigaciones limitadas sobre el aislamiento de compuestos bioactivos de este microorganismo.⁵

Dentro de los metabolitos bioactivos de las cianobacterias cabe destacar:

a) Didemnina B (**7**) es un lipopéptido cíclico y fue el primer producto natural marino en ser evaluado en pruebas clínicas en humanos para el tratamiento de varios tipos de cáncer, con resultados desafortunados en la fase II, sin embargo se trabaja en análogos sintéticos de este.⁶ (Figura 2)

b) La Boroficina (**8**) dentro de su estructura contiene boro y exhibe una potente citotoxicidad contra líneas celulares LoVo y KB.⁷ (Figura 2)

c) Cianovirina (**9**) es una proteína de 101 aminoácidos que ha mostrado potente actividad contra virus de inmunodeficiencia.⁸ (Figura 2)

d) Dolastatina 10 (**10**) es un pentapéptido modificado citotóxico que ha sido recomendado para pruebas clínicas fase II como anticancerígeno.⁹ (Figura 3)

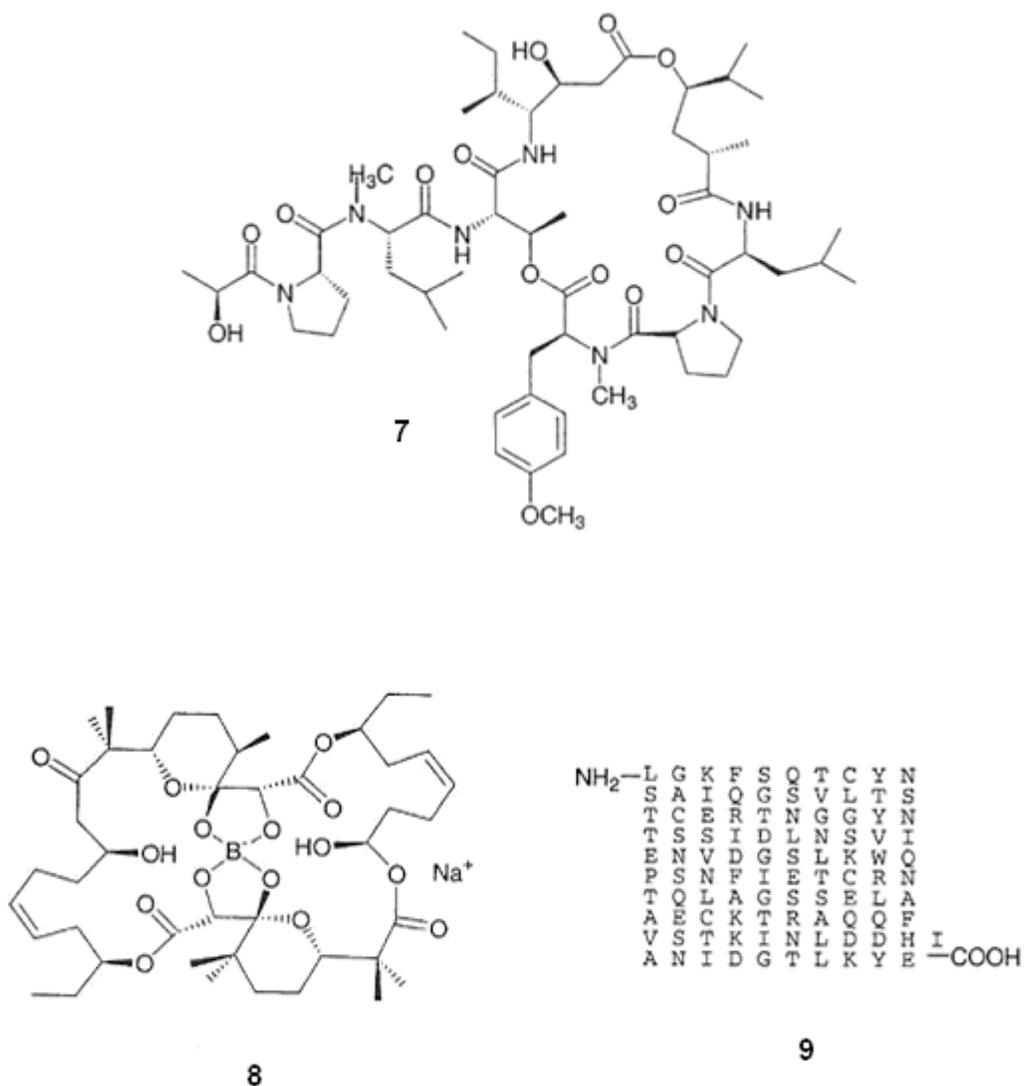


Figura 2. Estructuras químicas de la Didemmina B (**7**), la Boroficina (**8**) y la Cianovirina (**9**).

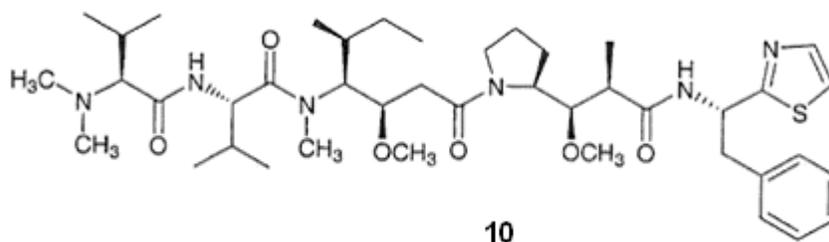


Figura 3. Estructura química de la Dolastatina 10 (**10**).

2.2 Vía metabólica secundaria.

En los últimos 50 años se han aislado y caracterizado los productos microbianos (ej. pigmentos, alcaloides, toxinas, antibióticos, carotenoides, lipopéptidos, etc.) que no muestran una función obvia en la vida del organismo que los produce (conocidos como metabolitos secundarios). En el mundo marino, la cianobacteria es una fuente prolifera de tales compuestos, muchos de los cuales muestran actividad biológica como antibióticos, anticancerígenos, antivirales entre otras.

El metabolismo primario de los microorganismos se caracteriza por tener como productos finales energía e intermediarios para la síntesis de macromoléculas esenciales tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo existen ciertos organismos que poseen genes para producir metabolitos secundarios en adición a los genes necesarios para su crecimiento. En estos organismos ciertos pasos del metabolismo primario carecen de regulación con la consecuente acumulación de intermediarios y productos finales del metabolismo primario, que sirven como subsidiarios de otras vías para formar metabolitos secundarios.⁵ (Esquema 1)

La diversidad estructural de los productos naturales generados por los microorganismos parece ser predominantemente el resultado de modificaciones y reacciones de combinación de la vía metabólica primaria.

2.3 Aminoácidos.

En un análisis de la literatura de productos naturales derivados de cianobacterias marinas se muestra que aproximadamente el 68% contiene nitrógeno.⁵ Consecuentemente los productos naturales de muchas cianobacterias contienen fragmentos de aminoácidos naturales o sus derivados.

- Química y estereoquímica de los aminoácidos.^{10a}

Los aminoácidos son los bloques de construcción de los péptidos y se componen de un átomo de carbono que tiene enlazado un grupo carboxilo, un grupo amino, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral R₁. (Figura 4)

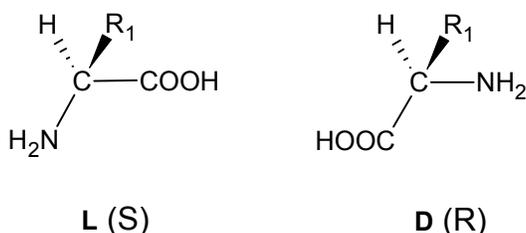


Figura 4. Estereoquímica de los aminoácidos.

El aminoácido más simple es la glicina cuya cadena lateral es otro átomo de hidrógeno dando lugar a un compuesto aquiral, pero se tienen dos posibles configuraciones de sustituyentes alrededor del átomo de carbono α central para todos los otros aminoácidos, haciendo que existan en dos formas estereoquímicas conocidas como L-isómeros para los aminoácidos encontrados en las proteínas y D-isómeros para aquellos que tienen la configuración opuesta. Los aminoácidos naturales son designados de esta forma por que tienen la misma configuración que el L-gliceraldehído, el cual arbitrariamente fue designado como la forma L.

Dos isómeros de configuración o quiralidad opuesta se relacionan como imágenes en un espejo y son referidos como enantiómeros; son idénticos en todos los aspectos, excepto que en solución estos rotan el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas. El enantiómero que desvía la luz polarizada a la derecha se

conoce como dextrorrotatorio (+) y el que lo hace hacia la izquierda es levorrotatorio (-). Cabe indicar que no hay una correlación entre la dirección de la rotación óptica (RO) y la configuración del isómero.

De acuerdo con el sistema de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog, los L-aminoácidos son de configuración (S) con excepción de la cisteína y sus derivados. Cuando la configuración de un aminoácido no es indicada se asume que se trata del enantiómero L.

- Naturaleza iónica de los aminoácidos. ^{10a}

Cada uno de los grupos funcionales de los aminoácidos puede existir en forma protonada o desprotonada. (Figura 5)

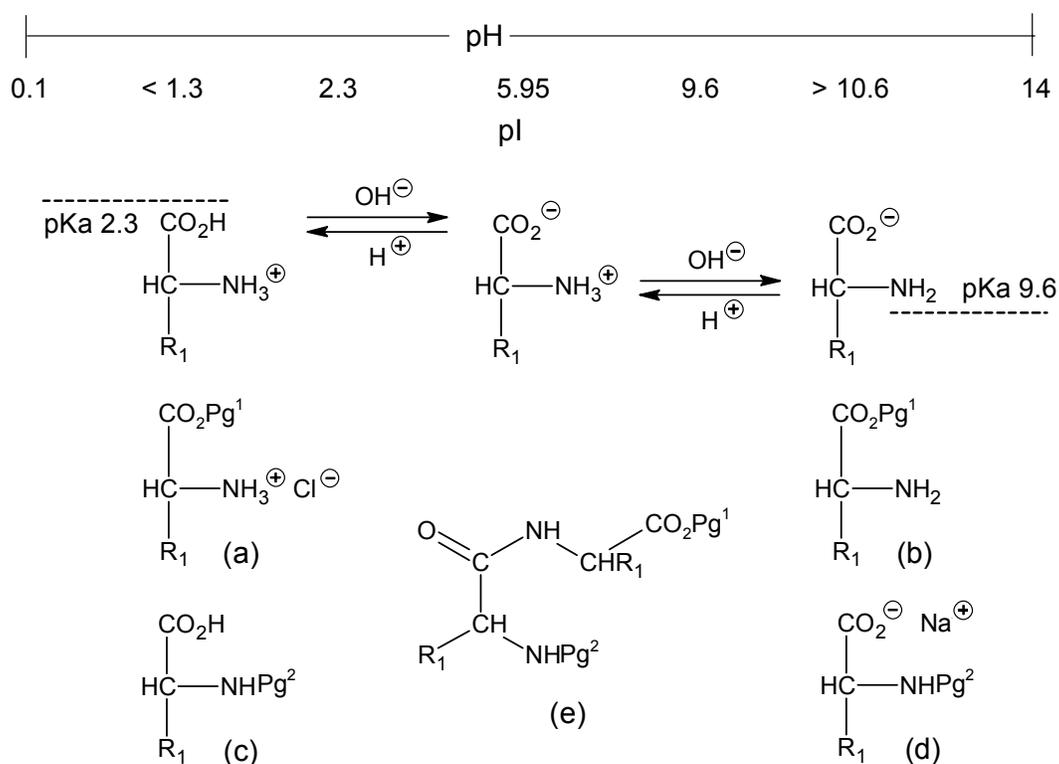


Figura 5. Naturaleza iónica de los aminoácidos (los valores de pKa corresponden a la Val). Pg = grupo protector. (a) Insoluble en disolvente orgánico y soluble en solución ácida; (d) insoluble en disolvente orgánico y soluble en solución alcalina; (b), (c) y (e) soluble en disolvente orgánico.

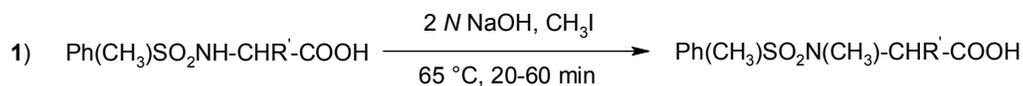
El estado iónico de un grupo funcional es dictado por dos parámetros: su naturaleza química y el pH del medio. Con cambios en el pH cada grupo puede perder o ganar un protón. La constitución química del grupo determina sobre cual intervalo de pH ocurre esto.

El pKa corresponde al pH al cual la mitad de las moléculas están protonadas y la otra mitad no. Los pKa's de los grupos funcionales están influenciados por los grupos adyacentes y los grupos cercanos.

El aminoácido es una molécula cargada en todos los valores de pH; es un catión a pH ácido, un anión a pH alcalino y predominantemente un ión de ambos tipos o zwitterión a pH's entre los dos valores de pKa. Un punto medio sobre la escala de pH en el cual el aminoácido no migra en un campo eléctrico es referido como punto isoeléctrico (pI). Estas características pueden ser aplicadas como el primer paso de cualquier purificación basándonos en la solubilidad de los aminoácidos y sus derivados.

2.4 *N*-metilaminoácidos y métodos de *N*-metilación.

En varios de los depsipéptidos producidos por cianobacterias marinas se encuentran fragmentos que corresponden a aminoácidos modificados; en el caso de las Ulongamidas A-F (**1- 6**) se tienen aminoácidos *N*-metilados, por lo cual es necesaria una revisión sobre las metodologías de *N*-metilación.¹¹ (Esquema 2 y 3)



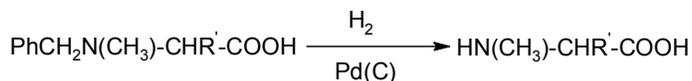
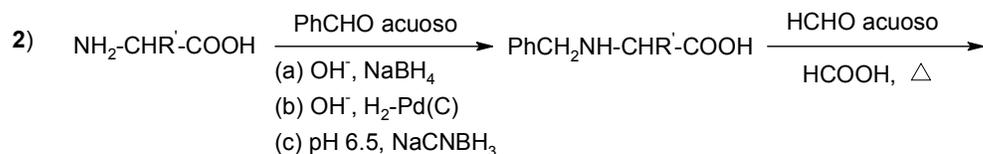
(a) 12 N HCl, 100 °C, 8 h
 (b) Na/ NH₃



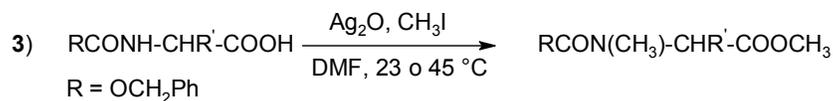
(d) 2 N HBr/ AcOH, 24 h

(a) Método de Fischer y Lipschitz, 1915

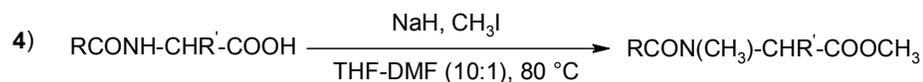
(b) Método de Vigneaud y Behrens, 1937



(a,b) Método de Quitt, 1963



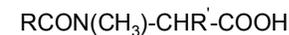
Método de Olsen, 1970



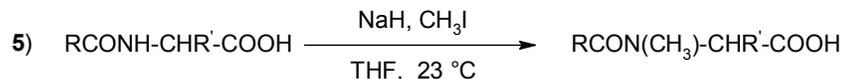
(a) 2 N NaOH-MeOH, 35 °C; R = OCH₂Ph

(b) N NaOH-THF; R = Ph, CH₃

5.6 N HBr/ AcOH; R = OCH₂Ph



Método de Coggins y Benoiton, 1971



R = OCH₂Ph, OtBu; 5 °C para R' = CH₂OBzl, CH₂OtBu

Método de Benoiton y colaboradores, 1973-1976

Esquema 2. Revisión de métodos de N-metilación de aminoácidos.

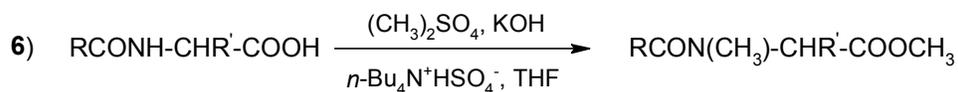
El siguiente análisis sobre las técnicas de *N*-metilación y la pureza enantiomérica de los productos se basa en el Esquema 2. Antes de llevar a cabo la monometilación del aminoácido, el grupo amino debe ser protegido. El grupo protector debe ser fácil de eliminar posteriormente.

El primer grupo protector utilizado para preparar *N*-metilaminoácidos es el *p*-toluensulfonilo. La metilación del tosilaminoácido produce el tosil-*N*-metilaminoácido, el cuál al ser tratado con sodio en amoniaco líquido libera el *p*-toluensulfonilo y genera el *N*-metilaminoácido deseado.¹² Otros métodos para remover el grupo tosilo resultan en la parcial racemización del compuesto.¹³

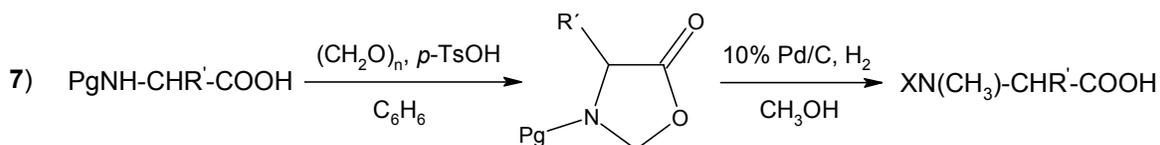
Un segundo grupo protector utilizado es el bencilo, el cual se introduce al aminoácido por reacción con benzaldehído a pH alcalino.¹⁴ La metilación es llevada a cabo mediante el procedimiento de Eschweiler-Clarke^{15, 16} el cual emplea formaldehído acuoso y ácido fórmico. Sin embargo, ambos pasos de esta síntesis resultan en la parcial racemización del *N*-metilaminoácido.

Los alcoxycarbonilos *tert*-butoxicarbonilo (Boc) y benciloxycarbonilo (Z) son posteriormente introducidos. Inicialmente una vez protegido el grupo amino del aminoácido, este se metila con yoduro de metilo y óxido de plata.¹⁷ El producto de esta reacción es el éster metílico del derivado *N*-metilado. La metilación empleando yoduro de metilo e hidruro de sodio en dimetilformamida también produce derivados esterificados.¹⁸ Desafortunadamente la saponificación de un éster de un *N*-metilaminoácido-*N*-protegido resulta en una ligera racemización de éste.¹⁹

Un método directo para preparar Z- y Boc-*N*-metilaminoácidos de pureza enantiomérica aceptable fue desarrollado a inicios de 1970 cuando se mostró que la metilación de estos derivados con yoduro de metilo e hidruro de sodio genera el producto sin la esterificación del grupo carboxilo, cuando la reacción se hace en tetrahidrofurano a temperatura ambiente.²⁰ Esta ha sido desde entonces la técnica seleccionada para preparar estos derivados y cabe destacar que ventajosamente la metilación de los Z-derivados es más rápida que la de Boc-derivados.



R = OCH₂Ph



Pg = Z, Boc

X = H, Boc

Esquema 3. Revisión de métodos de *N*-metilación de aminoácidos más recientes.

Entre los métodos de *N*-metilación más recientes encontramos el que se lleva a cabo con *Z*-derivados en THF empleando yoduro de metilo e hidróxido de potasio, en presencia de un catalizador de transferencia de fases sólido-líquido²¹ (bisulfato de tetrabutilamonio); donde se obtiene un derivado esterificado.

Otro método consiste en la reducción de oxazolidinonas *N*-protegidas por medio de hidrógeno en presencia de Pd/C.²²

2.5 Síntesis de péptidos.

En la práctica un dipéptido es formado por la combinación de dos aminoácidos enlazados por la reacción del grupo carboxilo de uno de los aminoácidos con el grupo amino de un segundo aminoácido. Por convenio, las estructuras peptídicas se escriben de forma que el grupo amino se encuentre a la izquierda y el grupo carboxilo a la derecha. Los extremos izquierdo y derecho del péptido se denominan *N*-terminal y *C*-terminal respectivamente.²³

- Estrategias en síntesis de péptidos.

Debido a que los aminoácidos poseen dos o tres grupos funcionales capaces de sufrir reacciones, el objetivo de una síntesis es formar el enlace deseado y

evitar a su vez reacciones sobre los otros grupos funcionales. La reactividad de un grupo funcional depende de su electrofilia o nucleofilia; y puede ser suprimida si se combina con un protector adecuado. Un grupo protector adecuado es aquel que es estable a la química que será sometida la molécula y que puede ser removido preferentemente sin reacciones paralelas. La elección entre proteger o no tiene implicaciones con la accesibilidad de los materiales de partida, la solubilidad de reactivos y productos, los métodos de acoplamiento, la cantidad de reacciones paralelas y la facilidad de la purificación de intermediarios y productos.

El objetivo de la síntesis de péptidos es sencillamente conectar aminoácidos en la secuencia prescrita por la formación de los enlaces amida entre ellos. Se han diseñado una serie de métodos y reactivos muy efectivos para la formación de los enlaces peptídicos, estos han hecho que la unión de aminoácidos por enlaces amida no sea difícil.

La síntesis de un dipéptido de secuencia prescrita requiere al menos tres operaciones:

- 1.- Protección del grupo amino del aminoácido *N*-terminal y del grupo carboxilo del aminoácido *C*-terminal (hay que tomar en cuenta la protección de los grupos de las cadenas laterales de los aminoácidos en caso de que estos sean susceptibles de reaccionar).
- 2.- Unión de ambos aminoácidos protegidos mediante enlace amida empleando agentes acoplantes o técnicas de acoplamiento.
- 3.- Eliminación de los grupos *N* y *C*-protectores (desprotección de los grupos de las cadenas laterales en caso de que se tengan).

2.6 Protección del grupo amino.

Los grupos amino son usualmente protegidos por formación de derivados con alcoxicarbonilos. El grupo *Z* fue descubierto por Bergmann y Zervas²⁴ en 1932, es uno de los grupos de protección de aminas más habituales, se elimina fácilmente por reacciones distintas de la hidrólisis, tal como la hidrogenólisis en presencia de

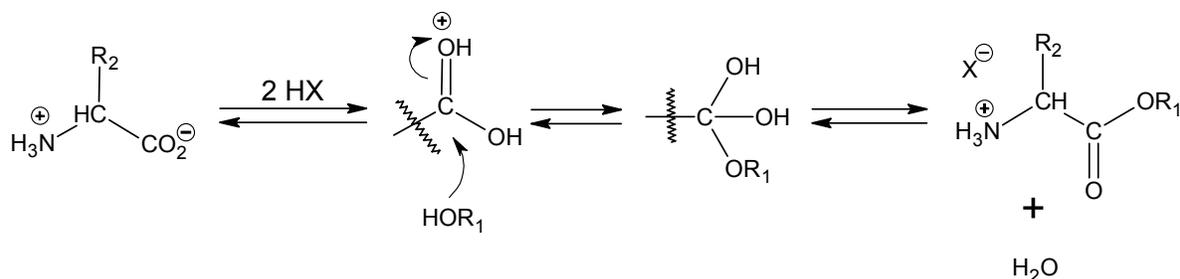


Figura 7. Protección del grupo carboxilo por esterificación de aminoácidos con alcohol, catalizada por ácido.

Los ésteres de bencilo son una opción muy popular ya que se pueden eliminar por hidrogenólisis. Así, un péptido sintético *N*-protegido con *Z* y *C*-protegido como éster de bencilo, puede desprotegerse completamente en una única operación.

Los ésteres terbutílicos no se pueden preparar por el método general de esterificación debido a la naturaleza poco reactiva del alcohol terbutílico. La formación de estos compuestos se efectúa por reacción del aminoácido con isobuteno en diclorometano generalmente, y es catalizada por ácido sulfúrico concentrado. (Figura 8)

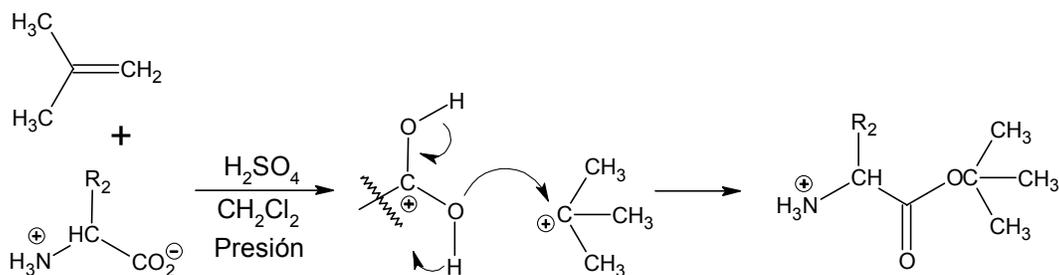


Figura 8. Protección del grupo carboxilo de los aminoácidos como su éster terbutílico.

Los ésteres terbutílicos se pueden eliminar por hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético en condiciones suaves y no son afectados por la reacción de hidrogenólisis en presencia de paladio o platino.

2.8 Protección del grupo hidroxilo de la tirosina (**11**).

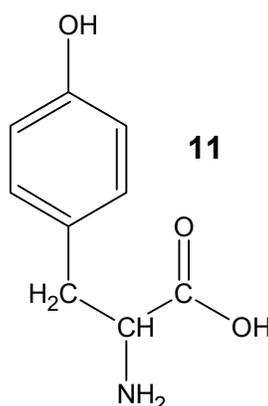


Figura 9. Estructura química de L-tirosina.

El grupo hidroxilo de **11** es muy reactivo, por lo que usualmente se protege durante una síntesis. La parte fenólica es un buen aceptor de cationes y el anión fenólico es mejor nucleófilo que un grupo α -amino, debido a esto la tirosina desprotegida invita a reacciones paralelas durante las reacciones de acoplamiento, así como durante las reacciones de desprotección por hidrólisis ácida.

Algunos grupos protectores son sensibles a ácidos y/o a nucleófilos, mientras que otros sufren transposiciones durante su desprotección con ácidos fuertes y forman subproductos tales como 3-benciltirosina (**13**) (Figura 10).²⁵ Es posible minimizar la reacción de alquilación por la vía intermolecular por el uso de anisol o benceno, los cuales compiten con los reactivos y los productos de reacción por las especies alquilantes. Sin embargo, es más difícil interferir con la vía intramolecular.

Por lo tanto las principales consideraciones a tomar en la protección del hidroxilo de **11** son la estabilidad del grupo protector y su tendencia a alquilar la posición orto del anillo cuando es removido.

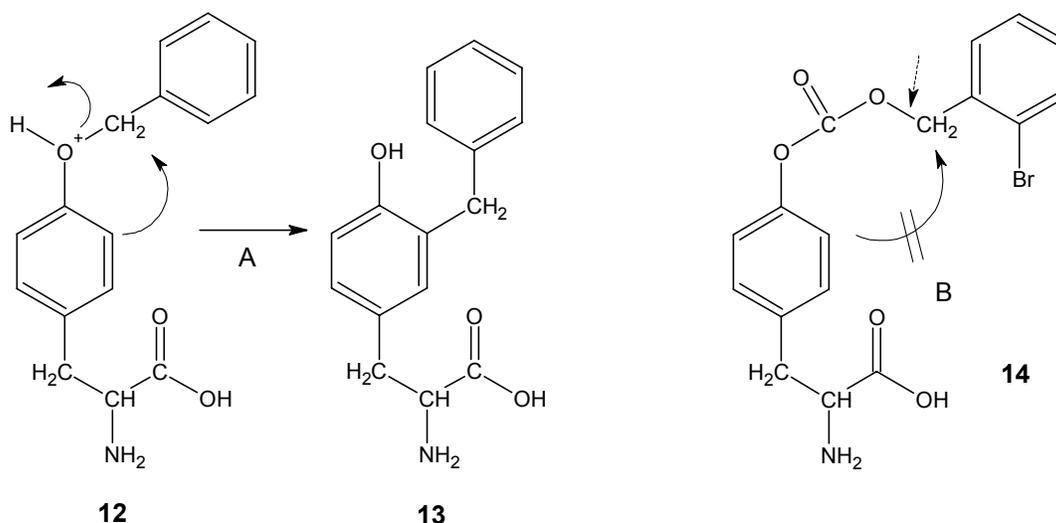


Figura 10. (A) Transposición al fenol sustituido durante la debencilación ácida de *O*-benciltirosina (**12**). La alquilación también puede ocurrir por reacción intermolecular. (B) La alquilación no ocurre durante la hidrólisis ácida de 2-bromobenciloxycarboniltirosina (**14**). El oxicarbonilfenol producido es un nucleófilo más débil que el fenol y el catión que se genera está más lejos del nucleófilo.

Entre algunos ejemplos de grupos protectores tenemos el ciclohexilo²⁶ que posee una adecuada estabilidad y menor tendencia como agente alquilante, su desventaja radica en que el derivado necesario no es fácil de preparar. Un homólogo menor no cíclico de éste es el 3-pentilo²⁵, cuya eliminación se efectúa con HF. Otro grupo protector que se ha empleado es el 2-bromobenciloxycarbonilo.

En nuestro caso revisando la literatura se optó por la *O*-protección por formación del éter metílico.²⁸

2.9 Formación de enlaces peptídicos.^{10b}

La formación de un enlace peptídico es efectuado por la abstracción de una molécula de agua de los grupos amino y carboxilo de dos derivados de aminoácidos. (Figura 11)

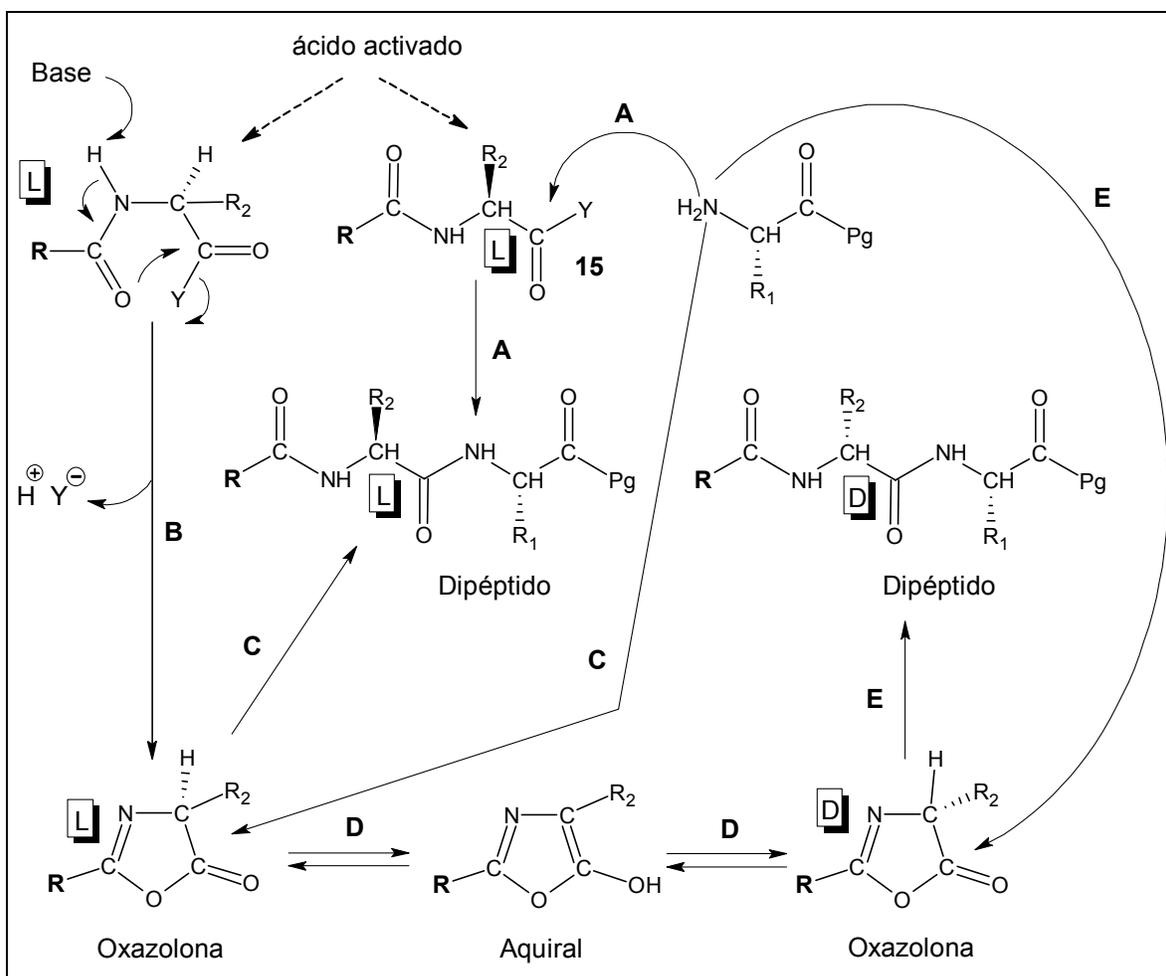


Figura 11. Pg= grupo protector. A) Formación del enlace peptídico (reacción intermolecular), B) Formación de oxazolona (reacción intramolecular), C) Obtención del dipéptido a partir de L-oxazolona, D) Enolización que genera D-oxazolona cuando R=alquilo, E) Obtención del dipéptido a partir de D-oxazolona cuando R=alquilo.

El grupo carboxilo de uno de los aminoácidos se encuentra activado por un grupo electroattractor "Y" que incrementa la electrofilia sobre el átomo de carbono del carbonilo y dirige la reacción hacia la formación del dipéptido (A). Aunque debido a la naturaleza del componente activado (15) y que hay otro nucleófilo cercano que puede reaccionar con el electrófilo, se puede dar una reacción paralela que lleva a la formación de un compuesto cíclico denominado oxazolona. Cualquier base (B) promueve la ciclización.

Cuando **15** posee un grupo R = alquilo, se forma la oxazolona, la cual puede ser enolizada creándose una molécula aquiral, donde la reacción inversa genera los dos enantiómeros de la oxazolona (**D**). La subsecuente reacción de acoplamiento con este nuevo isómero produce un diastereoisómero no deseado (**E**).

En el caso de tener a **15** con un grupo R = alcóxido, se eliminan los pasos (**D**) y (**E**), y se disminuye la formación de la oxazolona (**B**). La parcial supresión de la ciclización se debe a la reducción de la nucleofilia del átomo de oxígeno del carbonilo, promovida por el oxígeno adyacente. Si se llega a formar algo de oxazolona esta no produce el otro enantiómero; además de ser más susceptible a la reacción de acoplamiento (**C**).²⁹ Esto nos lleva a la obtención de un solo diastereoisómero, cuando la reacción de acoplamiento es efectuada con *N*-alcoxicarbonilaminoácidos.

2.10 Agentes acoplantes.³⁰

El procedimiento seguido para combinar dos residuos de aminoácidos y formar un péptido es conocido como método de acoplamiento. Cuando el acoplamiento se efectúa por la adición de un solo compuesto a una mezcla de dos reactantes, éste es referido como agente acoplante.

- Uso de *N, N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC)

Las carbodiimidias son los agentes acoplantes más comunes, previamente eran usados en síntesis de nucleótidos y fueron introducidas en el trabajo con péptidos por Sheehan y Hess³¹ en 1955. La carbodiimida más conocida es la *N, N'*-diciclohexilcarbodiimida (**16**), esta produce un subproducto insoluble denominado *N, N'*-diciclohexilurea (**17**). (Figura 12)

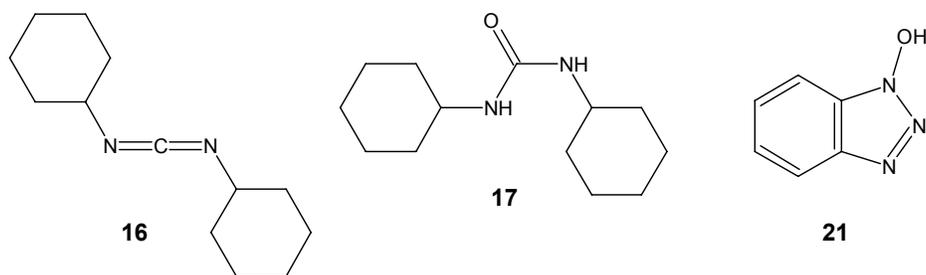


Figura 12. Estructuras químicas de *N, N'*-diclohexilcarbodiimida (**16**), *N, N'*-diclohexilurea (**17**) y HOBT (**21**).

La desventaja del uso de **16** es que el intermediario activo de su reacción con aminoácidos (**18**) tiende a la transposición y forma la *N*-acilurea (**19**), o se cicliza como oxazolona (**20**) (Figura 13). El uso de aditivos como el HOBT³² (**21**) (Figura 12) en una mezcla que contiene reactantes y carbodiimida, mejora significativamente la eficiencia del acoplamiento. El aditivo **21** suprime la formación de **19** y la isomerización de **20**. Fue introducido por König y Geiger en 1970.

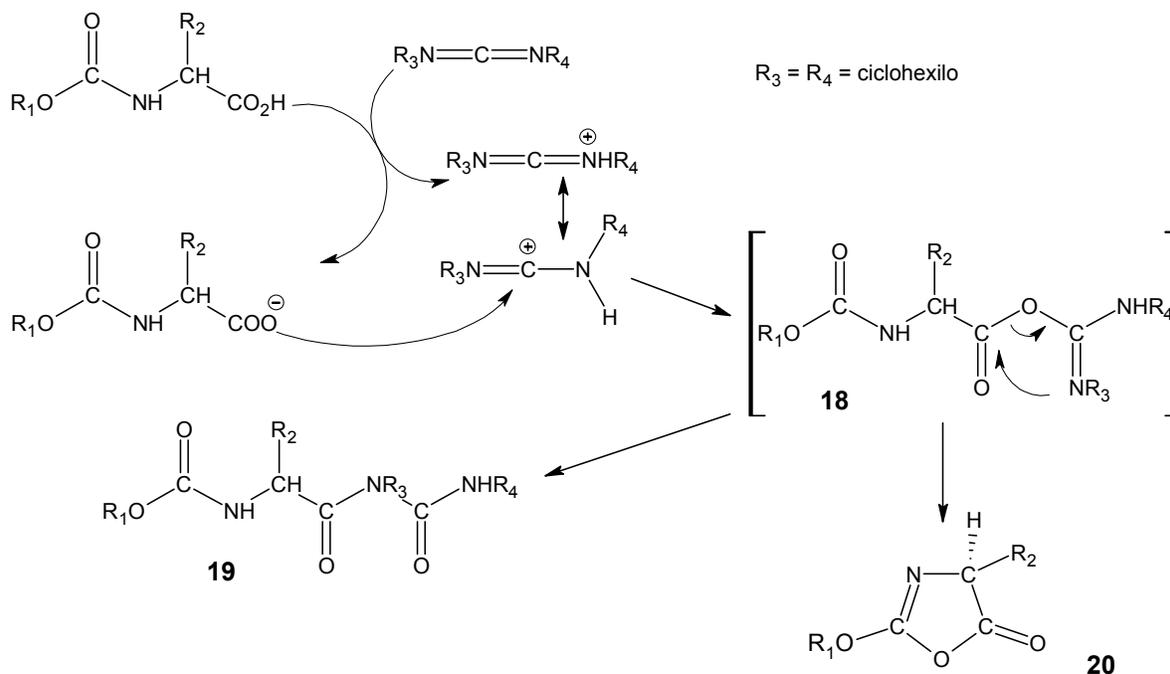


Figura 13. Reacciones paralelas por el uso de DCC en reacciones de acoplamiento.

- Otros agentes acoplantes.

A finales de 1970 se introdujeron agentes acoplantes que incorporan a **21** en su estructura, estos resultaron más eficientes y son además útiles para incorporar aminoácidos impedidos estéricamente, incluyendo los *N*-metilados. Su actividad es única ya que no reaccionan con grupos carboxilo sino con aniones carboxilato, y no reaccionan con grupos amino si el anión está presente. Las reacciones de acoplamiento por lo tanto son iniciadas al transformar los ácidos carboxílicos a sus aniones carboxilato en presencia de aminas terciarias.

El primero de la nueva generación de agentes acoplantes adoptado fue el BOP (**22**) (Figura 14) que fue introducido por Castro³³ en 1975. El compuesto **22** es cristalino, no higroscópico y puede prepararse fácilmente en grandes cantidades.^{34, 35}

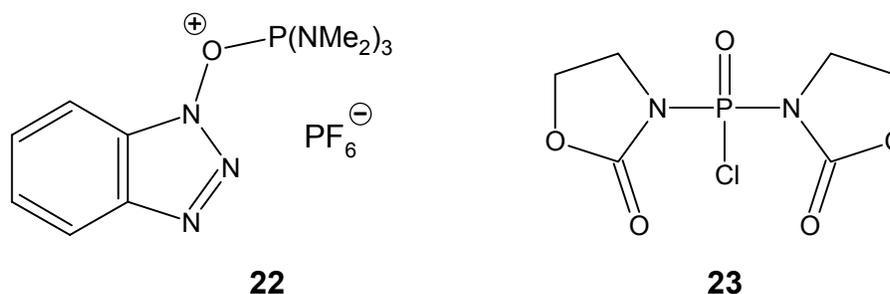


Figura 14. Estructuras químicas de los agentes acoplantes BOP (**22**) y BOP-Cl (**23**).

En 1980 Palomo-Coll³⁶ desarrollaron el BOP-Cl (**23**) (Figura 14) el cual es conocido como un poderoso reactivo para acoplar aminoácidos o péptidos *N*-alquilados o estéricamente impedidos.

2.11 Formación de dicetopiperazinas a partir de dipéptidos protegidos como ésteres.^{10e}

Una cadena peptídica consiste en una sucesión de átomos $-C(=O)-N-C^\alpha-$ los cuales son coplanares. El enlace C-N es más corto que el de una amida normal, esto se debe al movimiento parcial de los electrones π entre el C=O y el enlace C-N, lo que da al último el carácter de un doble enlace ($\sim 40\%$), haciéndolo incapaz de rotar libremente. El protón del grupo NH y el átomo de oxígeno se encuentran en el mismo plano pero en una relación *trans*. (Figura 15)

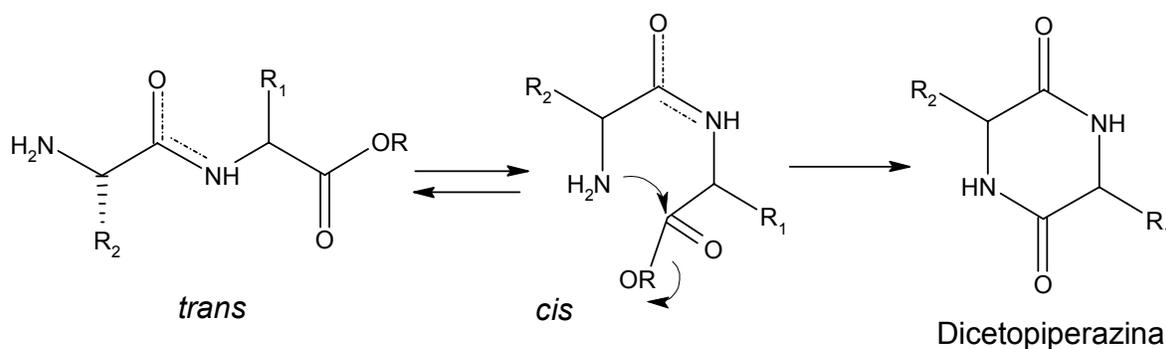


Figura 15. Formas *cis* y *trans* del enlace amida de un dipéptido protegido como éster y su ciclización a dicetopiperazina.

Debido al carácter de doble enlace del enlace peptídico, los dipéptidos tienden a acomodarse en las posiciones *cis* o *trans*. En la posición *cis* los grupos amino y carbonilo se encuentran cercanos el uno del otro, no así en la posición *trans*.

Los dipéptidos protegidos como ésteres, en los que el grupo amino está libre, tienden a reaccionar entre sí; el producto es una dicetopiperazina la cual es un dipéptido cíclico (Figura 15). La tendencia a la ciclización es mayor cuando el aminoácido C-terminal es prolina, glicina, valina, isoleucina o un *N*-metilaminoácido, los cuales se acomodan predominantemente en la forma *cis*, lo cual los hace muy reactivos hacia la formación de dicetopiperazinas.

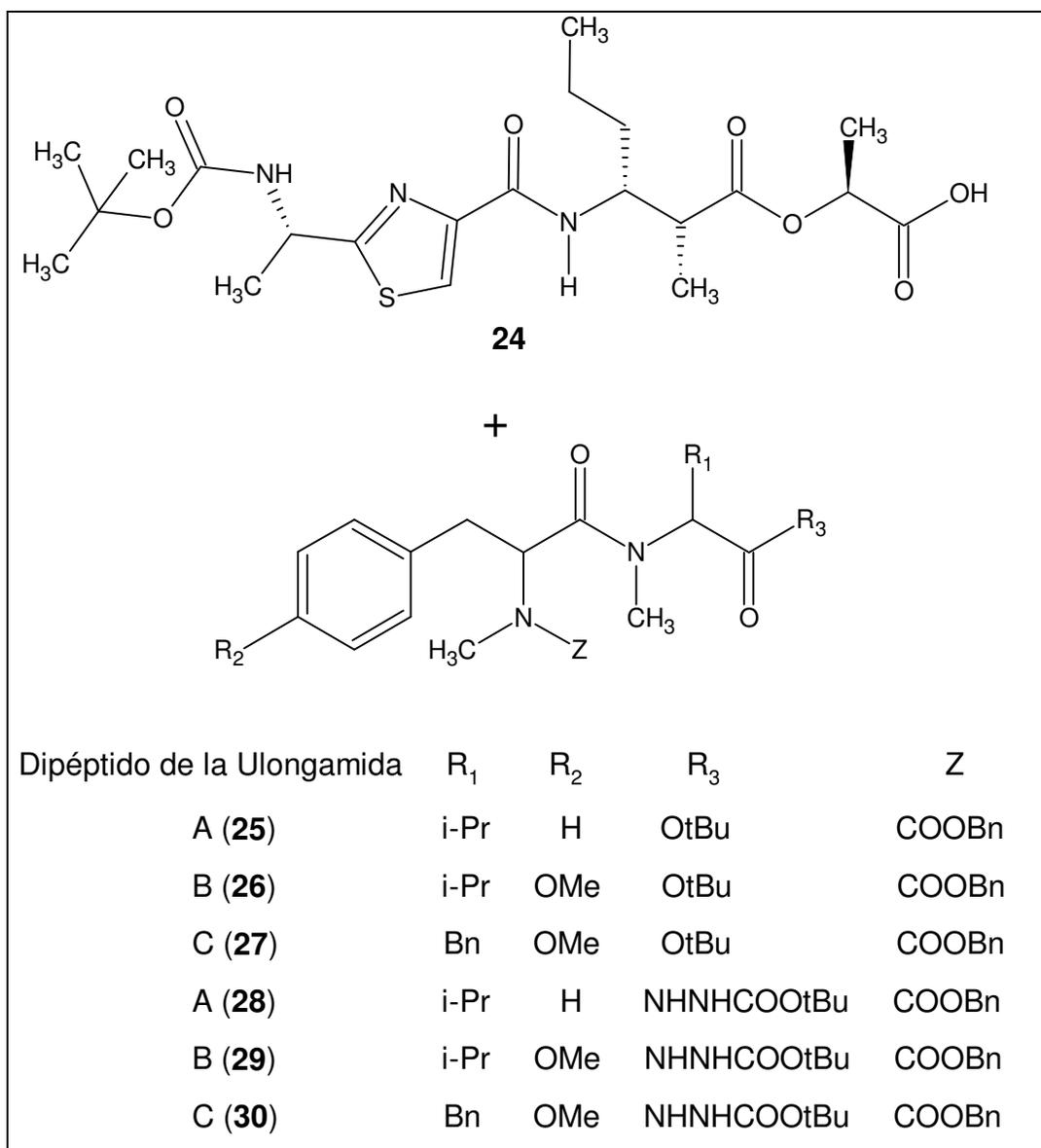
Las ciclizaciones ocurren más fácilmente cuando en un dipéptido protegido como un éster se tienen aminoácidos de configuración opuesta, cuando el grupo saliente es un alcóxido o un arilóxido (electroattractores); y cuando la reacción es catalizada por ácidos suaves, así como por bases.

La formación de dicetopiperazinas se disminuye por esterificación del grupo carboxilo terminal de un dipéptido con un alcohol terciario³⁷ (el cual provee un pobre grupo saliente), o por protección mediante formación de un derivado con carbazato de terbutilo.³⁸

3. Planteamiento del problema

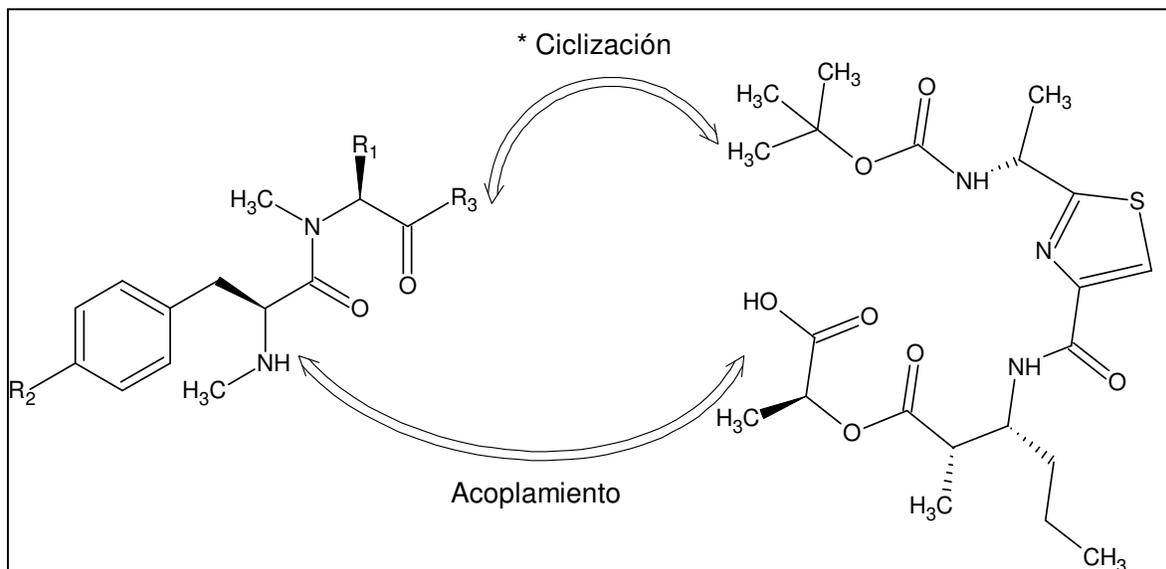
El proyecto final del equipo de trabajo consiste en la obtención de las Ulongamidas A, B y C (**1- 3**) por dos posibles rutas convergentes en la que se obtiene un decapeptido lineal que subsecuentemente es ciclizado. Debido a que las estructuras de las Ulongamidas antes mencionadas guardan una cierta similitud entre sí, se dividieron en dos fragmentos con grupos protectores.

El fragmento mayor conformado por el decapeptido **24** es común en las estructuras de las Ulongamidas deseadas, mientras que el fragmento menor (**25-30**), que consiste en un dipéptido se tienen variaciones en los aminoácidos y grupos protectores que lo integran. (Esquema 4)



Esquema 4. Fragmentos protegidos resultantes de la división de las Ulongamidas A, B y C.

Los aminoácidos que conforman los dipéptidos se encuentran *N*-metilados y para la protección de su grupo carboxilo se utilizaron dos diferentes grupos protectores, debido a las dos estrategias de síntesis convergente^{38, 39} por un lado (Esquema 5); y por el otro, para evitar la formación de dicetopiperazinas.



* **Ruta 1** Acoplamiento [a) TFA, CH₂Cl₂; b) BOP, DMF, 80-90 °C]

Dipéptido	R ₁	R ₂	R ₃
25	i-Pr	H	OtBu
26	i-Pr	OMe	OtBu
27	Bn	OMe	OtBu

* **Ruta 2** Método azida [a) TFA, CH₂Cl₂; b) NaNO₃, HCl, H₂O; c) NaHCO₃, CH₂Cl₂, H₂O]

Dipéptido	R ₁	R ₂	R ₃
28	i-Pr	H	NHNHCOOtBu
29	i-Pr	OMe	NHNHCOOtBu
30	Bn	OMe	NHNHCOOtBu

Nota: una vez que se tienen ciclizadas a las OMe-Ulongamidas B y C se debe de eliminar el grupo protector del hidroxilo de la tirosina.

Esquema 5. Rutas de síntesis convergente para la obtención de las Ulongamidas A, B y C (**1-3**).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general:

- Obtención de los dipéptidos intermediarios de las Ulongamidas A, B y C.

4.2 Objetivos particulares:

- Encontrar grupos protectores adecuados para los aminoácidos con los cuales se trabajará (Phe, Val y Tyr).
- Llevar a cabo reacciones de *N*-metilación sobre los aminoácidos Phe, Val y Tyr.
- Encontrar un método apropiado para el acoplamiento de aminoácidos impedidos estéricamente.
- Caracterizar los dipéptidos obtenidos por técnicas ya conocidas (IR, RO, EM, RMN ¹H, RMN ¹³C y RMN 2D).

5. Parte experimental

5.1 Métodos generales.

El progreso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (ccf) usando como adsorbente gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor de Macherey-Nagel, empleando como reveladores lámpara de luz ultravioleta Spectroline Model CX-20 y/o vapores de yodo.

La purificación de los compuestos se llevo a cabo mediante cristalización, por cromatografía en columna flash (empleando gel de sílice de 200-400 mallas), y/o por cromatografía en placa preparativa usando gel de sílice 60 F₂₅₄ de 20x20x0.2 cm como adsorbente.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato electrotérmico (MEL-TEMP) en tubos capilares y no están corregidos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ¹H) se obtuvieron en los equipos Varian-Gemini (200 MHz) y Varian Unity Inova (300 MHz, 500 MHz) usando como disolventes cloroformo deuterado (CDCl₃) o metanol deuterado (CD₃OD), y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los desplazamientos químicos se reportan en ppm a partir del TMS. Para indicar la multiplicidad de las señales en ¹H se utilizan las abreviaturas singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuádruplete (c) y múltiple (m). Las señales complejas se indican utilizando dos o más de estas abreviaturas (ejemplo dd = doble de doble).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN ¹³C) se determinaron en un equipo Varian Unity Inova a 125.7 MHz.

Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer modelo 343 utilizando celdas de 1 decímetro. Para la medición se utilizó la línea D del sodio (589 nm), a la temperatura del comportamiento de la celda (20 °C). Las

rotaciones específicas se indican junto con la concentración de la muestra en g/100 mL, así como el disolvente empleado.

Los espectros de infrarrojo (IR) se realizaron en un espectrofotómetro Brucker Tensor 27 mediante las técnicas de película o pastilla (KBr), utilizando poliestireno para su calibración.

Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo JEOL modelo IMS-AX505HA para análisis por impacto electrónico (EI) o ionización química (IQ). En el caso de estudios por FAB se empleó el equipo JEOL modelo JMS-SX102A. El valor del ión molecular se da como M^+ (m/z) con su respectivo porcentaje de abundancia.

5.2 Secado de disolventes.

Frecuentemente es necesario purificar un disolvente antes de usarlo ya que en caso contrario este podría introducir impurezas o deterioros en una reacción. Usualmente el agua es la impureza más significativa en un disolvente, por ello la importancia de eliminarla.

- Tetrahidrofurano (THF) ^{40a}

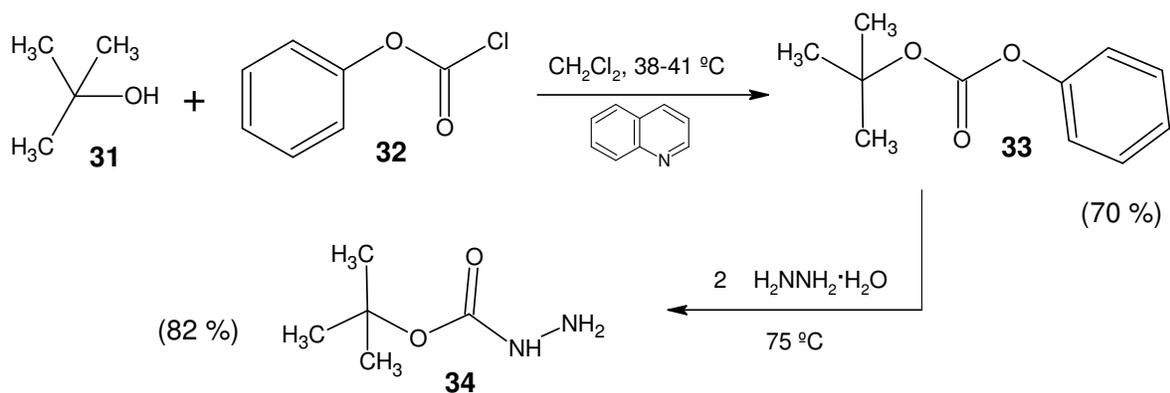
Se empleó THF grado analítico el cual antes de ser utilizado se colocó unas horas a reflujo con trozos de sodio metálico, empleando benzofenona como indicador de sequedad. Cuando se tiene una solución que va del azul al negro se tiene el disolvente seco. Al incrementarse el grado de humedad del disolvente cambia el color de la solución a verde o café (muy húmedo).

- Metanol anhidro

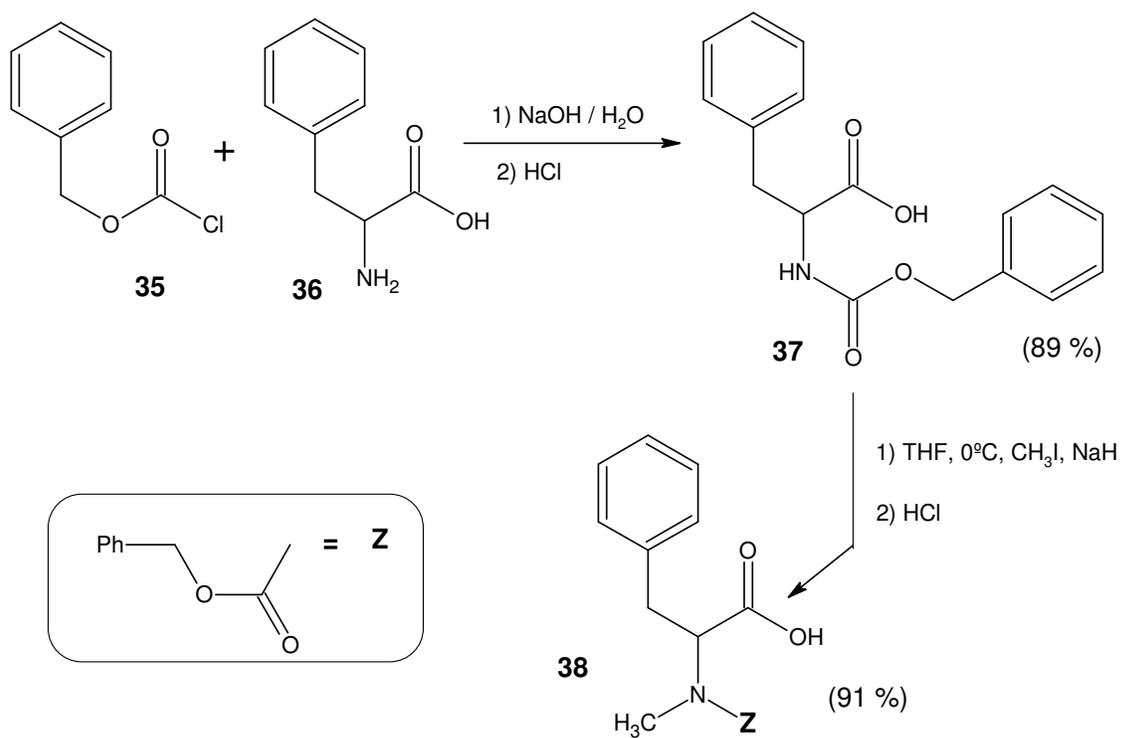
La técnica de secado empleada es la de Lund y Bjerrum. ^{40b}

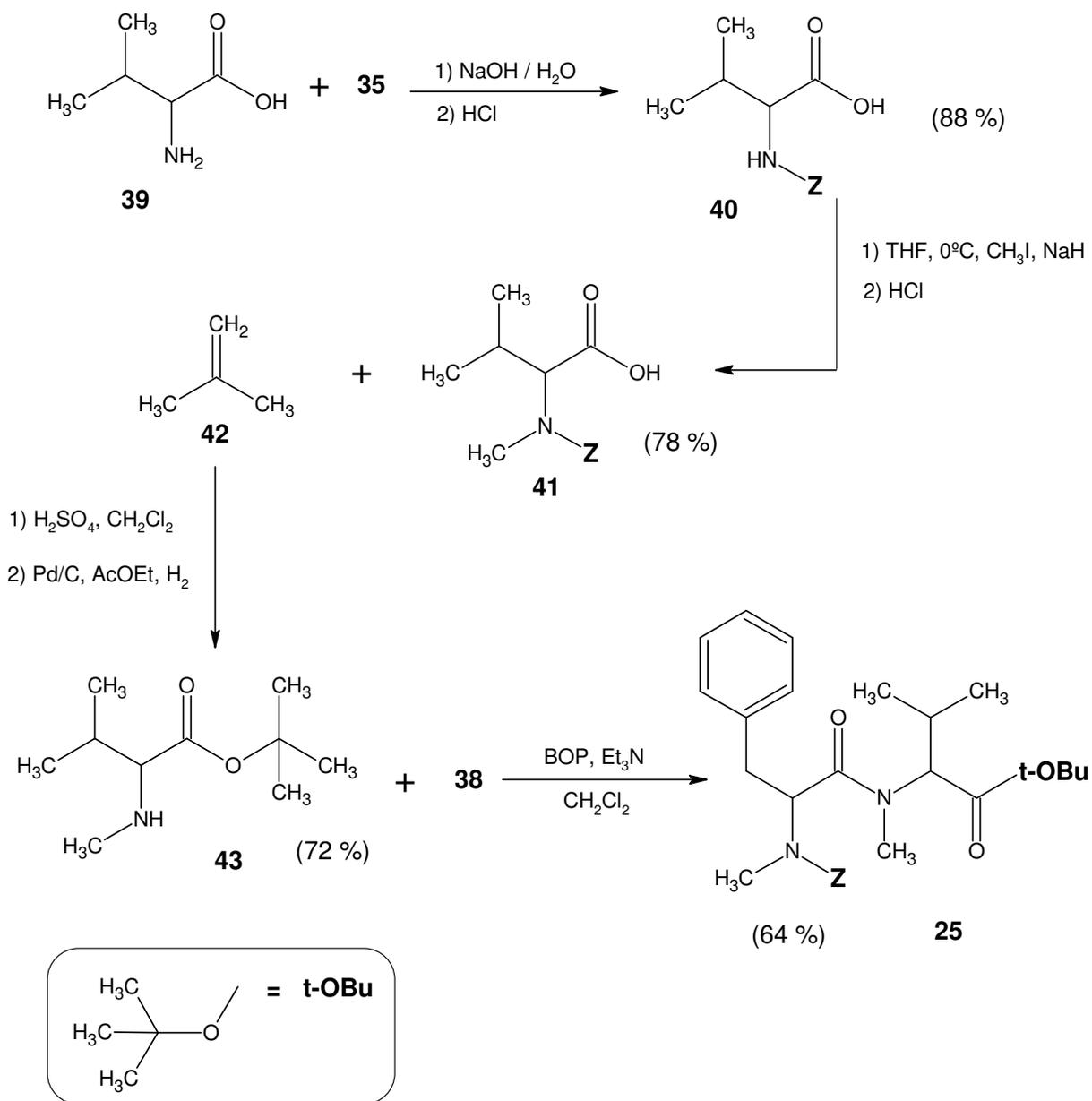
5.3 Rutas de síntesis.

a) Síntesis de carbazato de terbutilo.

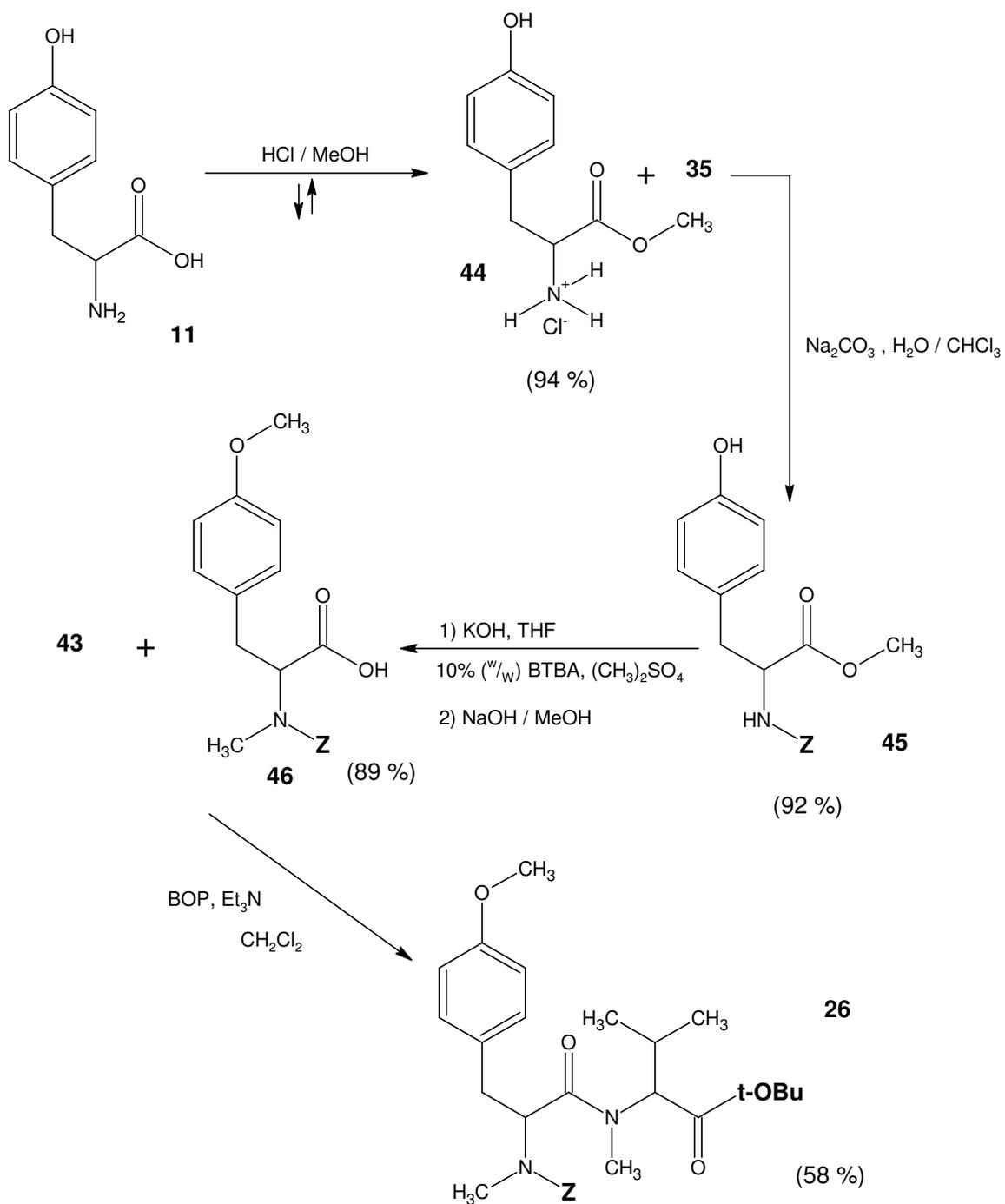


b) Síntesis del dipéptido de la Ulongamida A con el grupo carboxilo protegido como éster terbutílico.

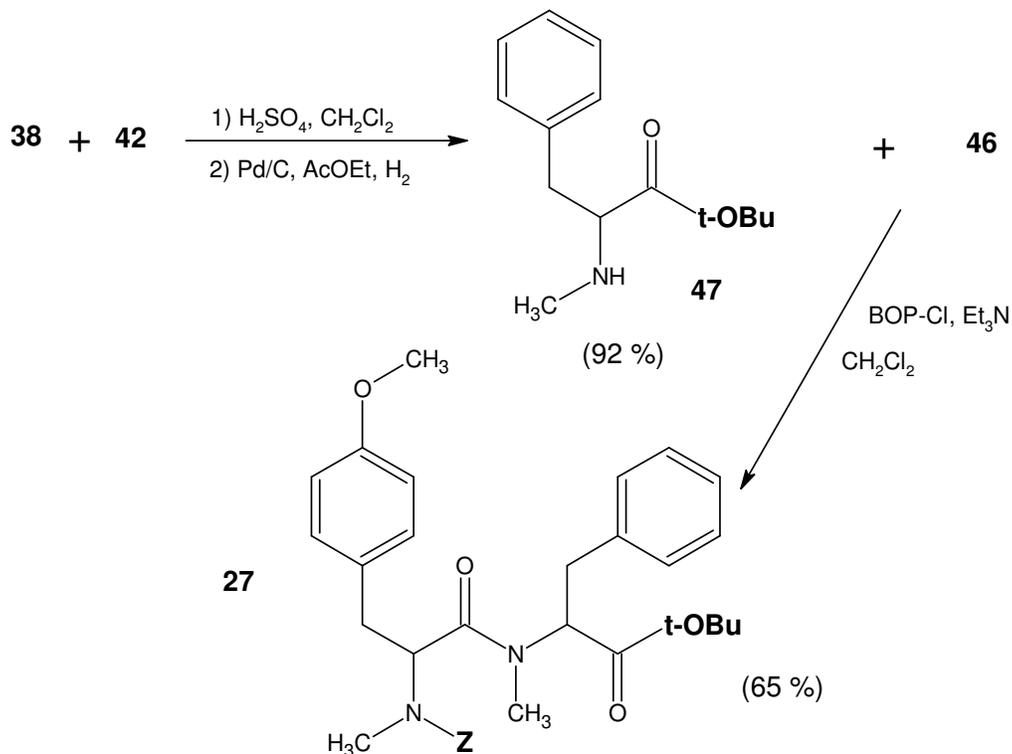




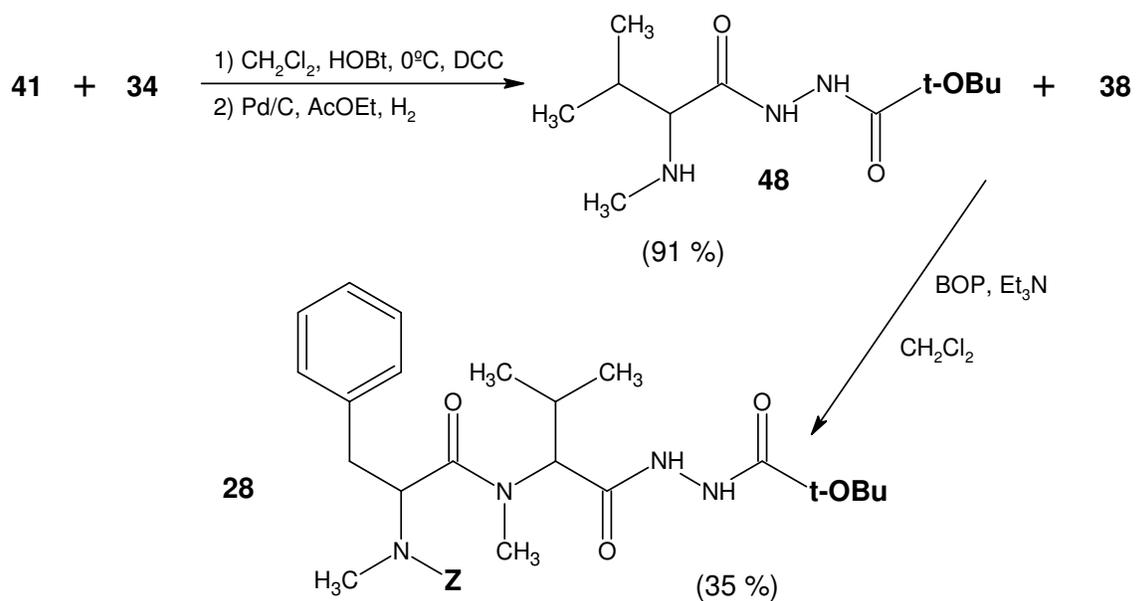
c) Síntesis del dipéptido de la Ulongamida B con el grupo carboxilo protegido como éster terbutílico.



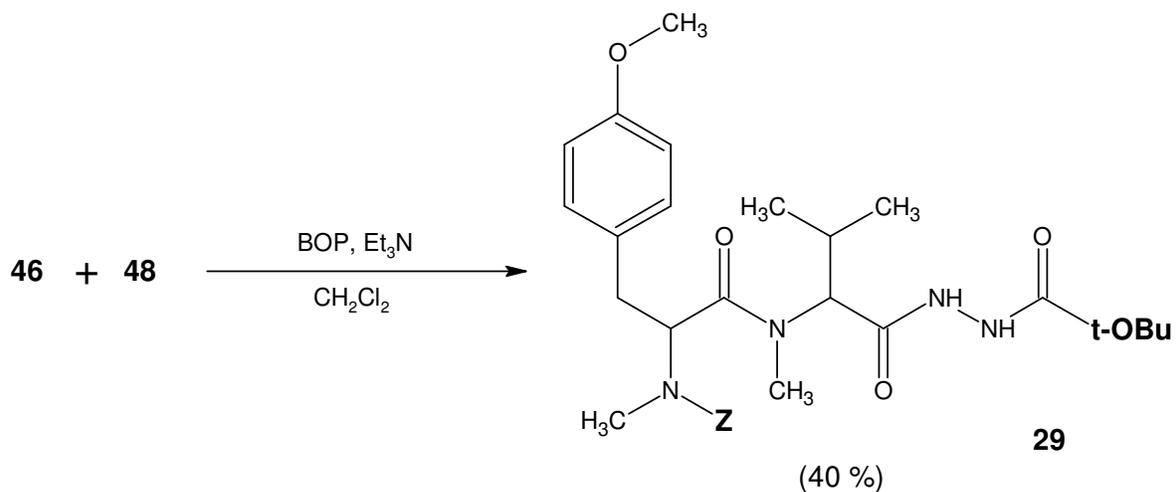
d) Síntesis del dipéptido de la Ulongamida C con el grupo carboxilo protegido como éster terbutílico.



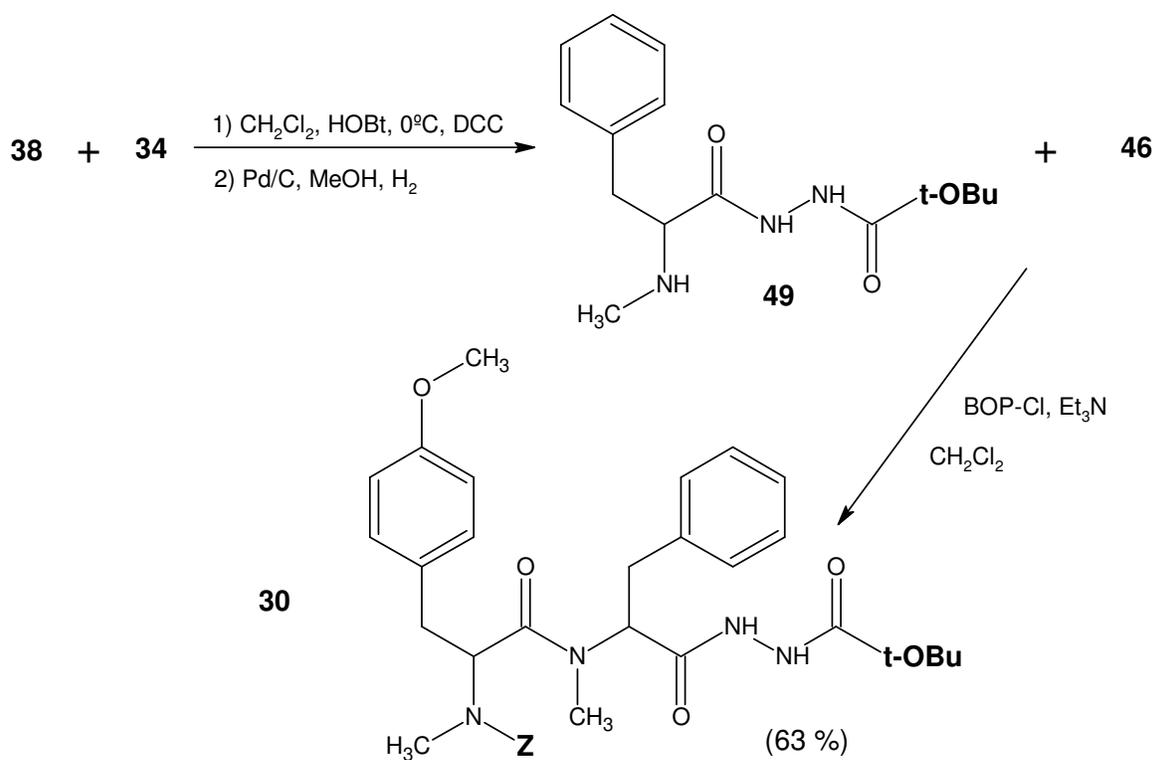
e) Síntesis del dipéptido de la Ulongamida A con el grupo carboxilo protegido con carbazato de terbutilo.



f) Síntesis del dipéptido de la Ulongamida B con el grupo carboxilo protegido con carbazato de terbutilo.



g) Síntesis del dipéptido de la Ulongamida C con el grupo carboxilo protegido con carbazato de terbutilo.



5.4 Métodos de síntesis

- **Yoduro de metilo (CH₃I)**⁴¹

En un matraz de tres bocas que tenía un equipo de destilación acoplado, un termómetro y un embudo de adición de 250 mL, se colocaron 200 g (1.2 mol) de yoduro de potasio en 108 mL de agua destilada. Se inició la agitación magnética y se añadieron 15 g (0.15 mol) de carbonato de calcio, tras lo cual la mezcla se calentó en canastilla a 60-65 °C. La temperatura se mantuvo en el rango mencionado y se agregó de forma gradual 118 mL (1.25 mol) de sulfato de dimetilo empleando el embudo de adición en un periodo de dos horas de forma que el yodometano comenzara a destilar. Una vez terminada la adición de sulfato de dimetilo la temperatura se incrementó a 65-70 °C por cerca de 40 min. para completar la destilación del yoduro de metilo. El producto se secó con cloruro de calcio, se decantó sobre un matraz de fondo redondo para realizar una nueva destilación, en la cual se adicionaron unos cristales de yoduro de potasio. El yodometano fue recibido en un matraz bola sumergido en un baño de hielo. El punto de ebullición del compuesto es 41-43 °C (en el laboratorio fue de 32-33 °C a 585 mmHg). La cantidad que se obtuvo del compuesto en forma de líquido incoloro fue 135.8 g (79 %).

- **Fenilcarbonato de terbutilo (33)**⁴²

Se llevó a cabo la destilación de quinolina a presión reducida colectando la fracción de 113-114 °C a 17 mmHg. En un matraz de fondo redondo de 100 mL de dos bocas con un termómetro se colocaron 10 mL (0.106 mol, 7.9 g) de terbutanol (**31**) y 12.6 mL (0.106 mol, 13.8 g) de quinolina en 20 mL de diclorometano. Se inició la agitación magnética y se adicionó de forma lenta 13.4 mL (0.106 mol) de clorocarbonato de fenilo (**32**) cuidando de mantener la temperatura entre 38-41 °C. Una vez terminada la adición se colocó una trampa de humedad y se dejó en agitación magnética toda la noche a temperatura ambiente. Se evaporó el

disolvente en el rotavapor. El residuo se diluye con 50 mL de diclorometano, se lavó con HCl 1N (2 x 30 mL) y con H₂O destilada (2 x 30 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el exceso de diclorometano se evaporó en el rotavapor. Se realiza una destilación a presión reducida en la cual se colectó un aceite ligeramente amarillo, que destiló a 69 °C a una presión de 0.35 mmHg, que corresponde al fenilcarbonato de terbutilo (14.4 g, 70%).

- **Carbazato de terbutilo (34)**⁴²

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se colocaron 14.4 g (0.074 mol) de fenilcarbonato de terbutilo (**33**) junto con 7.2 mL (0.148 mol) de hidrazina monohidratada. Se inició la agitación magnética y el calentamiento con parrilla hasta disolver el fenilcarbonato de terbutilo (aprox. 75 °C). Una vez disuelto se quita el calentamiento y se deja en agitación magnética toda la noche. La mezcla de reacción se adicionó sobre una solución de 8.8 g de NaOH en 50 mL de agua destilada, se extrajo con éter etílico (6 x 25 mL), los extractos se secaron con Na₂SO₄, posteriormente el disolvente se evaporó en el rotavapor. La purificación del residuo se llevó a cabo por recristalización de diclorometano/hexano. El producto se obtuvo en forma de cristales blancos (8g, 82 %) con un p.f. de 41-43 °C (lit.⁴³ p.f. 41-42 °C).

- **N-(benciloxicarbonil)-L-fenilalanina (37)**⁴⁴ [ZNPhe]

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 mL provisto de agitación magnética, tapón de hule y termómetro se disolvieron 5 g (0.03 mol) de L-fenilalanina (**35**) en 10 mL de H₂O destilada y 17.5 mL de solución de NaOH 2N. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C empleando un baño de hielo-sal y se le agregó de forma simultánea con agitación magnética cada 10 minutos y dividido en cinco porciones, un total de 17 mL de solución de NaOH 2N y 4.7 mL (0.033 mol) de cloruro de benciloxicarbonilo (**36**), cuidando que la temperatura se mantuviera por debajo de 10 °C. Una vez terminadas las adiciones se dejó con

agitación magnética a temperatura ambiente toda la noche. Se comprobó que el pH de la mezcla de reacción fuera básico y se realizan extracciones con diclorometano (2 x 40 mL). La fase orgánica se desecha mientras que la fase acuosa se lleva a pH 2 empleando HCl concentrado (acidificar de forma lenta con agitación magnética vigorosa, checando que el pH no varíe por lo menos en 15 minutos) y se realizan nuevamente extracciones con cloruro de metileno (3 x 60 mL). Los extractos orgánicos se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el disolvente con el empleo del rotavapor. El producto se cristalizó de la mezcla de disolventes CH₂Cl₂/hexano, obteniéndose 8.03 g (89%) en forma de cristales blancos que tienen un p.f. = 86-88 °C (lit.⁴⁵ 87-88 °C).

IR (película) cm⁻¹: 3500-2500, 3323, 3032, 1716, 1519, 1218, 1056, 741, 698

EM (IE): m/z (%) 299 (M⁺, 2), 91 (100), 109 (73), 148 (64)

[α]_D²⁰ = + 5.05 ° (c=5, AcOH) (lit.^{46a} [α]_D²⁰ = + 5 °, c=5 en AcOH)

- ***N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-*L*-fenilalanina (38) [Z_NMePhe]**

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 mL provisto de una trampa de humedad, tapón de hule y termómetro, se colocaron 6 g (0.02 mol) de ZNPhe (**37**) en 60 mL de THF al cual se le añadieron 10 mL (0.16 mol) de CH₃I. Se mezcló de forma homogénea empleando una parrilla de agitación magnética y posteriormente la mezcla se enfrió a 0 °C utilizando un baño de hielo seco/acetona. Una vez alcanzada la temperatura se agregaron lentamente mediante espátula 3.2 g (0.08 mol) de NaH (disperso en aceite mineral al 60%), al terminar las adiciones se deja ½ hora más en el baño a 0 °C y posteriormente en agitación por 16-18 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente empleando el rotavapor, el residuo se diluyó con 100 mL de H₂O, y se extrajo con diclorometano (3 x 30 mL). La fase orgánica se desechó mientras que la fase acuosa se aciduló con HCl 5N hasta pH 2; posteriormente se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con disolución saturada de NaHSO₃ (2 x 50 mL) y con agua destilada (1 x 50 mL), posteriormente se secaron con

Na₂SO₄ y finalmente se evaporaron. El producto resulto un semisólido blanco (5.7g, 91 %).

Nota: en caso de observarse dos fases es posible que se tenga aceite mineral residual, el cual se elimina por cromatografía en columna empleando como eluyente acetato de etilo/hexano (1:9, e incrementando la proporción de AcOEt una vez eliminado el aceite mineral).

IR (película) cm⁻¹: 3500-2500, 3031, 1756, 1700, 1634, 1452, 1138, 1037, 750, 698

EM (FAB): m/z (%) 314 (M+H, 35), 91 (100), 154 (42), 270 (38)

[α]_D²⁰ = - 65.9 ° (c=1.8, EtOH) (lit.¹⁷ **[α]_D²⁸** = -67 °, c=1.8 en EtOH)

- ***N*-(benciloxycarbonil)-L-valina (40)⁴⁷ [ZNVal]**

En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 mL adaptado con un termómetro y dos embudos de adición, se colocaron 10 g (0.085 mol) de L-valina (**39**), 20 mL de agua destilada y 45 mL de solución de NaOH 2M, con lo que se observó la disolución del α-aminoácido después de iniciada la agitación magnética. La mezcla se enfrió en un baño de hielo-sal a 0 °C y posteriormente se adicionaron de forma simultánea con agitación vigorosa 13.2 mL (0.094 mol) de cloruro de benciloxycarbonilo (**35**) y 47 mL de solución de NaOH 2M, divididos en cinco porciones, una cada 10 minutos por medio de los embudos de adición. Una vez terminadas las adiciones se deja en agitación magnética toda la noche a temperatura ambiente. Se aseguró que el pH de la mezcla de reacción fuera básico y se extrajo con diclorometano (2 x 50 mL). La fase orgánica se desechó y la fase acuosa se acidificó con HCl 5N hasta pH 2. Se efectuaron nuevamente extracciones con cloruro de metileno (3 x 50 mL), los extractos orgánicos se secaron con Na₂SO₄ y el disolvente se evaporó en el rotavapor. El producto se cristaliza de acetato de etilo/hexano, obteniéndose 18.86 g (88%) en forma de sólido blanco que tiene un p.f. = 62-64 °C (lit.⁴⁷ 60-62 °C).

IR (película) cm^{-1} : 3500-2500, 3325, 3035, 2967, 1714, 1525, 1458, 1221, 1096

EM (IE): m/z (%) 251 (M^+ , 9), 91 (100), 108 (93), 162 (30), 107 (26)

$[\alpha]_D^{20} = +6.3^\circ$ ($c=4$, CHCl_3) (lit.^{46b} $[\alpha]_D^{20} = +6.5^\circ$, $c=4$ en CHCl_3)

- ***N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-valina (41) [ZNMeVal]**

Se colocaron 10.4 g (0.0414 mol) de ZNVal (**40**) en 120 mL de THF dentro de un matraz redondo de tres bocas de 250 mL provisto de una trampa de humedad, tapón de hule y termómetro; se adicionaron 20.7 mL (0.33 mol) de CH_3I . La mezcla se agitó empleando una parrilla de agitación magnética. Se enfrió a 0°C y se añadieron lentamente mediante espátula 5 g (0.1243 mol) de NaH (disperso en aceite mineral al 60%), al terminar las adiciones se dejó $\frac{1}{2}$ hora más en el baño a 0°C y posteriormente con agitación por 16-18 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente empleando el rotavapor, el residuo se diluyó con 60 mL de H_2O y se extrajo con diclorometano (3 x 40 mL). La fase orgánica se desechó mientras que la fase acuosa se acidificó con HCl 5N hasta pH 2, posteriormente se hicieron nuevas extracciones con CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con disolución saturada de NaHSO_3 (2 x 50 mL) y con agua destilada (1 x 50 mL), posteriormente se secaron con Na_2SO_4 y finalmente se evaporaron en el rotavapor. El producto se recristalizó de acetato de etilo/hexano dando un sólido cristalino blanco (8.6 g, 78 %) que tiene un p.f. = $67-68^\circ\text{C}$ (lit.⁴⁸ $68-69^\circ\text{C}$).

IR (película) cm^{-1} : 3500-2500, 3034, 2967, 1740, 1705, 1677, 1454, 1306, 1156

EM (FAB): m/z (%) 266 ($M+H$, 48), 91 (100), 222 (33), 154 (21)

$[\alpha]_D^{20} = -83.6^\circ$ ($c=1$, EtOH) (lit.⁴⁸ $[\alpha]_D^{20} = -82.6^\circ$, $c=1$ en EtOH)

- **Éster terbutílico de *N*-metil-L-valina (43)⁴⁹ [NMeValOtBu]**

- Éster terbutílico de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-L-valina [ZNMeValOtBu]

Se condensaron 100 mL de 2-metilpropeno (**42**) por medio de una trampa de hielo seco-acetona. En un matraz de fondo redondo de 250 mL se agregaron 8.6 g (0.0324 mol) de ZNMeVal (**41**) en 40 mL de diclorometano. Se procedió a enfriar el matraz en un baño de hielo seco-acetona hasta una temperatura de -70 °C, tras lo cual se adicionó de forma rápida los 100 mL de 2-metilpropeno; en seguida se añade de forma cautelosa 15 gotas de ácido sulfúrico concentrado. El matraz se tapó y selló perfectamente para evitar la salida del alqueno; la mezcla de reacción se dejó en agitación magnética durante 7 días a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo el matraz se introdujo nuevamente en un baño de hielo seco-acetona por un periodo de 10 minutos antes de abrirlo. La mezcla de reacción se trató con 120 mL de solución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 60 mL). La fase acuosa se desechó mientras que la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna empleando como eluyente acetato de etilo/hexano (5:95). Se obtuvieron 9.4 g (90%) de ZNMeValOtBu como un aceite ligeramente amarillo.

IR (película) cm⁻¹: 3033, 2971, 1730, 1706, 1453, 1399, 1369, 1307, 1142

EM (FAB): m/z (%) 322 (M+H, 35), 91 (100), 266 (82), 220 (46)

[α]_D²⁰ = -68.5 ° (c=1, CHCl₃) (lit.⁵⁰ **[α]_D²⁵** = -67.2 °, c=1 en CHCl₃)

- Éster terbutílico de *N*-metil-L-valina [NMeValOtBu]

Se colocan 6.4 g (0.02 mol) de ZNMeValOtBu disueltos en 30 mL de acetato de etilo en un matraz de hidrogenación de 125 mL, bajo atmósfera de nitrógeno se adicionaron 0.96 g (15 % w/w) de Pd sobre carbono al 10%. La mezcla se agitó bajo atmósfera de hidrógeno, por un periodo de 16-18 horas a temperatura y

presión ambiente. Se filtró a través de celita para eliminar el catalizador, se evaporó el disolvente a una temperatura no mayor de 30 °C y una presión no menor de 20 mmHg (debido a lo volátil del compuesto). La cantidad obtenida de NMeValOtBu fue 2.7 g (72 %) como un aceite ligeramente amarillo.

Nota: el compuesto no se pudo purificar debido a su alta volatilidad por lo tanto la cantidad de disolvente residual puede variar dando a lugar que los valores de rotación óptica y rendimiento varíen entre los experimentales y los descritos en la literatura.

IR (película) cm^{-1} : 3344, 2969, 1726, 1457, 1367, 1252, 1155

EM (FAB): m/z (%) 188 (M+H, 55), 73 (100), 136 (82), 154 (67)

$[\alpha]_D^{20} = +3.7^\circ$ (c=1, CHCl_3) (lit.⁴⁹ $[\alpha]_D^{25} = +4.4^\circ$, c=1 en CHCl_3)

- **Éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (25)**

En un matraz de fondo redondo de 10 mL provisto de una trampa de humedad se colocaron 0.1812 g (0.579 mmol) de ZNMePhe (**38**) y 0.1083 g (0.579 mmol) de NMeValOtBu (**43**) en 5 mL de diclorometano; enseguida se agregan 0.17 mL (1.215 mmol) de trietilamina. La mezcla se enfrió a 0 °C en un baño de hielo-sal y se le añadieron 0.2817 g (0.6368 mmol) de BOP. La reacción se deja en agitación magnética ½ hora más a la misma temperatura y posteriormente 16-18 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente en el rotavapor, y el residuo se diluyó con 12 mL de acetato de etilo, se lavó con HCl 1N (2 x 6 mL), con solución saturada de NaHCO_3 (2 x 6 mL) y con salmuera (1 x 8 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó. El compuesto se purificó por cromatografía en placa preparativa empleando como eluyente acetato de etilo/hexano (1:9). Se obtuvieron 0.1799 g (64%) del dipéptido **25** como un aceite ligeramente amarillo.

IR (película) cm^{-1} : 3030, 2969, 1730, 1704, 1654, 1452, 1397, 1369, 1156, 751, 699

EM (FAB): m/z (%) 483 (M+H, 48), 47 (100), 223 (35), 296 (32), 268 (17)

$[\alpha]_D^{20} = -145.1^\circ$ (c=1, CHCl_3)

- **Clorhidrato del éster metílico de L-tirosina (44)**⁵¹

En un matraz de fondo redondo de 500 mL se colocaron 5 g (0.0276 mol) de L-tirosina (**11**) y 200 mL de metanol anhidro, saturado con cloruro de hidrógeno. La mezcla se calentó a reflujo por 16-18 horas. Se evapora el disolvente y el residuo se recristaliza de metanol-éter etílico. Se obtuvieron 6 g (94 %) del compuesto como un sólido blanco con un p.f. = 188-190 °C (descompone) (lit.⁵² 189-190 °C).

IR (pastilla, KBr) cm^{-1} : 3341, 3008, 2705, 2627, 1743, 1590, 1514, 1449, 1226, 840

EM (IE): m/z (%) M^+ no observable, 107 (100), 88 (75), 136 (54), 195 (25)

$[\alpha]_D^{20} = +73.7^\circ$ (c=3, piridina) (lit.⁵¹ $[\alpha]_D^{25} = +75.6^\circ$, c=3 en piridina)

- **Éster metílico de N-(benciloxicarbonil)-L-tirosina (45)**⁵³ [ZTyrOMe]

En un matraz de fondo redondo de 500 mL se colocaron 6.3 g (0.027 mol) del clorhidrato del éster metílico de L-tirosina (**44**) en 200 mL de cloroformo; enseguida se agregó una solución de 5.8 g (0.054 mol) de Na_2CO_3 en 30 mL de agua destilada. La mezcla se enfrió en un baño de hielo-sal a 0° y se le adicionaron simultáneamente 3.8 mL (0.027 mol) de cloruro de benciloxicarbonilo (**35**) y 25 mL de una solución de Na_2CO_3 2M en un periodo de una hora; posteriormente se dejó en agitación magnética a temperatura ambiente por 18 horas. Una vez transcurrido el tiempo se vertió en 120 mL de agua destilada y se dejó con agitación magnética 15 minutos más; se separó la fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 y se evaporó. El producto se purificó por cromatografía en columna usando como eluyente acetato de etilo/hexano (2:8) e incrementando la proporción al final (4:6). La cantidad obtenida de ZTyrOMe una vez recristalizado de

AcOEt/hexano fue 8.3 g (92 %) en forma de un sólido blanco con un p.f. = 92-93 °C (lit.⁵³ 91-92 °C).

IR (película) cm^{-1} : 3348, 3031, 2954, 1700, 1221, 1058

EM (IE): m/z (%) 329 (M^+ , 5), 178 (100), 107 (83), 91 (56)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10.8^\circ$ (c=0.5, MeOH)

- ***N*-(benciloxycarbonil)-*N,O*- dimetil-L-tirosina (46) [ZNMeTyr(OMe)]**

Se colocaron 4.2 g (0.0127 mol) de ZTyrOMe (**45**) en 80 mL de THF dentro de un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 mL provisto de una trampa de humedad y dos tapones de hule. Se agregó en porciones y con agitación magnética 7.2 g (0.128 mol) de KOH finamente dividida, seguido de 0.42 g (10 % w/w) de bisulfato de tetrabutilamonio. Luego en un periodo de 20 minutos se adicionaron 7.2 mL (0.076 mol) de sulfato de dimetilo. La mezcla se dejó en agitación magnética por una hora. La mezcla de reacción se filtró y la fase líquida se lavó con HCl 1 N (2 x 30 mL), con solución saturada de NaHCO_3 (2 x 30 mL) y salmuera (1 x 40 mL); se secó con Na_2SO_4 y se evaporó. El compuesto se purificó por cromatografía en columna usando un eluyente de AcOEt/hexano (1:9) obteniendo 4.1 g (90 %) de un aceite ligeramente amarillo.⁵⁴ Para llevar a cabo la reacción de hidrólisis del éster metílico se colocaron los 4.1 g (0.0115 mol) del compuesto anterior en 65 mL de metanol dentro de un matraz de fondo redondo y se añadieron 40.3 mL (0.023 mol) de NaOH 0.5745 M; la reacción se dejó con agitación magnética durante 20 minutos. El disolvente se evaporó en el rotavapor, el residuo se diluyó con 80 mL de agua destilada, se aciduló con HCl 5N hasta pH 2 y se extrajo con diclorometano (3 x 40 mL); los extractos se secaron con Na_2SO_4 y se evaporaron. El producto obtenido de ZNMeTyr(OMe) fue de 3.5 g (89%) como un aceite ligeramente amarillo.

IR (película) cm^{-1} : 3500-2500, 3033, 2955, 2938, 1738, 1704, 1515, 1248, 1142, 1034

EM (IE): m/z (%) 343 (M^+ , 8), 121 (100), 178 (42), 91 (37)

$[\alpha]_D^{20} = -52.2^\circ$ ($c=2.23$, CHCl_3) (lit.²¹ $[\alpha]_D^{21} = -48^\circ$, $c=2.23$ en CHCl_3)

- **Éster terbutílico de *N*-(benciloxicarbonil)-*N,O*-dimetil-*L*-tirosil-*N*-metil-*L*-valina (26)**

En un matraz de fondo redondo de 10 mL provisto de una trampa de humedad se colocaron 0.2153 g (0.627 mmol) de ZNMeTyr(OMe) (**46**) y 0.1173 g (0.627 mmol) de NMeValOtBu (**43**) en 5 mL de diclorometano; enseguida se agregaron 0.18 mL (1.318 mmol) de trietilamina. La mezcla se enfrió a 0 °C en un baño de hielo-sal y se añadieron 0.3 g (0.69 mmol) de BOP, dejando en agitación magnética ½ hora más a esta temperatura y posteriormente 16-18 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente, el residuo se diluyó con 12 mL de acetato de etilo. Posteriormente se realizaron lavados con HCl 1N (2 x 6 mL), solución saturada de NaHCO_3 (2 x 6 mL) y con salmuera (1 x 8 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El compuesto se purificó por cromatografía en placa preparativa empleando como eluyente acetato de etilo/hexano (1:9). Se obtuvieron 0.186 g (58 %) del dipéptido **26** como un aceite ligeramente amarillo.

IR (película) cm^{-1} : 3032, 2967, 2935, 1730, 1704, 1654, 1512, 1453, 1397, 1368, 1248, 1156, 1036

EM (FAB): m/z (%) 513 ($M+H$, 46), 91 (100), 326 (62), 254 (45)

$[\alpha]_D^{20} = -126.5^\circ$ ($c=1$, CHCl_3)

- **Éster terbutílico de *N*-metil-L-fenilalanina (47) [NMePheOtBu]**

- Éster terbutílico de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanina [ZNMePheOtBu]

Antes de efectuar la reacción de esterificación se condensaron 30 mL de 2-metilpropeno (**42**) empleando una trampa de hielo seco-acetona. En un matraz de fondo redondo de 250 mL se colocaron 3.2 g (0.01 mol) de ZNMePhe (**38**) en 20 mL de diclorometano. Se enfría el matraz en un baño de hielo seco-acetona hasta una temperatura de -70 °C, tras lo cual se adiciona de forma rápida los 30 mL de 2-metilpropeno condensados antes y se añade de forma cautelosa 15 gotas de ácido sulfúrico concentrado. El matraz se tapó y selló perfectamente para evitar la salida del alqueno; la mezcla de reacción se deja en agitación magnética durante 7 días a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo el matraz se introdujo nuevamente en un baño de hielo seco-acetona por un periodo de 10 minutos antes de abrirlo. La mezcla de reacción se trató con 30 mL de solución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 25 mL). La fase acuosa se desechó mientras que la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó en el rotavapor. El producto se purificó por cromatografía en columna empleando como eluyente acetato de etilo/hexano (5:95). Se obtuvieron 3.3 g (87%) de ZNMePheOtBu como un aceite ligeramente amarillo.

IR (película) cm⁻¹: 3030, 2977, 1733, 1706, 1453, 1398, 1368, 1255, 1139, 749, 699

EM (IE): m/z (%) 369 (M⁺, 0.1), 91 (100), 224 (53), 268 (34)

[α]_D²⁰ = - 49.4 ° (c=0.5, CHCl₃)

- Éster terbutílico de *N*-metil-L-fenilalanina [NMePheOtBu]

En un matraz de hidrogenación de 125 mL se colocaron 3.3 g (8.9 mmol) de ZNMePheOtBu disueltos en 50 mL de acetato de etilo. A esta solución se le adicionan bajo atmósfera inerte 0.5 g (15 % w/w) de Pd sobre carbono activo al

10%. La mezcla se agita bajo atmósfera de hidrógeno por un periodo de 16-18 horas a temperatura y presión ambiente (585 mmHg). Se filtra a través de celita para eliminar el catalizador, se evapora el disolvente en el rotavapor y se deja secando por una hora a una temperatura de 30 °C y una presión de 24 mmHg. La cantidad obtenida de NMePheOtBu fue 1.93 g (92 %) en forma de un aceite ligeramente amarillo.

IR (película) cm^{-1} : 3334, 3029, 2976, 1726, 1454, 1367, 1252, 1154, 742, 700

EM (FAB): m/z (%) 236 (M+H, 100), 180 (95), 134 (50), 88 (10)

$[\alpha]_D^{20} = +28.6^\circ$ (c=3.3, AcOEt)

- **Éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N,O*-dimetil-*L*-tirosil-*N*-metil-*L*-fenilalanina (27)**

En un matraz de fondo redondo de 25 mL provisto de una trampa de humedad se colocaron 0.343 g (1 mmol) de ZNMeTyr(OMe) (**46**) en 5 mL de diclorometano; enseguida se agregaron 0.16 mL (1.2 mmol) de trietilamina y 0.28 g (1.1 mmol) de BOP-Cl. La mezcla se enfrió a 0 °C en un baño de hielo-sal; después de 5 minutos se añaden 0.2585 g (1.1 mmol) de NMePheOtBu (**47**) disueltos en 2 mL de cloruro de metileno y 0.14 mL (1 mmol) de trietilamina. La reacción se dejó con agitación magnética 20 minutos más a esta temperatura y posteriormente 2 horas a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente en el rotavapor, el residuo se diluyó con 12 mL de acetato de etilo y se lavó con solución de HCl 1N (2 x 8 mL), con salmuera (1 x 15 mL), con solución saturada de NaHCO₃ (2 x 8 mL) y nuevamente con salmuera (1 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó en el rotavapor. El compuesto se purificó por cromatografía en placa preparativa empleando como eluyente acetato de etilo/hexano (2:8). Se obtuvieron 0.3614 g (65 %) del dipéptido **27** como un aceite ligeramente amarillo.

IR (película) cm^{-1} : 3030, 2976, 1731, 1701, 1654, 1513, 1451, 1368, 1248, 1152

EM (FAB): m/z (%) 561 (M+H, 82), 91 (100), 326 (74), 395 (47)

$[\alpha]_D^{20} = -120^\circ$ (c=1, CHCl_3)

- **Terbutilcarbazonato de *N*-metil-L-valina (48) [NMeValNHNBoc]**

- Terbutilcarbazonato de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-valina [ZNMeValNHNBoc]

Se preparó una solución de DCC de 4.3 g (0.02 mol) en 15 mL de diclorometano.⁵⁵ En un matraz de fondo redondo de 100 mL se colocaron 5.3 g (0.02 mol) de ZNMeVal (**41**), 2.64 g (0.02 mol) de carbazonato de terbutilo (**34**) y 3 g (0.02 mol) de HOBt en 60 mL de cloruro de metileno. La mezcla se agitó y se enfrió entre 0-5 °C por empleo de un baño de hielo-sal, tras lo cual se añadió la solución de DCC dividida en tres porciones cada 10 minutos, cuidando que la temperatura no se incremente en un lapso de una hora. Posteriormente se deja con agitación magnética a temperatura ambiente durante 16-18 horas. Se elimina el disolvente en el rotavapor, el residuo se diluyó con 100 mL de acetato de etilo y se filtró el precipitado. Al filtrado se le hicieron lavados con HCl 1N (2 x 20 mL), con solución saturada de NaHCO_3 (2 x 20 mL) y con agua destilada (1 x 40 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó. El compuesto se recrystalizó de acetato de etilo/hexano obteniéndose 5.72 g (75 %) en forma de polvo blanco con un p.f. = 91-93 °C.

IR (pastilla, KBr) cm^{-1} : 3314, 3252, 3044, 2966, 1731, 1680, 1656, 1478, 1390, 1364, 1180, 1151, 765, 705

EM (FAB): m/z (%) 380 (M+H, 57), 91 (100), 324 (88), 248 (83), 57(28)

$[\alpha]_D^{20} = -82.3^\circ$ (c=1, CHCl_3)

- Terbutilcarbazato de *N*-metil-*L*-valina [NMeValNHNBoc]

Se colocaron 3.85 g (0.01 mol) de ZNMeValNHNBoc disueltos en 40 mL de acetato de etilo dentro de un matraz de hidrogenación de 125 mL y posteriormente se adicionan bajo atmósfera inerte 0.578 g (15 % w/w) de Pd sobre carbono activo al 10%. El matraz se agita bajo atmósfera de hidrógeno por un periodo de 16-18 horas a temperatura y presión ambiente (585 mmHg). Se filtra a través de celita para eliminar el catalizador, se evapora el disolvente y el producto se recrystaliza de acetato de etilo/hexano. La cantidad obtenida de NMeValNHNBoc fue 2.26g (91%) en forma de polvo blanco que tiene un p.f. = 143-144 °C.

IR (pastilla, KBr) cm^{-1} : 3330, 3247, 2979, 2804, 1736, 1671, 1529, 1369, 1242, 1167

EM (IQ): m/z (%) 245 (M^+ , 8), 246 ($\text{M}+\text{H}$, 100), 102 (98), 190 (44)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = - 59.5 ° (c=1, CHCl_3)

- **Terbutilcarbazato de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-*L*-fenilalanil-*N*-metil-*L*-valina (28)**

En un matraz de fondo redondo de 25 mL provisto de una trampa de humedad se colocaron 0.3314 g (1.059 mmol) de ZNMePhe (**38**) y 0.2594 g (1.059 mmol) de NMeValNHNBoc (**48**) en 10 mL de diclorometano, se agregaron 0.31 mL (2.2 mmol) de trietilamina. La mezcla se enfría a 0 °C en un baño de hielo-sal y se añadieron 0.515 g (1.164 mmol) de BOP. La reacción se dejó bajo agitación magnética ½ hora más a la misma temperatura y posteriormente a 16-18 horas a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente, el residuo se disolvió en 12 mL de acetato de etilo, se lavó con HCl 1N (2 x 6 mL), con solución saturada de NaHCO_3 (2 x 6 mL) y con salmuera (1 x 8 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El compuesto se purificó por cromatografía en placa preparativa empleando como eluyente acetato de

etilo/hexano (3:7). Se obtuvieron 0.202 g (35 %) del dipéptido **28** en forma de espuma blanca.

IR (pastilla, KBr) cm^{-1} : 3285, 3032, 2970, 1738, 1702, 1632, 1477, 1457, 1233, 1162, 751, 699

EM (FAB): m/z (%) 541 (M+H, 4), 91 (100), 409 (93), 410 (25)

$[\alpha]_D^{20} = -157.7^\circ$ (c=1, CHCl_3)

- **Terbutilcarbazonato de *N*-(benciloxicarbonil)-*N,O*-dimetil-L-tirosil-*N*-metil-L-valina (29)**

En un matraz de fondo redondo de 25 mL provisto de una trampa de humedad se colocaron 0.298 g (0.868 mmol) de ZNMeTyr(OMe) (**46**) y 0.2128 g (0.868 mmol) de NMeValNHNHBoc (**48**) en 10 mL de diclorometano; se agregaron 0.25 mL (1.82 mmol) de trietilamina. La mezcla se enfría a 0 °C en un baño de hielo-sal y se adicionaron 0.422 g (0.954 mmol) de BOP. La reacción se dejó con agitación magnética ½ hora más a esta temperatura y posteriormente a 16-18 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente en el rotavapor, el residuo se disolvió en 12 mL de acetato de etilo, se lavó con HCl 1N (2 x 6 mL), con solución saturada de NaHCO_3 (2 x 6 mL) y con salmuera (1 x 8 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó en el rotavapor. El producto se purificó por cromatografía en placa preparativa empleando como eluyente acetato de etilo/hexano (3:7). Se obtuvieron 0.196 g (40 %) del dipéptido **29** en forma de espuma blanca.

IR (pastilla, KBr) cm^{-1} : 3286, 3033, 2969, 1742, 1701, 1632, 1512, 1462, 1246, 1162

EM (FAB): m/z (%) 571 (M+H, 7), 439 (100), 91 (94), 274 (34), 154 (29)

$[\alpha]_D^{20} = -138.2^\circ$ (c=1, CHCl_3)

- **Terbutilcarbazato de *N*-metil-*L*-fenilalanina (49) [NMePheNHNBoc]**

- Terbutilcarbazato de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-*L*-fenilalanina
[ZNMePheNHNBoc]

Se preparó una solución de DCC de 2.48 g (0.012 mol) en 10 mL de diclorometano. En un matraz de fondo redondo de 100 mL se agregaron 3.8 g (0.012 mol) de ZNMePhe (**38**), 1.59 g (0.012 mol) de carbazato de terbutilo (**34**) y 1.85 g (0.012 mol) de HOBt en 30 mL de cloruro de metileno. La solución se agitó magnéticamente y se enfrió entre 0-5 °C en un baño de hielo-sal. Enseguida se añadió la solución de DCC dividida en tres porciones cada 10 minutos cuidando que la temperatura no se incremente en un lapso de una hora, posteriormente se deja con agitación magnética a temperatura ambiente durante 16-18 horas. Se evaporó el disolvente en el rotavapor, el residuo se diluyó con 100 mL de acetato de etilo y se filtró el precipitado. El filtrado se lavó con HCl 1N (2 x 20 mL), solución saturada de NaHCO₃ (2 x 20 mL) y con agua destilada (1 x 40 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó. El producto se recristalizó de metanol/acetato de etilo obteniéndose 2.6 g (51 %) en forma de cristales incoloros.

IR (pastilla, KBr) cm⁻¹: 3290, 3031, 2978, 1683, 1492, 1454, 1368, 1245, 1160, 745, 699

EM (FAB): m/z (%) 428 (M+H, 7), 91 (100), 372 (28), 296 (19)

[α]_D²⁰ = - 65.4 ° (c=1, CHCl₃)

- Terbutilcarbazato de *N*-metil-*L*-fenilalanina [NMePheNHNBoc]

La hidrogenólisis de ZNMePheNHNBoc se debe llevar a cabo una vez que se vaya a realizar su acoplamiento con ZNMeTyr(OMe) (**46**) y la cantidad a emplear debe de tomarse en cuenta para los cálculos estequiométricos ya que este intermediario no se caracterizó ya que es inestable; se asumió que la ruptura del grupo protector benciloxicarbonilo (Z) ocurre en un 100 %. En un matraz de fondo

redondo de 25 mL se colocaron 0.4953 g (1.16 mmol) de ZNMePheNHNHBoc en 10 mL metanol; bajo atmósfera de nitrógeno se adicionaron 74 mg (15 % w/w) de Pd sobre carbono activo al 10%. El matraz se agitó bajo atmósfera de hidrógeno por un periodo de dos horas a temperatura y presión ambiente (585 mmHg). Se filtra a través de celita para eliminar el catalizador, se evapora el disolvente y se deja secar el compuesto $\frac{1}{2}$ hora en bomba de vacío.

- **Terbutilcarbazato de *N*-(benciloxicarbonil)-*N,O*-dimetil-L-tirosil-*N*-metil-L-fenilalanina (30)**

En un matraz de fondo redondo de 25 mL provisto de una trampa de humedad se colocaron 0.3314 g (0.966 mmol) de ZNMeTyr(OMe) (**46**) en 6 mL de diclorometano; se agregaron 0.15 mL (1.06 mmol) de trietilamina y 0.2705 g (1.06 mmol) de BOP-Cl. La mezcla se enfría a 0 °C en un baño de hielo-sal y después de 5 minutos se añadieron 0.3398 g (1.16 mmol) de NMePheNHNHBoc (**49**) disueltos en 3 mL de cloruro de metileno y 0.13 mL (0.966 mmol) de trietilamina. La reacción se dejó agitando durante 20 minutos más a la misma temperatura y posteriormente 2 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente en el rotavapor, el residuo se disolvió en 12 mL de acetato de etilo, se lavó con HCl 1N (2 x 8 mL), con salmuera (1 x 10 mL), con solución saturada de NaHCO₃ (2 x 8 mL) y nuevamente con salmuera (1 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó en el rotavapor. El compuesto se purificó por cromatografía en columna empleando como eluyente acetato de etilo/hexano (25:75). Se obtuvieron 0.3736 g (63 %) del dipéptido **30** en forma de espuma blanca.

IR (pastilla, KBr) cm^{-1} : 3295, 3031, 2976, 1700, 1648, 1511, 1486, 1456, 1368, 1246, 1160, 747, 699

EM (FAB): m/z (%) 619 (M+H, 18), 487 (100), 91 (98), 322 (46)

$[\alpha]_D^{20}$ = - 111.6 ° (c=1, CHCl₃)

6. Discusión de resultados.

6.1 Análisis de los métodos de síntesis.

El objetivo de la síntesis de péptidos es la obtención de un solo diastereoisómero. La isomerización puede ocurrir en cualquier paso de la síntesis, en la preparación de los derivados de aminoácidos, en el acoplamiento o en la desprotección; por ello se debe tener especial cuidado en la elección de la metodología para llevar a cabo estas transformaciones. Los parámetros que influyen en el grado de racemización de aminoácidos son complejos y entre estos destacan su estructura, disolventes, la base orgánica empleada, la temperatura y la estequiometría.

Por otro lado como primer paso en la purificación de los derivados de aminoácidos y de los dipéptidos, se utilizaron sus características de solubilidad. (Figura 5)

- ***N*-protección de L-Phe y L-Val.**

El empleo del grupo protector benciloxicarbonilo y su eliminación se ha reportado como libre de reacciones paralelas.⁵⁶ La *N*-protección con Z se efectuó sobre los aminoácidos L-Val y L-Phe, donde se tiene como primer paso la formación del ion carboxilato y subsecuentemente la reacción de la amina con el cloruro de benciloxicarbonilo, el cual debe ser agregado de forma lenta a 0 °C y con agitación vigorosa. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se tiene al aminoácido *N*-protegido en forma de anión, que finalmente es acidificado. La síntesis de ZNVal (**40**) se lleva a cabo sin contratiempos.

El anillo aromático de L-fenilalanina no contiene sustituyentes que incrementen su reactividad, éste es resistente a la oxidación y a las condiciones usuales de hidrogenólisis aplicadas en la remoción del grupo Z. La ZNPhe (**37**) debe acidificarse lentamente debido a que se ha reportado en la literatura⁵⁷ que se puede tener una mezcla de ZNPhe y su sal de sodio con un p. f. = 126-128 °C, en

comparación con ZNPhe puro que muestra un p. f. = 87-88 °C; por ello la necesidad de un tratamiento exhaustivo con ácido clorhídrico.

- ***N*-metilación de ZNPhe y ZNVal.**

Los *N*-metilaminoácidos son de interés en la incorporación dentro de los péptidos por que un enlace amida metilado cambia su conformación a un enlace *cis*, lo cual prolonga la vida de la molécula en sistemas biológicos debido a que el enlace no es susceptible a las proteasas que usualmente hidrolizan los enlaces peptídicos.

Si se llevara a cabo la metilación de los aminoácidos sin un grupo *N*-protector con yoduro de metilo o sulfato de dimetilo en medio alcalino, se obtendría la sal cuaternaria.

La reacción de *N*-metilación transcurre usando una proporción 1:8:4 (aminoácido *N*-protegido, yoduro de metilo e hidruro de sodio), en donde para un máximo desempeño el NaH debe de ser agregado a la mezcla después del yoduro de metilo. Para evitar reacciones de isomerización se debe de adicionar la base en condiciones de temperatura baja de 0 a 5°C. Una vez que ha transcurrido el tiempo de reacción, se realiza la acidificación del producto y se lleva a cabo un lavado con solución de bisulfito de sodio que se emplea para remover el yodo del medio.

El método de *N*-metilación de Benoiton a baja temperatura no genera el producto esterificado y en un análisis hecho por él, con ZNAla²⁰ a las condiciones de reacción dadas, se ha observado que después de 5 días de reacción la esterificación se ha llevado a cabo solo en un 33%.

La pureza enantiomérica (porcentaje de isómero D < 0.1) en la obtención de ZNMeVal y ZNMePhe por la técnica de Benoiton esta ampliamente respaldada;^{11, 58} en nuestro caso esta se comprobó mediante comparación de las rotaciones

ópticas. Una vez *N*-metilado el aminoácido, el grupo protector necesita ser removido, la remoción se llevo a cabo mediante hidrogenólisis, lo cual es preferible al uso de ácido bromhídrico en ácido acético, debido a que este último procedimiento genera racemización en la desprotección de derivados de *N*-metilaminoácidos.¹⁹

- ***N*-protección y *N, O*-dimetilación de L-Tyr.**

- *N*-protección de L-tirosina

En el caso de L-Tyr no se pudo seguir la metodología empleada en la protección de L-Phe y L-Val con el grupo Z, debido a que en esas condiciones se da la formación de *N, O*-dibenciloxicarbonil-L-tirosina.⁵⁹ Por lo que se recurrió a la formación del compuesto del correspondiente éster metílico **44**, con lo cual mejora la solubilidad de la L-tirosina **11** en disolventes orgánicos; posteriormente se realizó la protección con Z empleando cloruro de benciloxicarbonilo y una base más débil (Na₂CO₃).

- *N*-metilación y *O*-protección.

La presencia de un grupo hidroxilo en el anillo aromático de L-Tyr lo hace susceptible a las reacciones de sustitución electrofílica aromática, y además debido a su carácter ácido es fácilmente desprotonado y el anión fenóxido compite con el grupo α -amino como nucleófilo.⁵¹ Por todo esto es necesario efectuar la protección del hidroxilo del compuesto **45**, esto se logró por la formación de un éter metílico. La elección de este grupo protector se basa en que en un solo paso se da la *O*-protección y la *N*-metilación; así, tratamiento de **45** con sulfato de dimetilo e hidróxido de potasio finamente dividido en presencia de un catalizador de transferencia de fases, da rendimientos satisfactorios. El catalizador utilizado fue bisulfato de tetrabutilamonio, que a pesar de ser un compuesto iónico se disuelve en medios no polares, debido a los cuatro grupos alquilo unidos al nitrógeno que apantallan la carga positiva e imponen su carácter lipofílico al ion tetrabutilamonio. Las sales de amonio cuaternario catalizan la reacción entre un

anión y un sustrato orgánico transfiriendo el anión desde la fase acuosa, donde no puede contactar con el sustrato, a la fase orgánica, donde está débilmente solvatado y en un estado altamente reactivo.

Cabe destacar que también se encontró que la reacción de dimetilación se puede dar por el empleo de yoduro de metilo e hidruro de sodio en THF a 23 °C, sin embargo no se dan datos sobre la estequiometría seguida⁶⁰ y las condiciones de reacción; al intentarlo en el laboratorio solo se obtuvieron compuestos con metilaciones incompletas aun empleando condiciones de metilación exhaustiva.¹⁸

El siguiente paso una vez efectuada la reacción de dimetilación, es una reacción de saponificación la cual se realiza en un disolvente acuoso-orgánico (metanol) para solubilizar los reactivos y los productos. En la saponificación la integridad quiral del aminoácido puede verse afectada, por lo tanto se requieren periodos cortos de reacción, una solución alcalina diluida y bajas temperaturas.

- **C-protección.**

La protección del grupo carboxilo de un aminoácido se lleva a cabo comúnmente por esterificación; los ésteres pueden ser fácilmente removidos. Los ésteres utilizados en este trabajo fueron el éster *terbutílico* y el grupo *terbutylcarbazato*.

- Protección como ésteres *terbutílicos*.

La reacción de esterificación de **41** es muy lenta debido al impedimento estérico que involucra el tener un *N*-metilaminoácido *N*-protegido en comparación al aminoácido libre cuya reacción de esterificación se lleva a cabo en 4 horas.⁶¹ Lo mismo ocurre con la esterificación del compuesto **38**.

El empleo de ésteres *terbutílicos* en la C-protección de aminoácidos provee la ventaja adicional de que da estabilidad a los aminoácidos como bases libres, una

vez eliminado el grupo *N*-protector (Z), lo que da pie a su almacenaje y uso directo en acoplamientos.³⁷ Esto se observa con los compuestos **43** y **47**.

- Protección con carbazato de *tert*-butilo.

El uso del grupo C-protector carbazato de *tert*-butilo en el aminoácido terminal de los dipéptidos **28**, **29** y **30** se debió a estudios previos con otros dipéptidos reportados en la literatura.³⁸

La protección del grupo carboxilo por formación de derivados con carbazato de *tert*-butilo se hizo con los compuestos **48** y **49**, utilizando DCC, como agente condensante y se adicionó HOBt para incrementar la eficacia de la carbodiimida y disminuir la generación de *N*-acilurea.

- **Síntesis de dipéptidos.**

La presencia de cadenas laterales con grupos voluminosos en los aminoácidos disminuye la velocidad de formación del enlace peptídico, eso mismo sucede cuando se llevan a cabo acoplamientos con *N*-metilaminoácidos. A pesar de que estos últimos tienen un incremento de nucleofilicidad de cerca de 1-1.5 unidades más que un grupo amino pero que debido al sustituyente metilo, el centro nucleofílico está más impedido estéricamente.⁶²

La síntesis de los dipéptidos fue una de las partes más difíciles del proyecto, para ello se probaron tres agentes acoplantes distintos.

- DCC.

Al inicio del proyecto solo se tenía DCC y al utilizarlo en la síntesis del dipéptido **25**, partiendo de los fragmentos **38** y **43**, se obtuvo como producto un derivado de *N*-acilurea (**50**), favorecida porque el nucleófilo (residuo amino) está muy impedido y el acoplamiento es demasiado lento (Figura 16). La estructura química de **50** está apoyada por su espectro de RMN ¹H y su EM (IE, M⁺ = 519).

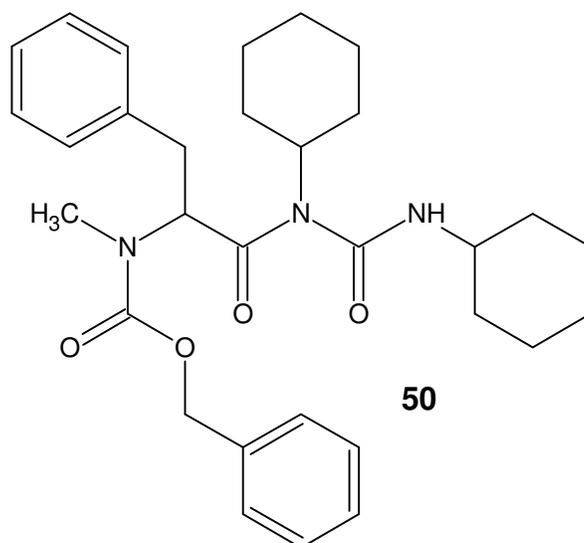
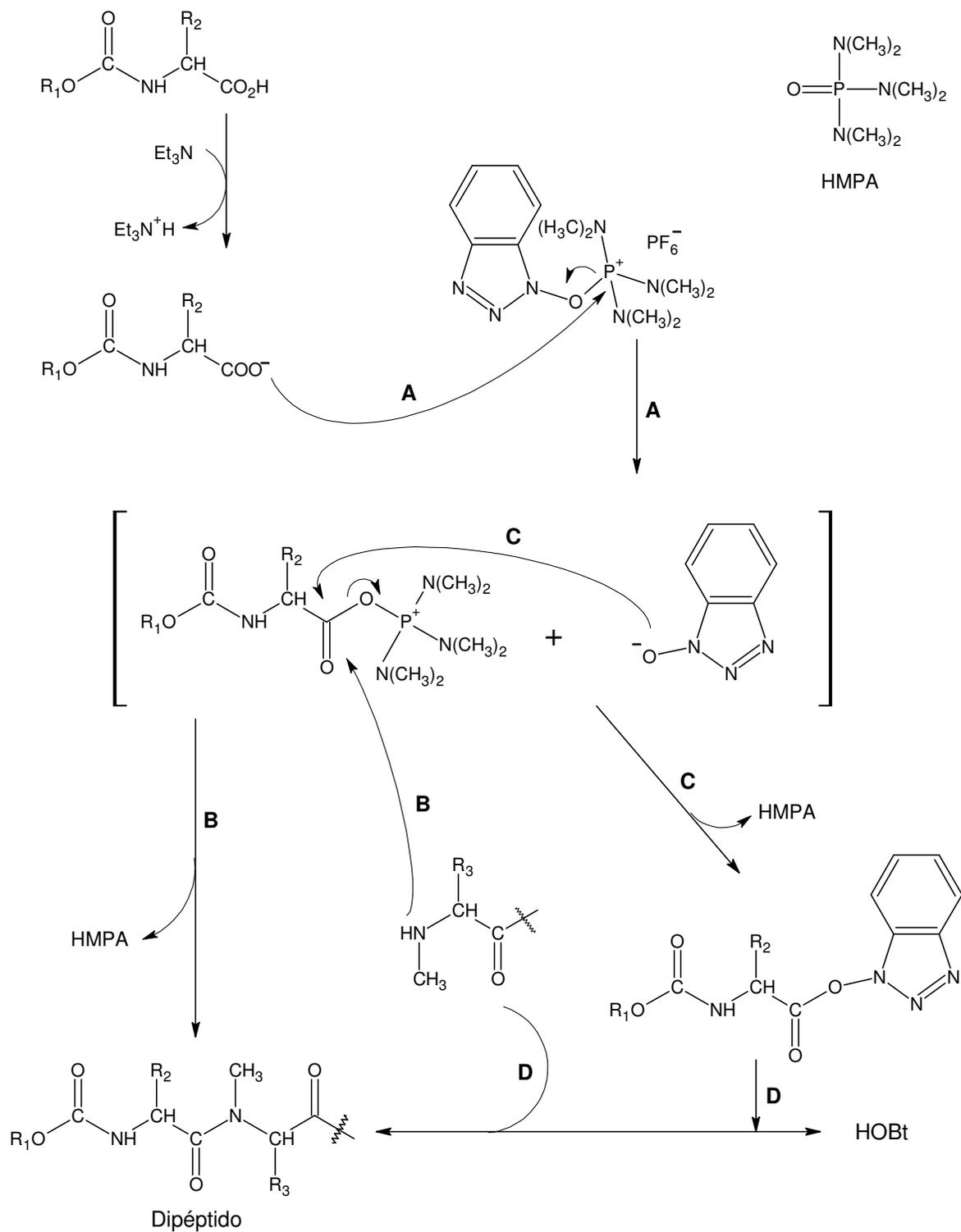


Figura 16. Estructura química del derivado de *N*-acilurea (**50**) obtenido en el intento de acoplamiento del dipéptido **25** con DCC.

- BOP.

Debido a la falla en la síntesis del dipéptido **25** con DCC se empleó el agente acoplante BOP (esquema 6), el cual da rendimientos de bajos a moderados en la síntesis de los dipéptidos **25** (64 %), **26** (58 %), **28** (35 %) y **29** (40 %). La estequiometría seguida fue 1:1:2.1:1.1 (residuo *N*-terminal, residuo *C*-terminal, trietilamina, BOP). Cuando se realiza la síntesis de los dipéptidos **27** y **30**, los rendimientos son bajos, 30% y 11%, respectivamente; por ello se decidió buscar otro agente acoplante.

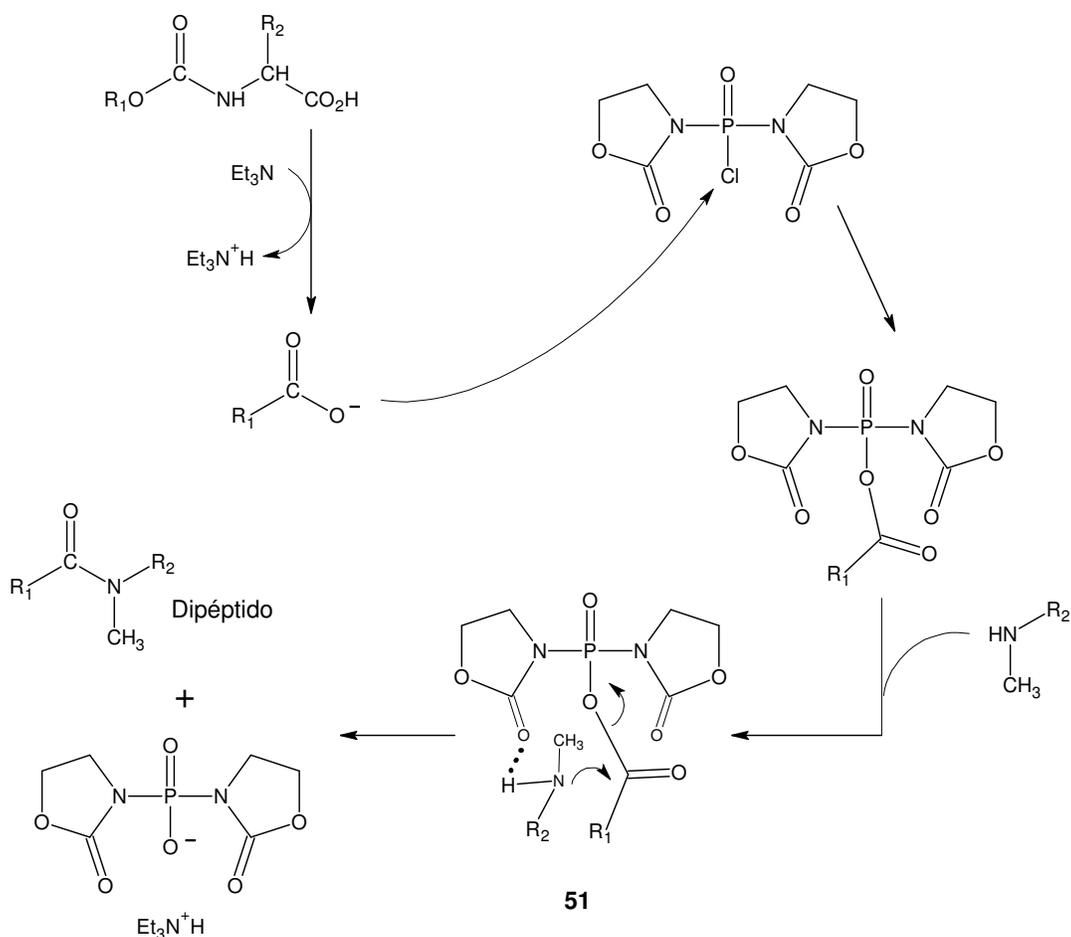


Esquema 6. Formación del enlace peptídico empleando el agente acoplante BOP, partiendo de un *N*-(benziloxycarbonil)aminoácido; el dipéptido se puede originar a partir de dos posibles intermediarios (A) y (C).^{10c}

- BOP-Cl.

El uso de BOP-Cl (1.1 equivalentes) como agente acoplante de aminoácidos impedidos estéricamente permitió un rango de temperatura de 0-5 °C y la síntesis de dipéptidos entre 4-20 horas. El uso de trietilamina (2.2 equivalentes) como base permitió la obtención de dipéptidos en rendimientos favorables.⁶³

El BOP-Cl incrementó los rendimientos de síntesis de los dipéptidos **27** (65%) y **30** (63%). La estequiometría empleada para **27** fue 1:1.1:2.1:1.1 (residuo *N*-terminal, residuo *C*-terminal, trietilamina, BOP-Cl) y 1:1.2:2.1:1.1 para **30**. Se ha mencionado en la literatura que un probable paso en el mecanismo de reacción de BOP-Cl como agente acoplante consiste en una asistencia electrofílica por parte de una oxazolona.⁶⁴ (Esquema 7)



Esquema 7. Formación del enlace peptídico empleando el agente acoplante BOP-Cl, donde se ha propuesto la asistencia electrofílica por parte de una oxazolona en uno de los intermediarios (**51**).

Al analizar los resultados obtenidos con los agentes acoplantes BOP y BOP-Cl en la síntesis de dipéptidos, se destaca la eficacia de éste último. Probablemente la utilización de este agente acoplante en la síntesis de **25**, **26**, **28** y **29** incrementa el rendimiento pero debido a cuestiones de tiempo ya no se pudo corroborar en el laboratorio.

En la síntesis de dipéptidos se tienen reacciones que envuelven la remoción de protones. Las bases usadas para este fin son usualmente aminas terciarias, las cuales son nucleófilos débiles que no compiten por los electrófilos envueltos en las reacciones. El uso de aminas terciarias involucra dos puntos importantes que es su fuerza como base y el impedimento estérico alrededor del átomo de nitrógeno. La fuerza de la base depende de los sustituyentes sobre el átomo de nitrógeno y se incrementa con grupos electrodonadores. La abstracción de protones se da más fácil en aminas terciarias menos impedidas estéricamente. Nuestros acoplamientos se llevaron a cabo empleando trietilamina, con la cual los pioneros en síntesis de dipéptidos también obtuvieron resultados favorables.

6.2 Análisis de resonancia magnética nuclear.

Los derivados de aminoácidos y dipéptidos muestran en sus espectros de RMN de protones la presencia de más de un conformero en solución, esto basado en la diversidad de señales observadas, por lo tanto se hace necesario un apartado especial para el análisis detallado de los espectros de RMN. En principio, se deben considerar las variaciones críticas que dependen del equilibrio conformacional, como una consecuencia del disolvente y que depende en gran medida de la polaridad, formación de puentes de hidrógeno, protonación o desprotonación; o bien debido a cambios en la temperatura. Está bien establecido que la preferencia del conformero más estable usualmente se incrementa a bajas temperaturas.

- **Derivados de aminoácidos.**

Considerando una molécula que contiene un grupo electrodonador conectado a un grupo electroatractor por un enlace sencillo, éste llega a poseer carácter de doble enlace debido a la presencia de las llamadas estructuras canónicas (Figura 17). El uso de disolventes polares puede incrementar el carácter de doble enlace.

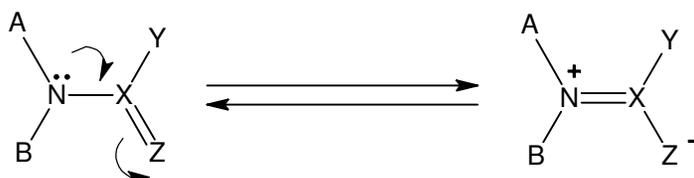
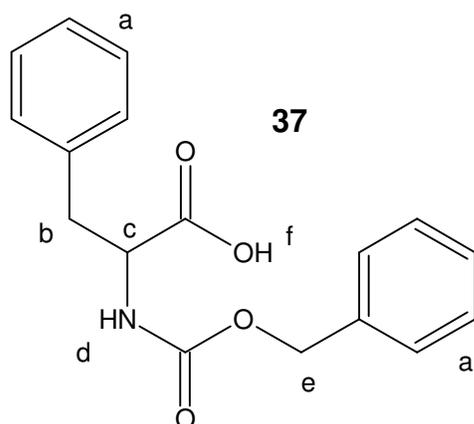


Figura 17. Carácter de doble enlace dado por las estructuras canónicas.

***N*-(benciloxicarbonil)-L-fenilalanina (37)**

En el compuesto **37** cuando tanto la amina como el grupo ácido están libres la formación de un zwitterión es común, para este caso la estructura conformacional se reduce a una sola. Los datos espectroscópicos de RMN del compuesto **37** se muestran a continuación:



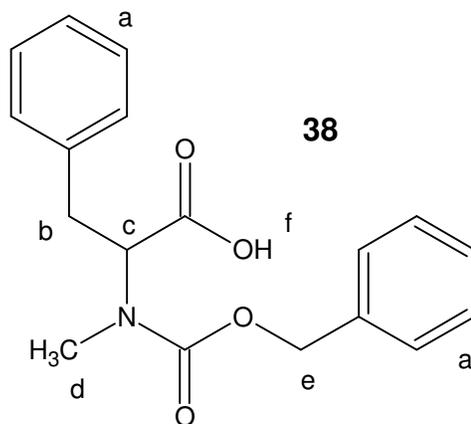
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz):

- a) 7.11-7.33 (m, 10H)
- b) 3.19 (dd, 1H, $J = 5.0, -13.4$) y 3.12 (dd, 1H, $J = 6.6, -13.4$)
- c) 4.70 (ddd, 1H, $J = 8.2, 5.0, 6.6$)
- d) 5.18 (d, 1H, $J = 8.2$) señal que disminuye un poco con D₂O
- e) 5.09 (s, 2H)
- f) No observable

En el espectro de resonancia magnética de protón destaca que el metileno b se observa como la parte AB de un sistema ABX $\delta_A= 3.19$, $\delta_B= 3.12$ y $\delta_X= 4.70$, cuyas constantes de acoplamiento se muestran al lado de la estructura del compuesto **37**.

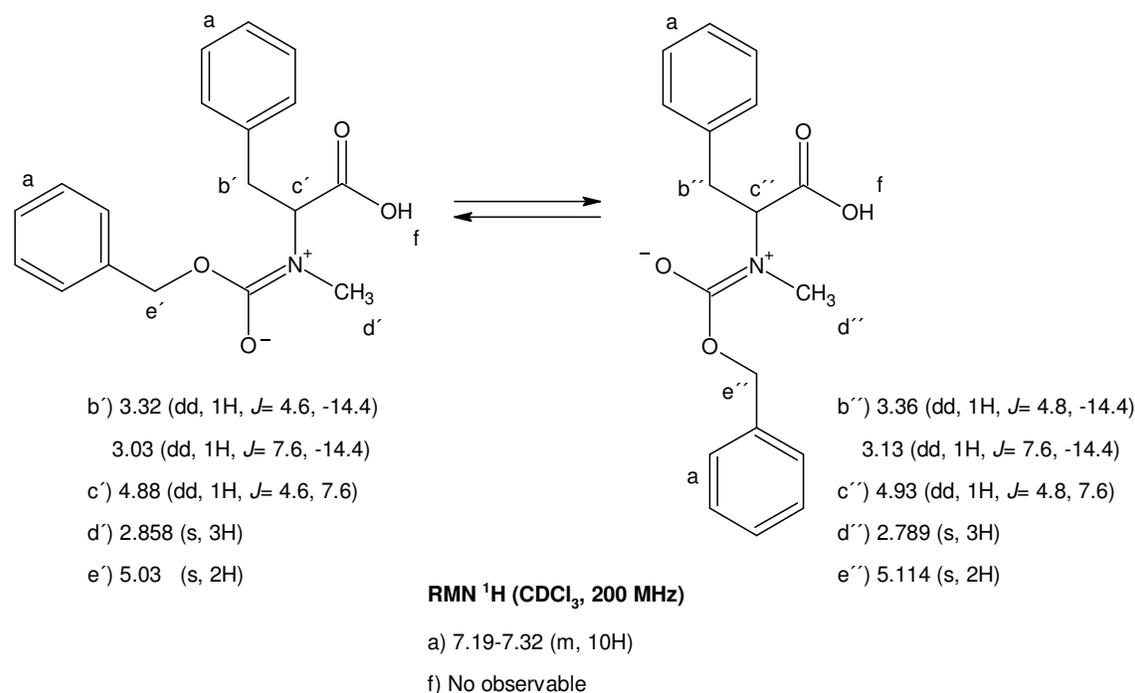
***N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanina (**38**)**

Cuando tenemos el derivado *N*-metilado **38** la presencia de estructuras alternativas tiene lugar ocasionando estructuras canónicas que tienen que ser consideradas para explicar los diferentes espectros de resonancia magnética protónica.



En el espectro de RMN ^1H del compuesto **38** se observa que algunas de las señales aparecen duplicadas debido a la presencia de formas canónicas y que usando los datos de la integración fueron detectadas con una relación 40/60. (Esquema 8)

Los datos más importantes para el compuesto **38** son:

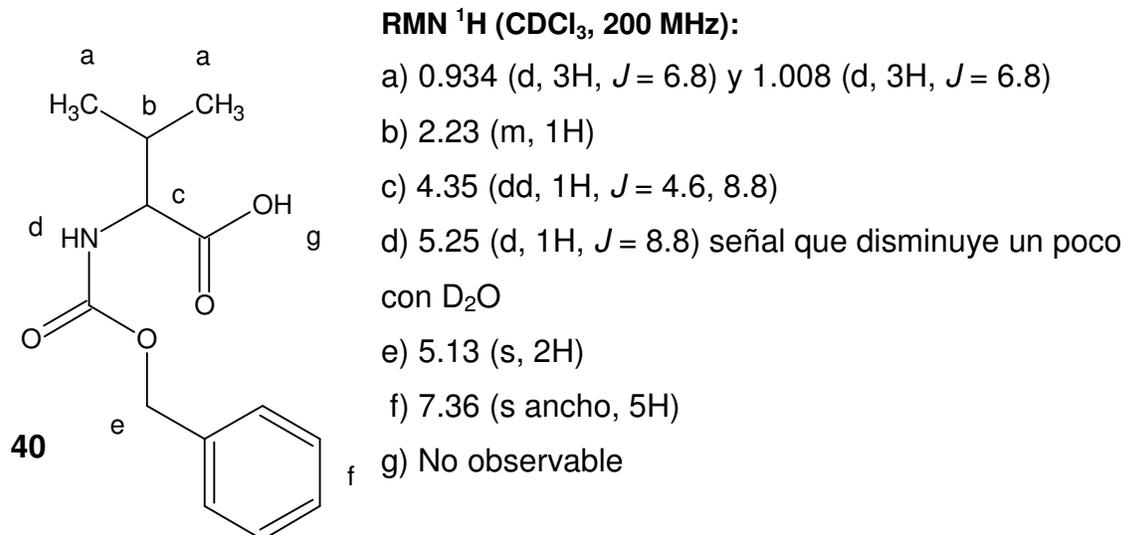


Esquema 8. Estructuras canónicas de *N*-(benciloxycarbonyl)-*N*-metil-L-fenilalanina (**38**).

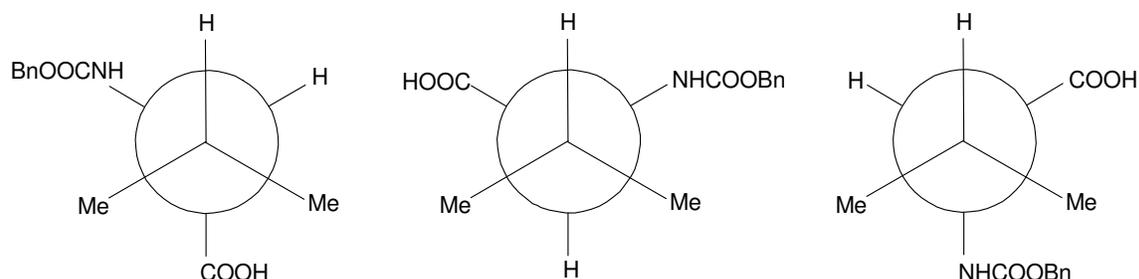
El espectro de RMN ^1H de este compuesto se encuentra en el anexo A como figura 18.

N-(benciloxycarbonyl)-L-valina (**40**)

Para el caso del producto **40** se observan señales que proporcionan datos tal como se describen a continuación:



Una observación relevante en el espectro de RMN ^1H relacionada con los metilos del grupo isopropilo, es aquella en la cual ambos metilos presentan diferentes desplazamientos químicos para cada uno de ellos debido a que estos grupos son considerados diastereotópicos, tal como se observa en las proyecciones de Newman del compuesto **40**. (Esquema 9)

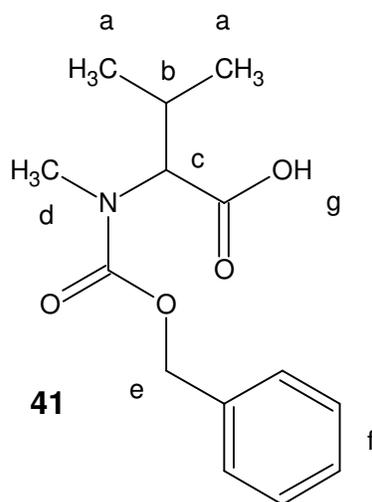


Esquema 9. Proyecciones de Newman para *N*-(benciloxicarbonil)-L-valina.

Como se observa en el esquema 9, ambos metilos están sujetos a diferentes medios magnéticos originados por los grupos que los rodean y consecuentemente al ser diastereotópicos ambos serán magnéticamente no equivalentes presentando respectivamente para cada uno de ellos un doblete con acoplamiento $\sim 7\text{Hz}$.

***N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-L-valina (**41**)**

Un fenómeno similar al anterior se presentó también para el compuesto **41**.

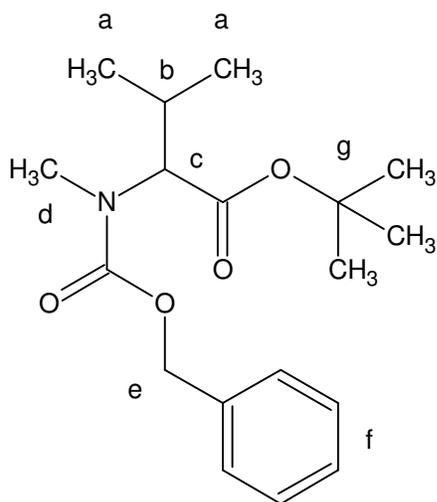


RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz):

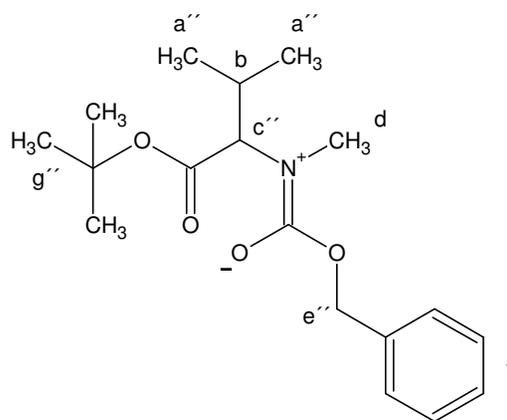
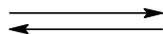
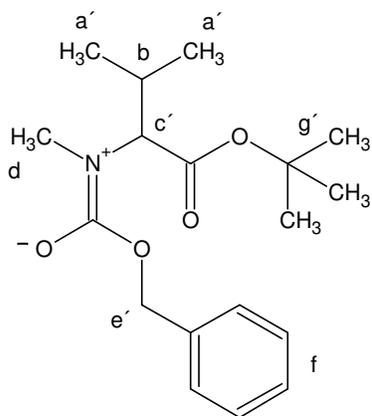
- a) 0.93 (d, 3H, $J = 6.6$) y 1.05 (d, 3H, $J = 6.6$)
- b) 2.25 (m, 1H)
- c) 4.35 (d, 1H, $J = 10.6$)
- d) 2.95 (s, 3H)
- e) 5.18 (s, 2H)
- f) 7.36 (s ancho, 5H)
- g) No observable

En el inciso a) correspondiente a los desplazamientos químicos se pueden notar las señales debidas a los metilos diastereotópicos, los cuales presentarán consecuentemente diferentes desplazamientos químicos.

Éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-valina (precursor de 43)



Para este compuesto la interpretación del espectro de RMN ^1H se presenta con varias alternativas en la interpretación debido tanto a la presencia de metilos diastereotópicos del grupo isopropilo, así como a las formas canónicas resultantes, y que a través del espectro de resonancia magnética de protón fueron calculados en una relación 1:1. (Esquema 10)



a') 0.864 (d, 3H, $J= 6.8$)
 0.889 (d, 3H, $J= 6.8$)
 c') 4.19 (d, 1H, $J= 10.8$)
 e') 5.13 (d, 1H, $J= -12.6$)
 5.22 (d, 1H, $J= -12.6$)
 g') 1.446 (s, 9H)

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

b) 2.16 (m, 1H)
 d) 2.91 (s, 3H)
 f) 7.35 (s ancho, 5H)

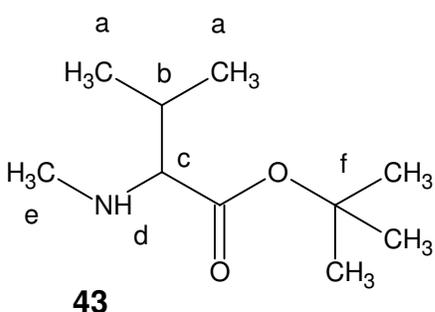
a'') 0.93 (d, 3H, $J= 6.8$)
 1.006 (d, 3H, $J= 6.8$)
 c'') 4.40 (d, 1H, $J= 10.6$)
 e'') 5.16 (s, 2H)
 g'') 1.426 (s, 9H)

Esquema 10. Estructuras canónicas del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-valina

El espectro de RMN ^1H de este compuesto se ubica en el anexo A como figura 19.

Éster terbutílico de *N*-metil-L-valina (**43**)

El compuesto **43** proporciona señales en RMN que se resumen a continuación:



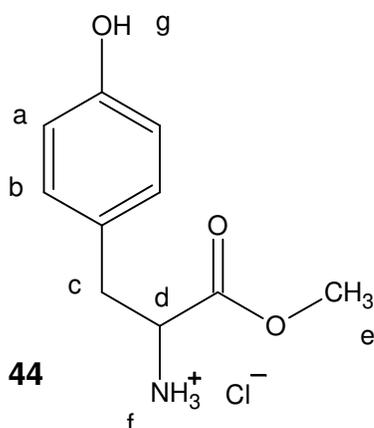
RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz):

- a) 0.945 (d, 3H, $J = 6.8$) y 0.95 (d, 3H, $J = 6.8$)
- b) 1.85 (m, 1H)
- c) 2.76 (d, 1H)
- d) No observable
- e) 2.37 (s, 3H)
- f) 1.49 (s, 9H)

Una vez más en el inciso a) se detectan señales que identifican a los metilos diastereotópicos y que muestran diferentes desplazamientos químicos.

Clorhidrato del éster metílico de L-tirosina (**44**)

Uno de los primeros derivados aquí sintetizados de L-tirosina fue el compuesto **44**, el cual presenta las siguientes características espectroscópicas en resonancia magnética de protón:



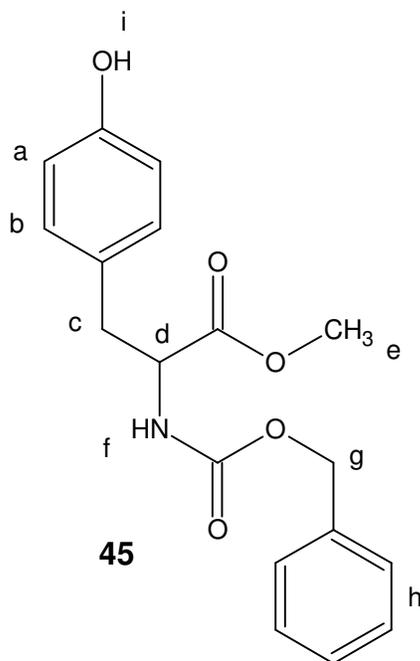
RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz):

- a) 6.77 (doblete escindido, 2H)
- b) 7.06 (doblete escindido, 2H)
- c) 3.08 (dd, 1H, $J = 7.4, -14.6$) y 3.17 (dd, 1H, $J = 6.0, -14.6$)
- d) 4.23 (dd, 1H, $J = 6, 7.4$)
- e) 3.803 (s, 3H)
- f) No observable
- g) No observable

En el espectro de RMN ^1H fue relevante que el metileno c se observa como la parte AB de un sistema ABX $\delta_A= 3.17$, $\delta_B= 3.08$ y $\delta_X= 4.23$, cuyas constantes de acoplamiento pueden ser leídas al lado de la estructura de **44**.

Éster metílico de *N*-(benciloxycarbonil)-L-tirosina (**45**)

Cuando se analiza el espectro de RMN ^1H para el compuesto **45**, se hizo las siguientes observaciones:

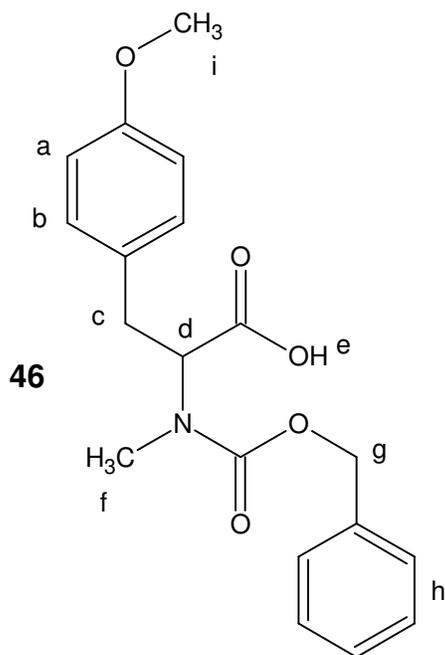


RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz):

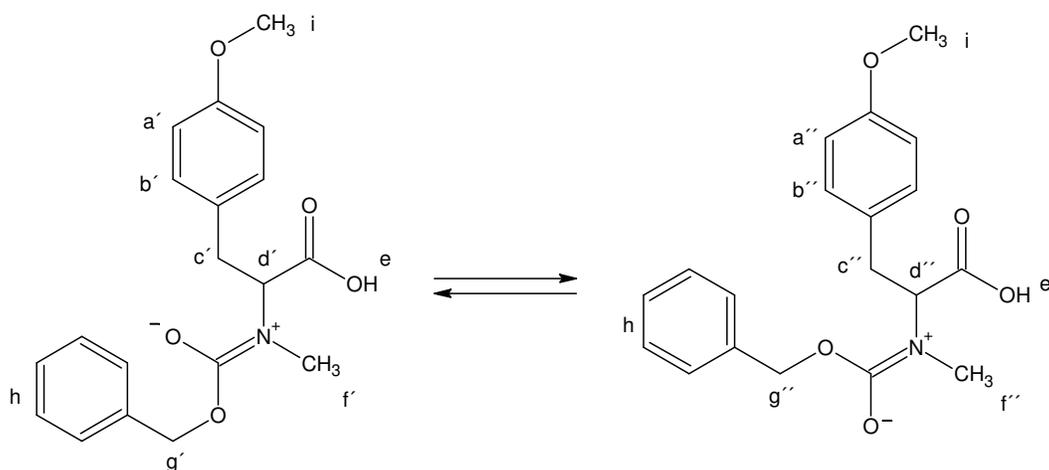
- a) 6.7 (doblete escindido, 2H)
- b) 6.94 (doblete escindido, 2H)
- c) 3.00 (dd, 1H, $J = 8.2, -12.0$) y 3.06 (dd, 1H, $J = 8.2, -12.0$)
- d) 4.62 (td, 1H, $J = 8.2, 8.2$)
- e) 3.72 (s, 3H)
- f) 5.23 (d, 1H, $J = 8.2$)
- g) 5.07 (d, 1H, $J = -12.4$) y 5.1 (d, 1H, $J = -12.4$)
- h) 7.34 (s ancho, 5H)
- i) No observable

De la misma manera que ocurre en el compuesto **44** el metileno marcado como c para el producto **45** se observa como la parte AB de un sistema ABX $\delta_A= 3.06$, $\delta_B= 3.00$ y $\delta_X= 4.62$, con constantes de acoplamiento bien definidas. Se muestra el espectro de RMN ^1H de este compuesto y sus expansiones en el anexo A como figura 20.

N-(benciloxycarbonil)-*N,O*- dimetil-L-tirosina (**46**)



Para efectuar las reacciones posteriores encaminadas a la obtención de los dipéptidos intermediarios de las Ulongamidas B y C fue necesario trabajar el compuesto **45** como su derivado OMe y NMe (**46**) debido a características de estabilidad del producto. En el espectro de RMN ^1H del compuesto **46** se observó que algunas de las señales de los protones aparecen duplicadas debido también a las formas canónicas previamente discutidas y que se presentan en una relación 58/42. (Esquema 11)



a') 6.8 (d escindido, 2H)
 b') 7.09 (d escindido, 2H)
 c') 3.05 (dd, 1H) y 3.31 (dd, 1H)
 d') 4.88 (dd, 1H)
 f') 2.79 (s, 3H)
 g') 5.12 (s, 2H)

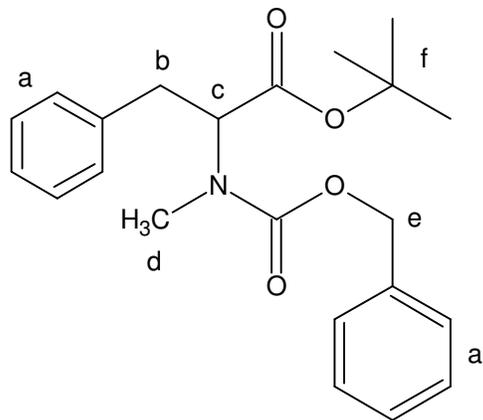
RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

e) No observable
 h) 7.31 (m, 5H)
 i) 3.78 (s, 3H)

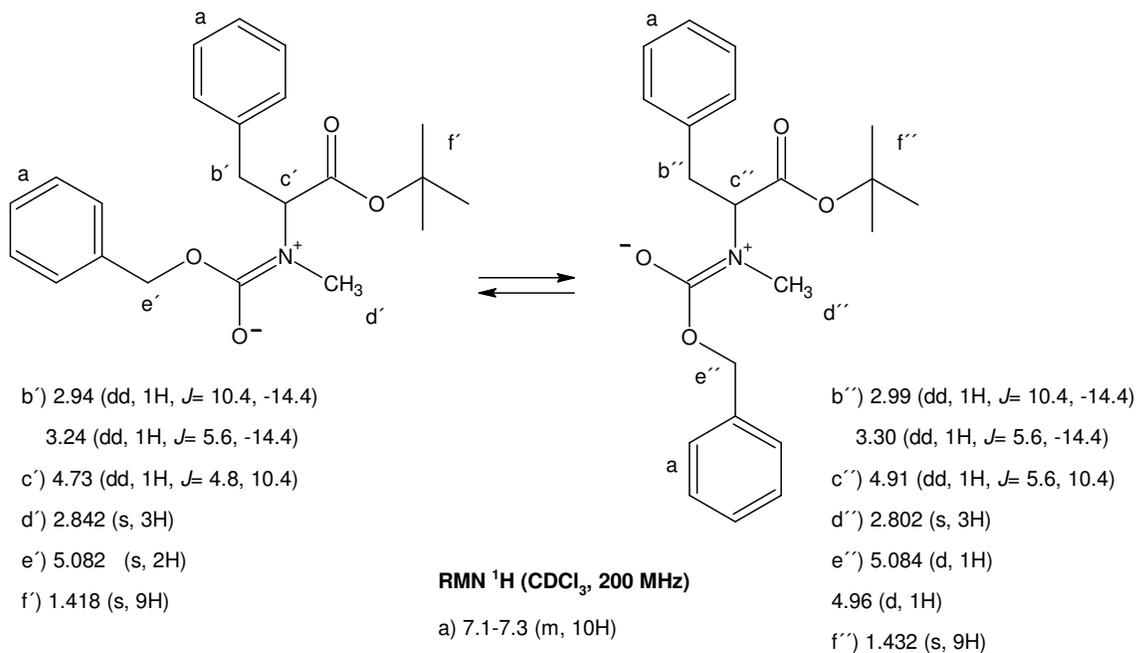
a'') 6.77 (d escindido, 2H)
 b'') 7.03 (d escindido, 2H)
 c'') 2.99 (dd, 1H) y 3.24 (dd, 1H)
 d'') 4.83 (dd, 1H)
 f'') 2.85 (s, 3H)
 g'') 5.0 (d, 1H) y 5.09 (d, 1H)

Esquema 11. Estructuras canónicas de *N*-(benciloxycarbonil)-*N,O*- dimetil-L-tirosina (**46**).

Éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanina (precursor de **47**)



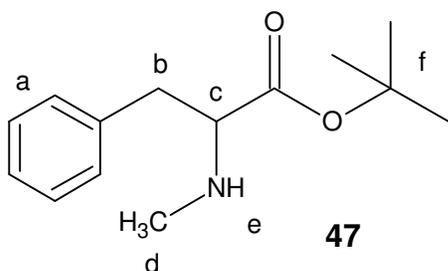
El compuesto precursor de **47** presenta desplazamientos químicos mostrados a continuación:



Esquema 12. Estructuras canónicas del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanina en una relación 1:1.

Éster terbutílico de *N*-metil-L-fenilalanina (47)

Para el caso del compuesto **47**, este presenta las siguientes características en resonancia magnética de protón:

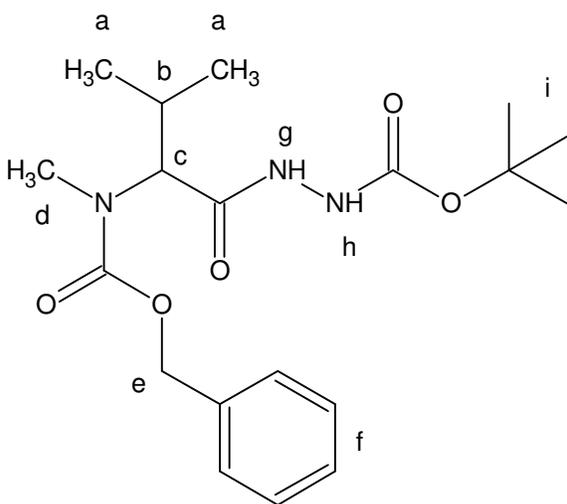


RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz):

- a) 7.1-7.3 (m, 5H)
- b) 2.93 (dd, 1H, $J = 6.4, -13.4$)
- 2.86 (dd, 1H, $J = 7.6, -13.4$)
- c) 3.32 (dd, 1H, $J = 7.6, 6.4$)
- d) 2.376 (s, 3H)
- e) No observable
- f) 1.36 (s, 9H)

Terbutilcarbazonato de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-L-valina (precursor de **48**)

Este derivado es preparado como precursor del compuesto **48** y presenta los siguientes datos espectroscópicos:



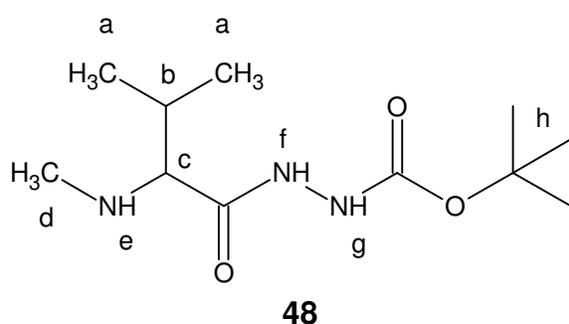
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz):

- a) 0.89 (d, 3H, $J = 6.6$) y 0.99 (d, 3H, $J = 6.6$)
- b) 2.31 (m, 1H)
- c) 4.16 (d, 1H, $J = 11$)
- d) 2.92 (s, 3H)
- e) 5.17 (s, 2H)
- f) 7.36 (s ancho, 5H)
- g) 6.317 (señal ancha, 1H)
- h) 7.94 (señal ancha, 1H)
- i) 1.452 (s, 9H)

El espectro de RMN ¹H de este compuesto se ubica en el anexo A como figura 21.

Terbutilcarbazato de *N*-metil-L-valina (**48**)

Para el compuesto **48** al igual que su precursor también se observan los metilos diastereotópicos correspondientes al grupo isopropilo. A continuación se dan sus características espectroscópicas en resonancia magnética de protón:

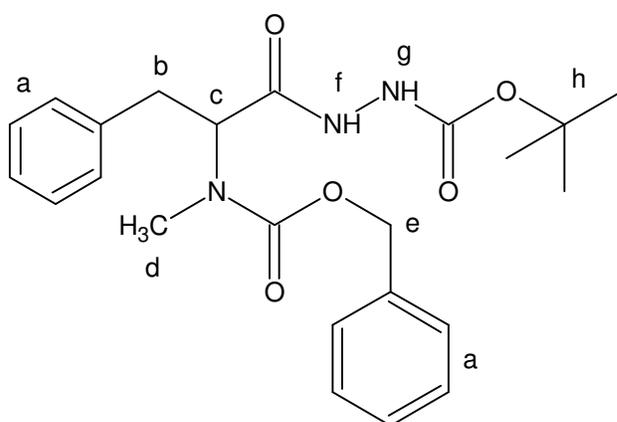


RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz):

- a) 0.957 (d, 3H, $J = 6.8$) y 1.016 (d, 3H, $J = 6.8$)
- b) 2.1 (m, 1H)
- c) 2.89 (d, 1H, $J = 4.8$)
- d) 2.46 (s, 3H)
- e) No observable
- f) 6.42 (señal ancha, 1H)
- g) 8.33 (señal ancha, 1H)
- h) 1.476 (s, 9H)

Terbutilcarbazato de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanina (precursor de **49**)

Como último derivado aquí sintetizado se tiene al precursor de **49**, el cual presenta las siguientes características en RMN de protón:



RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz):

- a) 7.1-7.4 (m, 10H)
- b) 3.32 (dd, 1H, $J = 6.9, -14.3$)
- 3.03 (dd, 1H, $J = 9.35, -14.3$)
- c) y e) señales sobrepuestas
- d) 2.89 (s, 3H)
- f) 6.33 (señal ancha, 1H)
- g) 7.91 (señal ancha, 1H)
- h) 1.45 (s, 9H)

- **Dipéptidos sintetizados.**

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C para los dipéptidos aquí sintetizados fueron inusualmente complejos, exhibiendo señales que obligaron a detallar al máximo la interpretación. En un principio sugería que la complejidad correspondía a una mezcla de diastereoisómeros; después de sucesivas purificaciones, la complejidad de señales persistía. Posteriormente, en la literatura se encontraron péptidos que analizados por RMN ^1H revelan una notable diferencia en sus propiedades conformacionales, ya que existen como una mezcla de rotámeros detectadas en sus espectros de RMN ^1H en solución de CDCl_3 .⁶⁵ Como ya se examinó en los derivados de los aminoácidos, aquí también están presentes las formas canónicas típicas de los dipéptidos.

Para ilustrar el comportamiento del dipéptido **25** ante la presencia de varias estructuras canónicas propuestas, fue necesario iniciar un estudio a través de RMN 1D de ^1H y ^{13}C , así como determinaciones bidimensionales que incluyen experimentos HSQC, COSY, HMBC y NOESY.

El análisis de los espectros de RMN 1D y 2D para el dipéptido **25** se llevo a cabo por la siguiente ruta deductiva:

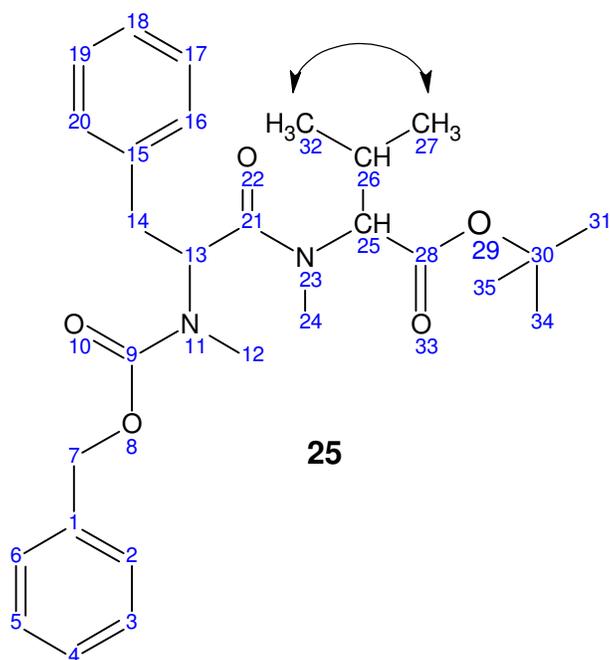
1.- Checar de forma general las señales de RMN ^1H y verificar que los desplazamientos de los hidrógenos correspondan a los esperados. Se plantea desde el inicio la presencia de cuatro rotámeros en solución (CDCl_3) lo que da origen a que el número de señales esperadas en algunos casos se multiplica por cuatro. En un espectro de ^1H los valores de las constantes de acoplamiento y la multiplicidad de cada señal nos proporciona información valiosa sobre la estructura química del compuesto. (Figura 22 del anexo B)

2.- Completar la interpretación espectroscópica con el análisis de RMN ^{13}C apoyado por el estudio DEPT para la asignación del grado de protonación de los carbonos y que corresponden a los diferentes metilos, metilenos y metinos ubicados en la molécula, en donde por comparación con el espectro normal de ^{13}C

obtenemos señales debidas a los carbonos cuaternarios. Además en RMN de ^{13}C detectamos a través de su desplazamiento químico a los carbonos de los carbonilos y a los carbonos ipso de los anillos aromáticos. (Figuras 23 y 24 del anexo B)

3.- Para asignar adecuadamente la correlación entre protones y carbonos a través de una ligadura σ ($^1J_{\text{CH}}$), se efectuó por medio del experimento HSQC (figura 25 del anexo B) para cada una de las moléculas aquí estudiadas. En la figura 26 del anexo B se tiene una expansión del experimento HSQC donde se muestra la correlación entre protones y carbonos de los metilos del isopropilo del dipéptido **25**.

4.- Para probar y apuntalar las correlaciones $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ también se efectuó el experimento HMBC (figura 27 del anexo B) el cual establece conectividades entre $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ a través de dos ligaduras σ ($^2J_{\text{CH}}$) y a través de tres ligaduras σ ($^3J_{\text{CH}}$), lo cual nos permite determinar grupos vecinos dentro de la estructura del dipéptido **25**. Como ejemplo tenemos la asignación de los carbonos 27 y 32 de los metilos del isopropilo para cada una de las formas canónicas presentes tomando como referencia sus hidrógenos correspondientes. (Figura 28 del anexo B)



5.- El experimento COSY (figura 29 del anexo B) muestra las interacciones entre protones a través de dos ligaduras σ (${}^2J_{HH}$) y tres ligaduras σ (${}^3J_{HH}$). En la figura 30 del anexo B se da un ejemplo de la localización de los hidrógenos geminales del carbono 7 del dipéptido **25** para las cuatro formas canónicas propuestas, donde cada hidrógeno se presenta como un doblete.

6.- En el estudio NOESY (figura 31 del anexo B) del dipéptido **25** podemos observar las interacciones vistas en el experimento COSY, y además aquellas interacciones dipolares entre grupos cercanos espacialmente con distancias que no exceden 2.5-2.8 Å. En este experimento es inherentemente observado el fenómeno EXSY (protones estructuralmente iguales pero con configuración diferente que son intercambiables por medio de un determinado equilibrio). Para comprobar que diversidad y complejidad en el número de señales observadas para el compuesto **25** que es debido a diferentes equilibrios estructurales, fue necesario obtener a través del experimento NOESY aquellas señales que representan el equilibrio conformacional entre estructuras y que se obtienen a través del experimento EXSY. (Figura 32 del anexo B)

Conjuntando todos los experimentos anteriores fue posible caracterizar cuatro estructuras (figura 33) presentes en el dipéptido **25** que son interconvertibles a través de un equilibrio representado en la figura 34 y que basados en la integración de las señales apropiadas se determinó que están en una proporción 35:24:22:19.

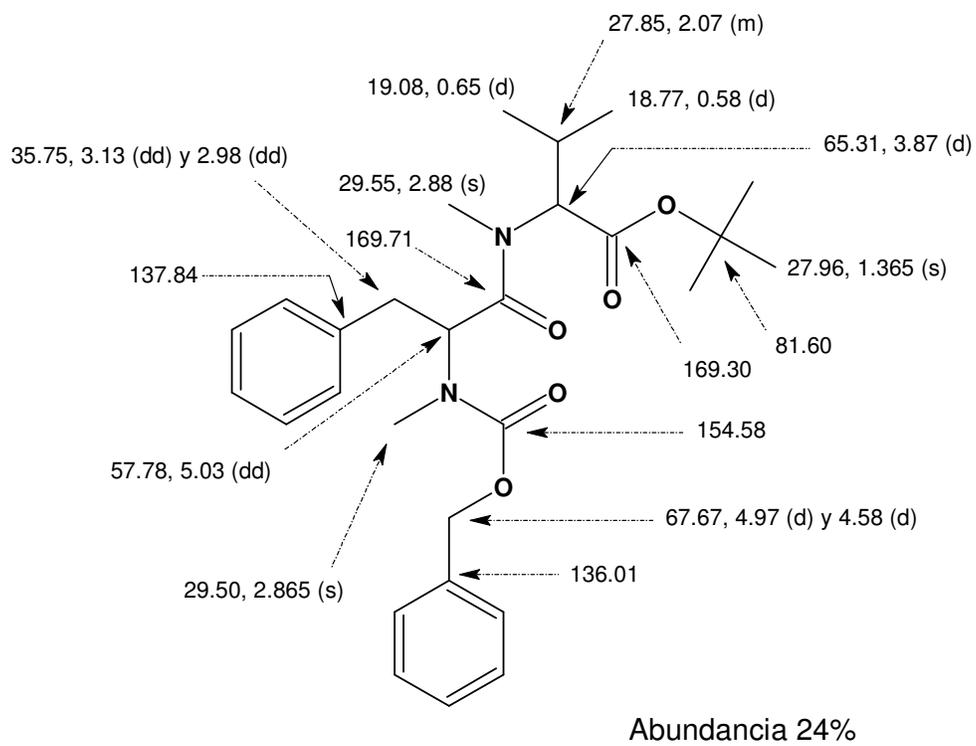
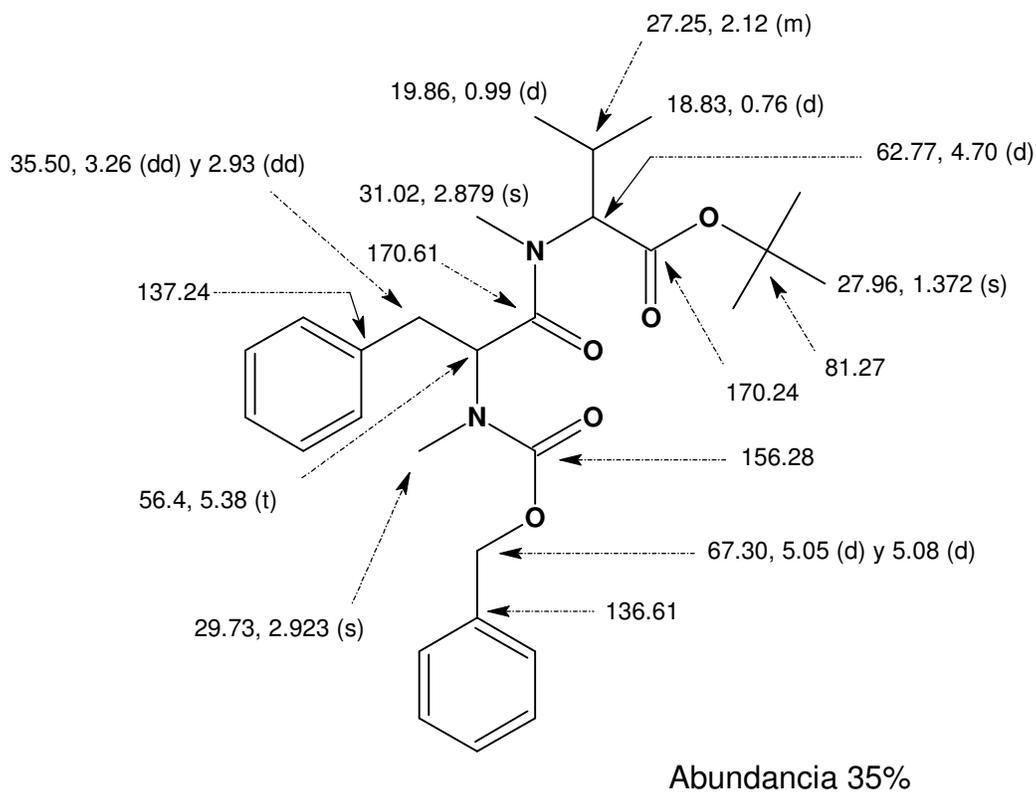
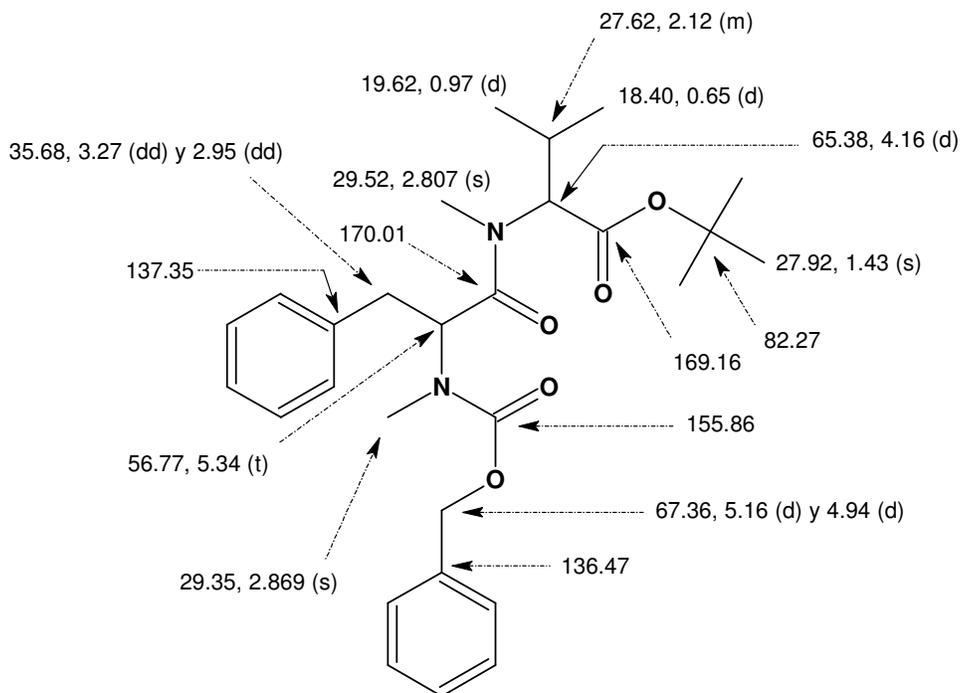
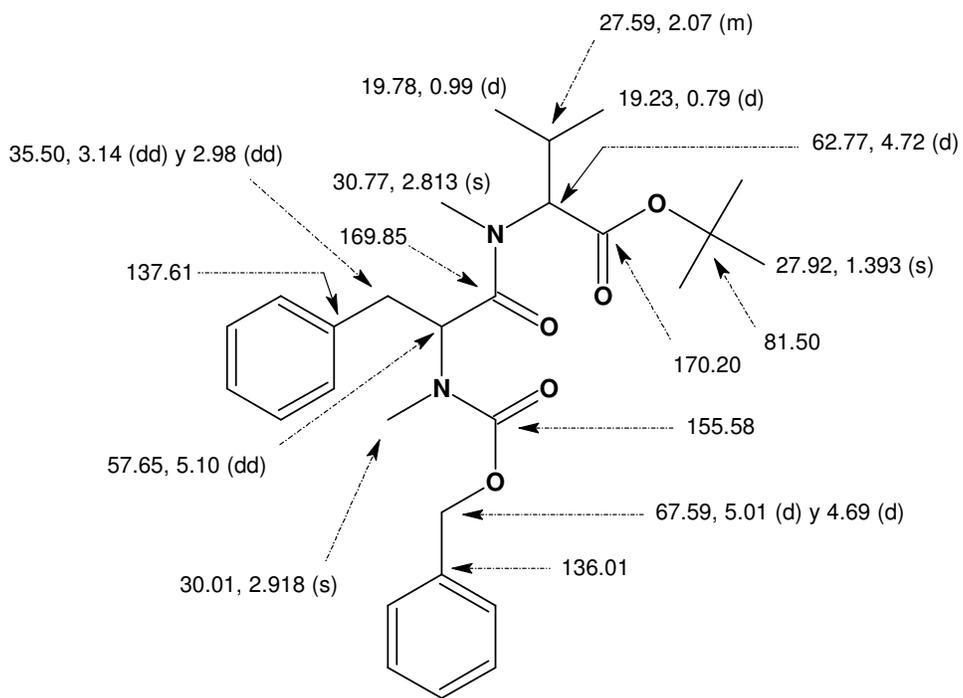


Figura 33. Caracterización espectroscópica de las cuatro formas canónicas detectadas para el éster terbutílico de *N*-(benziloxicarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**).



Abundancia 22%



Abundancia 19%

Figura 33. Continuación caracterización espectroscópica de las cuatro formas canónicas detectadas para el éster terbutílico de *N*-(benziloxicarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (25).

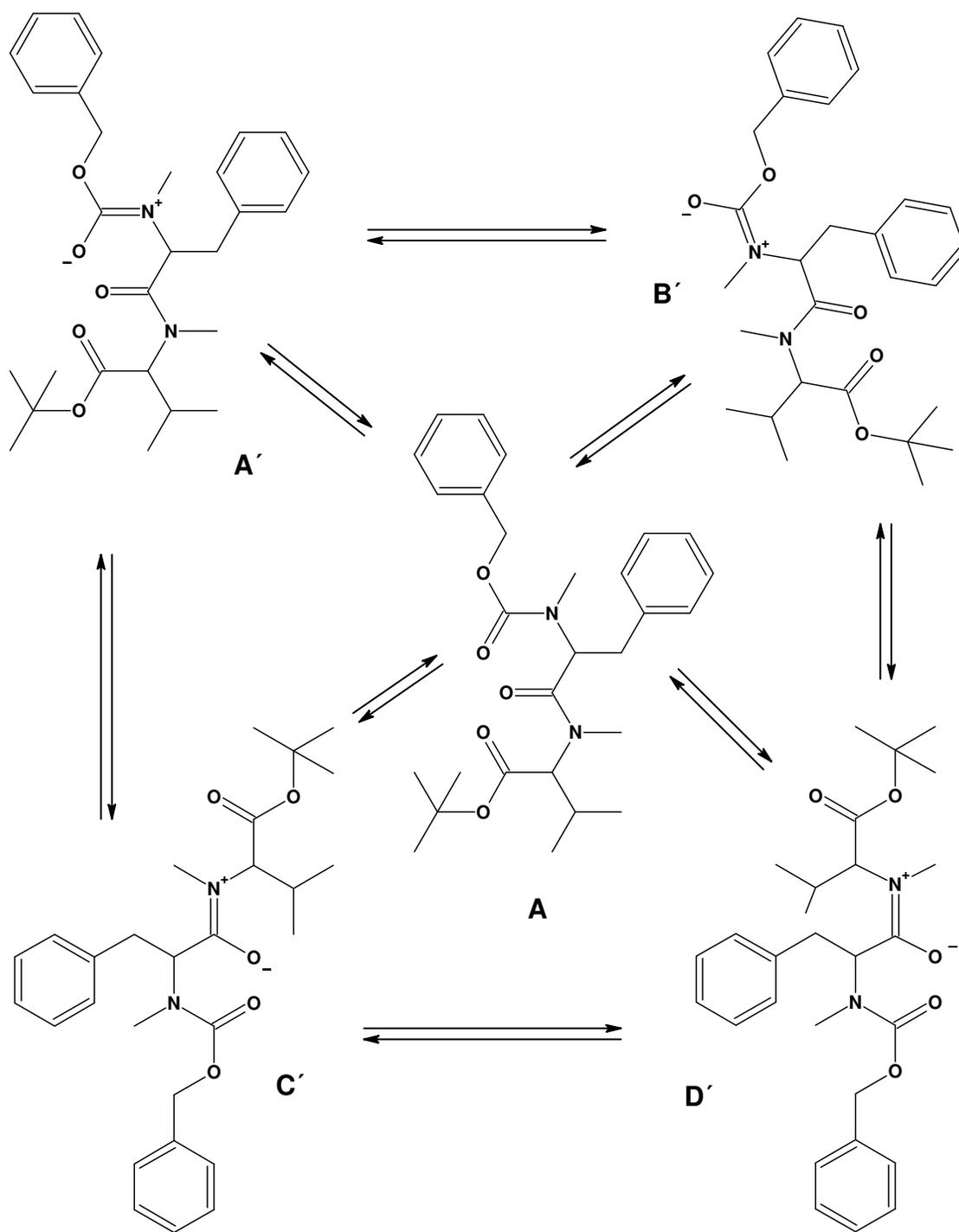


Figura 34. Interconversión entre las cuatro formas canónicas detectadas para el éster terbutílico de *N*-(beniloxicarbonyl)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (25).

Dos de los cuatro rotameros tienen la característica de presentar interacción dipolar entre los hidrógenos de los carbonos 13 y 25, mientras que los otros dos rotameros carecen de efecto nuclear Overhauser entre dichos hidrógenos.

Además para comprobar que el comportamiento espectroscópico del dipéptido **25** debido a la presencia de las estructuras canónicas propuestas en la figura 34 se realizó un estudio a diferentes temperaturas. Los experimentos de RMN ^1H a temperatura variable ofrecen información acerca del equilibrio conformacional del dipéptido **25**, que nos asegura la existencia de un solo compuesto que se encuentra en equilibrio químico a temperaturas de 100 °C. Según lo observado al incrementar la temperatura y determinar un espectro de RMN ^1H , la complejidad de señales de los protones se simplifica por la coalescencia de señales, debido a la rápida interconversión entre las formas canónicas. Estos estudios se hicieron a 25, 50, 65, 80, 90 y 100 °C en $\text{CDCl}_2\text{CDCl}_2$. (Figuras 35-40 del anexo B)

Como se puede ver con el dipéptido **25**, el análisis de RMN 1D y 2D es exhaustivo y puede aplicarse para comprender los casos de los dipéptidos **26**, **27**, **28**, **29** y **30** donde también se tiene la presencia de formas canónicas en solución para estos dipéptidos. Solo se muestra su espectro de RMN ^1H en el anexo B como figuras 41, 42, 43, 44 y 45 respectivamente. El análisis de su resonancia magnética nuclear ya no se efectuó de forma tan detallada, pero en los espectros presentados se observan las señales características de cada estructura, la cual es apoyada por su EM.

7. Conclusiones

- Se logró la obtención de los dipéptidos intermediarios utilizados en la síntesis de las Ulongamidas A, B y C.
- La C-protección del aminoácido C-terminal de los dipéptidos se realizó por su conversión al éster terbutílico o bien a su terbutilcarbazonato.
- Se efectuó la reacción de *N*-metilación por el método de Benoiton para los dos primeros aminoácidos. Para el caso del derivado de tirosina se requirió el uso de un catalizador de transferencia de fases para lograr la *N, O*-dimetilación, dando lugar a su vez a la *O*-protección del grupo hidroxilo.
- Se llevo a cabo la *N*-protección de los aminoácidos L-Phe, L-Val y L-Tyr con el grupo benciloxicarbonilo de forma efectiva.
- Los agentes acoplantes BOP y BOP-Cl resultaron ser los más efectivos para el acoplamiento de aminoácidos impedidos estéricamente en comparación con la DCC.
- **Se caracterizó de forma completa al dipéptido 25 por RMN 2D, la estructura del dipéptido 25 se presenta en cuatro formas canónicas en solución (CDCl₃) detectadas a través del fenómeno EXSY y apoyada por los estudios de RMN ¹H a diferentes temperaturas hasta la coalescencia de las diferentes señales de los protones.**

8. Anexo A: espectros selectos de RMN ^1H de derivados de aminoácidos.

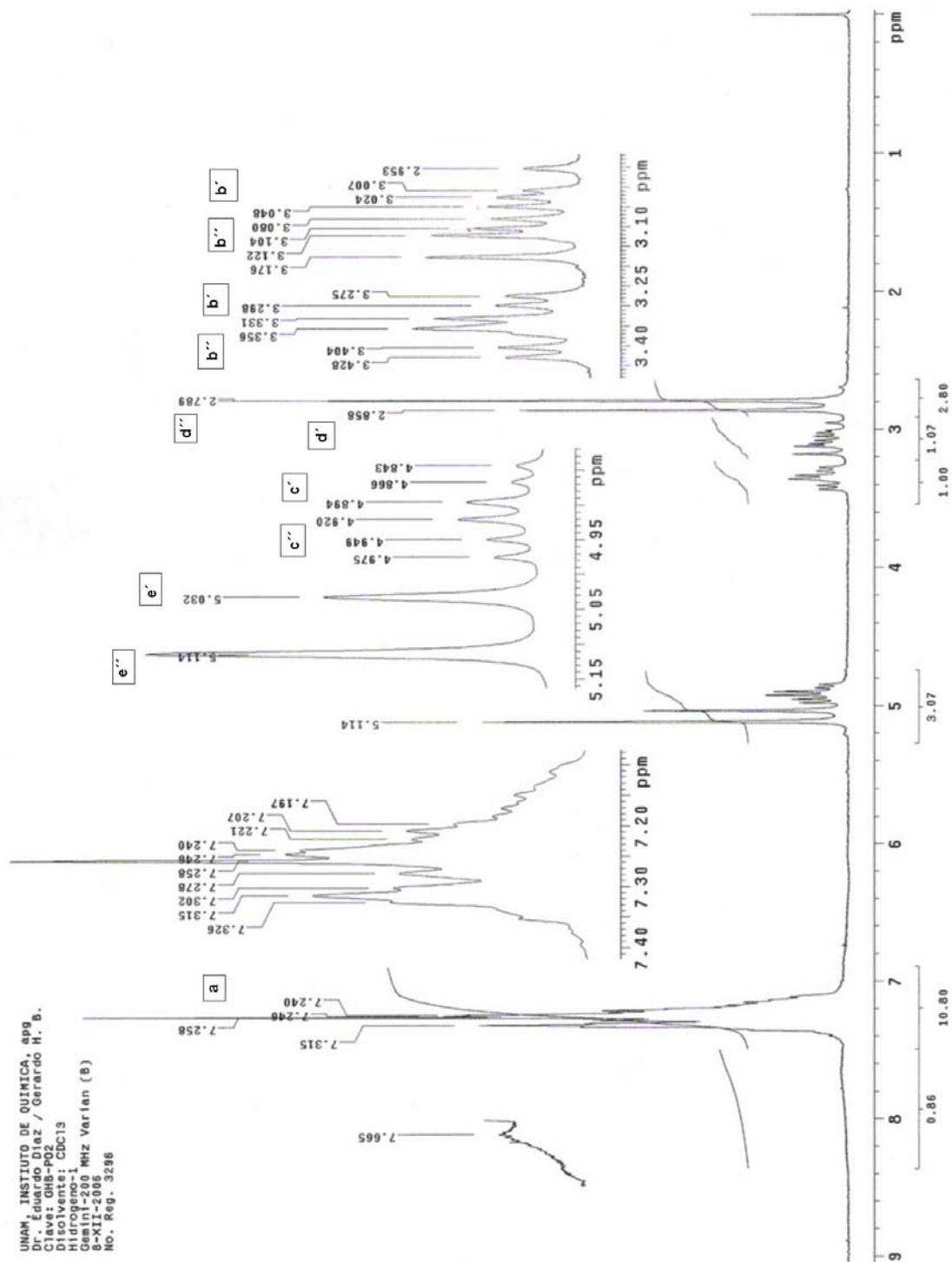


Figura 18. Espectro de RMN ^1H de *N*-(benziloxicarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanina (**38**).

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, aqg
 Dr. Eduardo Diaz / Gerardo H.B.
 Clave: GHB-V08
 Disolvente: CDCl3
 Hidrogeno-1
 Gemini-200 MHz, Varian (B)
 14-V-2007
 No. Reg. 1391

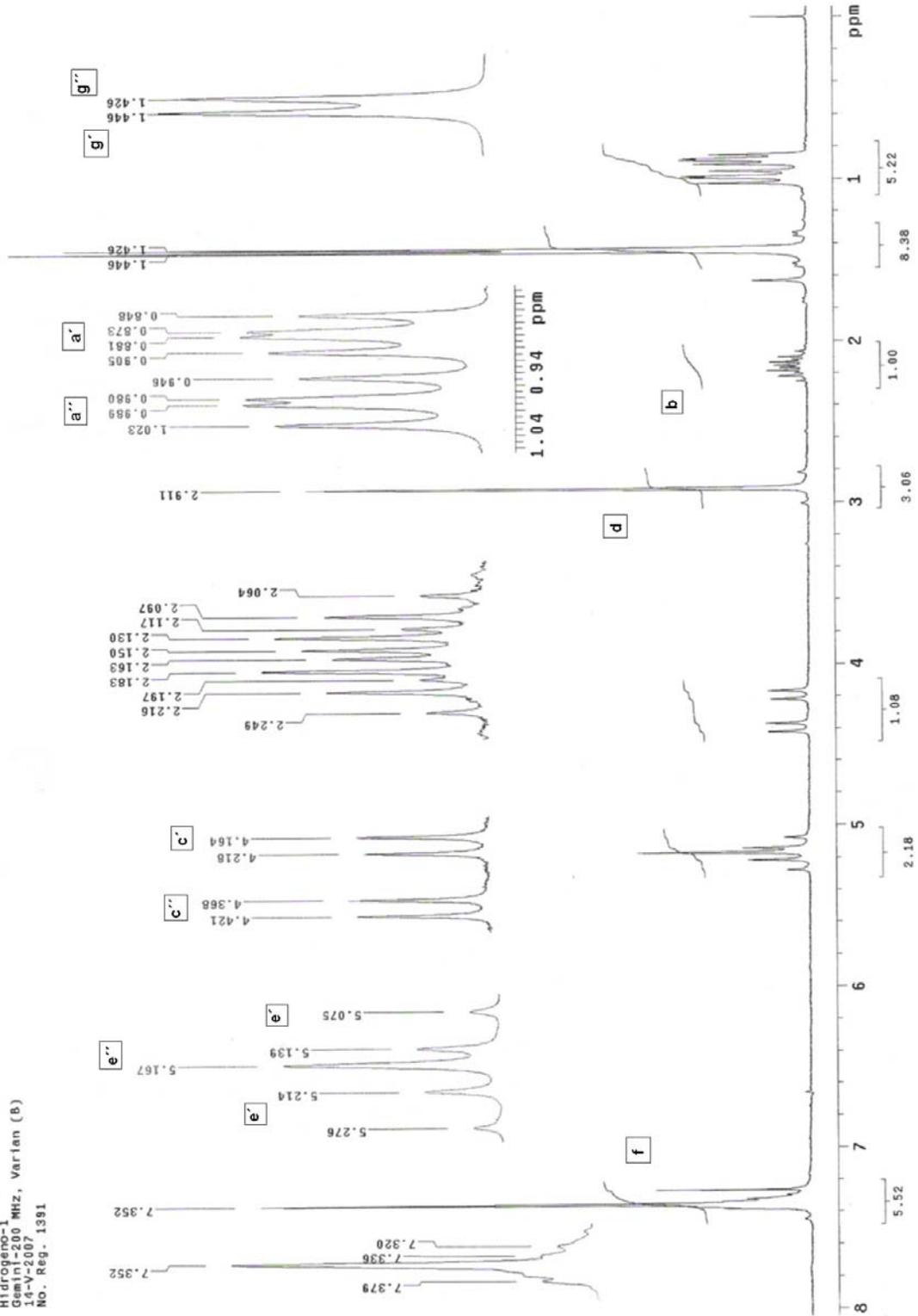


Figura 19. Espectro de RMN ^1H del éster terbutílico de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-*L*-valina compuesto precursor de **43**.

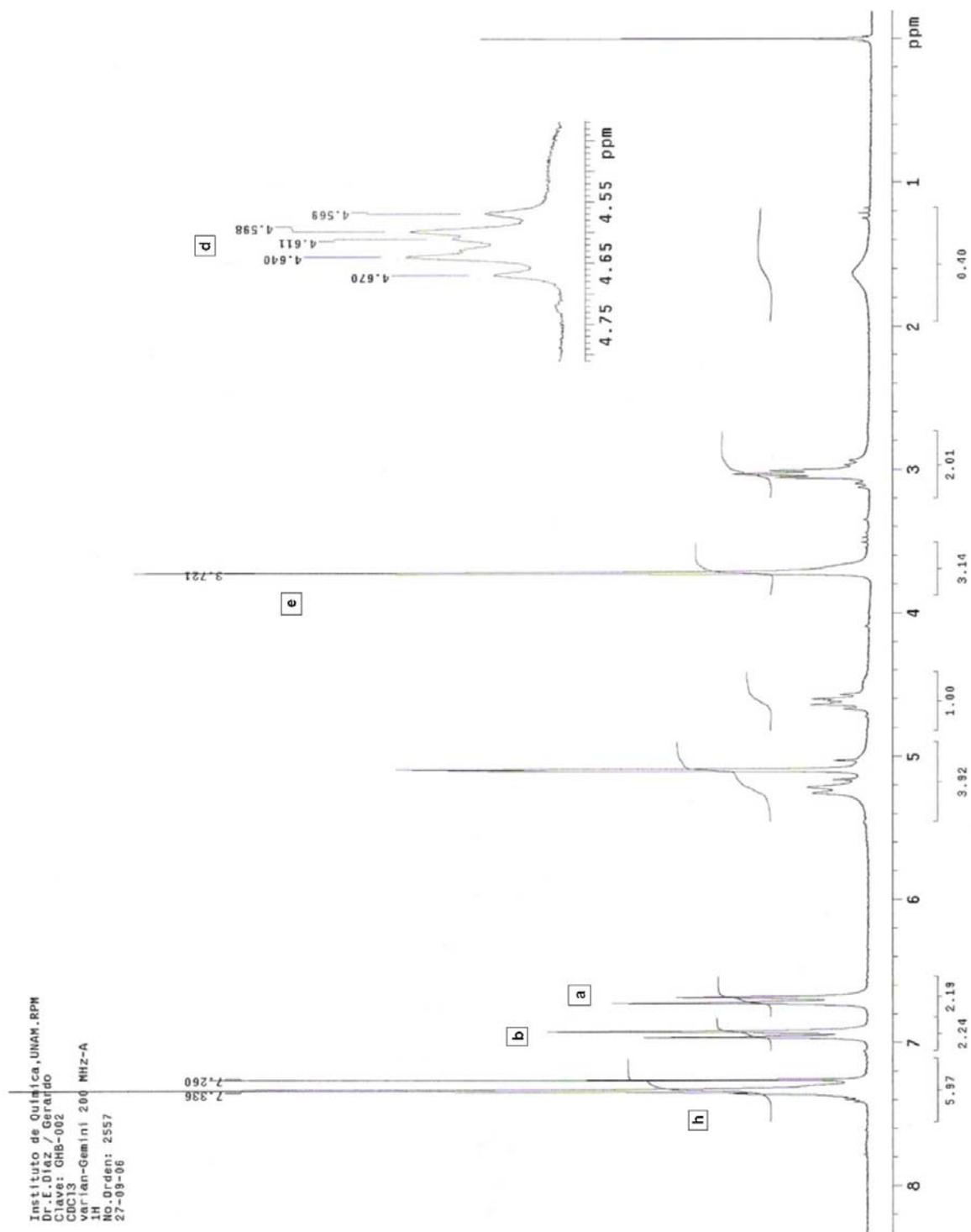


Figura 20. Espectro de RMN ^1H del éster metílico de *N*-(benciloxicarbonil)-*L*-tirosina (**45**).

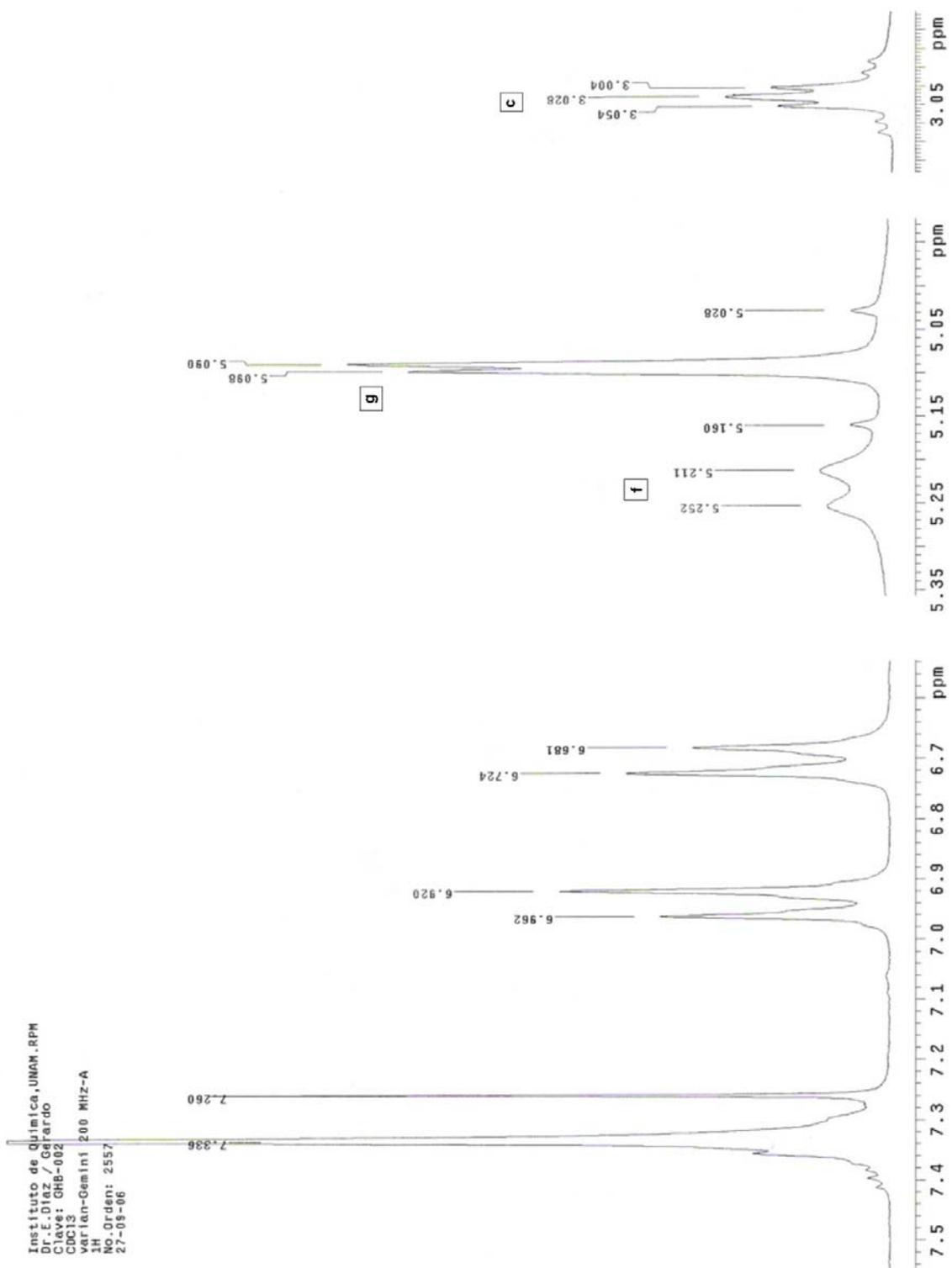


Figura 20. Expansiones del espectro de RMN ^1H del éster metílico de *N*-(benciloxicarbonil)-*L*-tirosina (**45**).

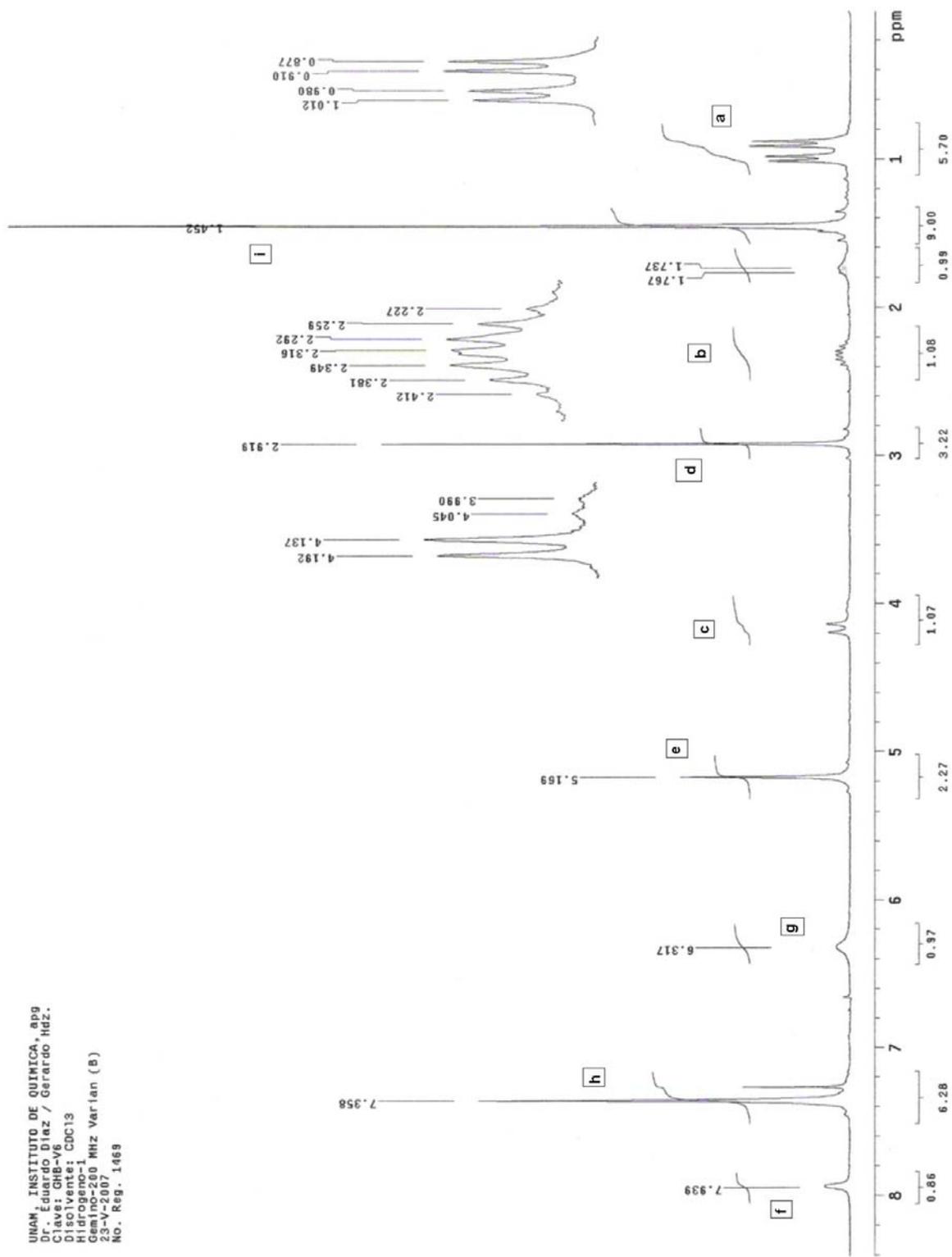


Figura 21. Espectro de RMN ¹H de terbutilcarbazato de *N*-(benciloxicarbonyl)-*N*-metil-L-valina compuesto precursor de **48**.

9. Anexo B: espectros de RMN de los dipéptidos sintetizados.

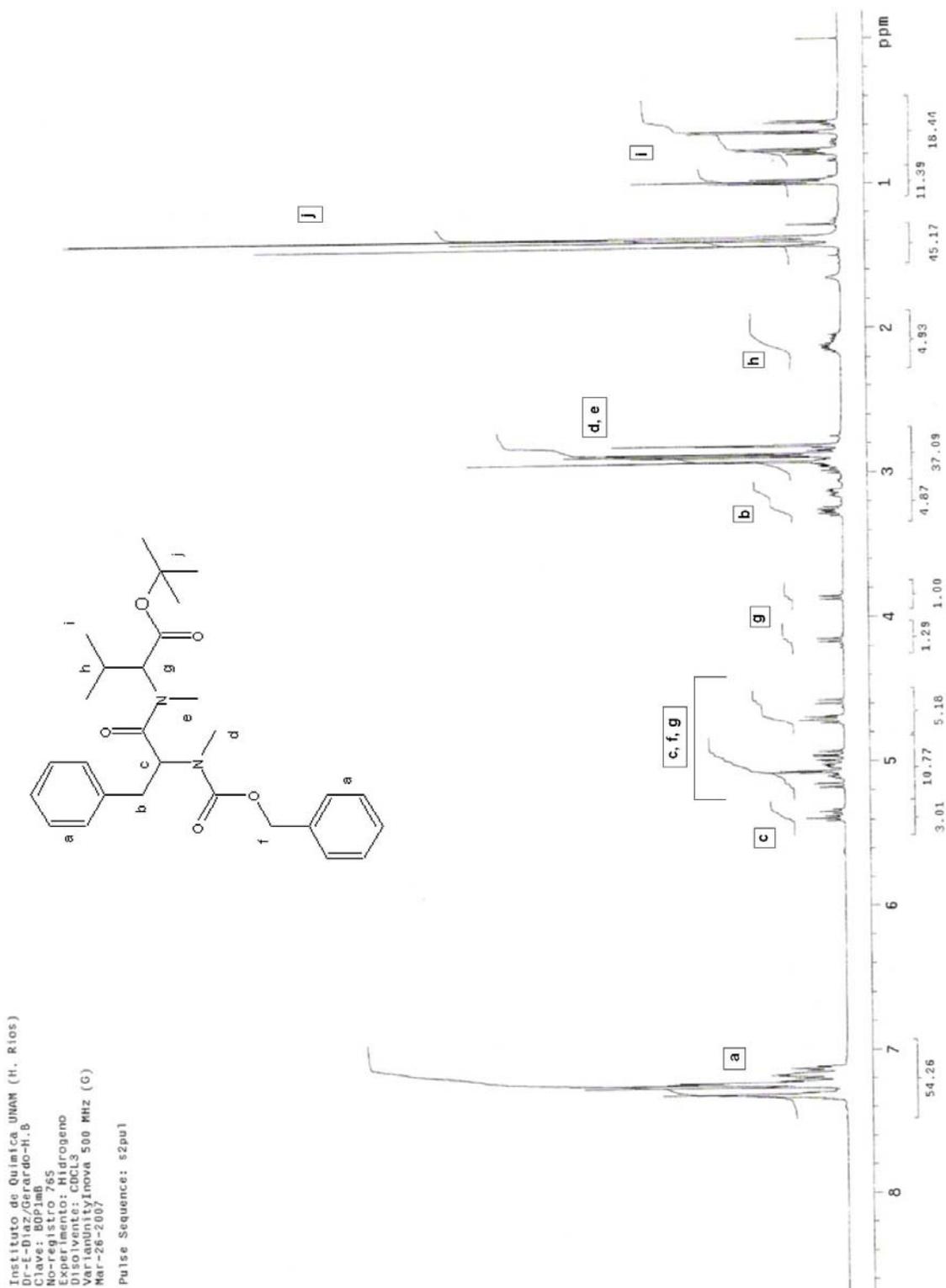


Figura 22. Espectro de RMN ^1H del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (25).

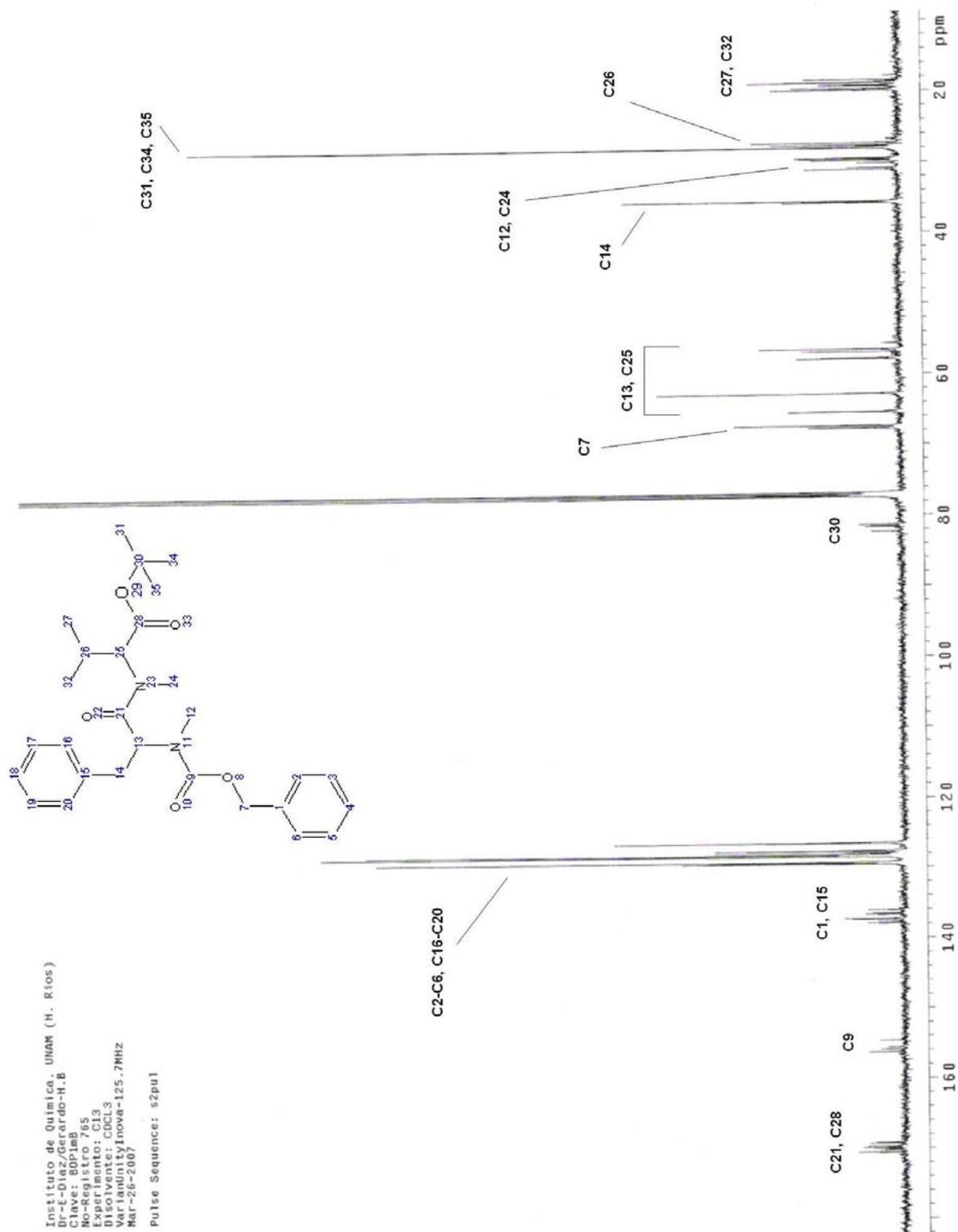


Figura 23. Espectro de RMN ¹³C del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**).

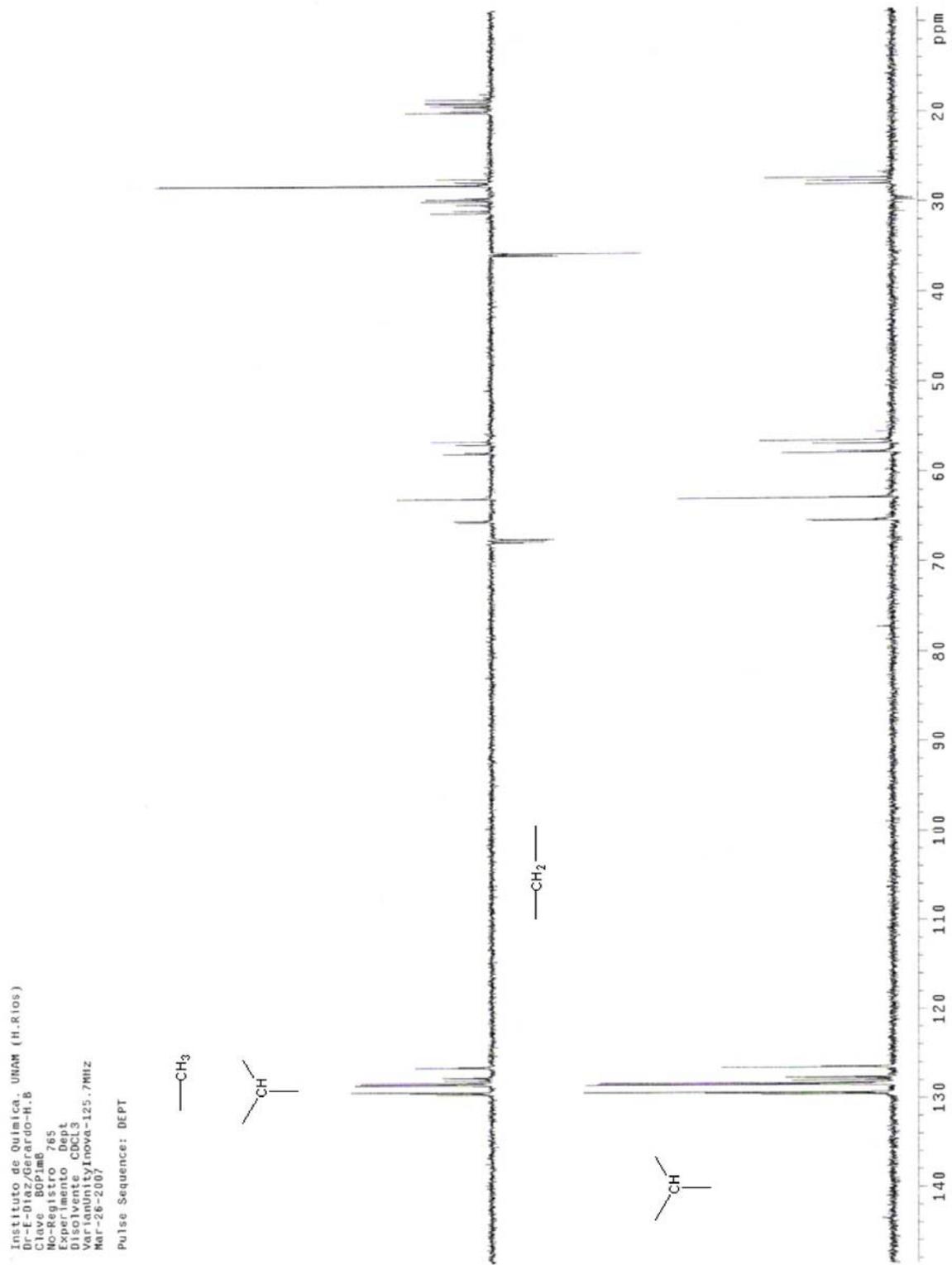


Figura 24. Estudio DEPT para el éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**).

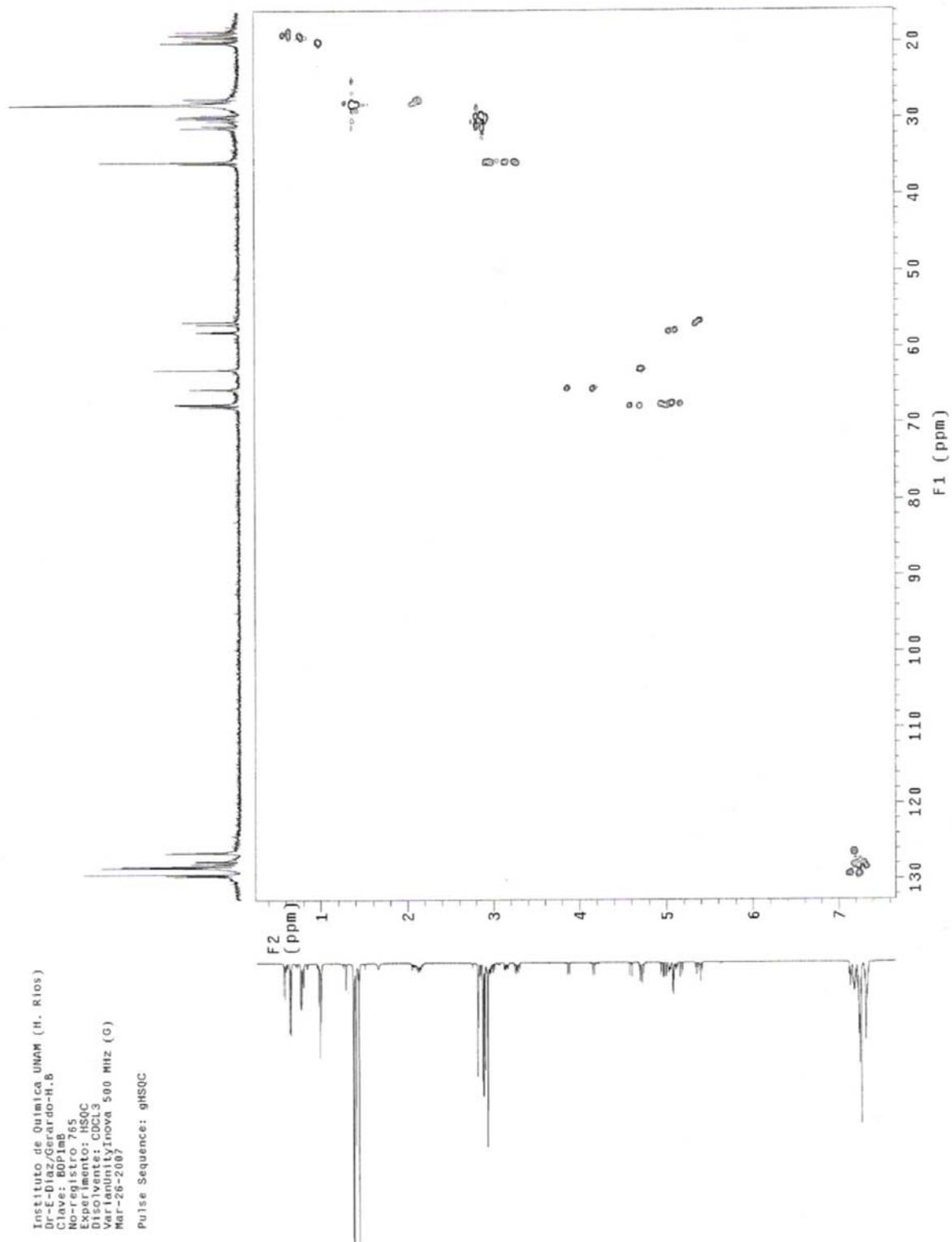


Figura 25. Estudio HSQC para el éster *tert*-butilico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**).

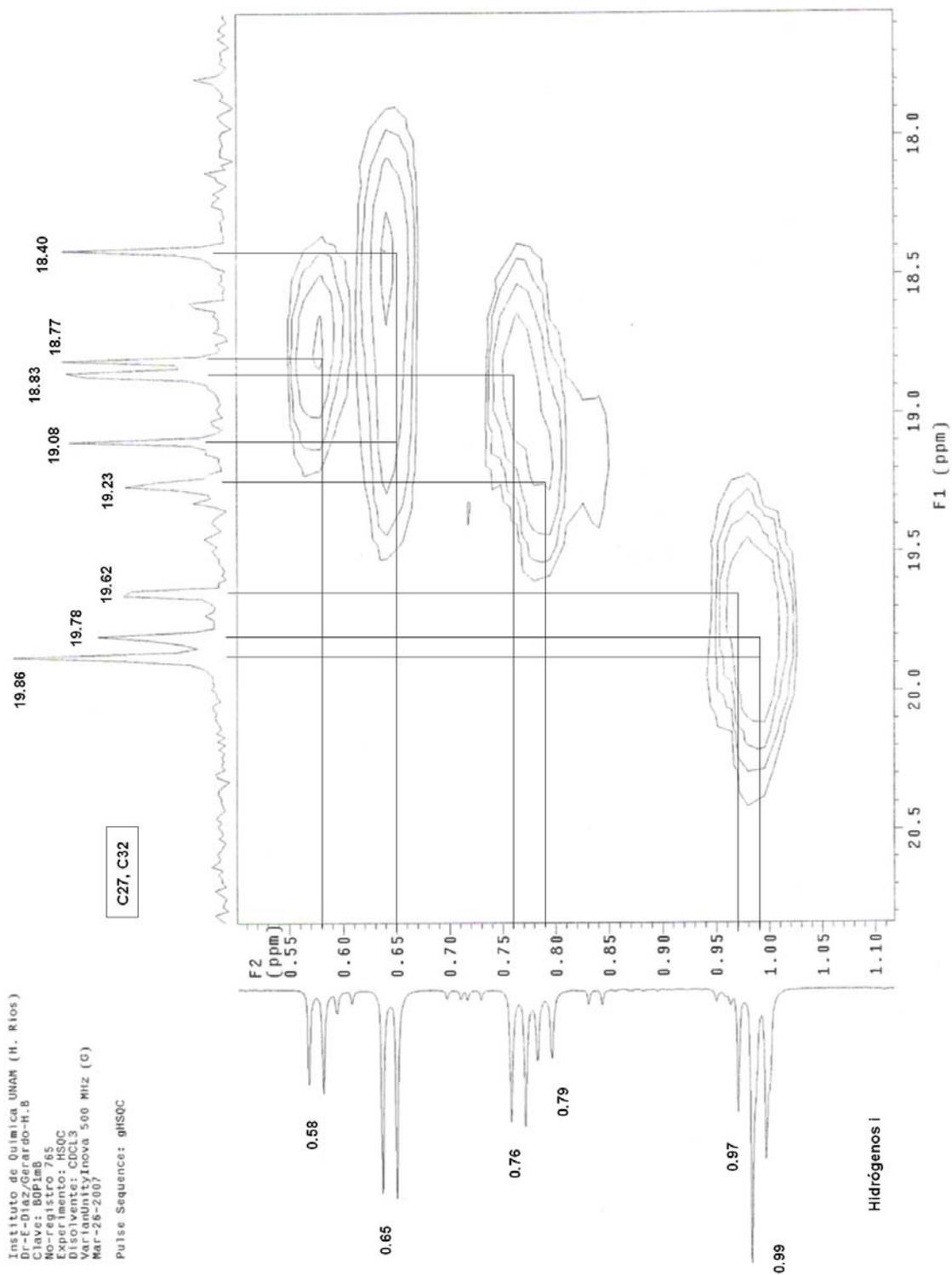


Figura 26. Expansión del estudio HSQC para el éster terbutílico de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**), donde se muestra la correlación entre carbonos e hidrógenos de los metilos del isopropilo.

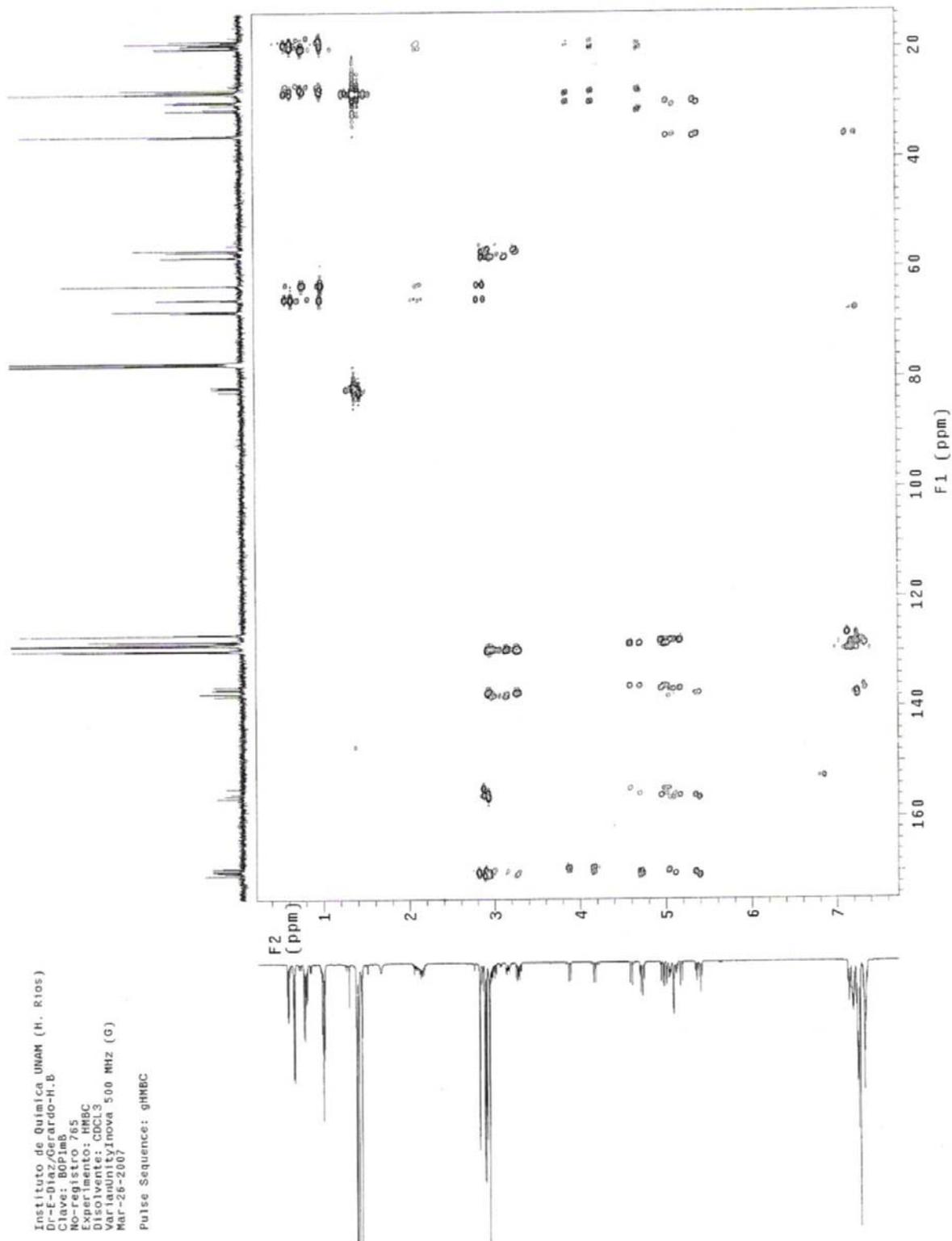


Figura 27. Estudio HMBC para el éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**).

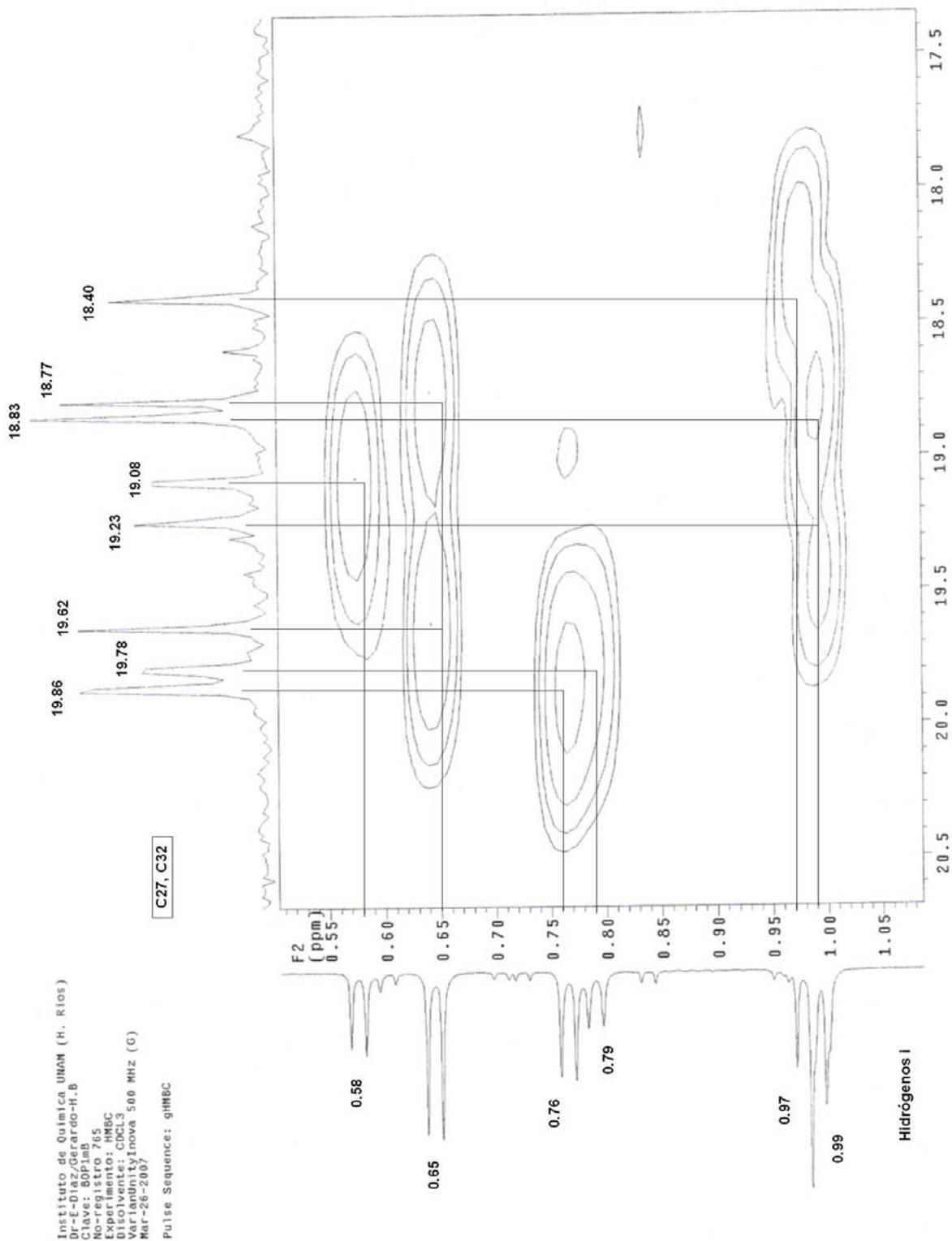


Figura 28. Expansión del estudio HMBC para el éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**), donde se muestra la correlación entre carbonos e hidrógenos de los metilos del isopropilo a través de tres ligaduras σ .

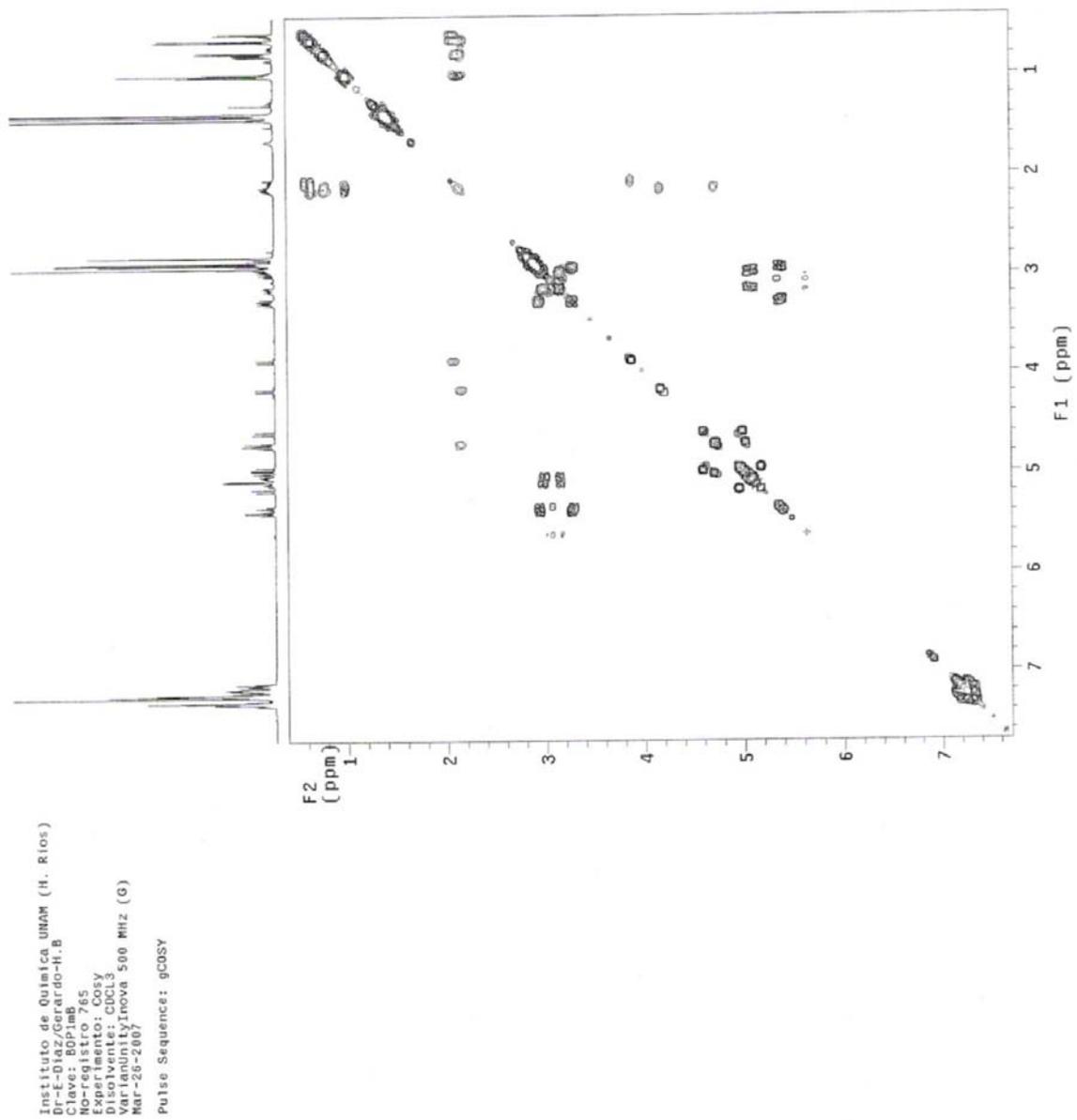


Figura 29. Estudio COSY para el éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**).

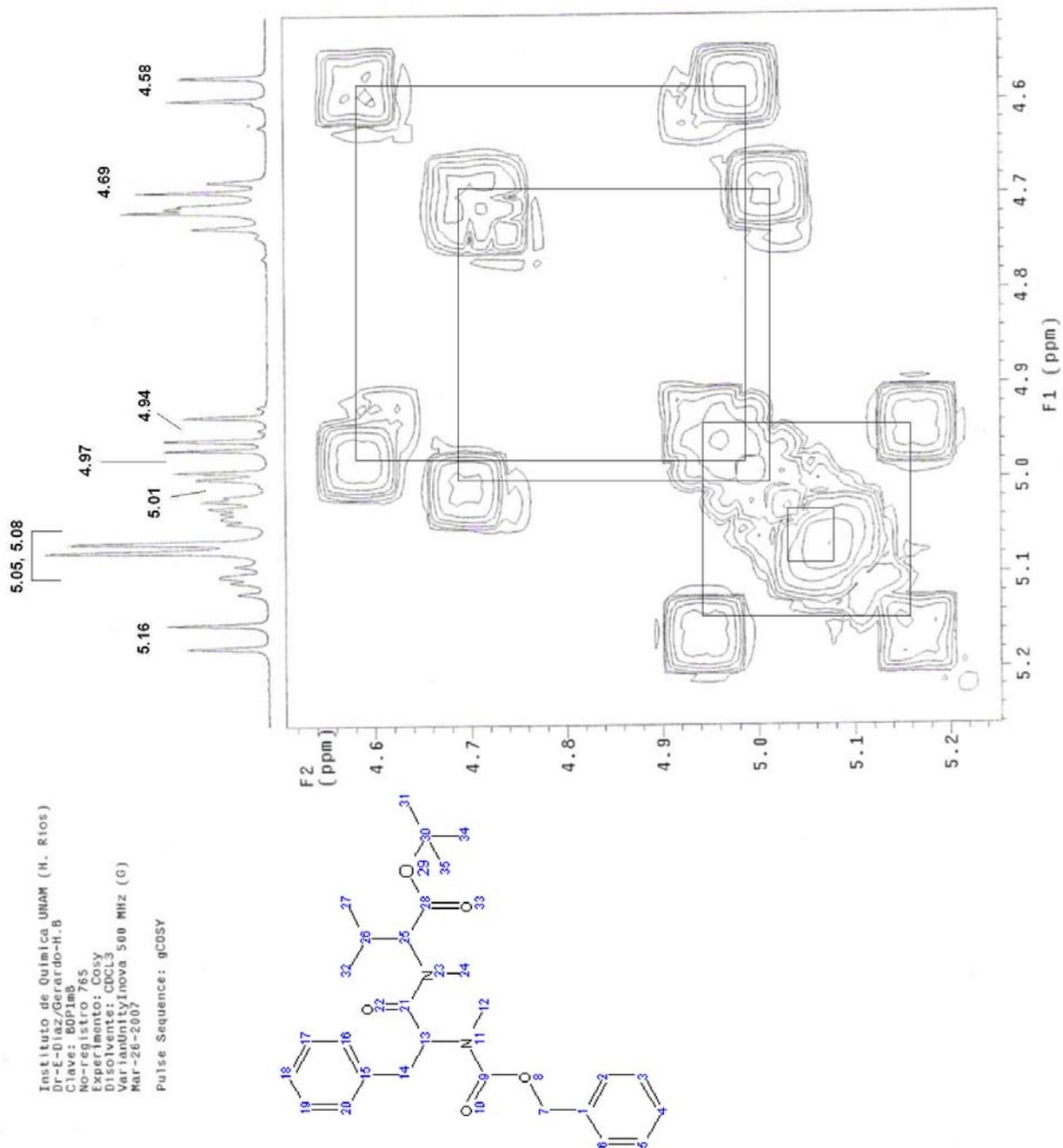
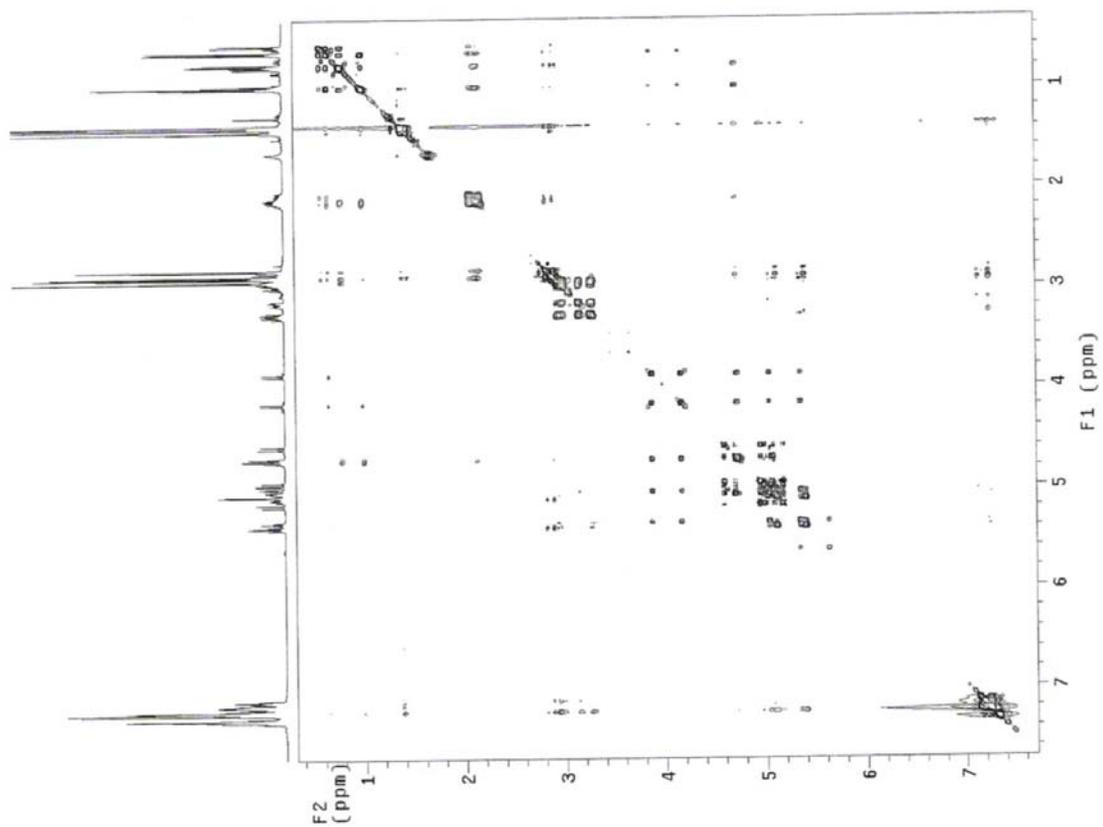


Figura 30. Expansión del estudio COSY para el éster terbutílico de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**), donde se muestra la correlación entre hidrógenos geminales del carbono 7.



Instituto de Química UNAM (H. Ríos)
 Dr-E-Díaz/Gerardo-H.B
 Clave: 80PimB
 Registro: 1937
 Disolvente: Meesy
 VarianUnityInova 500 MHz (G)
 Abr-26-2007
 Pulse Sequence: NOESY

Figura 31. Estudio NOESY para el éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-*L*-fenilalanil-*N*-metil-*L*-valina (**25**).

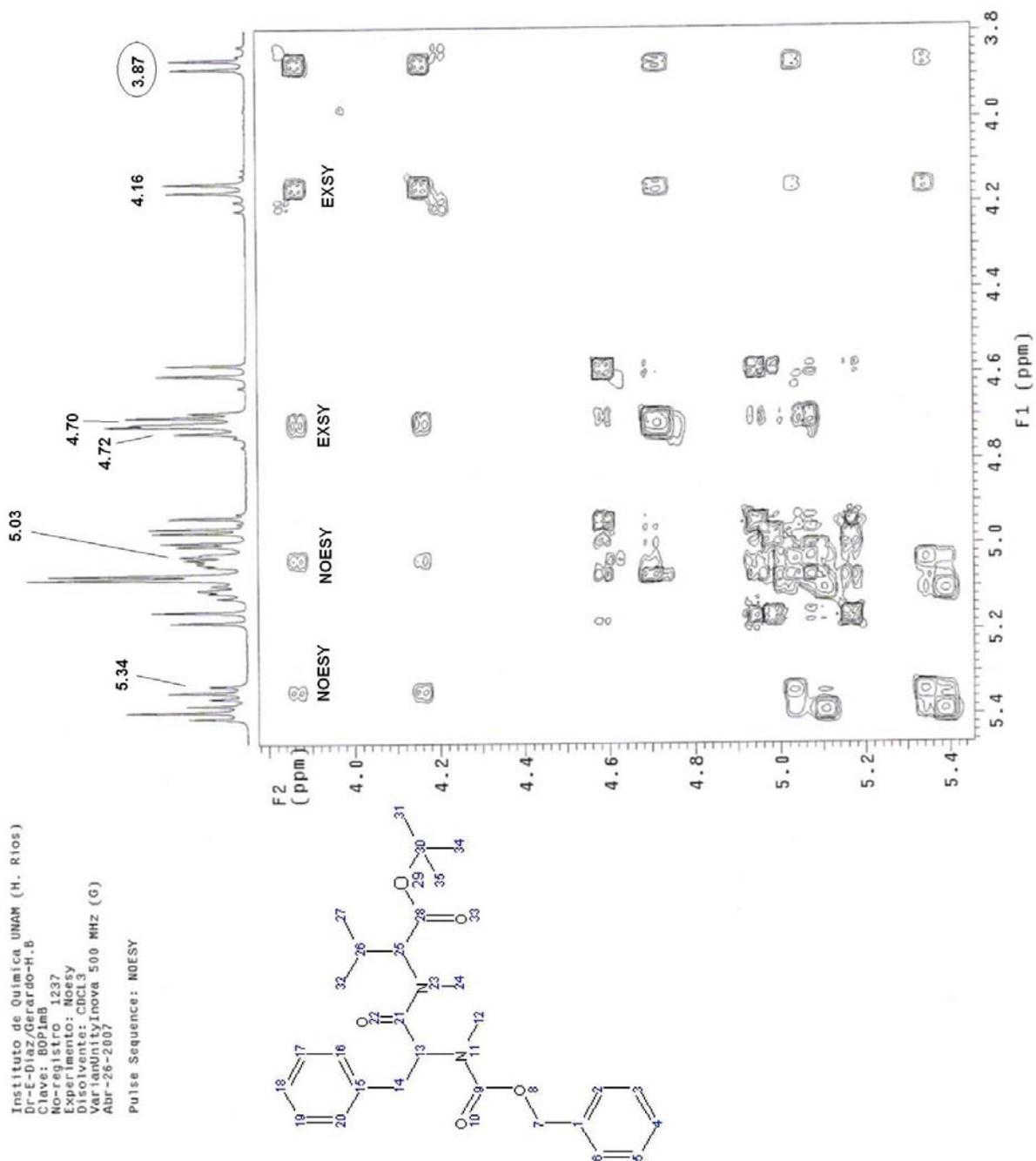


Figura 32. Expansión del estudio NOESY para el éster *tert*-butilico de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**), donde se muestra el fenómeno EXSY para el hidrógeno del metino correspondiente al carbono 25, así como su interacción en el espacio con el hidrógeno del carbono 13.

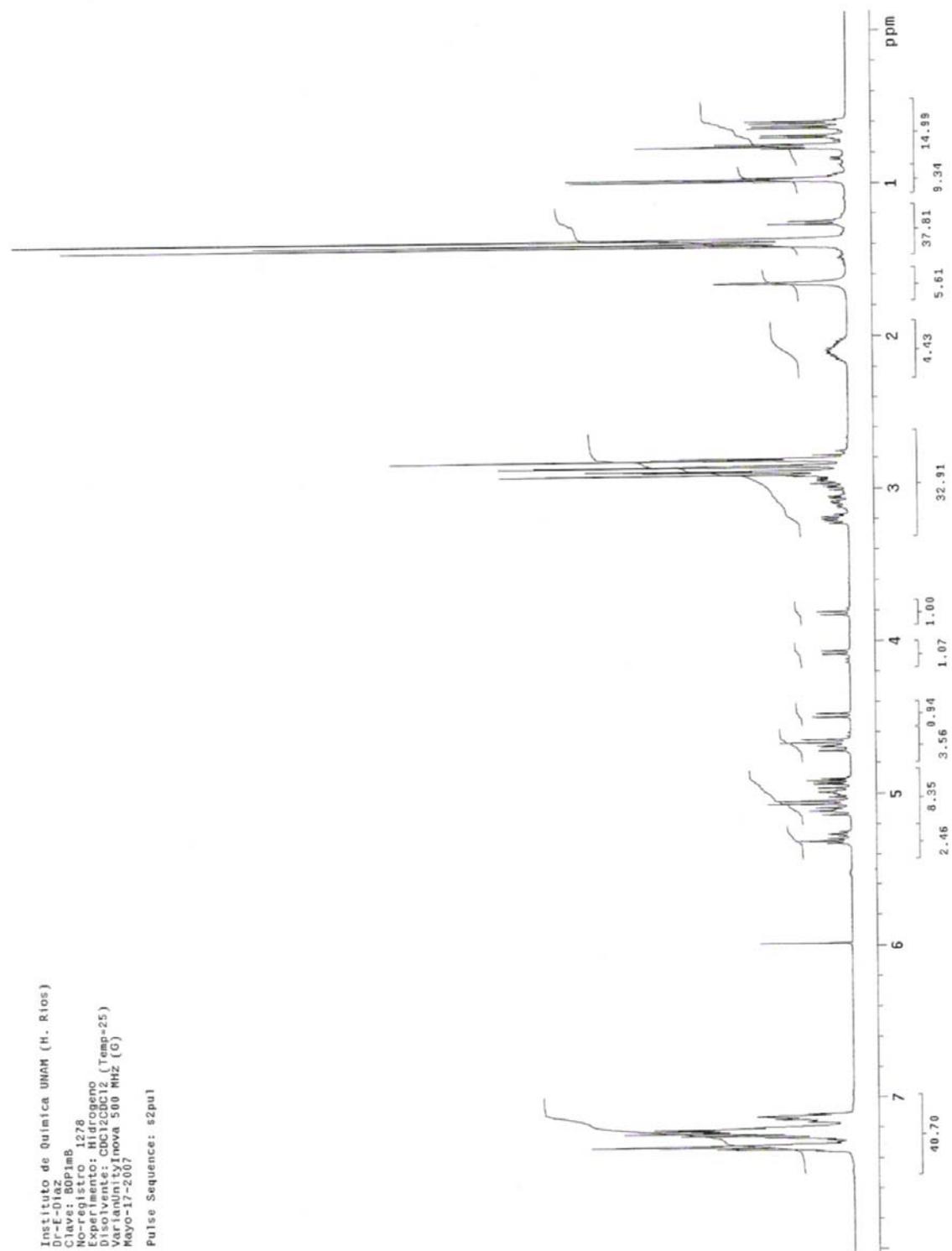


Figura 35. Espectro de RMN ¹H del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**) a 25 °C.

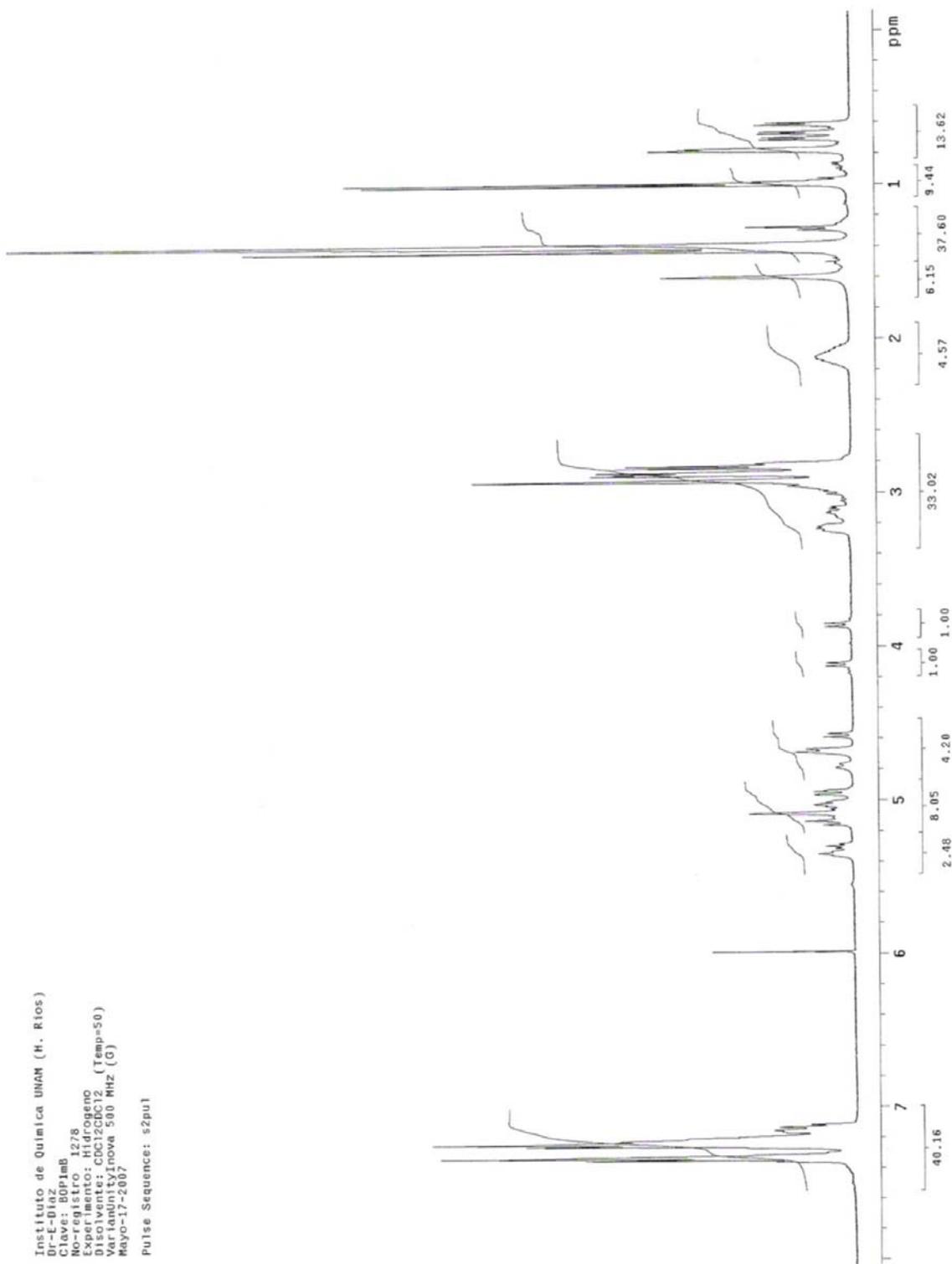


Figura 36. Espectro de RMN ¹H del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**) a 50 °C.

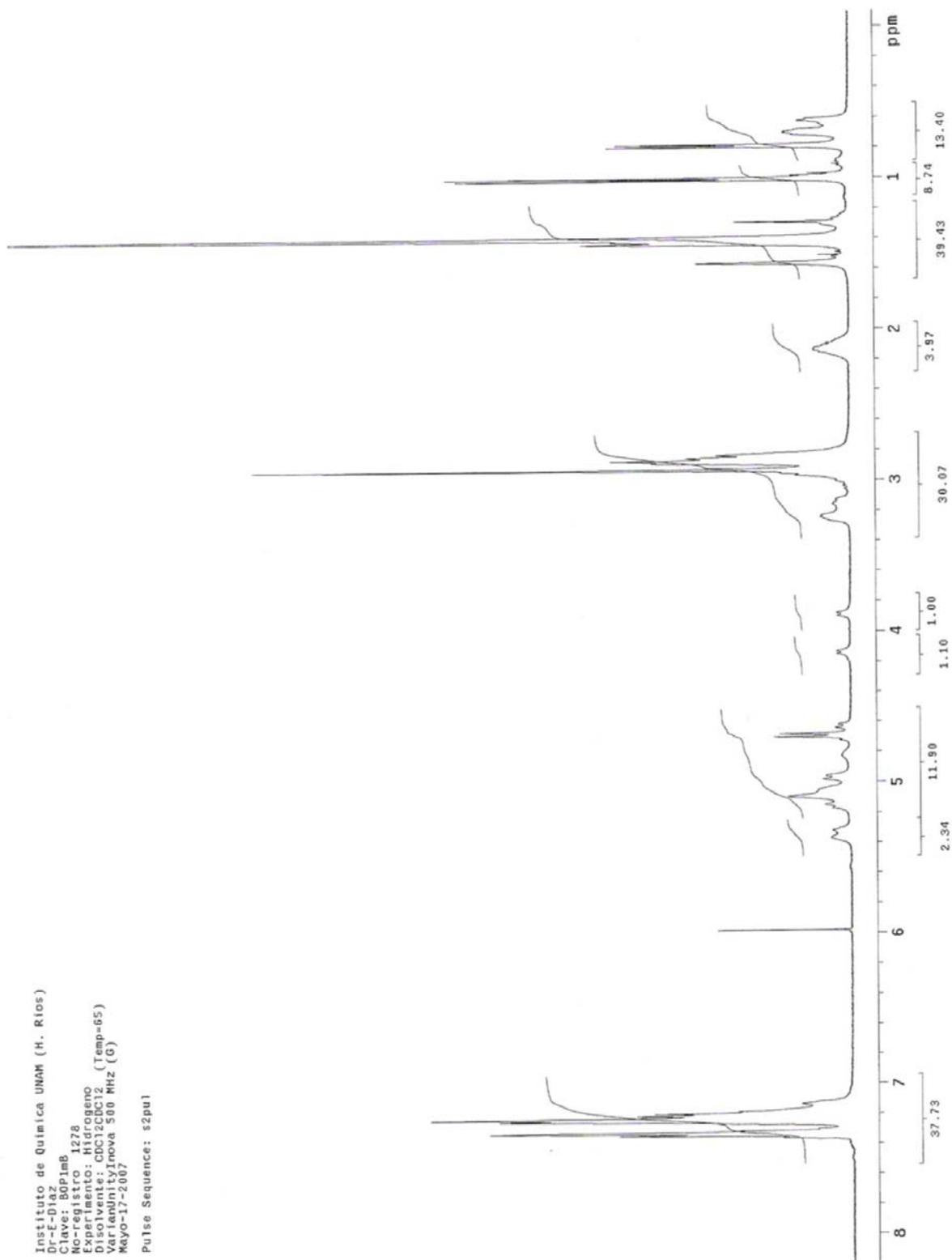


Figura 37. Espectro de RMN ^1H del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**) a 65 °C.

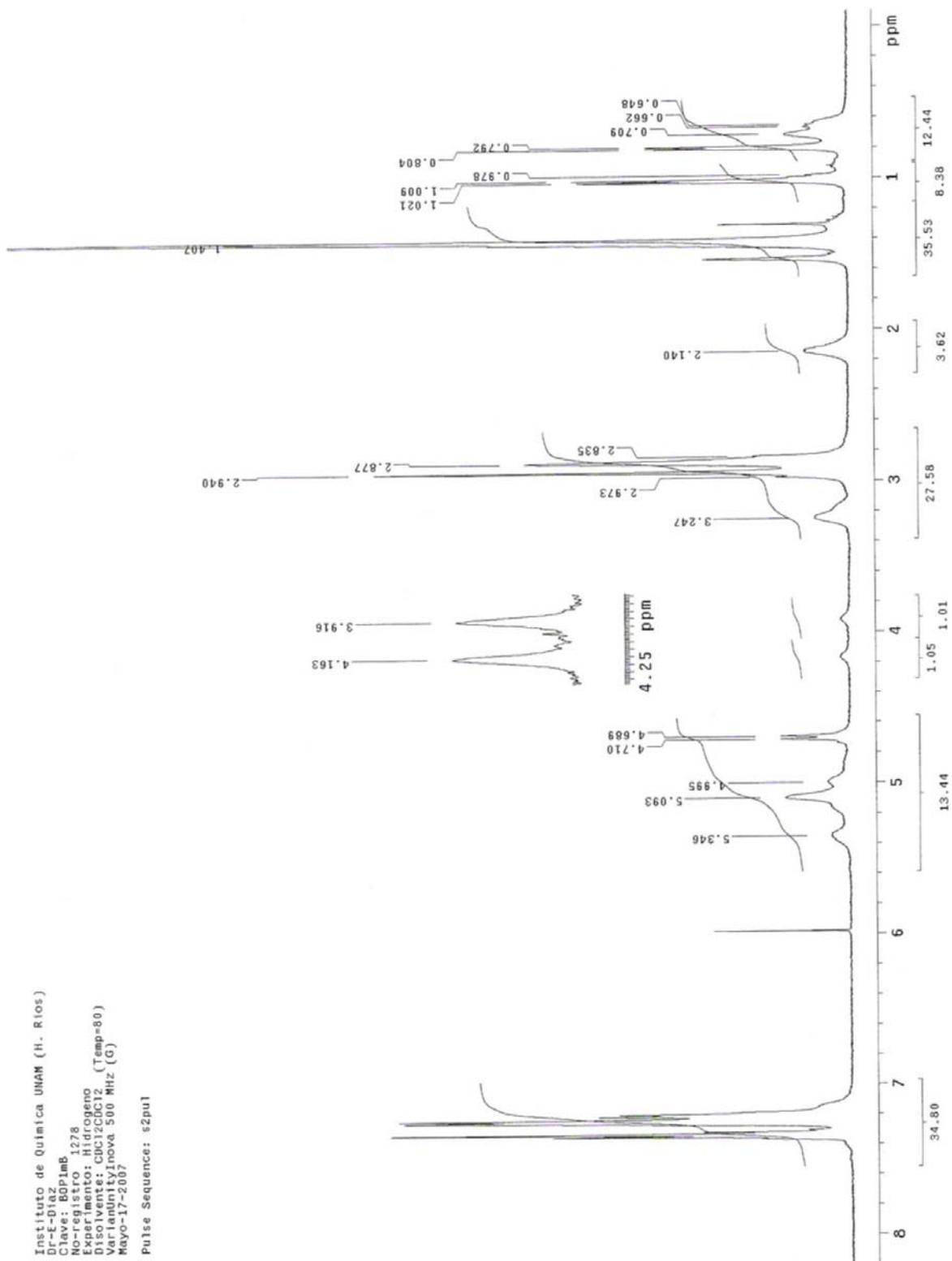


Figura 38. Espectro de RMN ^1H del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**) a 80 °C.

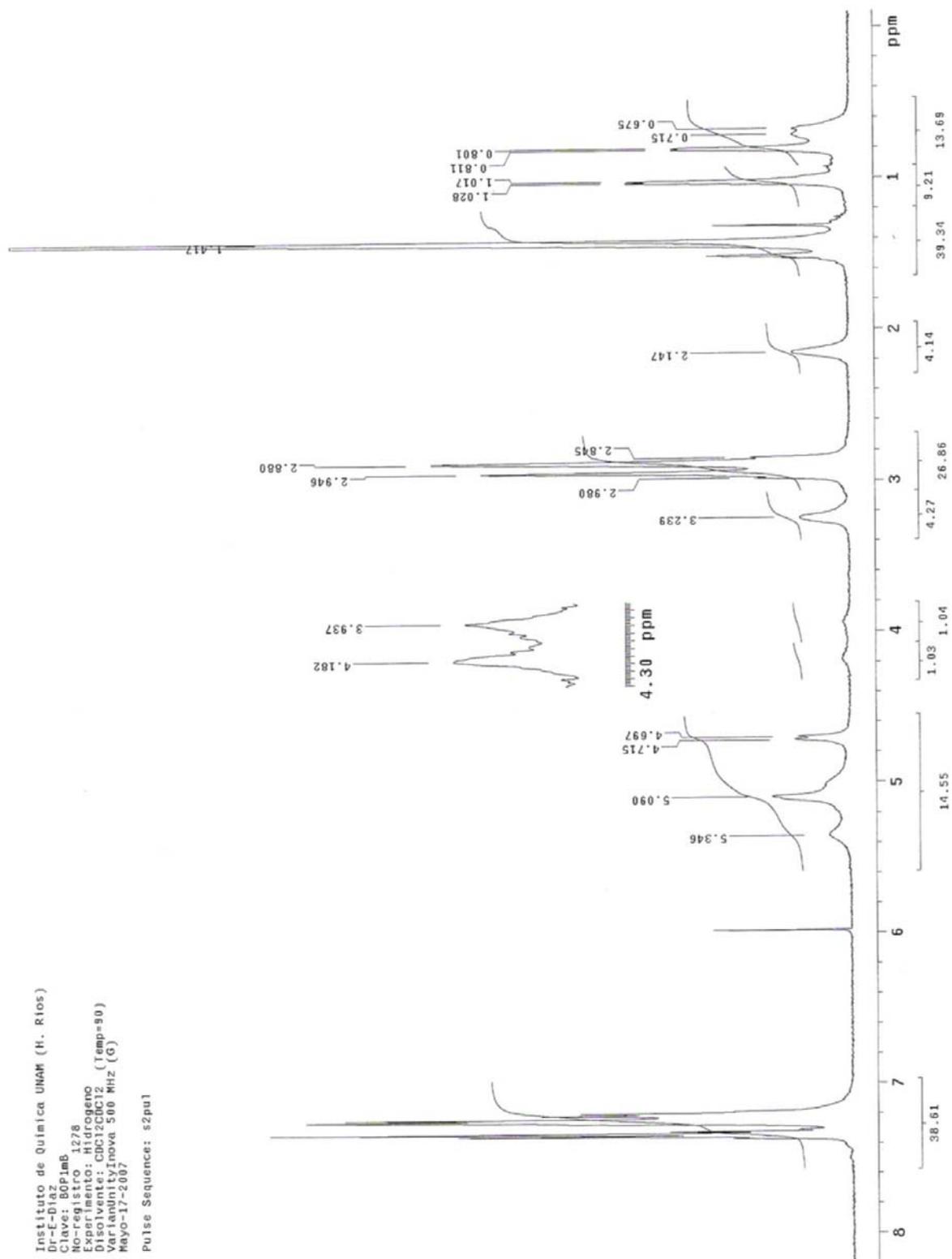


Figura 39. Espectro de RMN ¹H del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*-metil-*L*-fenilalanil-*N*-metil-*L*-valina (**25**) a 90 °C.

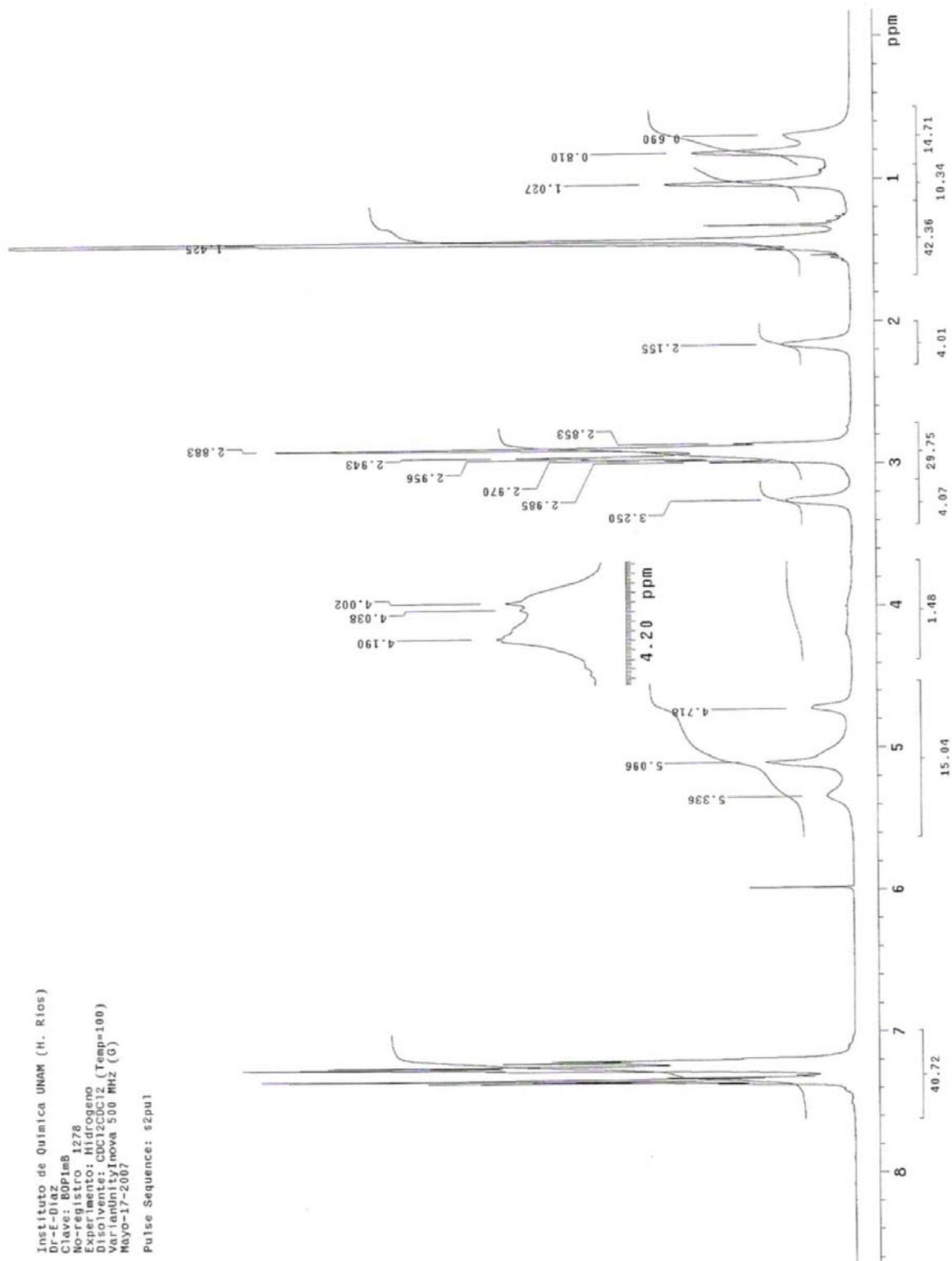


Figura 40. Espectro de RMN ¹H del éster terbutílico de *N*-(benciloxicarbonil)-*N*-metil-L-fenilalanil-*N*-metil-L-valina (**25**) a 100 °C.

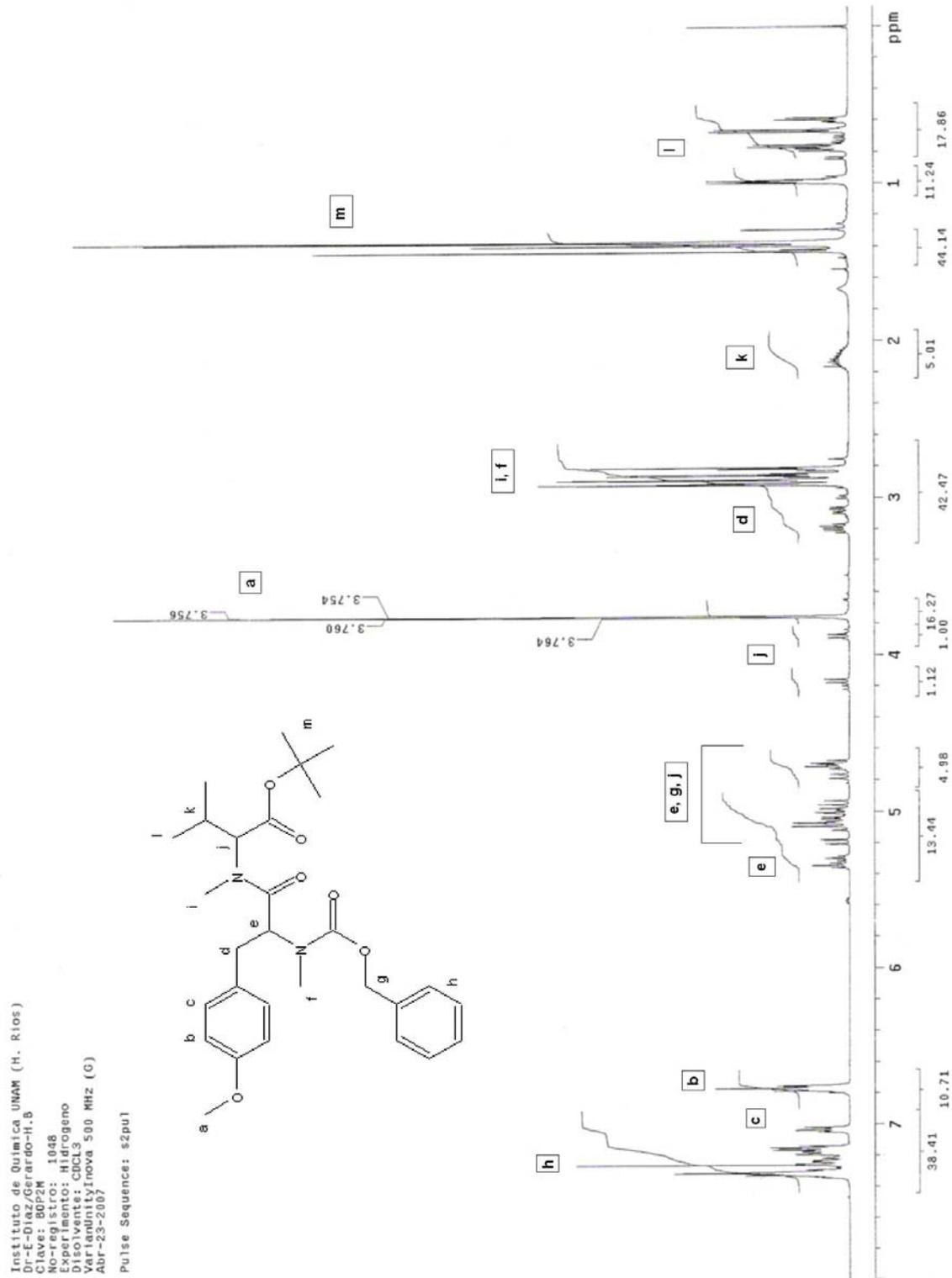


Figura 41. Espectro de RMN ¹H del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*,*O*-dimetil-*L*-tirosil-*L*-metil-*L*-valina (**26**).

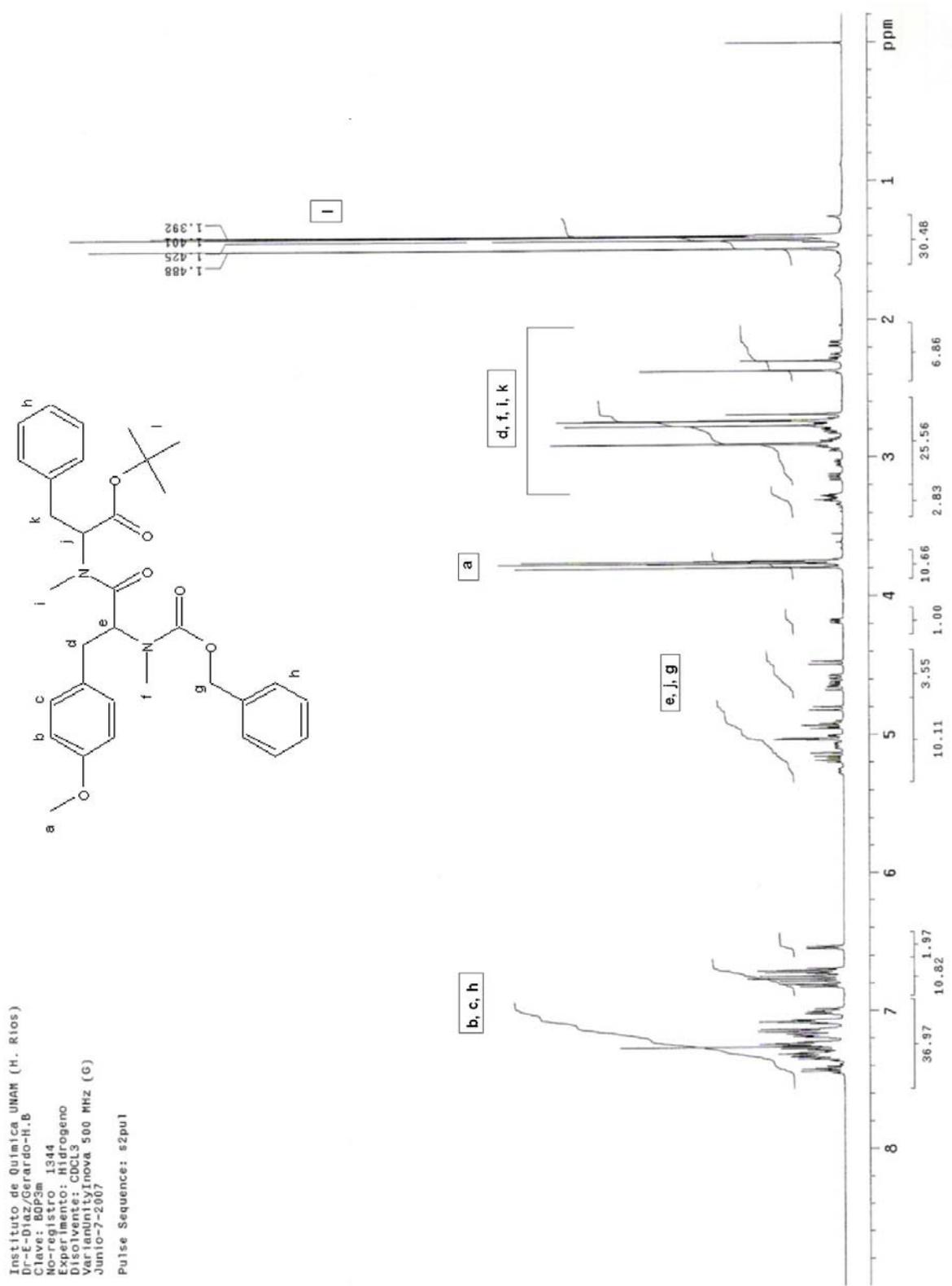


Figura 42. Espectro de RMN ¹H del éster terbutílico de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*,*O*-dimetil-*L*-tirosil-*N*-metil-*L*-fenilalanina (**27**).

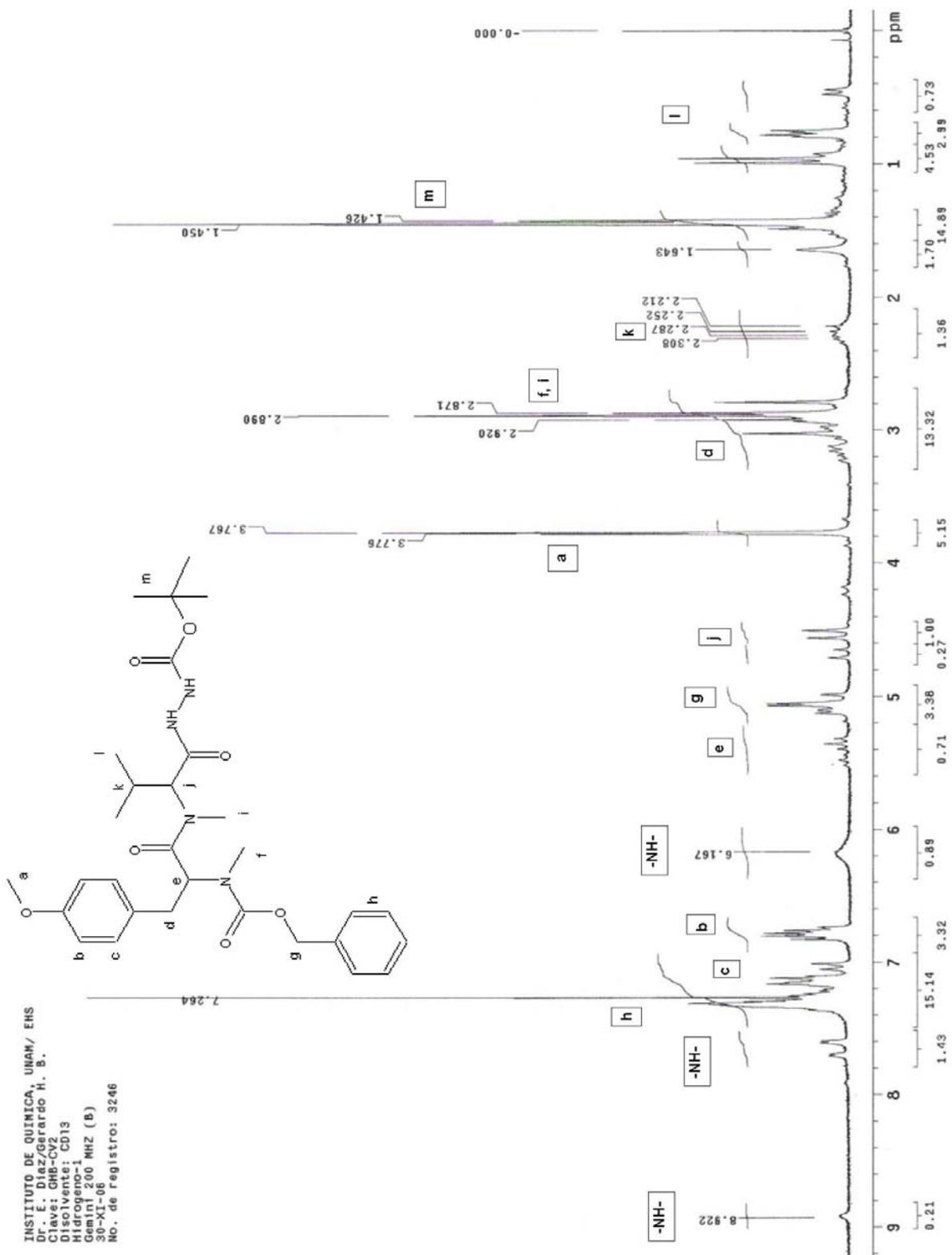


Figura 44. Espectro de RMN ¹H del terbutilcarbazato de *N*-(benciloxycarbonyl)-*N*,*O*-dimetil-*L*-tirosil-*N*-metil-*L*-valina (**29**).

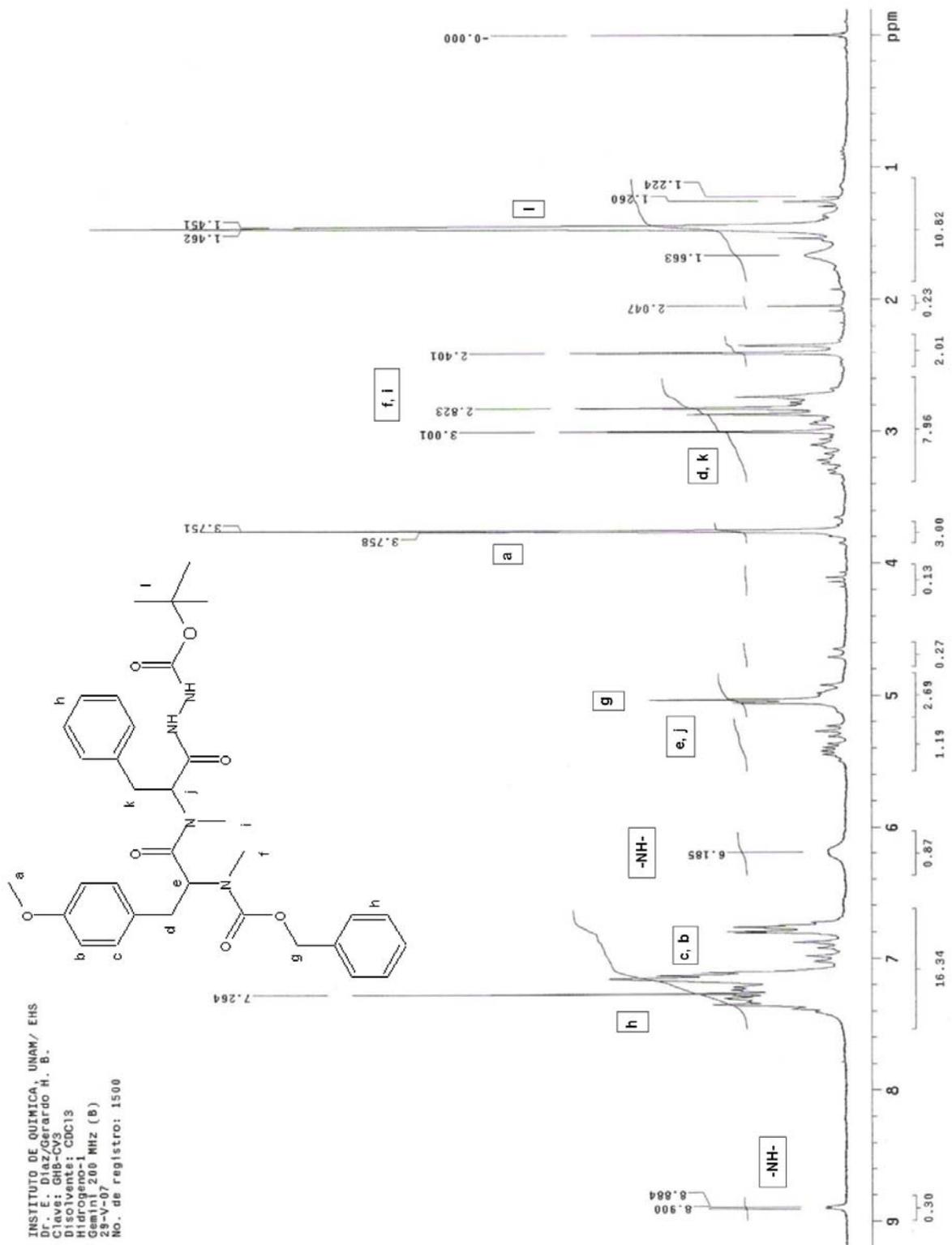


Figura 45. Espectro de RMN ^1H del terbutilcarbazato de *N*-(benciloxycarbonil)-*N*,*O*-dimetil-L-tirosil-*N*-metil-L-fenilalanina (**30**).

10. Bibliografía:

- 1.- IUPAC-IUB *Eur. J. Biochem.*, **1984**, 138, 9.
- 2.- Yasumoto, T.; Murata, M., *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1897-1909.
- 3.- Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Corbett, T. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 5418-5423.
- 4.- Luesch, H.; Williams, P. G.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J., *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 996-1000.
- 5.- Burja, A. M.; Banaigs, B.; Abou-Mansour, E.; Burgess, J. G.; Wright, P. C., *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9347-9377.
- 6.- Rinehart, K. L.; Kishore, V.; Bible, K. C.; Sakai, R.; Sullins, D. W.; Li, Kai-Ming., *J. Nat. Prod.*, **1988**, 51, 1-21.
- 7.- Hemscheidt, T.; Puglisi, M. P.; Larsen, L. K.; Patterson, G.; Moore, R. E., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 3467-3471.
- 8.- Bewley, C. A.; Otero-Quintero, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 3892-3902.
- 9.- Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 6883-6885.
- 10.- Benoiton, N. L., *Chemistry of peptide synthesis*, Taylor & Francis Group, N. Y. (**2006**) a) pp. 1, 2; b) pp. 7-11; c) pp. 46-48; d) pp. 83-86; e) pp. 185-187.
- 11.- Cheung, S. T.; Benoiton, N. L., *Can. J. Chem.*, **1977**, 55, 916-921.
- 12.- Vigneaud, V.; Behrens, O. K., *J. Biol. Chem.*, **1937**, 117, 27-36.
- 13.- Fischer, E.; Lipschitz, W., *Chem. Ber.*, **1915**, 48, 360-378.
- 14.- Quitt, P.; Hellerbach, J.; Vogler, K., *Helv. Chim. Acta*, **1963**, 46, 327-333.
- 15.- Eschweiler, W., *Chem. Ber.*, **1905**, 38, 880-882.
- 16.- Clarke, H. T.; Gillespie, H. B.; Weisshaus, S. Z., *J. Am. Chem. Soc.*, **1933**, 55, 4571-4587.
- 17.- Olsen, R. K., *J. Org. Chem.*, **1970**, 55, 1912-1915.
- 18.- Coggins, J. R.; Benoiton, N. L., *Can. J. Chem.*, **1971**, 49, 1968-1971.
- 19.- McDermott, J. R.; Benoiton, N. L., *Can. J. Chem.*, **1973**, 51, 2555-2561.
- 20.- McDermott, J. R.; Benoiton, N. L., *Can. J. Chem.*, **1973**, 51, 1915-1919.

- 21.- Li, Wen-Ren; Ewing, W. R.; Harris, B. D.; Joullié, M. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7659-7672.
- 22.- Vidyasagar, G.; Venkat, G.; Iyengar, D. S., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 1985-1986.
- 23.- Carey, F. A., *Química Orgánica*, Tercera edición, McGraw-Hill, Madrid, pp. 979, 988-990 (**1999**)
- 24.- Bergmann, M.; Zervas, L., *Chem. Ber.*, **1932**, *65*, 1192-1201.
- 25.- Erickson, B. W.; Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 3750-3757.
- 26.- Engelhard, M.; Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 3559-3563.
- 27.- Bódi, J.; Nishiuchi, Y.; Nishio, H.; Inui, T.; Kimura, T., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 7117-7120.
- 28.- Chu, K. S.; Negrete, G. R.; Konopelski, J. P., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 5196-5202.
- 29.- Jones, J. H.; Witty, M. J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1979**, 3203-3206.
- 30.- Han, So-Yeop; Kim, Young-Ah., *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2447-2467.
- 31.- Sheehan, J. C.; Hess, G. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 1067-1068.
- 32.- König, W.; Geiger, R., *Chem. Ber.*, **1970**, *103*, 788-798.
- 33.- Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *14*, 1219-1222.
- 34.- Castro, B.; Dormoy, J. R.; Dourtoglou, B.; Evin, G.; Selve, C.; Ziegler, J. C., *Synthesis*, **1976**, 751-752.
- 35.- Dormoy, J. R.; Castro, B., *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *35*, 3321-3322.
- 36.- Diago-Meseguer, J.; Palomo-Coll, A. L.; Fernández-Lizarde, J. R.; Zugaza-Bilbao, A., *Synthesis*, **1980**, 547-551.
- 37.- Anderson, G. W.; Callahan, F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 3359-3363.
- 38.- Ward, D. E.; Lazny, R.; Pedras, M. S., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 339-342.
- 39.- Alvarado, C.; Díaz, E.; Guzmán, A., *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 603-607.
- 40.- Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L., *Purification of laboratory chemicals*, Fifth edition, Butterworth Heinemann, N. Y. (**2003**) a) pp. 361; b) pp. 284
- 41.- Hartman, W. W., *Organic Syntheses*, Vol. II, John Wiley & Sons, New York, pp. 404, 405 (**1966**)

- 42.- Bodanszky, M.; Bodanszky, A., *The practice of peptide synthesis*, Springer-Verlag, Berlin , pp. 241, 242 (**1984**)
- 43.- Carpino, L. A.; Collins, D.; Göwecke, S.; Mayo, J.; Thatte, S. D.; Tibbetts, F., *Organic Syntheses*, Vol. V, John Wiley & Sons, New York, pp. 168-170 (**1973**)
- 44.- Ramage, R., Hopton, D.; Parrott, M. J.; Richardson, R. S.; Kenner, G. W.; Moore, G. A., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1985**, 461-470.
- 45.- Wünsch, E.; Graf, W.; Keller, O.; Keller, W.; Wersin, G., *Synthesis*, **1986**, 958-960.
- 46.- *Aldrich Catálogo de Químicos Finos*, Sigma-Aldrich, México (2007-2008) a) pp. 2524; b) pp. 2525
- 47.- Aitken, R. A.; Karodia, N.; Massil, T.; Young, R. J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **2002**, 533-541.
- 48.- Cheung, S. T.; Benoiton, N. L., *Can. J. Chem.*, **1977**, *55*, 906-910.
- 49.- Tung, R. G.; Dhaon, M. K.; Rich, D. H., *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 3350-3354.
- 50.- Galpin, I. J.; Mohammed, A. K. A.; Patel, A.; Priestley, G., *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 1763-1772.
- 51.- Penso, M.; Albanese, D.; Landini, D.; Lupi, V.; Tricarico, G., *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, *23*, 4513-4517.
- 52.- Rachele, J. R., *J. Org. Chem.*, **1963**, *28*, 2898.
- 53.- West, J. B.; Wong, Chi-Huey., *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 2728-2735.
- 54.- Ramanjulu, J. M.; Ding, X.; Joullié, M. M., *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 4961-4969.
- 55.- Ward, D. E.; Gai, Y.; Lazny, R.; Pedras, M. S., *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 7832-7840.
- 56.- Gross, E.; Meienhofer, J., *The peptides, analysis, synthesis, biology*. Special methods in peptide synthesis, part. B, Vol. 5, Academic Press, N. Y., pp 161 (**1983**)
- 57.- Goodman, M.; Stueben, K. C., *J. Org. Chem.*, **1959**, *24*, 112-113.
- 58.- Cheung, S. T.; Benoiton, N. L., *Can. J. Chem.*, **1977**, *55*, 911-915.
- 59.- Katchalski, E.; Sela, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, *75*, 5284-5289.
- 60.- Stoochnoff, B. A.; Benoiton, N. L., *Tetrahedron Lett.*, **1973**, *14*, 21-24.

- 61.- Roeske, R., *J. Org. Chem.*, **1963**, 28, 1251-1253.
- 62.- Ryakhovskii, V. V.; Agafonov, S. V.; Kosyrev, Yu M., *Russ. Chem. Rev.*, **1991**, 60, 924-933.
- 63.- Tung, R. D.; Rich, D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 4342-4343.
- 64.- Auwera, C.; Anteunis, M. J. O., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1987**, 29, 574-588.
- 65.- Schreiber, S. L.; Anthony, N. J.; Dorsey, B. D.; Hawley, R. C., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 6577-6580.