



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS MEDIADOS POR MICROONDAS, EN PRESENCIA DE MATERIALES SÓLIDOS CATALÍTICOS DE CARÁCTER BÁSICO. SÍNTESIS DE XENOBACTINA.

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. LAURA ELIZABETH RIVERA MÉNDEZ

DR. RICARDO JORGE CÁRDENAS PÉREZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, CDMX

ENERO, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE PÉPTIDOS MEDIADOS POR MICROONDAS, EN  
PRESENCIA DE MATERIALES SÓLIDOS CATALÍTICOS DE  
CARÁCTER BÁSICO. SÍNTESIS DE XENOBACTINA.**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
Q. LAURA ELIZABETH RIVERA MÉNDEZ**



Ciudad de México, enero 2020

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Vocal: Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

Vocal: Dr. José Gustavo Ávila Zárraga

Vocal: Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez

Secretario: Dr. Alejandro Cordero Vargas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Este trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio 2-8 del Instituto de Química de la UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez

---

SUSTENTANTE:

Q. Laura Elizabeth Rivera Méndez

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico recibido a través de la beca de maestría (No. de becario 626703)

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM.

El presente trabajo contó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), en el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación (PAPITT), proyecto IN209818.

Al Dr. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez, por permitirme formar parte de su laboratorio y colaborar en este proyecto. Además de brindarme de su conocimiento.

A los miembros del jurado: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Dr. José Alfredo Vázquez Martínez, Dr. José Gustavo Ávila Zárraga, Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez y Dr. Alejandro Cordero Vargas, por las valiosas aportaciones y comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A los técnicos académicos del Instituto de Química:

A la M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso por su apoyo en los análisis de HPLC y su capacitación en el equipo.

Al Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez por la adquisición de los espectros de RMN.

A la Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya por la adquisición de los espectros de IR y la determinación de rotación óptica.

Al M. en C. Everardo Tapia Mendoza por los espectros de masas adquiridos.

A mis papás por siempre confiar en mí y apoyarme siempre que lo necesito.

A mis sobrinas por siempre hacerme reír y olvidarme un poco de los problemas.

A Daniel por siempre estar a mi lado, por preocuparse por mí y tenerme mucha paciencia.

A Faby por ser la hermana que nunca tuve.

A Valeria por haber llenado de alegría mis días aun cuando mis días se tornaban difíciles.

A Jessy por hacer agradable y llevadera mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Gaviño por hacer amena mi estancia en el laboratorio.

## DEDICATORIA

*A mi abuelito, por ser mi motor para concluir con esta etapa y por  
los hermosos recuerdos que me dejó.*

## **CORRIGENDA**

*El título del presente trabajo señala la síntesis de xenobactina, sin embargo, la molécula que se sintetizó fue un análogo de esta, en el cual se sustituyó la D-isooleucina por L-isooleucina.*

## RESUMEN

Los péptidos son reconocidos por tener funciones cruciales en la fisiología humana, incluyendo acciones como hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y ligantes de canales iónicos. Debido a esto, son moléculas de gran interés en la investigación de la industria farmacéutica, siendo la síntesis química una de las áreas que se ha explorado en los últimos años.

Dentro de la síntesis de péptidos, existe una gran diversidad de reactivos para lograr la formación del enlace peptídico, así como diferentes estrategias para obtener una molécula objetivo. Independientemente de estas variantes, se conocen dos tipos de síntesis de péptidos: en disolución y en fase sólida. Sin embargo, en la actualidad se ha buscado tener alternativas sostenibles, como lo es el uso de las microondas (MO) como fuente de calentamiento, ya que permite acortar tiempos de reacción.

Mientras que para la síntesis de péptidos en fase sólida se ha explorado la asistencia de MO, para la síntesis en disolución han sido escasas las investigaciones. Por esta razón, en el presente trabajo, se desarrolló una metodología de síntesis mediada por microondas, para lo cual se utilizó THF como disolvente, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) e hidrotalcita (HT) como base. Se eligieron las condiciones de reacción, mediante el estudio de reacciones de acoplamiento de aminoácidos por HPLC con detector de arreglo de diodos, y se realizaron variaciones en temperatura, tiempo de reacción y cantidad de HT utilizada.

Una vez obtenidas las condiciones de reacción, se llevó a cabo la síntesis de un ciclodepsipéptido análogo de la xenobactina, con el fin de implementar la metodología desarrollada. Para esto, se intentaron dos rutas sintéticas diferentes antes de realizar la síntesis mostrada en este trabajo.

La metodología desarrollada, permitió formar enlaces peptídicos entre aminoácidos, como alanina (Ala), isoleucina (Ile), leucina (Leu), treonina (Thr), triptófano (Trp) y valina (Val), con la asistencia de microondas con rendimientos moderados y tiempos cortos de reacción.



# ÍNDICE

1. Introducción.....	11
2. Antecedentes	
2.1 ¿Qué es un aminoácido?.....	12
2.2 ¿Qué es un péptido y una proteína?.....	13
2.2.1 Ciclopeptidos.....	14
2.2.1.1 Xenobactina.....	15
2.3 Síntesis de péptidos.....	16
2.3.1 $\alpha$ -Amino-protección.....	17
2.3.1.1 Benciloxycarbonilo.....	17
2.3.1.2 <i>t</i> -Butiloxycarbonilo.....	18
2.3.1.3 9-fluorenilmetoxycarbonilo .....	19
2.3.2 $\alpha$ -Carboxi-protección.....	19
2.3.2.1 Ésteres metílicos y etílicos.....	19
2.3.2.1.1 Utilización de hidrotalcita como base.....	20
2.3.2.2 Ésteres bencílicos.....	21
2.3.2.3 Ésteres de <i>t</i> -butilo.....	21
2.3.3 Formación del enlace peptídico.....	22
2.3.3.1 Activación y acoplamiento	
2.3.3.1.1 Acil azidas.....	22
2.3.3.1.2 Carbodiimidas .....	23
2.4 Estrategias de síntesis de péptidos	
2.4.1 Alargamiento de la cadena peptídica.....	24
2.4.1.1 Estrategia N $\rightarrow$ C.....	24
2.4.1.2 Estrategia C $\rightarrow$ N.....	25
2.4.1.3 Condensación de segmentos.....	26
2.4.2 Síntesis de péptidos en disolución.....	26
2.4.3 Síntesis de péptidos en fase sólida.....	26
2.4.4 Síntesis de ciclopeptidos.....	28

2.4.4.1 Síntesis de ciclodepsipéptidos.....	30
2.4.5 Síntesis de péptidos asistida por microondas	
2.4.5.1 ¿Qué son las microondas y cómo interactúan con la materia?.....	31
2.4.5.2 Síntesis de péptidos asistida por microondas en fase sólida.....	33
3. Objetivos.....	34
4. Síntesis propuesta	
4.1 Diseño de la ruta sintética para la obtención de Xenobactina.....	34
4.2 Análisis retrosintético y propuesta de ruta sintética.....	36
5. Resultados y discusión	
5.1 Estudio de las condiciones de reacción para la síntesis de péptidos asistida por microondas	
5.1.1 Estudio del tiempo de reacción para la formación de Boc-L-Trp-Thr-OMe a temperatura ambiente.....	39
5.1.2 Estudio del tiempo de reacción para la formación de Boc-L-Trp-Thr-OMe usando microondas.....	41
5.1.3 Estudio del tiempo de reacción para la formación de los intermediarios reactivos de HOBt del Boc-L-Trp .....	42
5.1.4 Estudio del tiempo de reacción para la formación de los intermediarios reactivos de HOBt de la Boc-L-Thr en microondas.....	43
5.1.5 Estudio de las condiciones de reacción de la metodología general de síntesis de péptidos.....	44
5.2 Formación de Boc-L-Thr-D-Val-OMe.....	45
5.3 Formación de Boc-L-Thr-D-Val-L-Ile-OMe.....	45
5.4 Formación Boc-L-Thr-D-Val-L-Ile-L-Leu-OMe.....	46
5.5 Acetilación del L-Thr-OMe·HCl.....	46
5.6 Sililación de <i>N</i> -Ac-L-Thr-OMe.....	48
5.7 Formación de <i>N</i> -Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OMe.....	49

5.8	Formación del hexapéptido.....	52
5.9	Formación del ciclohexadepsipéptido mediante una macrolactonización.....	53
6.	Conclusiones.....	54
7.	Sección experimental .....	55
8.	Referencias.....	66
9.	Anexos	
9.1	Espectros de RMN.....	70

## ABREVIATURAS

A, Ala: alanina	I, Ile: isoleucina
Arg: arginina	IR: infrarrojo
Asp: asparagina	<i>J</i> : constante de acoplamiento
Boc: <i>ter</i> -butiloxicarbonilo	K: lisina
Boc <sub>2</sub> O	Leu: leucina
BnOH: alcohol bencílico	Me: metilo
Cbz: benciloxicarbonilo	MeOH: metanol
c.c.f.: cromatografía en capa fina	MO: microondas (MW: Microwave en inglés)
DCC: <i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida	N: Asparagina
DIC: <i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida	p.f.: punto de fusión
DMF: <i>N,N'</i> -dimetilformamida	Pro: prolina
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	Ph: fenilo
EMAR: espectrometría de masas de alta resolución	Phe: fenilalanina
ESI: electrospray ionization	R: arginina
Et: etilo	RMN: resonancia magnética nuclear
F: fenilalanina	R.O.: rotación óptica
Fmoc: cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo	S: serina
FmocCl: cloruro de 9-(fluorenilmetoxi)carbonilo	T, Thr: treonina
G: glicina	T.A.: temperatura ambiente
GP: grupo protector	TBDMSCl: cloruro de <i>ter</i> -butildimetilsililo
HBr: ácido bromhídrico	TFA: ácido trifluoroacético
HBTU: hexafluorofosfato de (1- <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio	TsOH: ácido <i>p</i> -toluensulfónico
His: histidina	Tyr: tirosina
HOBt: 1-hidroxibenzotriazol	V, Val: valina
HPLC: high performance liquid chromatography (cromatografía de líquidos de alta eficiencia)	W, Trp: triptófano
HT: hidrotalcita	Z: benciloxicarbonilo
	ZCl: cloroformiato de bencilo
	Z <sub>2</sub> O: dicarbonato de dibencilo
	Z-OSu: succinimido carbonato de bencilo
	Z-Bt: 1,2,3-benzotriazol-1-carboxilato de bencilo
	δ: desplazamiento químico

## 1. INTRODUCCIÓN

Los fármacos peptídicos juegan un papel importante en química medicinal, debido a su alta selectividad y eficacia en tratamientos para múltiples padecimientos, por ejemplo, desórdenes autoinmunes, deficiencias hormonales, infecciones, y desórdenes metabólicos junto con diabetes y cáncer de diferentes orígenes. <sup>[1]</sup> Al mismo tiempo, son relativamente seguros y bien tolerados por los pacientes, ya que presentan un mecanismo de acción biológico que imita en gran medida a las vías naturales del organismo. <sup>[2]</sup> En consecuencia, se ha incrementado el interés en los péptidos dentro de la investigación y desarrollo farmacéutico. Actualmente, más de 60 fármacos peptídicos han sido aprobados por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) en el mercado, <sup>[3,4]</sup> más de 150 péptidos se encuentran en desarrollo clínico activo, 260 péptidos adicionales han sido probados en ensayos clínicos en humanos y 400 están en etapas preclínicas de desarrollo. <sup>[1]</sup> Estas etapas mencionadas, forman parte del desarrollo de un fármaco, el cual consiste en la etapa preclínica, en la cual se realizan ensayos en animales para evaluar la actividad biológica y la seguridad del fármaco. Después, sigue la etapa clínica, la cual consiste en 4 fases, en las que se realizan ensayos en humanos, para determinar la cinética del fármaco, su dosificación, su seguridad y eficacia, a corto y largo plazo. <sup>[5]</sup>

Lo anterior se traduce en un área de oportunidad para la industria farmacéutica. Por ejemplo, la medicina basada en péptidos Lupron<sup>TM</sup> de los Laboratorios Abbott, uno de los fármacos más comunes para el tratamiento del cáncer de próstata, <sup>[6]</sup> logró ventas globales de más de 2.3 mil millones de dólares estadounidenses en 2011. Mientras que, el mercado global de fármacos peptídicos fue valorado en 14.1 billones de dólares estadounidenses en 2011, <sup>[3]</sup> siendo el 0.016% de las ventas globales. En 2016, el mercado fue valorado en 21.5 billones de dólares estadounidenses en 2016 y se espera siga creciendo. <sup>[1]</sup> Sin embargo, el alcance de los fármacos peptídicos para la población sigue siendo limitado, puesto que el costo de una dosis es muy elevado en la mayoría de los casos, como lo es el caso del Lucrin Depot; una inyección que contiene 11.25 mg de acetato de leuprorelina tiene un costo de \$12,110.00 MXN, <sup>[7]</sup> cuyo compuesto es utilizado como paliativo en tratamiento de cáncer de próstata, inclusive en etapas avanzadas. <sup>[8]</sup>

Debido a lo anterior, es de suma importancia buscar una manera rentable y eficiente de obtener este tipo de fármacos, así como de contribuir al desarrollo de nuevos. Para esto, existen síntesis de

péptidos en disolución y en fase sólida, donde se han empleado múltiples variaciones para la optimización de las reacciones, como el uso de diversos grupos protectores para la amina y el ácido carboxílico, y diferentes agentes de acoplamiento. [9] Además, se ha explorado el uso de las microondas como fuente de calentamiento. Sin embargo, la mayoría de los trabajos que emplean microondas realizan síntesis en fase sólida, mientras que en disolución son escasos los trabajos reportados. [10] Es por ello que surge la necesidad de investigar la síntesis de péptidos en disolución asistida por microondas, esto con el objetivo de adquirir un mayor conocimiento que permita generar nuevas metodologías de síntesis más eficientes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 ¿Qué es un aminoácido?

Un amino ácido es una molécula con dos funcionalidades, que como su nombre lo dice, contiene un grupo básico amino y un grupo ácido carboxílico. Los aminoácidos son zwitteriones (compuestos eléctricamente neutros, pero con cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes) en su forma neutra (Figura 1), por lo que son sales solubles en agua y sustancias cristalinas con puntos de fusión relativamente altos, por ejemplo, la glicina tiene un punto de fusión de 236 °C, siendo el más pequeño de los aminoácidos. Además, con respecto a sus propiedades ácido-base, resultan ser anfóteros ya que poseen carácter ácido y básico. [11]

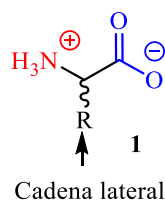


Figura 1. Estructura general de un  $\alpha$ -aminoácido

Los aminoácidos pueden ser clasificados de acuerdo a la posición de la amina en la cadena que contiene al ácido carboxílico. En la Figura 2, se muestran ejemplos de  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  aminoácidos: **2** es la glicina, el más pequeño de los  $\alpha$ -aminoácidos; **3** es la  $\beta$ -alanina, uno de los aminoácidos que constituye

una de las unidades de la coenzima A; y **4** es el ácido  $\gamma$ -butírico (GABA por sus siglas en inglés), que es uno de los  $\gamma$ -aminoácidos involucrados en la transmisión de pulsos nerviosos. [12]

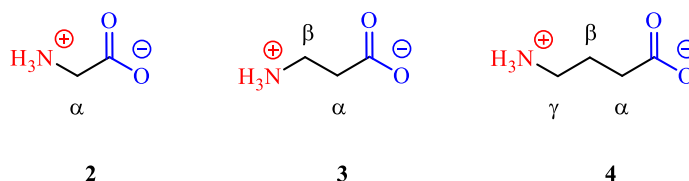


Figura 2. Se presenta la clasificación de los aminoácidos por la posición del grupo amino, siendo **2** un  $\alpha$ -aminoácido, **3** un  $\beta$ -aminoácido y **4** un  $\gamma$ -aminoácido.

Los  $\alpha$ -aminoácidos poseen una cadena lateral (mostrada en la Figura 1), la cual, dependiendo del sustituyente, le confiere diferentes características a parte de las propiedades ácido-base ya mencionadas. Además, también disponen de una configuración absoluta, dado que el carbono  $\alpha$  es un centro quiral, por lo que pueden tener configuración S o R (Figura 3). Asimismo, cuando la configuración es S, también son llamados L-aminoácidos, mientras que para la configuración R, son nombrados D-aminoácidos.

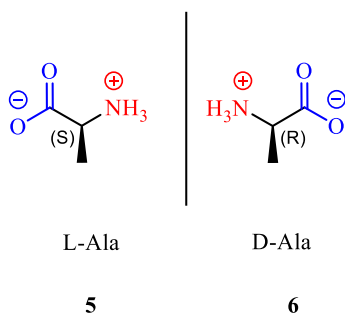
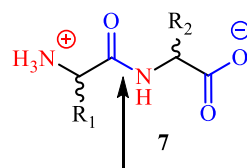


Figura 3. Par de enantiómeros de la alanina

## 2.2 ¿Qué es un péptido y una proteína?

Un enlace amida entre un ácido carboxílico de un aminoácido y uno nitrógeno del grupo amino de otro, se denomina enlace peptídico, así, formando un dipéptido como se muestra en la Figura 4. De este modo, un tripéptido tiene tres aminoácidos unidos por dos enlaces peptídicos. Los péptidos que poseen más de 30 – 50 aminoácidos son llamados polipéptidos. [12] Las proteínas pueden tener miles

de aminoácidos, aunque los términos proteína y polipéptido son utilizados indistintamente algunas veces. Las moléculas referidas como péptidos, generalmente tienen masas moleculares de 10,000, y las llamadas proteínas tienen masas moleculares más altas. [13]

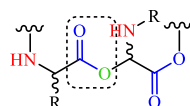


Enlace peptídico

Figura 4. Formación de un dipéptido

### 2.2.1 Ciclopepsipéptidos

Los depsipéptidos se definen como péptidos en los cuales un enlace tipo éster reemplaza a uno o más enlaces peptídicos (Figura 5). Estos ésteres pueden originarse no solo a partir de cadenas laterales de hidroxilo de aminoácidos proteínogénicos (por ejemplo, serina, treonina y tirosina), también pueden provenir de grupos hidroxilos de aminoácidos no proteínogénicos, ácidos grasos, e hidroxiácidos, como es el caso de la enterobactina (Figura 6), que es un ciclopepsipéptido que proviene del ácido corísmico y la L-serina. [14]

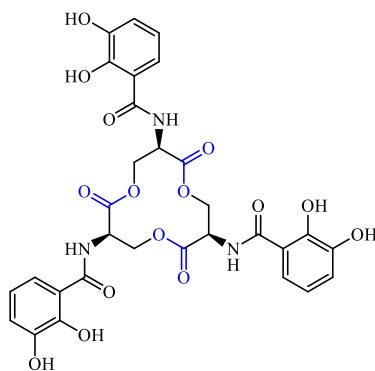


8

Figura 5. Estructura general de un depsipéptido proveniente de Thr

Muchos ciclopepsipéptidos han sido identificados a partir de hongos, bacterias y organismos marinos. Dentro de las propiedades biológicas que presentan, se incluyen actividades antitumorales, antifúngicas, antivirales, antibacteriales, antihelmínticas y antiinflamatorias. [15] Un ejemplo de un ciclopepsipéptido que fue aislado de una bacteria, es la xenobactina, descrita en la siguiente sección.



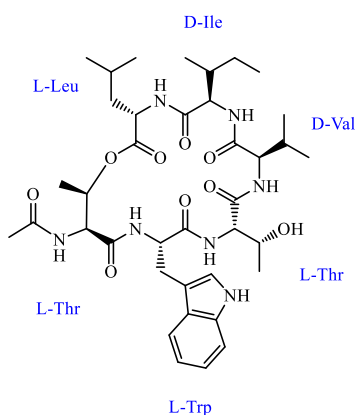


9

Figura 6. Estructura de la enterobactina

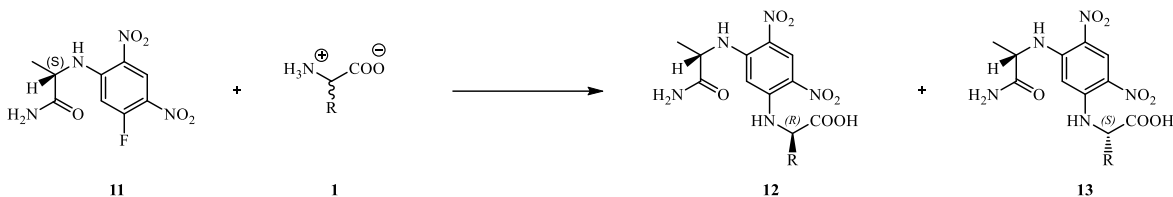
### 2.2.1.1 Xenobactina un ciclodepsipéptido proveniente de *Xenorhabdus* sp. PB30.3

La xenobactina (Figura 7) fue aislada de la cepa sp. PB30.3 de la *Xenorhabdus*, y caracterizada por experimentos de RMN-1D y 2D. Su configuración absoluta fue determinada por el método de Marfey, el cual consiste en hidrolizar el péptido y hacer reaccionar a los aminoácidos con el reactivo de Marfey, como se muestra en el Esquema 8, para después analizarlos por HPLC y compararlos con una base de datos. [16] Además, se realizaron los estudios de actividad biológica que revelaron tener buena actividad antiprotozoal contra *Plasmodium falciparum*, y actividad antibiótica específica contra la bacteria Gram positiva *Micrococcus luteus*, mientras que no se observó citotoxicidad. [17]



10

Figura 7. Estructura de la xenobactina



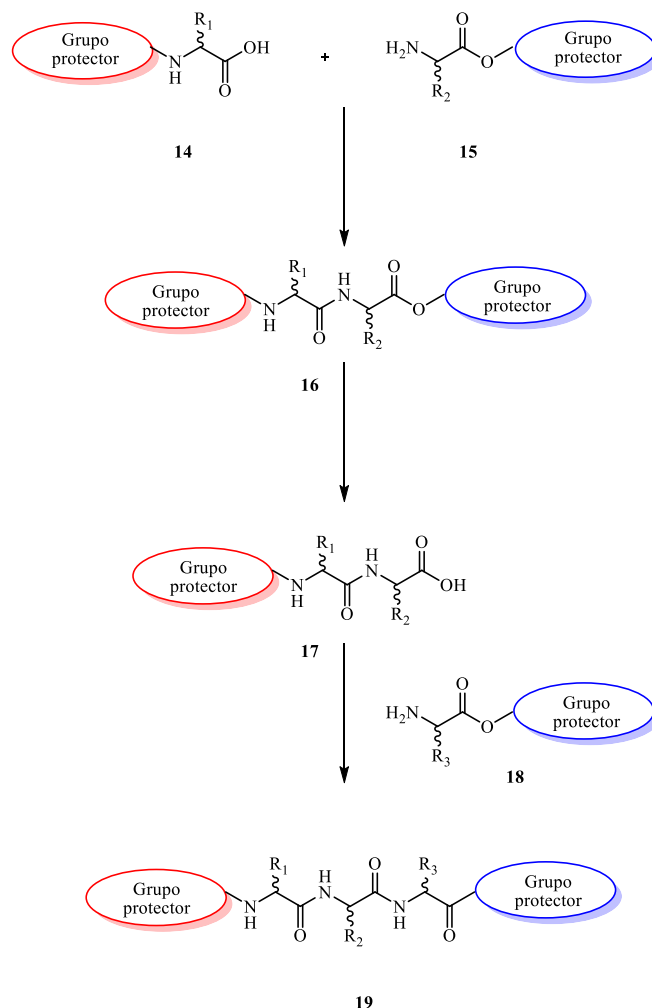
Esquema 1. En el esquema se muestra el ejemplo de la mezcla racémica de un  $\alpha$ -aminoácido **12** con el reactivo de Marfey **11**, para generar el par de diastereoisómeros **13** y **14**.

Es importante mencionar que, la *Xenorhabdus* sp. PB30.3 es una bacteria que vive en estrecha simbiosis con los nematodos del género *Steinernema*, y que durante el ciclo de vida *Xenorhabdus*–*Steinernema*, se producen múltiples compuestos bioactivos. Una sola cepa de *Xenorhabdus* puede producir una variedad de compuestos antibacterianos y antifúngicos, dentro de los cuales se encuentra la familia de los depsipéptidos, en la cual está incluida la xenobactina. [18], [19]

Finalmente, la xenobactina es un ciclohexadepsipéptido poco estudiado y que no ha sido sintetizado mediante síntesis orgánica. Por esto, surge el interés de desarrollar una metodología que pueda ser utilizada para sintetizar este tipo de compuestos.

### 2.3 Síntesis de péptidos

El acoplamiento de dos aminoácidos para formar un péptido, requiere una supresión de la reactividad de los grupos funcionales que no forman parte del enlace peptídico. Usualmente, esto se logra mediante la derivatización de los grupos, lo cual es vital que sea una modificación reversible. Después de formar el enlace peptídico, el siguiente paso es la liberación del grupo funcional que formará el segundo enlace peptídico. Esta desprotección debe ser selectiva sin afectar la protección de los otros grupos presentes. [20] Este proceso se muestra en el Esquema 2.



Esquema 2. Uso de grupos protectores y su remoción para la síntesis de péptidos

### 2.3.1 $\alpha$ -Amino-protección

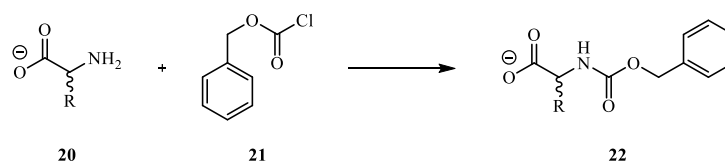
Como se mencionó anteriormente, los aminoácidos que se desean acoplar deben protegerse con grupos cuya desprotección se lleve a cabo por mecanismos diferentes. Por lo que, existe una gran variedad de grupos protectores de aminas que son compatibles con los utilizados para los ácidos carboxílicos. Se pueden encontrar grupos protectores que sean estables bajo condiciones básicas, ácidas o ambas. En este trabajo se presentan sólo algunos.

#### 2.3.1.1 *Benciloxycarbonilo*

Bergmann y Zervas describieron este método de protección de grupos amino en 1932. La abreviatura designada para este grupo protector fue Z en honor a Zervas,<sup>[9]</sup> aunque también es conocido como

Cbz. El grupo Z surgió como uno de los grupos protectores ampliamente utilizados para síntesis de péptidos en disolución, esto debido a la fácil preparación y estabilidad de los aminoácidos protegidos; y la versatilidad de las condiciones de remoción del grupo por hidrogenólisis o por ácidos fuertes como HBr.

El cloroformiato de bencilo (ZCl, **21**) fue el reactivo originalmente propuesto para la protección de aminas, como se muestra en el Esquema 3. Sin embargo, debido a su descomposición en condiciones de almacenamiento, se recurrieron a reactivos alternativos como el dicarbonato de dibencilo **23**, succinimido carbonato de bencilo **24** y el 1,2,3-benzotriazol-1-carboxilato de bencilo **25** (Figura 8). [21]



Esquema 3. Protección de aminas con ZCl

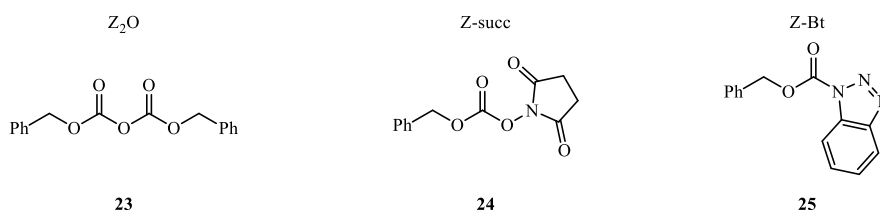
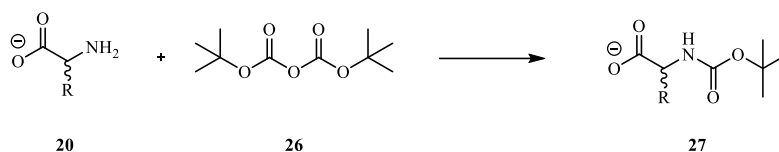


Figura 8. Alternativas de reactivos para la introducción del grupo Z

### 2.3.1.2 *t*-Butiloxicarbonilo

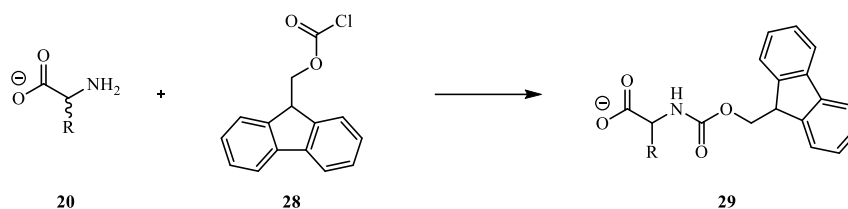
Los ácidos *t*-butoxicarbonilamino **27** (Esquema 4) fueron los primeros derivados empleados que fueron sensibles a ácidos más suaves que el bromuro de hidrógeno. La protección por *t*-butoxicarbonilo (Boc) surgió en 1950 en búsqueda de un grupo protector que fuera más sensible al ácido que el grupo Z. Los aminoácidos protegidos por Boc son estables a la hidrogenólisis y a la reducción con sodio en amoniaco líquido. Estos derivados son típicamente obtenidos por la acilación del grupo amino con el carbonato (Boc<sub>2</sub>O, **26**) como se muestra en el Esquema 4. El Boc puede ser removido por una disolución de TFA (ácido trifluoroacético) a temperatura ambiente. [20]



Esquema 4. Protección de aminas con dicarbonato de Boc<sub>2</sub>O

### 2.3.1.3 9-Fluorenilmetoxicarbonilo

El grupo 9- fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) es normalmente introducido de la manera Schotten-Bauman, usando el cloroformiato **28** (Esquema 5). El grupo Fmoc es muy estable en condiciones ácidas, pero es removido fácilmente bajo ciertas condiciones básicas. Una disolución al 20% de piperidina en DMF, es la mezcla típicamente utilizada, pero otros sistemas como el ion fluoruro en DMF, también es efectivo. La desprotección del grupo Fmoc con piperidina toma cuestión de segundos a temperatura ambiente. [9]



Esquema 5. Protección de aminas con FmocCl

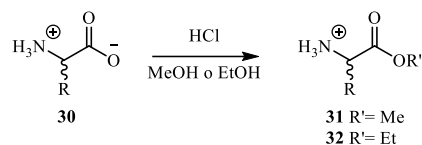
## 2.3.2 $\alpha$ -Carboxil-protección

Los grupos carboxilo son usualmente protegidos como ésteres. Para obtener estos derivados, debido a la naturaleza del grupo carboxilo, puede protonarse en presencia de un ácido fuerte, lo cual facilita el ataque de alcoholes seguido de liberación de agua para producir el éster como la sal de ácido. Dado que la reacción es reversible; como consecuencia, el agua evita que la alquilación se complete, por lo que en algunos protocolos es recomendado remover el agua que se va generando. [20]

### 2.3.2.1 Ésteres metílicos y etílicos

El método clásico de esterificación, es saturar con HCl gas una suspensión del aminoácido **30** en metanol o etanol (Esquema 6). Otra manera de obtener los ésteres es por la adición de aminoácido a

una mezcla de cloruro de tionilo en metanol, o cloruro de acetilo en metanol. En el caso de la metilación, ocasionalmente se usa diazometano.



Esquema 6. Formación de ésteres metílicos y etílicos

Los ésteres metílicos y etílicos son excelentes grupos protectores si no deben ser removidos después de construir la cadena, ya que pueden ser fácilmente convertidos en amidas por aminólisis. También, pueden ser tratados por hidracina para formar acil azidas para llevar a cabo un acoplamiento con otro aminoácido. [22]

#### 2.3.2.1.1 Utilización de hidrotalcita como base

Como se mencionó anteriormente, los ésteres metílicos o etílicos, son obtenidos como la sal del ácido utilizado. Por esta razón, cuando se requiere llevar a cabo un acoplamiento con otro aminoácido, se requiere liberar la amina para poder realizar el ataque nucleofílico al carbonilo del segundo aminoácido, por lo tanto, se debe utilizar una base que libere a la amina. Las bases que típicamente son utilizadas en cantidades estequiométricas, son aminas terciarias, las cuales generan una gran cantidad de desechos. En este contexto, la hidrotalcita (HT) es un material que puede reemplazar las bases clásicas en las síntesis, además de ser barata. [23] Las hidrotalcitas son materiales en capas sintéticos o naturales hechos de láminas bidimensionales cargadas positivamente de hidróxidos metálicos mixtos con agua y aniones compensadores de carga. Su fórmula más general puede ser escrita de la siguiente manera:  $[\text{M}^{2+}_{1-x}\text{M}^{3+}_x(\text{OH})_2]^{x+}(\text{A}^{n-})_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$ . La brucita es la estructura cristalográfica de la cual las hidrotalcitas derivan. En la brucita ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ), los  $\text{Mg}^{2+}$  son coordinados con seis moléculas de  $\text{OH}^-$  para formar un octaedro que comparte bordes con sus vecinos para constituir capas infinitas de dos dimensiones. Por ejemplo, existen las hidrotalcitas a base de iones  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ , que originan un exceso de carga positiva que es compensada con aniones carbonato en el espacio entre las capas (Figura 9). En particular, este tipo de hidrotalcitas son relevantes como catalizadores básicos. [24]

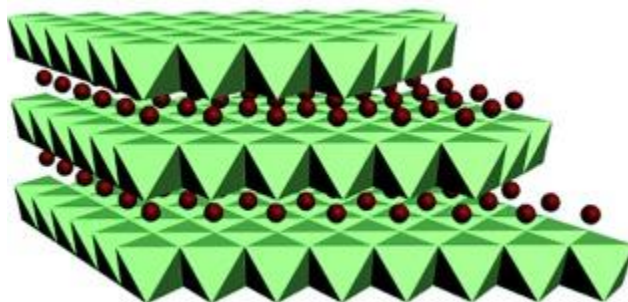
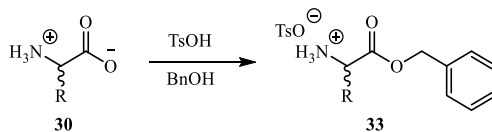


Figura 9. Los cationes  $Mg^{2+}$  y  $Al^{3+}$  son coordinados seis veces para formar octaedros que comparten bordes para construir capas infinitas. Las esferas pequeñas en la región entre capas representan los aniones que compensan las cargas positivas como  $CO_3^{2-}$ . [24]

### 2.3.2.2 Ésteres bencílicos

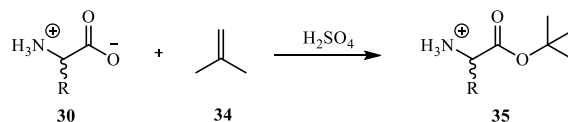
A diferencia de los ésteres metílicos y etílicos, los ésteres bencílicos de los aminoácidos son preparados por esterificación con el alcohol bencílico (BnOH) catalizada por ácido p-toluensulfónico (TsOH), y son aislados por las sales del ácido p-toluensulfónico como se muestra en el Esquema 7. Un grupo éster bencílico puede ser removido por saponificación e hidrazinólisis, pero aún más importante, puede ser removido utilizando HBr/AcOH, HF, o por hidrogenólisis cataítica. [9]



Esquema 7. Formación del éster bencílico

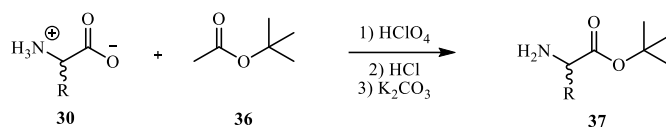
### 2.3.2.3 Ésteres de *t*-butilo

Formar un éster de *t*-butilo es más demandante que preparar los ésteres anteriormente mencionados. En lugar de realizar la esterificación directa catalizada por ácido con *t*-butanol, se debe recurrir a la adición del grupo carboxilo al isobuteno, como se muestra en el Esquema 8.



Esquema 8. Formación del éster de *t*-butilo a partir de isobutileno [25]

Otra forma de obtener el éster, es mediante una transesterificación con acetato de *t*-butilo (Esquema 9).

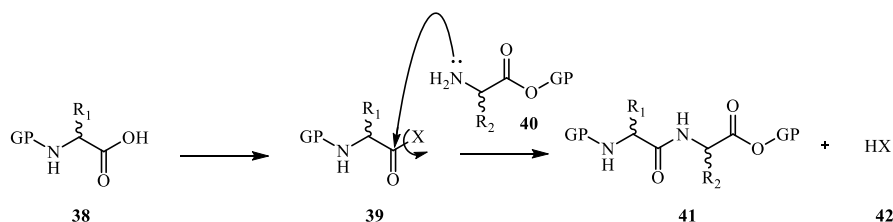


Esquema 9. Transesterificación con acetato de *t*-butilo [26]

Mientras que los grupos *t*-butilo son removibles con ácidos moderadamente fuertes, son lo suficientemente resistentes a ácidos débiles, para permitir un manejo seguro de los intermediarios que están protegidos por ellos. [22]

### 2.3.3 Formación del enlace peptídico

En las secciones anteriores, se mencionaron algunos grupos protectores que comúnmente son utilizados para proteger tanto aminas, como ácidos carboxílicos en aminoácidos. En esta sección, se mostrarán algunos métodos de formación del enlace peptídico, para lo cual se debe realizar la activación del ácido carboxílico *N*-protegido, para poder ser acoplado con otro aminoácido debidamente protegido (Esquema 10).



Esquema 10. Activación del ácido carboxílico seguido de la formación del enlace peptídico

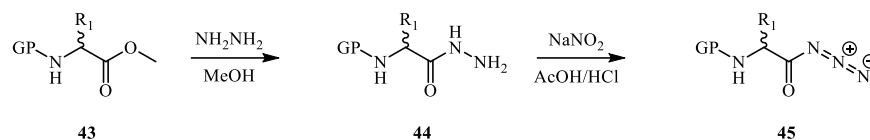
#### 2.3.3.1 Activación y acoplamiento

##### 2.3.3.1.1 Acil azidas

Los pasos originales de la síntesis de acil azidas de Curtius (1902), mostrados en el Esquema 11, siguen siendo utilizados, aunque la conversión del ácido carboxílico a la acil azida con difenilfosforil azida se ha convertido en una alternativa viable. Además, en lugar de usar nitrito de sodio, se utilizan los alquil nitritos, con mejora de rendimiento en algunos casos. [27]



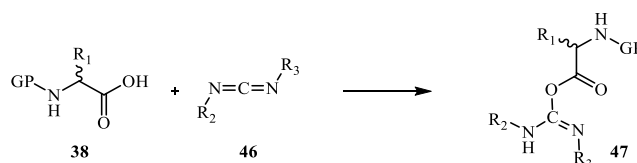
En la mayoría de los casos de acoplamiento, este método brinda una racemización despreciable. Sin embargo, es importante tomar en cuenta la naturaleza tóxica del ácido hidrazoico que se forma después del acoplamiento. [26]



Esquema 11. Formación de una acilazida vía una hidrazinólisis

### 2.3.3.1.2 Carbodiimidas

Las dialquilcarbodiimidas son reactivos que forman enlaces peptídicos de forma eficiente, estas reaccionan con el grupo carboxilo para dar la O-acilisourea **47**, como se muestra en el Esquema 12. Luego, el acilo (RC=O) del intermediario es transferido al grupo amino de la segunda molécula. Entre las carbodiimidas más utilizadas, se encuentran la dicitlohexilcarbodiimida (DCC, **51**), el clorhidrato de la etil(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, **52**), y la diisopropilcarbodiimida (DIC, **53**), mostradas en la Figura 9. Cada una de ellas posee características únicas. La DCC y la DIC no son afines al agua, por lo que no pueden ser lavadas con disoluciones acuosas de ácido o base del disolvente orgánico, mientras que la EDC, al poseer un grupo amino, puede ser lavada con ácido. [20]



Esquema 12. Activación de un ácido con una carbodiimida

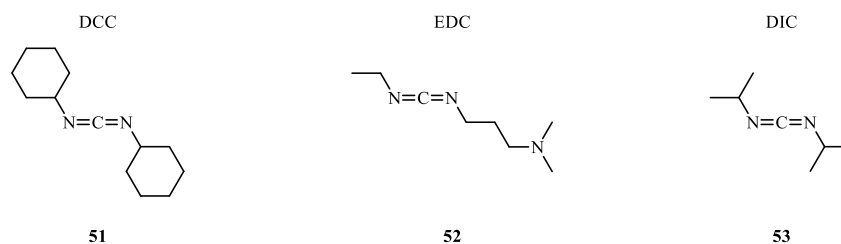
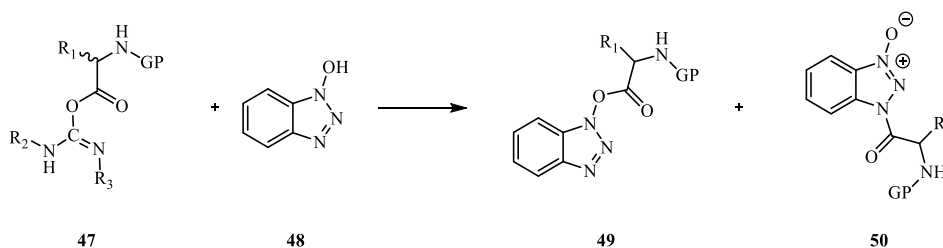


Figura 10. Carbodiimidas típicamente usadas

La DCC es un método rápido y sencillo, debido a la rapidez de la activación y el acoplamiento en una sola operación, seguido de la filtración de la *N,N*-diciclohexilurea que se forma. Sin embargo, la sobreactivación en el intermediario reactivo **47** (Esquema 12) da como resultado cierta pérdida de la pureza quiral cuando los segmentos peptídicos son acoplados. También, el centro nucleofílico en las *O*-acilisoureas compiten con la amina proveniente de la carbodiimida, y forma *N*-acilureas que son productos no reactivos. [27]

La racemización y la formación de la *N*-acilurea puede suprimirse con la adición de un auxiliar nucleofílico, como lo es el 1-hidroxybenzotriazol (HOBt). Este aditivo ataca al intermediario **47**, generando el par de intermediarios reactivos de 1-hidroxibenzotriazol **49** y **50** (Esquema 13), lo cuales son buenos agentes acilantes. [28]



Esquema 13. Formación de los intermediarios reactivos de 1-hidroxibenzotriazol

## 2.4 Estrategias de síntesis de péptidos

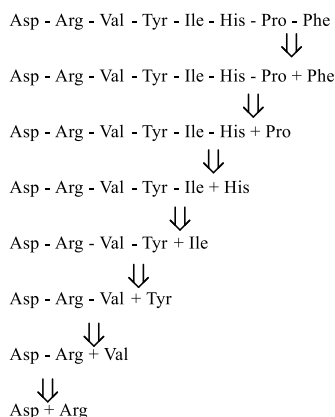
### 2.4.1 Alargamiento de la cadena peptídica

Debido a la individualidad de cada uno de los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos y las variaciones en las propiedades de los intermediarios, parece impráctico proponerse una estrategia general para cualquier tipo de péptido. La síntesis de péptidos debe estar basada en el análisis retrosintético, comenzando por identificar los problemas inherentes en la secuencia del compuesto objetivo. En principio, existen tres enfoques posibles que se explican a continuación.

#### 2.4.1.1 Estrategia *N*→*C*

Este enfoque sigue la secuencia natural de la síntesis de proteínas en los ribosomas. En el Esquema 15 se muestra el análisis retrosintético de *N*→*C*, donde se puede observar que solo un aminoácido

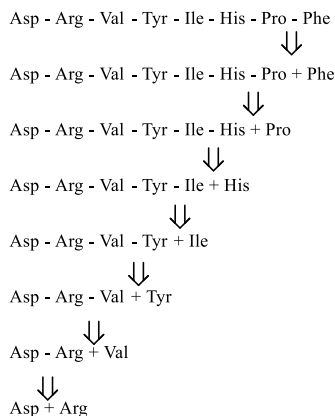
requiere proteger a la amina, el cual es removido después de terminar la secuencia de la cadena. Sin embargo, esta estrategia muestra una gran desventaja, ya que los bloques peptídicos subsecuentes están expuestos al efecto de la racemización del proceso de acoplamiento. Esto debido a que estos bloques se someten a la activación y la activación de los ácidos carboxílicos los expone.



Esquema 15. Análisis retrosintético de la angiotensina con una estrategia N→C

#### 2.4.1.2 Estrategia C→N

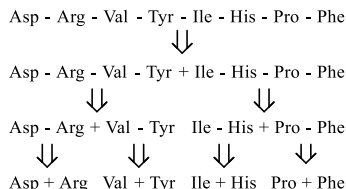
Para este enfoque, se tiene una amplia clase de grupos protectores para aminas que evitan la racemización. La eficiencia de esta estrategia es debido en gran parte al exceso que se usa de los agentes acoplantes, que es suficientemente alto para asegurar velocidades de reacción razonablemente altas en todo el proceso de acoplamiento. Enseguida, se muestra el análisis retrosintético de la angiotensina con esta estrategia. [27]



Esquema 15. Análisis retrosintético de la angiotensina con una estrategia C→N

### 2.4.1.3 Condensación de segmentos

Otro enfoque para realizar la síntesis de péptidos es condensando segmentos, es decir, una síntesis del tipo convergente. Por ejemplo, en el Esquema 16 se muestra el análisis retrosintético para la síntesis del octapéptido angiotensina, donde cuatro dipéptidos son acoplados para dar dos tetrapéptidos, que finalmente son condensados para formar el octapéptido. Después de plantear el análisis retrosintético, otro aspecto importante por tomar en cuenta es la integridad quiral de los aminoácidos, por lo que se deben elegir grupos protectores que eviten la racemización o epimerización, o recurrir a la utilización de aditivos como el 1-hidroxibenzotriazol que también lo eviten. [27]



Esquema 16. Análisis retrosintético de la angiotensina mediante condensación de segmentos

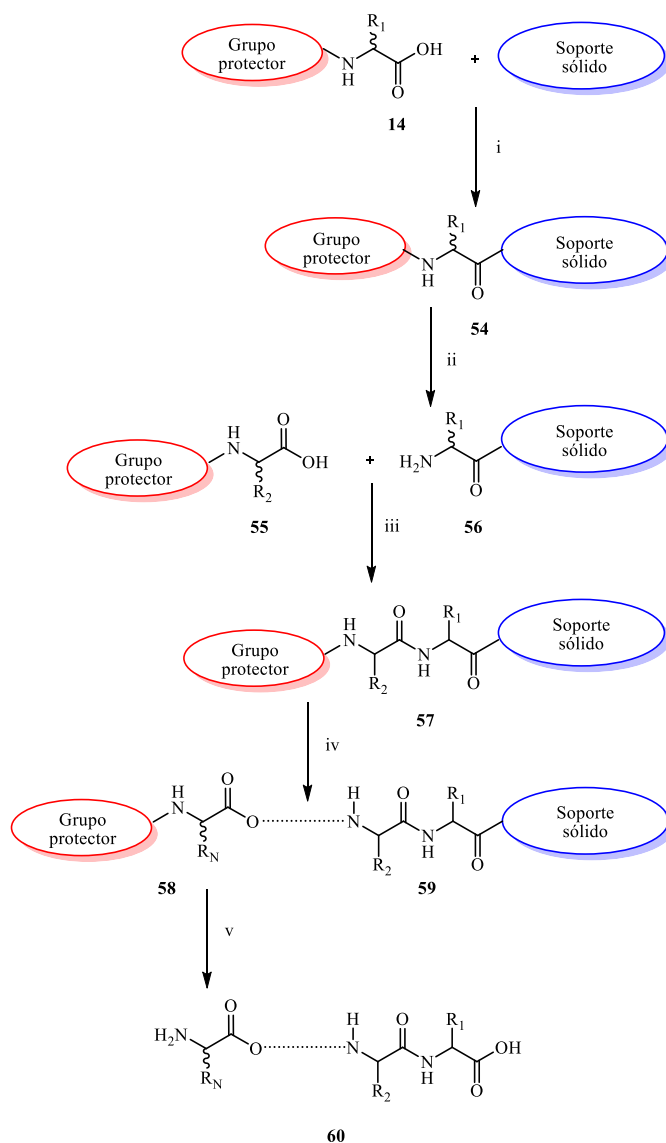
### 2.4.2 Síntesis de péptidos en disolución

La síntesis de péptidos en disolución usa un enfoque de condensación de segmentos, donde fragmentos adecuadamente protegidos son sintetizados por separado en disolución, y después estos son acoplados. La *N*-terminal del aminoácido es típicamente protegida por el grupo Boc y la *C*-terminal protegida por un alquil éster. La formación del enlace peptídico es facilitada por el uso de carbodiimidas junto con un supresor de la racemización como el HOBt. Sin embargo, existen otros grupos protectores que pueden ser utilizados, así como los diferentes disolventes que pueden utilizarse, como son DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y THF. [29]

### 2.4.3 Síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis en fase sólida significa en un soporte sólido. Merrifield planteó los fundamentos de la síntesis en fase sólida desde 1963, proponiendo una síntesis donde el primer aminoácido *N*-protegido atacara a un soporte insoluble de extracción, y que este fuera un soporte que resistiera todos los reactivos utilizados. Después, el grupo amino era desprotegido, y los aminoácidos *N*-protegidos eran

acoplados sucesivamente. Cada reacción era seguida por filtración, para remover los reactivos y productos secundarios que estaban disueltos en el disolvente. Finalmente, el péptido se separaba del soporte sólido y se desprotegia. Este proceso, se puede ver de manera general en el esquema 17. [9] En este tipo de síntesis, típicamente el ácido carboxílico es el grupo que se une con el soporte sólido, por lo que siguen una estrategia C→N. Además, los dos grupos *N*-protectores comúnmente utilizados son el Boc que es lábil en medio ácido, y el Fmoc lábil en medio básico. [29]



Esquema 17. Condiciones: i, ataque del aminoácido protegido al soporte sólido; ii, *N*( $\alpha$ )-desprotección; iii, acoplamiento con otro aminoácido protegido al aminociclopolímero; iv, repetición de i y ii hasta que sea apropiado; v ruptura del péptido con el polímero y desprotección.

## 2.4.4 Síntesis de ciclopéptidos

Los péptidos cíclicos están divididos en dos clases amplias. Aquellos en los que el esqueleto peptídico está formado por los enlaces amida habituales entre los residuos de los aminoácidos, se conocen como homodéticos. En cambio, aquellos en los que la cadena contiene un enlace diferente al peptídico, se denominan heterodéticos. Por ejemplo, dentro de los enlaces más frecuentes se encuentran el enlace disulfuro y la función éster. [30]

Dependiendo de los grupos funcionales, un péptido puede ciclarse de cuatro maneras diferentes: cabeza – cola, cabeza – cadena lateral, cadena lateral – cola y cadena lateral – cadena lateral (Figura 11). [14] La ciclación requiere dos grupos reactivos dentro de la misma cadena peptídica y hacerlos reaccionar bajo condiciones que favorezcan los procesos intramoleculares. Sin embargo, puede ocurrir la reacción intermolecular, la cual produce dímeros o polímeros. Para favorecer la reacción intramolecular, se debe trabajar en alta dilución (típicamente  $10^{-3}$  –  $10^{-4}$  mol/L). [30] En disolventes apróticos, los oligopéptidos a veces tienden a plegarse sobre sí mismos, lo cual puede favorecer la ciclación sobre la polimerización, y promover la formación del anillo para ser logrado sin recurrir a condiciones de alta dilución. [9]

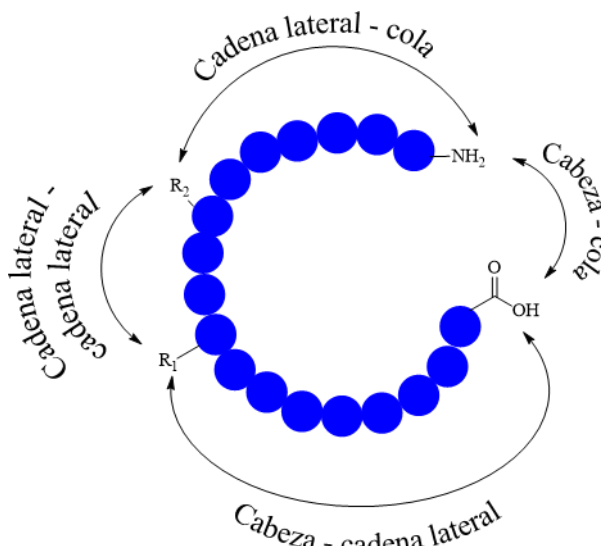


Figura 11. Las cuatro maneras en que un péptido puede ser ciclado

La síntesis de péptidos cíclicos homodéticos involucra primero la preparación de la secuencia peptídica requerida. Subsecuentemente, se realiza la activación del grupo carboxilo terminal para su macrolactamización con el grupo amino libre del péptido.

Existen varios problemas asociados con la macrociclación de péptidos. En primer lugar, el grupo carboxilo necesita ser activado por un agente de acoplamiento. En segundo lugar, el péptido activado debe de adoptar una conformación de pre-ciclación antes de poder reaccionar. La energía de esta conformación depende de la longitud y la secuencia del péptido, y la configuración de los aminoácidos.

[14]

Para lograr una secuencia adecuada del péptido lineal, es importante elegir aminoácidos que favorezcan la ciclación y eviten la epimerización en los grupos terminales. Dado que el residuo C-terminal es sensible a la epimerización, si la glicina es uno de los aminoácidos que constituyen al péptido objetivo, este es una elección ideal. La prolina, debido a que su integridad quiral no se ve afectada en la mayoría de las condiciones habituales de síntesis de péptidos, es el siguiente mejor. Si la secuencia del péptido no posee estos aminoácidos, la leucina o la alanina son aminoácidos sin tendencia pronunciada a la epimerización que también pueden ser utilizados. Además de tomar en cuenta la pureza quiral, es importante no elegir aminoácidos que puedan promover reacciones secundarias. Similarmente, los aminoácidos con impedimento, como valina e isoleucina no son realmente adecuados en la posición C-terminal, ya que aumentan las reacciones secundarias, por ejemplo, la migración del acilo  $O \rightarrow N$  en el intermediario O-acilisourea de las ciclaciones mediadas por carbodiimidas. [27]

Los anillos pequeños restringidos (2 a 4 aminoácidos) y los anillos medianos (5 a 8 aminoácidos) son generalmente difíciles de preparar en rendimientos buenos, a menos que sus secuencias incluyan aminoácidos que ayuden a inducir un giro- $\beta$  en el péptido precursor (Figura 12).

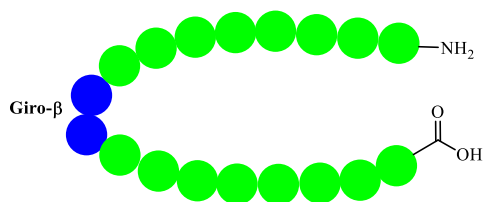
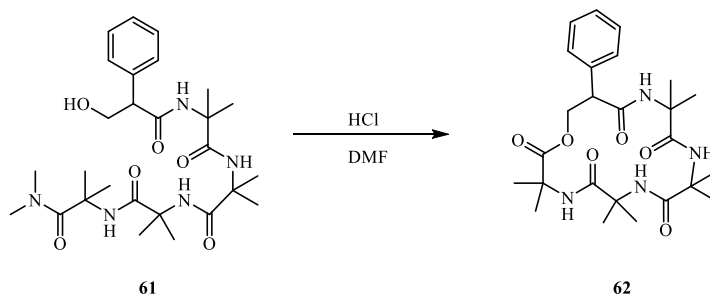


Figura 12. Conformación de pre-ciclación

### 2.4.4.1 Síntesis de ciclodepsipéptidos

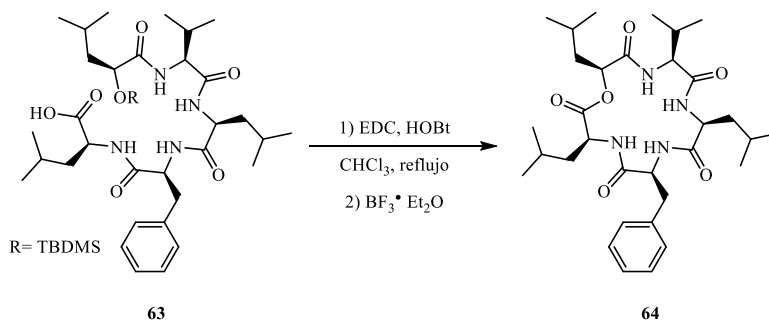
Los ciclodepsipéptidos representan una clase importante de los ciclopéptidos heterodéticos. Los métodos para su síntesis pueden ser clasificados en dos categorías: la primera donde el paso de ciclación involucra la formación de un enlace peptídico (macrolactamización), para lo cual se sigue los parámetros discutidos en la sección anterior; la segunda involucra la formación de un éster (macrolactonización).

Un método de macrolactonización implica el llamado proceso de ciclación de “azirina/oxazolona”. Un ejemplo se muestra en el Esquema 18, donde una 2,2-disustituida-3-aminoazirina **61** es usada para preparar el precursor lineal para formar la oxazolona que posteriormente será atacada por el alcohol, y así formar el éster **62**. Sin embargo, este método está limitado para péptidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos. [31]



Esquema 18. Macrolactonización mediante el proceso “azirina/oxazolona”

Finalmente, en el Esquema 19 se muestra un método de macrolactonización, el cual parte del péptido lineal con el alcohol protegido con TBDMS (**63**), seguido de la activación del ácido con EDC y HOBt para evitar la epimerización, para luego concluir con el cierre del anillo con la desprotección *in situ* del grupo alcoxi con el ácido de Lewis  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ . [32,33]



Esquema 19. Macrolactonización promovida por  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$



## 2.4.5 Síntesis de péptidos asistida por microondas

### 2.4.5.1 ¿Qué son las microondas y cómo interactúan con la materia?

La radiación electromagnética, es una forma en la que la energía puede propagarse a través del espacio y que, al interactuar con la materia provoca cambios importantes en ella que pueden ser aprovechados para entender su comportamiento. El mecanismo fundamental responsable de esta radiación es la aceleración de una partícula cargada. Cuando una partícula cargada se acelera, debe irradiar energía. Los diferentes tipos de radiación electromagnética se muestran en la Figura 13, siendo las microondas, la radiación de interés. La región de las microondas, está comprendida aproximadamente de  $1\text{ m} - 10^{-4}\text{ m}$ .<sup>[34]</sup> Este tipo de radiación, al interactuar con la materia, produce cambios en las rotaciones moleculares, lo cual se ve traducido en un incremento en la energía cinética de las moléculas, por lo que es posible decir que el uso de las microondas es una forma de “calentar” a la materia. Sin embargo, el aumento en la energía cinética debido a la irradiación de la materia con las microondas difiere fuertemente en su funcionamiento de las formas normales para calentar una sustancia. Es por ello que, su aplicación para llevar a cabo reacciones químicas, ha sido de gran interés para la comunidad científica.<sup>[35]</sup>

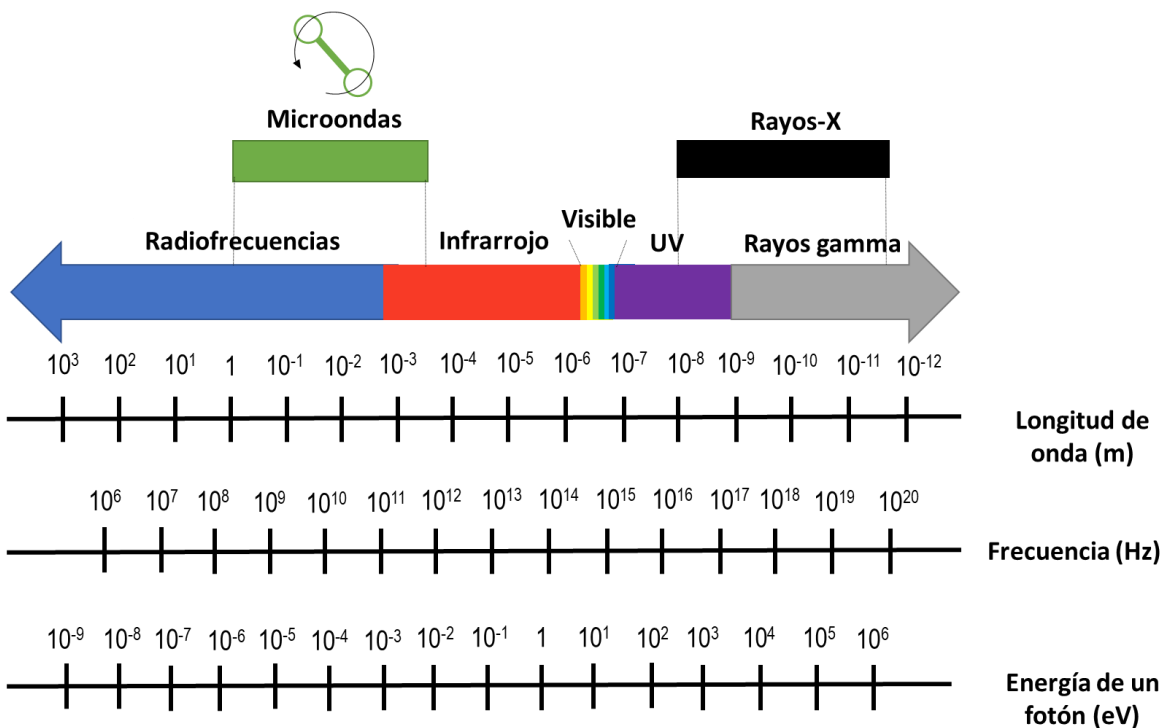


Figura 13. Espectro electromagnético

Un sistema de reacción convencional está formado por los reactivos responsables de una transformación química, un medio donde se llevará a cabo la reacción y el recipiente que contiene a todo el sistema. Típicamente, cuando se requiere que la temperatura necesaria para llevar a cabo dicha transformación sea superior a la del medio ambiente, este sistema de reacción necesita una fuente de calentamiento. Las fuentes de calentamiento típicas elevan la temperatura del sistema y fundamentadas en la ley cero de la termodinámica; suelen ser cuerpos que rodean al sistema de reacción y que poseen una temperatura mayor a la de éste. Así, al buscar el equilibrio térmico, se aumenta la temperatura del sistema de reacción. Sin embargo, este tipo de calentamiento suele ser poco controlado, ya que existen gradientes de temperatura en el sistema debido a que la conducción del calor se da primero de la fuente externa de energía al recipiente que contiene al sistema de la reacción y posteriormente de la parte externa de la reacción a la parte interna (Figura 14). Por otra parte, el calentamiento a través del uso de microondas, permite que el aumento en la energía cinética se lleve a cabo de forma más controlada, ya que la radiación electromagnética que se emplea no interacciona con los recipientes que contienen al sistema de la reacción, si no que directamente aumentan la energía de los componentes de la reacción generando un rápido aumento en la temperatura de estos componentes, lo que facilita que ocurran las transformaciones deseadas (Figura 14). [35]

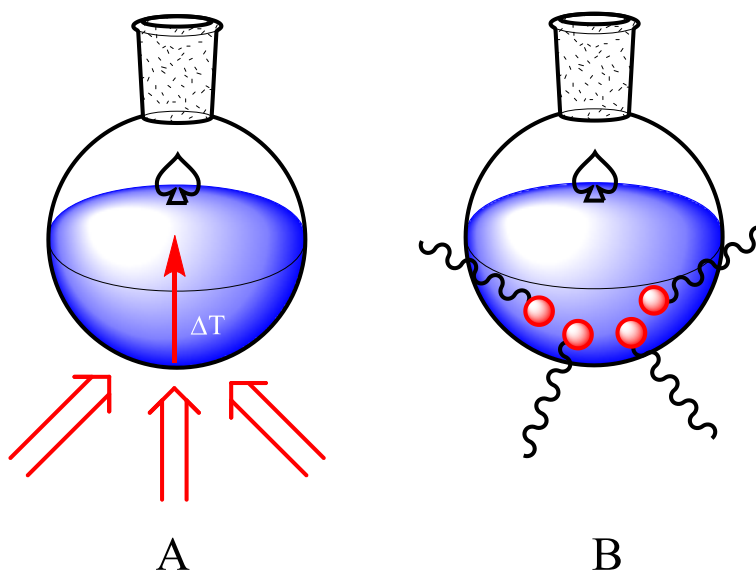


Figura 14. Se representan las formas convencionales de calentar a un sistema de reacción. En la figura A se puede ver que el calentamiento que proviene de una fuente externa genera un gradiente, ya que las paredes del recipiente al estar en contacto directo con la fuente externa poseerán una mayor temperatura que el sistema en el seno de la reacción. Por otro lado, en la figura B se representa el calentamiento asistido por microondas, en el cual se representa que estas atraviesan al recipiente y localizan puntos de calentamiento específicos en el seno del sistema.

La interacción de los sustratos o disolventes con las microondas en una reacción asistida por esta radiación, se debe principalmente a dos fenómenos: la polarización dipolar y la conducción iónica. El primer mecanismo de interacción, la polarización dipolar, está fundamentada en que los momentos dipolares, tratan de alinearse con el campo eléctrico que presentan las microondas. Debido a que este campo eléctrico constantemente está cambiando, las moléculas al tratar de alinearse con él, aumentan rápidamente sus movimientos rotacionales y en consecuencia genera energía térmica. El segundo mecanismo es la conducción iónica, en el cual las partículas disueltas (generalmente iones) oscilan de un lado a otro bajo la radiación de microondas. Esta oscilación provoca colisiones de las partículas cargadas con moléculas o átomos vecinos, que en última instancia son responsables de crear energía térmica. [36]

#### 2.4.5.2 Síntesis de péptidos asistida por microondas en fase sólida

Debido a la importancia que han presentado los péptidos terapéuticos para la química farmacéutica, se ha estudiado la síntesis de péptidos mediada por microondas, dado que esta fuente de calentamiento brinda tiempos de reacción más cortos, y en muchos de los casos, reacciones más limpias, es decir, con una menor generación de subproductos,

Dentro de las metodologías que se han desarrollado para síntesis de péptidos asistida por microondas, se encuentran las de fase sólida. En la Tabla 1 se muestran los diversos trabajos que han sido desarrollados en este campo. Se logra observar que todas las síntesis coinciden con ser del tipo C→N, y no hay una gran variedad de disolventes, ya que en su mayoría utilizan DMF. En cambio, en la síntesis en disolución, es una síntesis más versátil, ya que puede ser también de tipo N→C y puede ser utilizada una amplia gama de grupos protectores, esta diversidad de opciones, permite proponer múltiples rutas sintéticas.

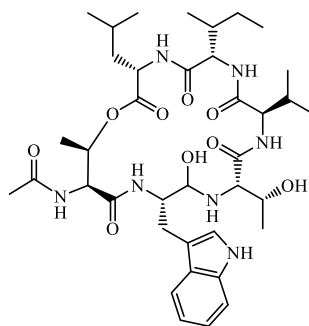
Péptido	Disolvente	Grupo protector	Activador	Tiempo	Año
GFGVAVIG	DMF	Fmoc	DCC	2 – 6 min	1992 [37]
Kalata B1	DMF	Boc	HBTU	5 min	2008 [38]
WNTVRISFK	DMF	Fmoc	DIC	30 s x 3	2006 [39]
GF	H <sub>2</sub> O	Boc	EDC	7 min x 2	2009 [40]

Tabla 1. Comparación de condiciones de reacción en trabajos desarrollados en síntesis de péptidos asistida por microondas

Sin embargo, son muy escasos los trabajos en síntesis de péptidos asistida por microondas en disolución, puesto que las bases que son recurrentemente utilizadas son aminas terciarias, las cuales, al someterse al calentamiento de las microondas, puede provocar una epimerización de algún centro estereogénico. Por esta razón, en el presente trabajo se tuvo gran interés en usar hidrotalcita, ya que se ha mostrado altos rendimientos en la síntesis de enlaces peptídicos y que puede ser removida fácilmente, generando menos residuos, aunado a que no epimeriza los centros estereogénicos.

### 3. OBJETIVOS

- Desarrollar una metodología para la síntesis de péptidos mediada por microondas.
- Realizar la síntesis total del análogo **65** de la xenobactina.<sup>[17]</sup>
- Caracterizar mediante espectroscopia de RMN e IR, espectrometría de masas y rotación óptica, al análogo de la xenobactina y los productos intermediarios de la ruta sintética.



65

Figura 15. Análogo de la Xenobactina

### 4. SÍNTESIS PROPUESTA

#### 4.1 Diseño de la ruta sintética para la obtención del análogo de xenobactina

La primera ruta de síntesis propuesta se basó en la formación de los enlaces de cada uno de los aminoácidos (Figura 16). Para esto, se propuso una síntesis lineal de N→C a partir de la *N*-Ac-Thr-OH (**85**, sección 5.5) para formar el enlace **1a** con el éster metílico del L-Trp, seguido del acoplamiento

de los ésteres metílicos de los aminoácidos subsecuentes, para formar los enlaces **2a**, **3a**, **4a** y **5a**. Para obtener el producto final, se propuso realizar una macrolactonización para formar el enlace **6a**. Se decidió ciclar de esta manera ya que, es conveniente tener a la L-Leu en el extremo C-terminal debido a que este aminoácido que no tiene tendencia pronunciada a la epimerización. Además, para elegir una macrolactamización, se tienen aminoácidos con impedimento estérico, lo cual no favorecería la ciclación. Finalmente, para realizar la macrolactonización, con base en el trabajo de Morales-Serna <sup>[33]</sup> se propuso sililar el alcohol de la treonina correspondiente desde el primer paso, para hacer selectivo el cierre del anillo, puesto que se tiene otra treonina en la molécula.

En esta primera propuesta se tuvieron problemas con la síntesis de *N*-Ac-Thr-OH (**85**), descrito a detalle en la sección 5.5. Esto debido a la alta polaridad del producto que resultaba en un bajo rendimiento, ya que al llevar a cabo lavados ácidos o básicos, el producto se repartía a la fase acuosa. Además, en la sililación posterior, se presentaban los mismos problemas, ya que el producto sililado seguía siendo muy polar. Por lo tanto, se decidió modificar esta primera propuesta.

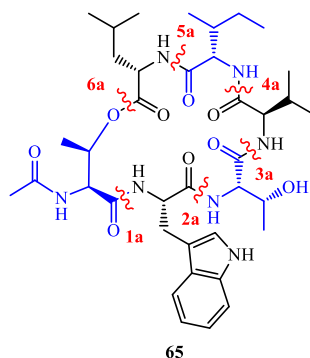


Figura 16. Primera propuesta de ruptura de enlaces del análogo de xenobactina para una síntesis lineal

Para la segunda ruta sintética, se propuso dejar al último el acoplamiento de la *N*-Ac-O-TBDMS-L-Thr (**76**) con el pentapéptido mostrado en la Figura 17 para formar el enlace **1a**. Para sintetizar el pentapéptido, se propuso nuevamente una síntesis lineal N→C, a partir del Boc-L-Trp. Sin embargo, debido a los resultados obtenidos en la sección 5.1, se observó que el Boc-L-Trp se descomponía, por lo que proponer una síntesis en la cual se tuviera este aminoácido desde el comienzo, no sería viable.

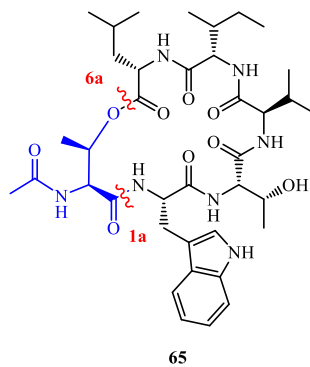


Figura 17. Segunda propuesta de ruptura de enlaces, para proponer el acoplamiento de un pentapéptido sintetizado de manera lineal y un aminoácido

Finalmente, se llegó a la propuesta realizada en este trabajo, planteando las desconexiones mostradas en la Figura 18, en la cual se plantea el acoplamiento entre un dipéptido y un tetrapéptido para formar el enlace 2a. El dipéptido se formaría a partir *N*-Ac-O-TBDMS-L-Thr (76) y su acoplamiento con el éster metílico del L-Trp. De esta manera, el L-Trp no se usaría en los primeros pasos de la síntesis, para evitar su descomposición. Mientras que, para el tetrapéptido se propuso realizar una síntesis lineal de N→C a partir de la Boc-L-Thr (70), utilizando los ésteres metílicos como grupo protector de las funcionalidades carboxilo.

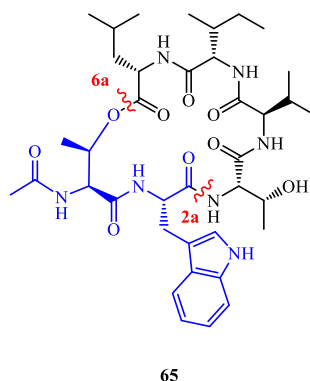
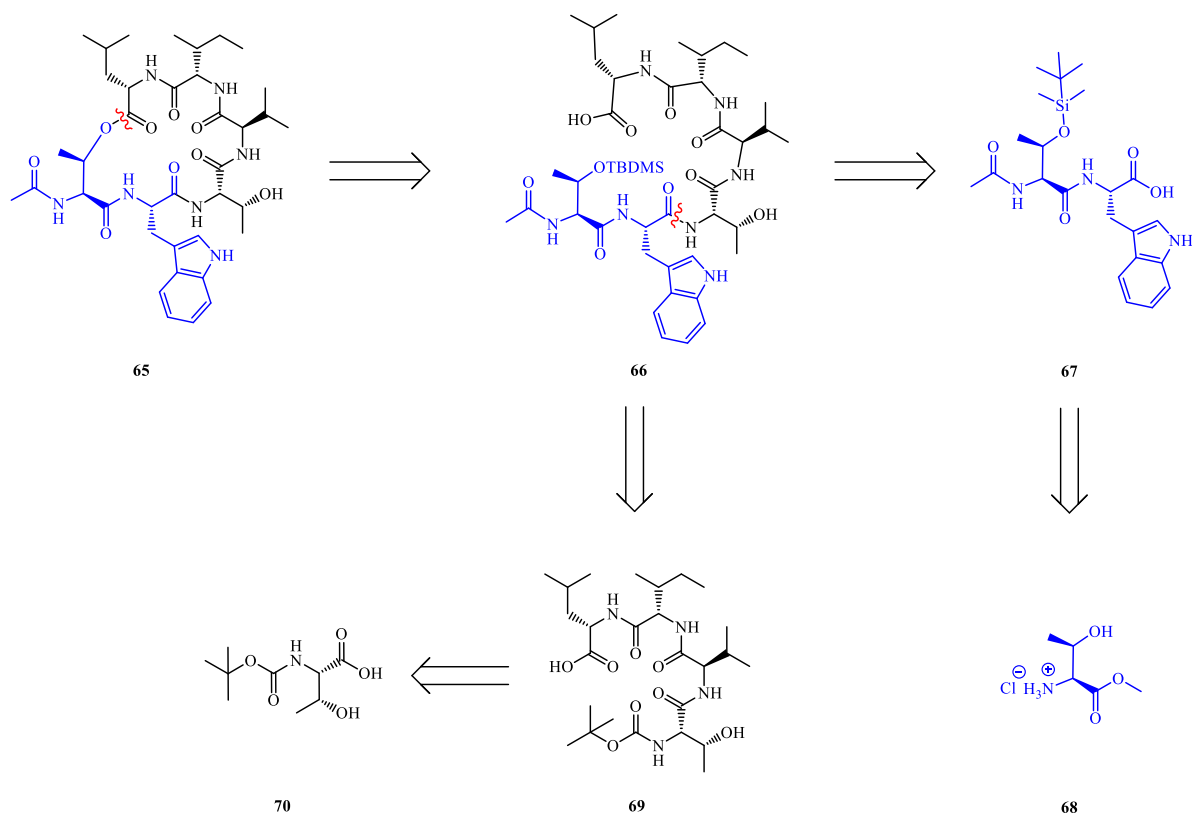


Figura 18. Propuesta final de ruptura de enlaces para realizar una síntesis convergente, entre un dipéptido y un tetrapéptido sintetizado de manera lineal

#### 4.2 Análisis retrosintético y propuesta de ruta sintética

En el Esquema 20, se muestra el análisis retrosintético de la molécula objetivo 65, donde se propone la desconexión del ciclohexadepsipéptido en el hexapéptido 66. Este péptido, se obtendría a partir del acoplamiento entre el tetrapéptido 69 y el dipéptido 67. A su vez, el tetrapéptido 5 provendría de una

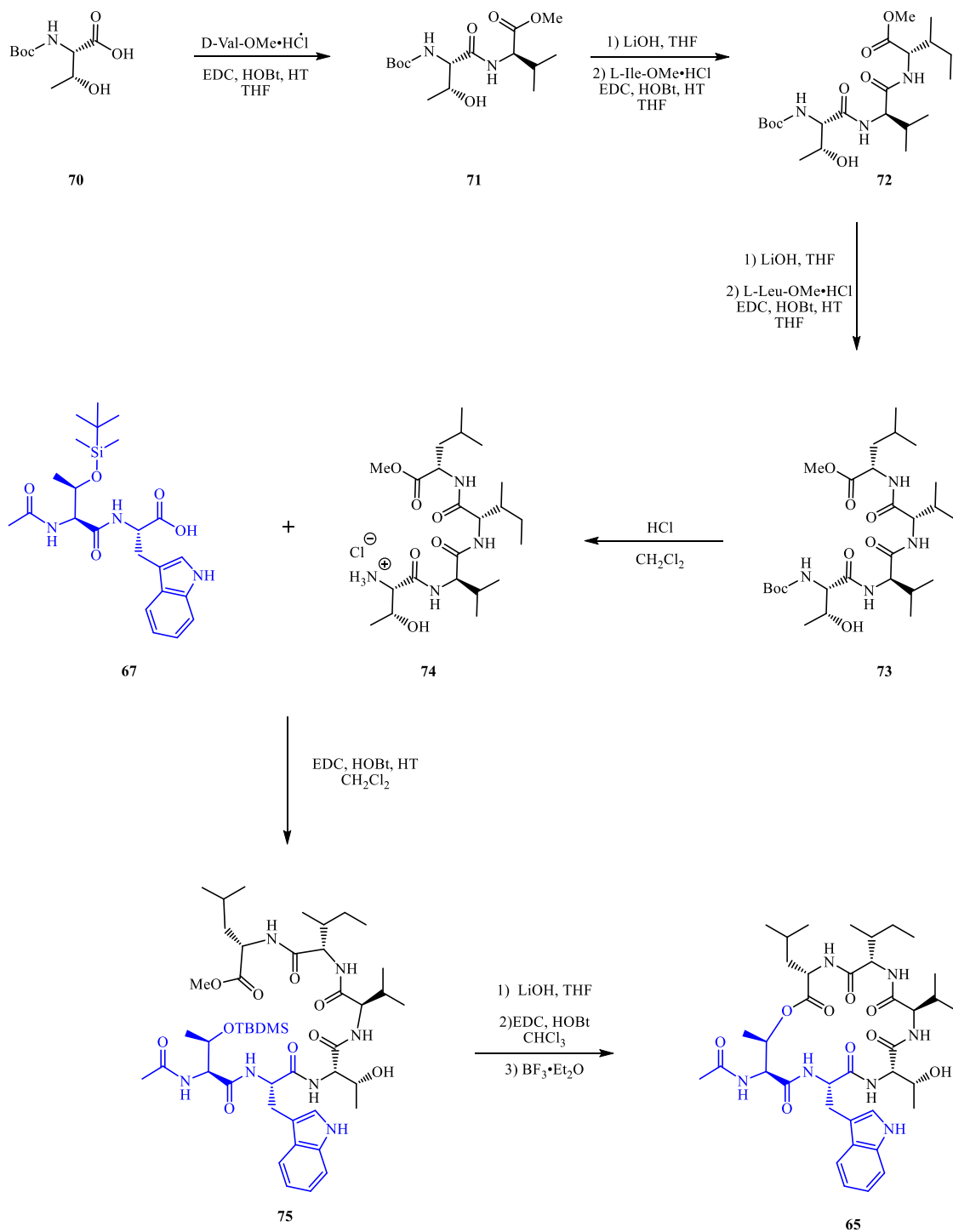
síntesis N→C, con los ésteres metílicos de los aminoácidos, comenzando por la Boc-L-Thr **70**. Finalmente, el dipéptido **67** se propone que pueda ser obtenido a partir del L-Thr-OMe·HCl **68**.



Esquema 20. Análisis retrosintético para la formación del análogo de xenobactina

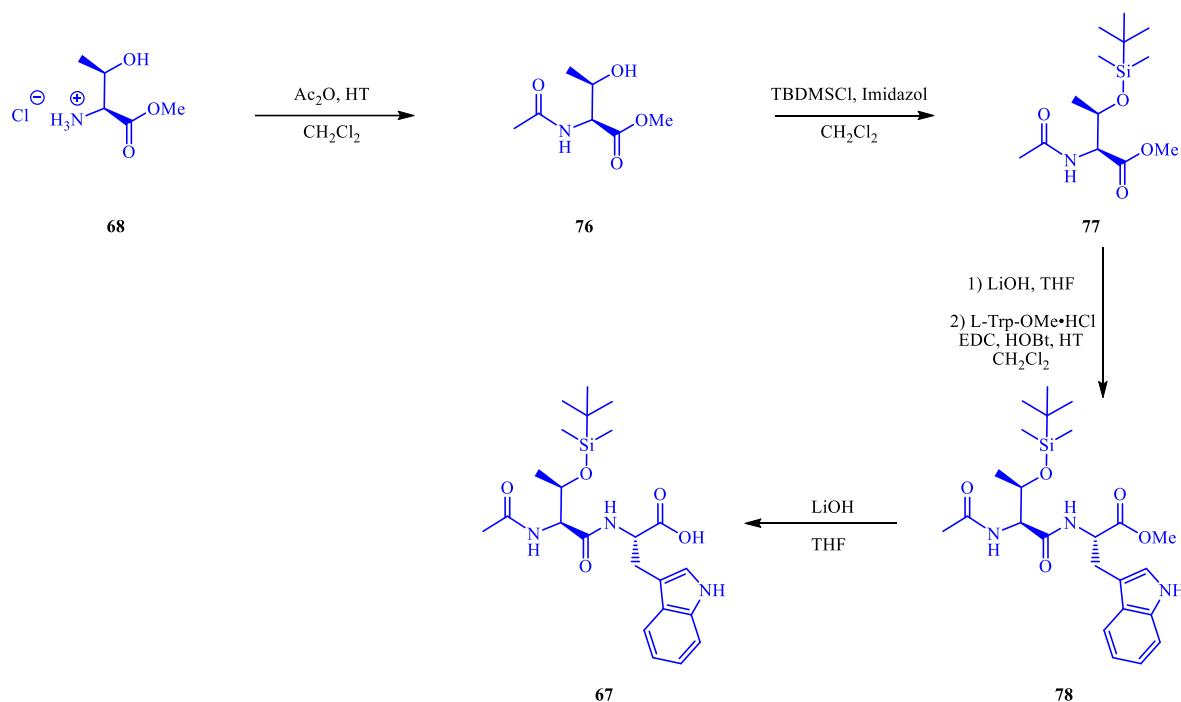
Con base en el análisis retrosintético, se propuso la ruta mostrada en el Esquema 21. Para sintetizar el tetrapéptido **73**, se propuso una síntesis N→C a partir de Boc-L-Thr y el subsecuente acoplamiento de los clorhidratos de los ésteres metílicos de los aminoácidos correspondientes, utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) como agente activador de los ácidos, hidrotalcita como base y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como aditivo. [23] Para realizar estos acoplamientos, se realizará la hidrólisis de los ésteres metílicos, la activación de éstos y el acoplamiento peptídico para continuar la síntesis N→C. Una vez obtenido **73** se llevará a cabo la desprotección del grupo Boc para generar **74** y realizar el acoplamiento con el dipéptido **67**. Para obtener **67** se propone la ruta sintética mostrada en el Esquema 22, en la cual se parte del clorhidrato del éster metílico de la L-Thr **68**, realizando una acilación en el nitrógeno para obtener **76**, seguido de una siliación del hidroxilo con cloruro de tert-butildimetilsilano (TBDMSCl) para generar **77**. Posteriormente, se realizará la hidrólisis del éster metílico de **77** para poder realizar el acoplamiento con L-Trp-OMe·HCl y poder obtener a **78**. El producto **67** se obtendrá mediante la hidrólisis básica de **78**, para poder llevar a cabo el acoplamiento

entre los péptidos **73** y **67**, seguido de la desprotección del éster metílico de **75**. Finalmente, se realizará la activación del ácido carboxílico obtenido, y posteriormente la desprotección del alcohol sililado para realizar la macrolactonización y así, obtener el análogo de xenobactina **65**.



Esquema 21. Ruta sintética para la formación del análogo de xenobactina **7**





Esquema 22. Ruta sintética para formar el dipéptido **E** para la formación del análogo de xenobactina

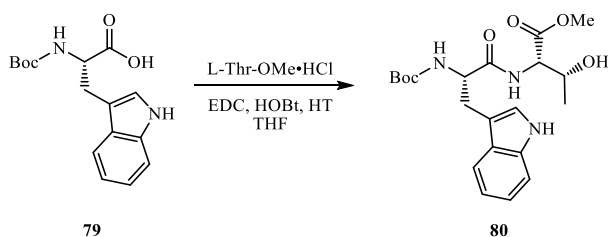
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Estudio de las condiciones de reacción para la síntesis de péptidos asistida por microondas

#### 5.1.1 Estudio del tiempo de reacción de la formación de Boc-L-Trp-L-Thr-OMe a temperatura ambiente

Inicialmente, se decidió estudiar la cinética de la reacción de formación del dipéptido Boc-L-Trp-Thr-OMe (**80**, Esquema 23), esto fue debido que el Boc-L-Trp (**79**) absorbe en la región del UV, por lo que de esta manera se podría observar con el detector UV de arreglo de diodos del equipo de HPLC. Además, se requería comparar el tiempo de esta reacción a temperatura ambiente y en condiciones de microondas. Para realizar el estudio a temperatura ambiente, en un vial de 10 mL se colocaron 50 mg de Boc-L-Trp (**79**), 31 mg de L-Thr-OMe·HCl (**68**), 28 mg de HOBt, 40 mg de HT y 35 mg de EDC, en 5 mL de THF. Se colocó en agitación a temperatura ambiente y cuando se cumplió 1 h, se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$ , se evaporó el disolvente y se analizó por HPLC. La concentración de la muestra inyectada al cromatógrafo fue de 1.5 mg/mL de disolución y se eluyó en un sistema 65:35

H<sub>2</sub>O/MeCN. Se repitió el mismo procedimiento a 2, 3, 4, 5 y 6 h. En este tiempo, la reacción aún no concluía, por lo que se dejó en agitación toda la noche. A las 22 h, se tomó otra alícuota como las anteriores, se diluyó y se inyectó, para este tiempo, la reacción ya había concluido. Finalmente, con los cromatogramas adquiridos, se graficó el área bajo el pico perteneciente al Boc-L-Trp (**79**) obteniendo el gráfico mostrado en la Figura 19. En este gráfico se puede observar la disminución de la concentración del Boc-L-Trp (**79**), logrando saber que la reacción necesita más de 6 h para concluirse, dato que fue comparado con el tiempo de reacción en el microondas.



Esquema 23. Reacción de formación de Boc-L-Trp-L-Thr-OMe

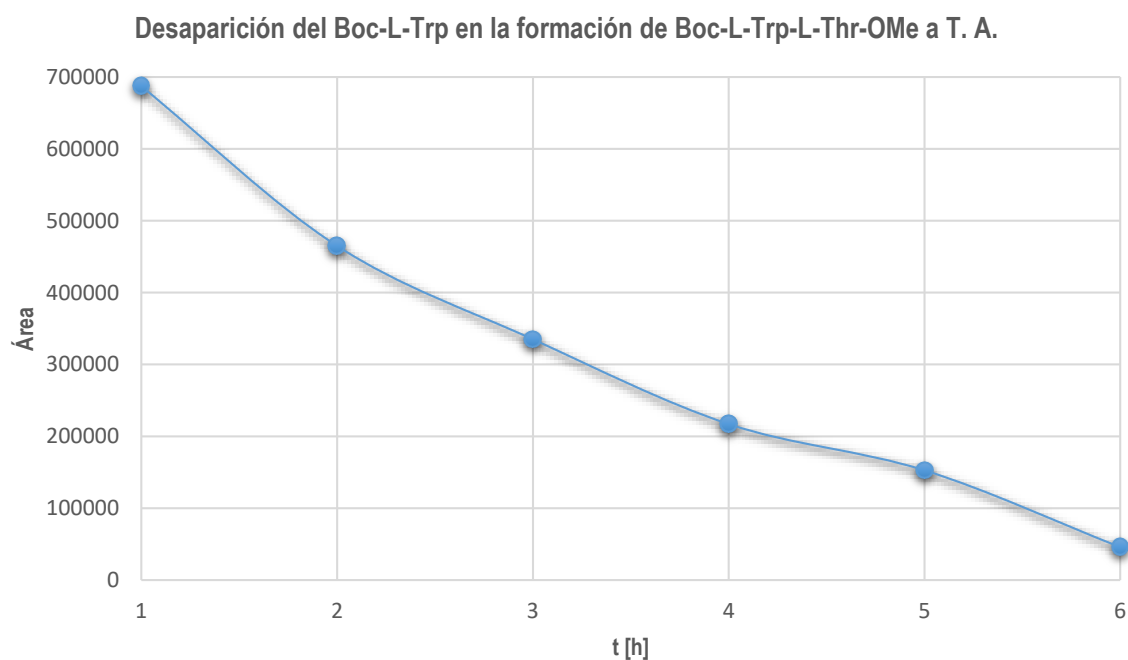


Figura 19. Gráfico del área bajo el pico del cromatograma del Boc-Trp en función del tiempo, a temperatura ambiente

### 5.1.2 Estudio del tiempo de reacción de la formación de Boc-L-Trp-Thr-OMe usando microondas

Para realizar la comparación de tiempos de reacción entre la reacción a temperatura ambiente y en microondas, se pesaron las mismas cantidades descritas en el apartado 5.1.1. En este caso, se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  antes de adicionar la EDC, para tener el Boc-L-Trp (**79**) a  $t=0$  min. Enseguida, el vial fue colocado en el microondas a 120  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$ , se evaporó el disolvente y se analizó por HPLC, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se colocó el vial en el equipo de microondas y se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  cada 5 min, hasta alcanzar los 30 min de reacción. Finalmente, se realizó el gráfico del área bajo el pico del Boc-L-Trp (**79**) en función del tiempo en min (Figura 20). El análisis del gráfico permite concluir que el rendimiento máximo es obtenido desde los primeros 10 min. A pesar de que los puntos de 15 min en adelante no siguen una recta con pendiente igual a cero, tienen valores similares de área, estos datos muestran una variación entre sí, debido a que, al tener una mezcla heterogénea, la toma de alícuotas tuvo una desviación estándar dada. Por lo tanto, se puede concluir que la reacción en microondas es más rápida por varios órdenes de magnitud. Sin embargo, al realizar la reacción en el microondas, se observó que la disolución se tornó de color amarillo, lo cual indica que existe algún tipo de descomposición. La primera propuesta, fue que el Boc-L-Trp (**79**) era el que se estaba descomponiendo, por lo que se realizó el estudio de la activación con 1-hidroxibenzotriazol.

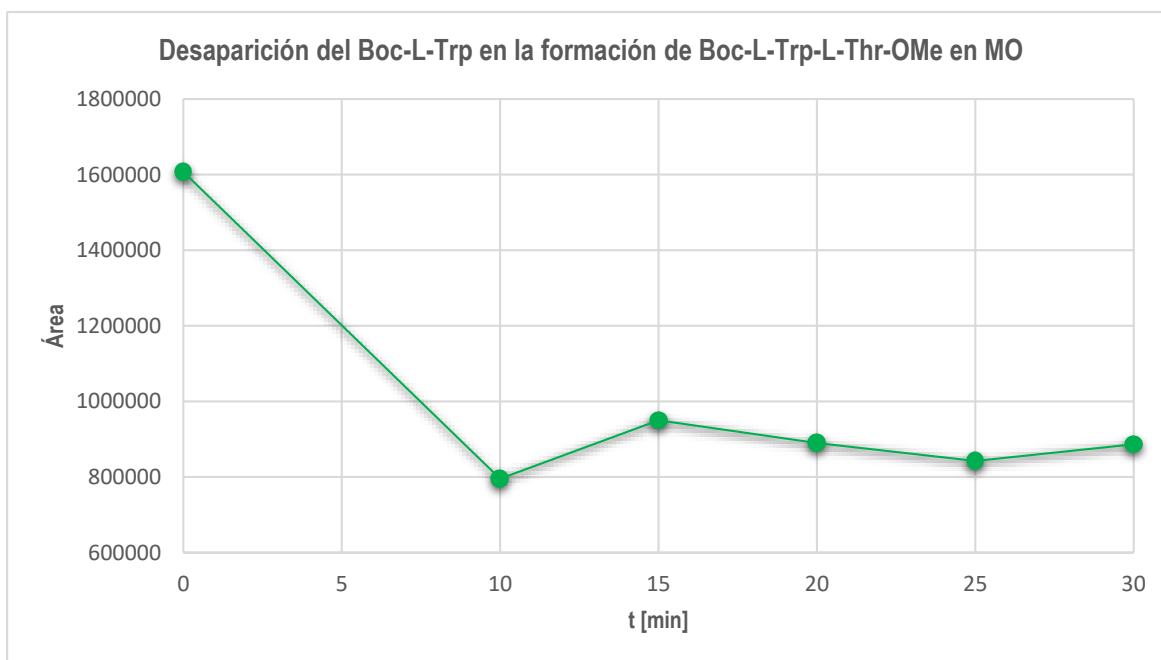


Figura 20. Gráfico del área bajo el pico del cromatograma del Boc-L-Trp en función del tiempo, a 120  $^{\circ}\text{C}$  en microondas

### 5.1.3 Estudio del tiempo de reacción de la formación de los intermediarios reactivos de HOBt del Boc-L-Trp

Para realizar este estudio, en un vial de 10 mL para microondas se colocaron 50 mg de Boc-L-Trp (79), 28 mg de HOBt y 35 mg de EDC, en 5 mL de THF. Se colocó el vial en el equipo de microondas a 120 °C por 5 min, finalizado el tiempo, se tomó una alícuota de 500 µL y se analizó por HPLC, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Se repitió este procedimiento, cada 5 min hasta cumplir 40 min. También, se siguió por c.c.f. cada punto, y lo que se notó fue que comenzaron a aparecer señales menos y más polares que los productos de activación, y la reacción siguió tornándose amarilla. Con esto se confirmó que el Boc-L-Trp (79) se descomponía. Por lo tanto, se evitó utilizar la asistencia de microondas en reacciones que involucraban derivados del Trp. Por último, se realizó el gráfico del área bajo el pico del HOBt, y los dos activados de HOBt del Boc-L-Trp, en función del tiempo (Figura 21), en el cual se puede ver que el máximo rendimiento obtenido fue a los 5 min, ya que, en los demás puntos para los 3 sustratos, los valores de área bajo el pico son similares.

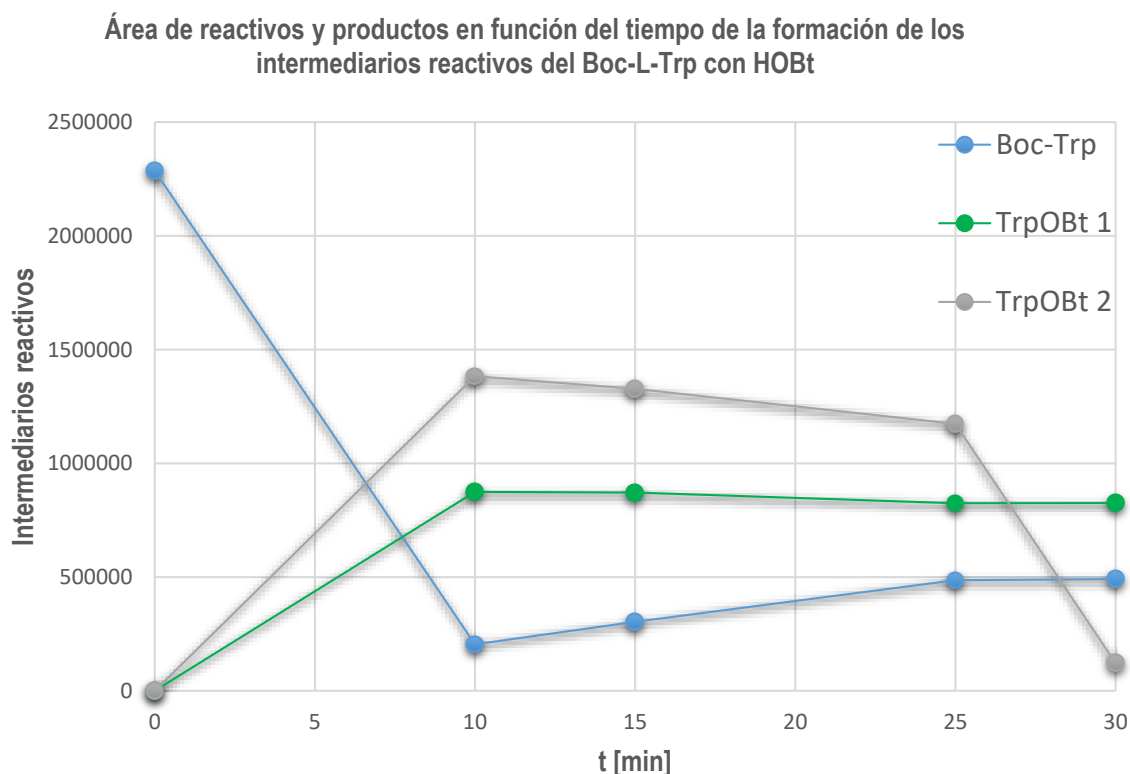


Figura 21. Gráfico del área bajo el pico del cromatograma de los activados de HOBt de Boc-L-Trp en función del tiempo

#### 5.1.4 Estudio del tiempo de reacción de la formación de los intermediarios reactivos de HOBt de la Boc-L-Thr en microondas

Se decidió disminuir la temperatura de reacción en el microondas, y estudiar la activación de Boc-L-Thr (**70**, Esquema 24), debido al cambio de ruta sintética descrito en la sección 4.1. En este caso, se estudió solo la activación, ya que la Boc-L-Thr (**70**) al no tener cromóforos, no podía ser detectada por UV, mientras que los intermediarios reactivos con HOBt sí. Para esto, en un vial de 10 mL para microondas, se adicionaron 30 mg de Boc-Thr, 23 mg de HOBt y 29 mg de EDC, en 3 mL de THF. Antes de adicionar la EDC, se tomó una alícuota para tener la concentración del HOBt a  $t = 0$  min. Enseguida, se colocó el vial en el reactor de microondas a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, se tomó una alícuota de  $450\ \mu\text{L}$  y se inyectó en el cromatógrafo. Se colocó el vial en el microondas a la misma temperatura por periodos de 5 min hasta cumplir 30 min, se tomaron alícuotas de  $450\ \mu\text{L}$  después de cada periodo, excepto para 20 min. Finalmente, se graficó el área bajo el pico del HOBt, y los dos intermediarios activos de la Boc-L-Thr (Figura 22), en el cual se observa de nuevo, que la reacción alcanza su mayor rendimiento en el primer periodo de tiempo en el microondas. Además, no se mostró cambio colorido, la mezcla permaneció incolora todo el tiempo, lo cual indica que el Boc-L-Trp (**79**) era el responsable de la coloración amarilla en los experimentos anteriores.

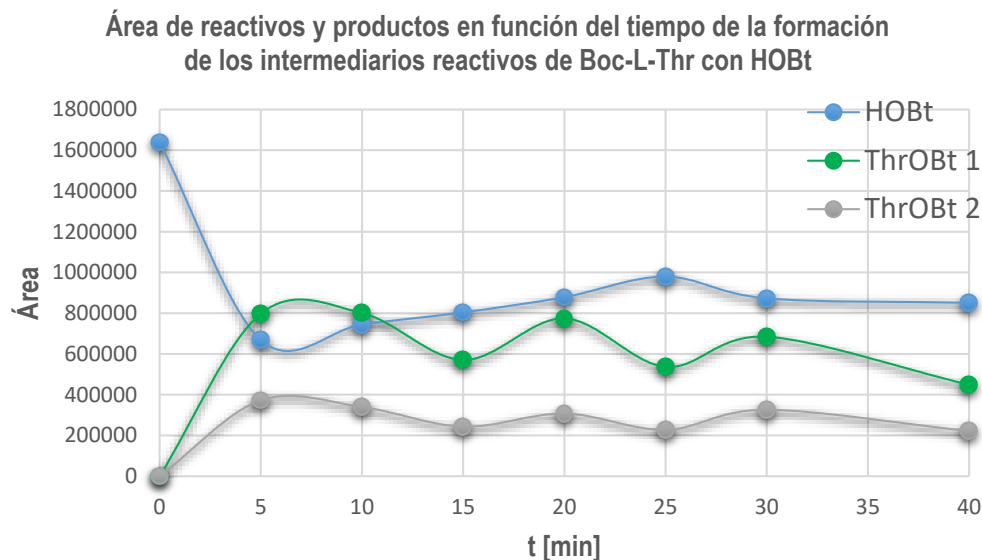
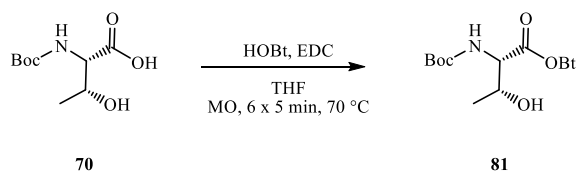


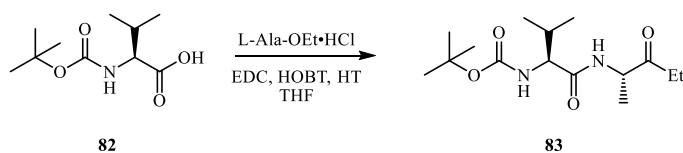
Figura 22. Gráfico del área bajo el pico del cromatógrafo de los activados de HOBt de la Boc-Thr en función del tiempo



Esquema 24. Reacción de la activación de Boc-L-Thr con HOBt

### 5.1.5 Estudio de las condiciones de reacción de la metodología general de síntesis de péptidos

Con los resultados obtenidos anteriormente, se decidió trabajar a 70 °C, realizando la síntesis de Boc-L-Leu-L-Ala-OEt (**83**, Esquema 25) para realizar una comparación con el artículo de Morales-Serna et al. [23]. Para esto, se utilizó como reactivo limitante la Boc-L-Leu (**82**) y 1.1 equivalentes de los otros reactivos, utilizando las cantidades de hidrotalcita utilizadas en el artículo. Los primeros experimentos realizados 1, 2 y 3 (Tabla 2), dieron como resultado, que a los 10 min se obtiene el rendimiento máximo, y no importa si se aumenta el tiempo de reacción. Con este resultado, se decidió proceder con dos experimentos más, 4 y 5 (Tabla 2), aumentando la cantidad de hidrotalcita. Esto resultó en un aumento en el rendimiento, y se siguió manteniendo el supuesto que a 10 min la reacción llegaba a su máximo rendimiento. Por lo tanto, estas fueron las condiciones elegidas para la metodología de síntesis de péptidos.



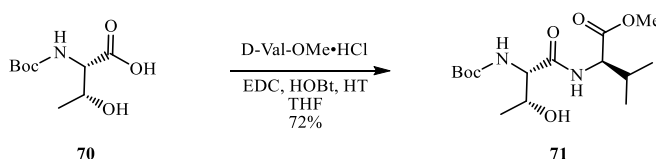
Esquema 25. Formación de Boc-L-Leu-L-Ala-OEt

	Boc-Leu (mmol)	Ala-OEt·HCl (mmol)	HOBt (mmol)	EDC (mmol)	HT (mg)	T (°C)	t (min)	Rendimiento (%)
1	0.25	0.275	0.275	0.275	50	70	10	66
2	0.25	0.275	0.275	0.275	50	70	15	65
3	0.25	0.275	0.275	0.275	50	70	20	65
4	<b>0.25</b>	<b>0.275</b>	<b>0.275</b>	<b>0.275</b>	<b>100</b>	<b>70</b>	<b>10</b>	<b>91</b>
5	0.25	0.275	0.275	0.275	100	70	15	89

Tabla 2. Condiciones de reacción en la obtención de Boc-L-Leu-L-Ala-OEt.

## 5.2 Formación de Boc-L-Thr-D-Val-OMe

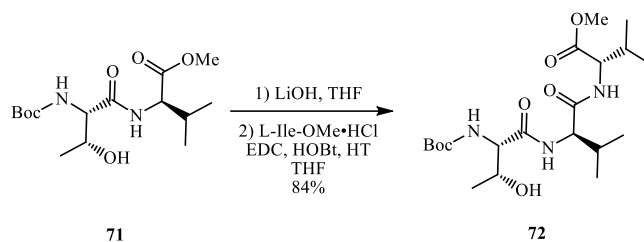
Para realizar la síntesis del tetrapéptido se comenzó por la Boc-L-Thr (**70**). Para esto, se colocaron todos los reactivos necesarios para la formación del enlace peptídico en el vial de 10 mL para microondas a 70 °C, durante 10 min (Esquema 26). Se tomó una c.c.f., y se reveló en UV, lo cual mostró que aún existían intermediarios reactivos de HOBt, ya que se revelaban dos señales muy tenues no polares, en un sistema 50:50 AcOEt/Hex. Sin embargo, este era el máximo rendimiento de la reacción bajo estas condiciones. Por lo tanto, se prosigió a tratar la reacción. Se confirmó la obtención del producto **71**, dado que en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observaron las señales del éster metílico de la D-Val-OMe en 3.72 ppm, y de la amida formada en 7.08 ppm. Además, en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C, se encuentran las señales de los carbonilos correspondientes al éster metílico y la amida en 172.3 ppm y 172.0 ppm. Finalmente, en el espectro de IR se observan las bandas de los carbonilos en 1741.19, 1702.39 y 1650.04 cm<sup>-1</sup>, del éster metílico, el carbamato y de la amida del enlace peptídico respectivamente. Además, en la región de 3484.39 a 3351.60 se encuentran las vibraciones de los enlaces N-H de la amida y el carbamato. Sin embargo, cada una de las señales muestra dos picos, por lo que se sugiere que existen 2 conformaciones favorecidas en la estructura.



Esquema 26. Formación de Boc-L-Thr-D-Val-OMe en microondas

## 5.3 Formación de Boc-L-Thr-D-Val-L-Ile-OMe

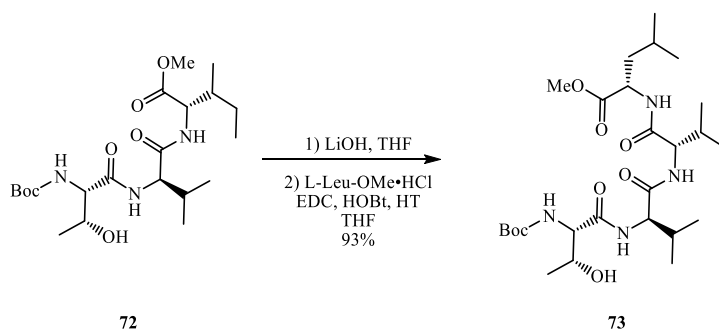
La hidrólisis básica del éster se siguió por c.c.f. y se detuvo cuando se observó la transformación completa de la materia prima. La formación del enlace peptídico, se realizó de la misma manera que para la Boc-L-Thr-D-Val-OMe (**71**), e igualmente, la c.c.f. revelaba la presencia de ácido activado. La formación del producto (**72**) de esta reacción (Esquema 27) se confirmó por RMN-<sup>1</sup>H, dado que se tenían las señales del éster metílico perteneciente a la L-isoleucina, y la nueva amida formada, en 3.70 ppm y en 6.96 ppm, respectivamente. En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C, presenta una nueva señal de carbonilo, teniendo 4 carbonilos en 173.2 ppm, 172.3 ppm, 171.4 ppm y 156.4 ppm.



Esquema 27. Formación de Boc-L-Thr-D-Val-L-Ile-OMe en microondas

#### 5.4 Formación Boc-L-Thr-D-Val-L-Ile-L-Leu-OMe

De igual manera, la hidrólisis básica del éster se siguió por c.c.f. y se detuvo cuando se observó transformación completa de la materia prima. Se realizó la metodología general de síntesis de péptidos, y también se revelaron intermediarios reactivos de HOBT remanentes por c.c.f. El producto (73) fue confirmado por RMN-<sup>1</sup>H, por la señal de los protones del éster metílico en 3.70 ppm, y un nuevo doblete en la zona de amidas, confirmando el nuevo enlace peptídico. En RMN-<sup>13</sup>C, se observa una nueva señal de carbonilo, siendo ahora 5 carbonilos en 172.3 ppm, 171.5 ppm, 171.2 ppm, 170.9 ppm y 156.1 ppm.



Esquema 28. Formación de Boc-L-Thr-D-Val-L-Ile-L-Leu-OMe en microondas

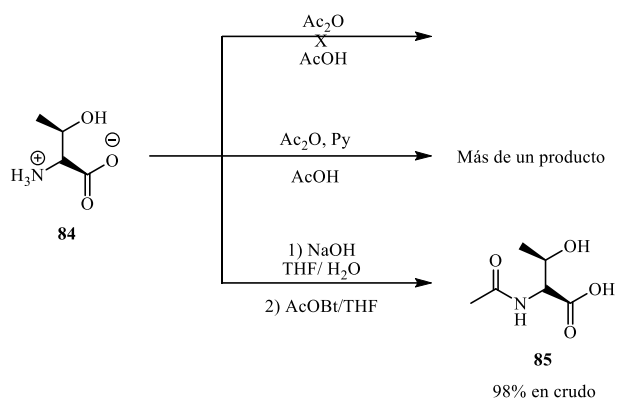
#### 5.5 Acetilación del L-Thr-OMe·HCl

Para poder obtener el dipéptido 78, se intentó primero realizar la acetilación de la L-Thr (84) de 3 maneras diferentes como se muestra en el Esquema 29. En la primera metodología <sup>[41]</sup> que se intentó, se suspendía la L-Thr en ácido acético (AcOH) y anhídrico acético (Ac<sub>2</sub>O), se calentaba a 40 °C y se agitaba durante 15, para obtener el 66% de rendimiento. Sin embargo, no se obtuvo reacción con esta

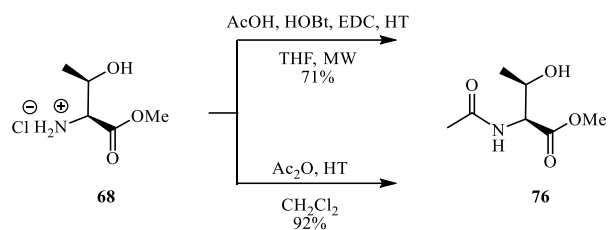


técnica. Después, se intentó repetir la reacción, pero en presencia de una base, piridina, como tradicionalmente se hacen las acetilaciones (Esquema 29). Con esta modificación, sí hubo reacción, pero al revelar la c.c.f había más de un producto y se dificultaba destilar la piridina sin tener que subir la temperatura, dado que no se podía lavar la piridina con ácido acuoso porque el producto era muy polar y se repartía también al agua. Por lo tanto, se intentó otra fuente de acetilo, mediante la activación de ácido acético con 1-hidroxibenzotriazol y DCC, para posteriormente adicionarlo a la L-Thr con la amina liberada (Esquema 29). Dado el problema ya mencionado de la polaridad tan alta del producto, no se podían hacer lavados ácidos o básicos, como en las reacciones anteriormente discutidas, por lo que se debía de llevar a la fase orgánica al HOBt a pH 4, hasta que la c.c.f ya no revelaba en UV. Después, se llevaba el pH a 3 y se evaporaba el agua a presión reducida. Finalmente, las sales obtenidas fueron lavadas con acetona caliente y filtradas. Se evaporaba el disolvente del filtrado, obteniendo de esta manera el producto. Sin embargo, quedaba un remanente de materia prima sin reaccionar.

Dado el problema con la alta polaridad del producto, se decidió partir del L-Thr-OMe-HCl (**68**) para disminuir la polaridad del producto, al tener protegido el ácido. Para esto, se volvió a intentar acetilar con ácido acético activado por HOBt, pero esta vez se realizó como en la técnica general de síntesis de péptidos en microondas, (Esquema 30). A pesar de que la polaridad del nuevo producto **76** disminuía, este se seguía repartiendo una parte al agua, por lo que, al realizar los lavados con ácido cítrico,  $K_2CO_3$  y salmuera, una parte se repartía, teniendo rendimientos variables del 35 – 70 %. Finalmente, dada la experiencia con el uso de HT, se propuso utilizarla como base para realizar la acetilación (Esquema 30), ya que, de esta manera, la base utilizada se quitaría filtrando, sin necesidad de lavar con ácido, técnica descrita en la sección experimental. De esta manera, el rendimiento fue aumentado hasta el 92 %, obteniendo el producto puro, de una forma rápida. La estructura del producto **76**, fue confirmada mediante RMN- $^1H$  por la aparición de las señales de la amida y el metilo del acetato, en 6.51 ppm y 2.07 ppm respectivamente. En el espectro de IR, se observan los carbonilos del éster metílico y la amida, en 1747.25 y 1642.72  $cm^{-1}$ , respectivamente.



Esquema 29. Acetilación de la L-Thr

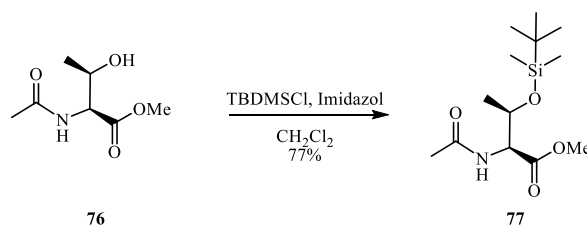


Esquema 30. Acetilación del L-Thr-OMe-HCl

## 5.6 Sililación de N-Ac-L-Thr-OMe

Para esta reacción, se intentaron técnicas [42,43] donde se utilizaba DMF como disolvente e imidazol como base. Sin embargo, los rendimientos eran muy bajos ( $\leq 30\%$ ), aun cuando se adicionaba DMAP al 10% en mol y se dejaba en agitación hasta por 36 h. Después, se realizó la técnica descrita por Luo [44], sin tener un aumento en el rendimiento de la sililación. Finalmente, se llevó a cabo la técnica descrita por Mathieu [45], quienes calentaban la reacción a 40 °C en DMF, sin embargo, en el intento realizado, se utilizó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se llevó a reflujo. La reacción se siguió por c.c.f., y se observó que la reacción llevaba un mejor avance que en los intentos anteriores. Finalmente, se realizaron variaciones a la técnica descrita por Mathieu, ya que si se adicionaban 2.4 eq de TBDMSCl desde el principio, el rendimiento decaía como en las otras técnicas, pero si se adicionaba 1.2 eq de TBDMSCl y después de 6 h de reflujo se adicionaban 1.2 eq más (Esquema 31), el rendimiento subía hasta el 77% después de purificar por cromatografía en columna. Se confirmó el producto por RMN-<sup>1</sup>H por la presencia del singlete que integra para 9 H en 0.83 ppm, correspondiente al *ter*-butilo, y los dos singletes en 0.02 ppm y -0.03 ppm, que integran para 3 H cada uno, pertenecientes a los metilos del silicio. En RMN-<sup>13</sup>C, se encuentra los metilos del *ter*-butilo en 25.7 ppm, y los metilos enlazados a silicio, en -4.3 ppm y -5.2 ppm. En el espectro de IR, la banda ancha del alcohol en 3277.08 cm<sup>-1</sup> de **76**, desaparece en

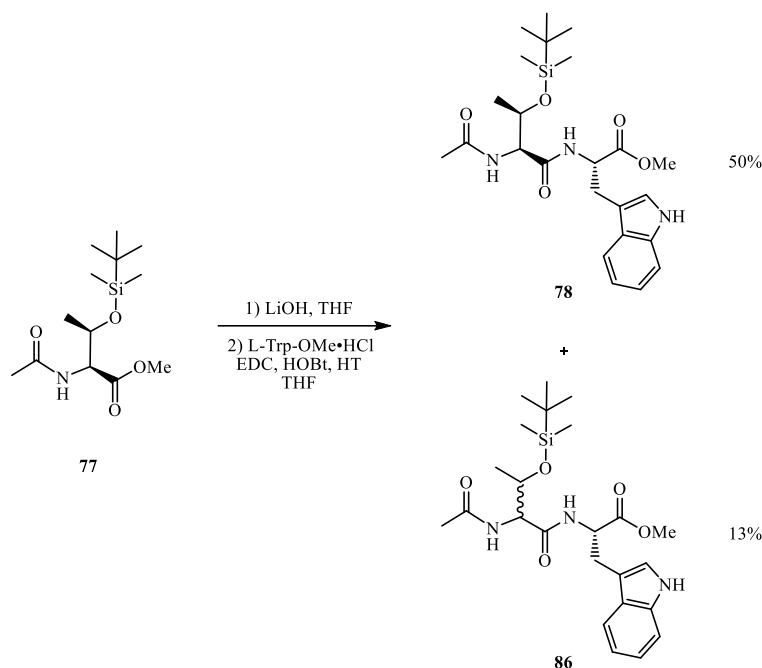
el espectro de **77**, ya que se formó el enlace oxígeno silicio, y se logran observar las señales correspondientes a los confórmers de la amida en 3349.46 y 3302.84  $\text{cm}^{-1}$ .



Esquema 31. Sililación de *N*-Ac-Thr con TBDMSCl

### 5.7 Formación de *N*-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OMe

La hidrólisis básica del éster se detuvo cuando la c.c.f. reveló transformación total de la materia prima. La segunda reacción (Esquema 32) se decidió realizar en microondas, para probar si el éster metílico del L-Trp se descomponía como el Boc-L-Trp (**79**). Para esto, se siguieron las condiciones estándar de microondas como en la formación del dipéptido Boc-L-Thr-D-Val-OMe (**71**), obteniendo un rendimiento en crudo del 85%. Se tomó una c.c.f. del crudo y se reveló el producto **78** con un  $R_f = 0.55$ , y el producto **86** con un  $R_f = 0.18$ , en un sistema 55:45 Hex:AcOEt. Se adquirió un espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la mezcla de productos (Sección 9.1, Espectro 1). Posteriormente, se realizó una cromatografía en columna para separar los productos en un sistema 55:45 Hex:AcOEt, seguido de un sistema 50:50 Hex:AcOEt. Se obtuvo un 50% de rendimiento de **78** y un 13% de **86** (Esquema 32). Se adquirieron los espectros de cada producto (Sección 9.1, Espectro 2 y 3 respectivamente), con lo que se confirmó que eran diastereoisómeros. Por lo tanto, se sugirió que eran epímeros, sin embargo, no se podía confirmar cuál centro quiral se epimerizó. Además, el producto se tornó de color amarillo y permaneció su coloración en cada uno de los productos, esto sugiere que al igual que el Boc-L-Trp (**79**) existe una descomposición por parte del éster metílico del L-Trp.

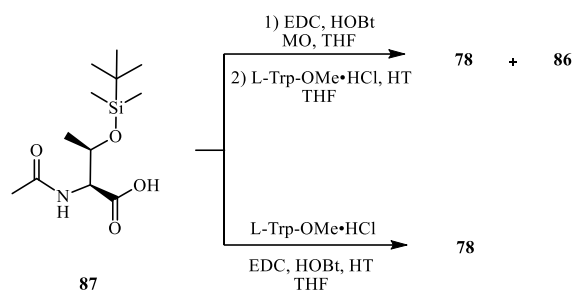


Esquema 32. Formación de *N*-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OMe en microondas

Debido a lo anterior, se realizaron otros experimentos para conocer en qué parte de la reacción se estaba llevando a cabo la epimerización y si las microondas estaban promoviendo esto. Se tomó un lote de **87** y se repartió en dos partes iguales para realizar las reacciones indicadas en el Esquema 33. La primera reacción se efectuó en dos pasos, el primero fue la activación del ácido carboxílico **87** en microondas bajo las condiciones estándar utilizadas en el intento anterior. Enseguida, se adicionó la mezcla de intermediarios reactivos de benzotriazol en un matraz que contenía una mezcla de L-Trp-OMe·HCl e HT, y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 h. Se adquirió el espectro de RMN-<sup>1</sup>H y se observó que se volvió a obtener mezcla de diastereoisómeros. Se determinó las proporciones de un producto sobre el otro con base en el espectro, las cuales fueron 58% para el producto **78** y 42% para el producto **86**. El segundo experimento (Esquema 33) se llevó a cabo a temperatura ambiente, adicionando todos los reactivos en un paso. Se obtuvo el 94% de rendimiento en crudo, en c.c.f. se observó la señal del producto deseado (**78**) y ácido activado remanente. Se realizó la RMN-<sup>1</sup>H, y se observó el producto **78** y ácido activado con HOBT.

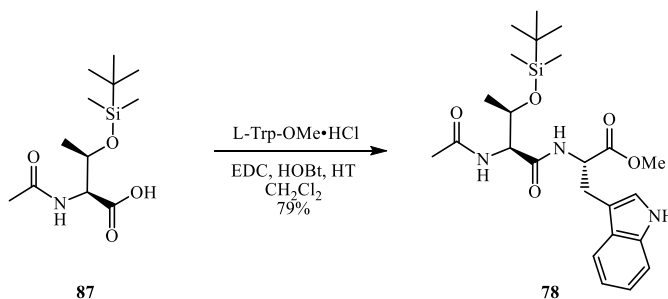
Los resultados anteriores indican, que a temperatura ambiente no se lleva a cabo la epimerización, que esta ocurre durante la activación en MO. Además, la proporción del diastereoisómero **86** aumenta cuando se realiza la activación en MO como primer paso, que realizando la reacción en MO como en el esquema 32. También, esto significa que la epimerización se está llevando a cabo en alguno de los centros quirales de la treonina, y se puede sugerir que ocurre cuando el ácido carboxílico **87** está

enlazado a la EDC, y que debido al impedimento estérico generado por el grupo TBDMS, el HOBt no puede reaccionar fácilmente con el ácido activado por la carbodiimida. Debido a que en temperatura ambiente no hay epimerización, se piensa que en MO se favorece la conformación adecuada para que la EDC pueda desprotonar el hidrógeno  $\alpha$  de la treonina y llevar a cabo la epimerización. Sin embargo, con la información que se tiene no se pueden confirmar estos supuestos.



Esquema 33. Comparación de la formación de *N*-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OMe en MO y T.A.

Debido a los resultados obtenidos anteriormente, se decidió llevar a cabo la reacción de acoplamiento a temperatura ambiente en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Esquema 34). Se eligió este disolvente debido a que la activación ocurre más rápido que en THF, según el trabajo de Morales-Serna; <sup>[46]</sup> y que en el reactor de MO utilizado no se puede trabajar este disolvente. La reacción fue seguida por c.c.f. y como en los demás casos de acoplamiento de aminoácidos mencionados, quedan intermediarios reactivos de HOBt sin reaccionar. Sin embargo, en comparación con los péptidos realizados en microondas, los intermediarios reactivos de HOBt sin reaccionar a temperatura ambiente parecen tener una mayor proporción. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna, confirmando la formación del producto por RMN- $^1\text{H}$  por la presencia del  $\text{CH}_3$  correspondiente al éster metílico en 3.67 ppm y las señales en la región de protones aromáticos. En el espectro de IR, la señal en  $3302.48\text{ cm}^{-1}$  se hizo ancha debido a que en esta región se encuentran las vibraciones N-H de las dos amidas y del indol del triptófano, en  $1743.95$  se encuentra la banda del carbonilo del éster, y en  $1650.98\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda ancha debido a que corresponde a las dos amidas de la molécula.



Esquema 34. Formación de *N*-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OMe a temperatura ambiente

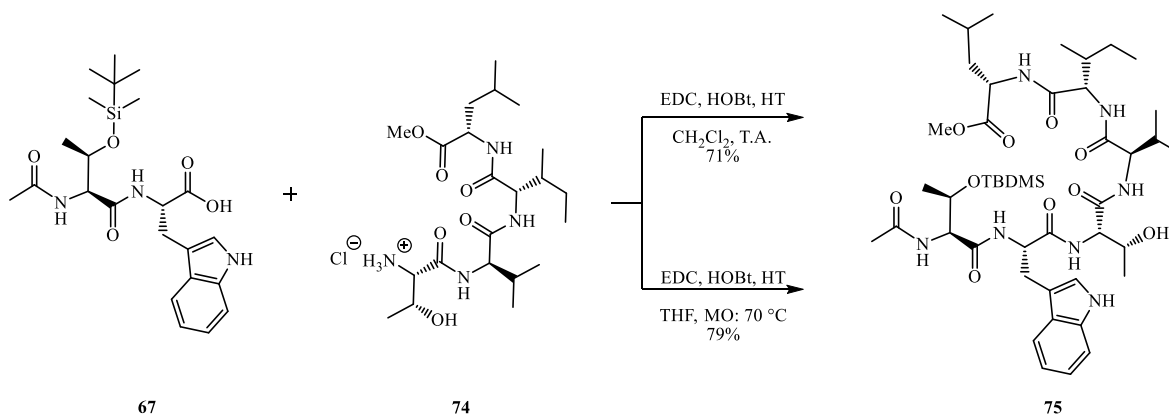
## 5.8 Formación del hexapéptido

Inicialmente, realizó la hidrólisis básica de **78**, la cual se detuvo cuando se observó la transformación completa de la materia prima. Para la desprotección del grupo Boc en **73**, se saturó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con HCl, al término de esta operación, la c.c.f. mostró una transformación completa.

Dado que uno de los péptidos posee un triptófano en su estructura, y para evitar su descomposición, el acoplamiento se llevó a cabo en temperatura ambiente bajo las condiciones indicadas en el Esquema 35. En este caso, la presencia de activados de HOBt en c.c.f se repitió también, por lo que fue purificado en cromatografía en columna. La confirmación de la obtención del producto por RMN-<sup>1</sup>H, fue la aparición de las señales de los CH<sub>3</sub> del sililo. Sin embargo, en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub> se veían anchas todas las señales, esto debido a las fuertes interacciones intramoleculares del péptido, ya que es probable que, con las interacciones de puente de hidrógeno internas, el péptido ya mostrara un giro-β. Debido a esto, se obtuvo el espectro en DMSO-d<sub>6</sub> para poder romper estas interacciones, ya que al ser un disolvente muy polar sus interacciones intermoleculares con la molécula son lo suficientemente fuertes para romper las intramoleculares. En cambio, el cloroformo es poco polar, por lo que sus interacciones con la molécula son débiles, y predominan las interacciones intramoleculares.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H en DMSO-d<sub>6</sub>, se logró observar los 6 protones de amida esperados. En RMN-<sup>13</sup>C, se tiene los 7 carbonilos en 172.7 ppm, 171.3 ppm, 171.0 ppm, 170.6 ppm, 169.7 ppm, 169.4 ppm y 169.1 ppm. También se mandó el producto a espectrometría de masas-ESI, obteniendo un m/z [M+H]<sup>+</sup> de 902.7269, mientras que el calculado para C<sub>45</sub>H<sub>75</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>Si fue de 902.5417, lo cual corresponde con la masa esperada. En el espectro de IR, se observa una señal muy ancha en 3281.50 cm<sup>-1</sup> correspondiente a todas las vibraciones N-H, y la vibración OH; en 1743.08 cm<sup>-1</sup> se encuentra la banda correspondiente al carbonilo del éster. Finalmente, en 1642.32 cm<sup>-1</sup> se observa una señal muy intensa que corresponde a los carbonilos de todas las amidas y el carbamato presentes en la molécula.

Por último, se repitió la reacción en MO, para conocer si el Trp se seguía descomponiendo. En este caso, no se mostró cambio de coloración y se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 79% después de purificar por cromatografía en columna, un rendimiento mayor al obtenido a temperatura ambiente. Además, el triptófano ya no mostró descomposición, ya que no se tornó de color amarillo la mezcla de reacción.

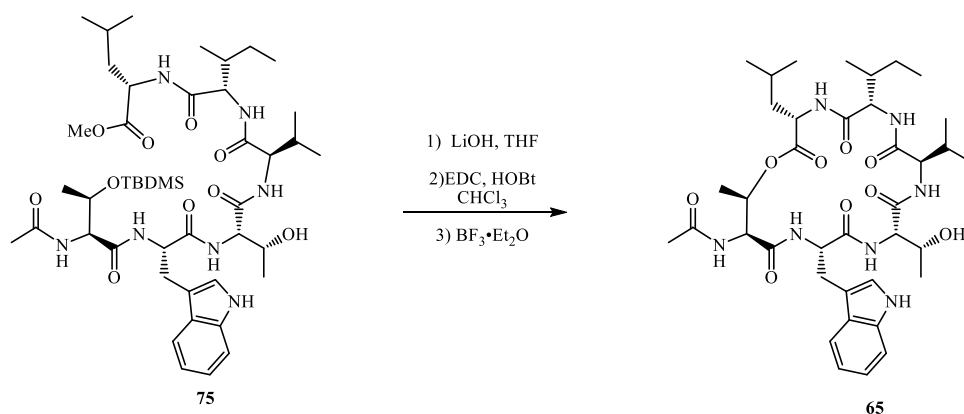


Esquema 35. Formación de *N*-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-L-Thr-D-Val-L-Ile-L-Leu-OMe a temperatura ambiente

### 5.9 Formación del ciclohexadepsipéptido mediante una macrolactonización

Con base en el trabajo de Velázquez, <sup>[32]</sup> se realizó la macrolactonización mostrada en el Esquema 36. En esta reacción se esperaba que el alcohol que cerrara el ciclo fuera el alcohol sililado, para que, al desprotegerse con el  $\text{BF}_3$  que es un ácido de Lewis, se formara un alcoholato que es más nucleofílico que el alcohol de la segunda treonina. Sin embargo, en la c.c.f después de realizar los lavados ácidos y básicos, revelaba más de un producto. Por lo tanto, se realizó una cromatografía en columna, con la cual se obtuvieron tres productos. Siendo el menos polar el producto deseado **65** con un rendimiento de 27%. El segundo producto se obtuvo con un 11% y el tercero, el más polar, se obtuvo con un rendimiento del 27%. La estructura del producto **65** se confirmó por RMN- $^1\text{H}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  (Sección 9.1, Espectro 4), dado que se encontró una señal del protón  $\beta$  de la Thr a campo bajo, en 5.12 ppm, lo que es esperado al ser un protón base de oxígeno de éster. También se puede notar, que ya no se encuentran las señales correspondientes al TBDMS. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  (Espectro 5), se observan las señales de los siete carbonilos, del indol y la señal base de oxígeno de éster en 76.06 ppm. Sin embargo, el producto no estaba totalmente puro.

En los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de los otros dos productos, no se logró determinar a qué estructuras correspondían. Por lo que se mandaron los tres productos a espectrometría de masas-ESI. Para el producto final **65**, se obtuvo un  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 756.5952$ , mientras que el calculado para  $\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{O}_9$  es de 756.4291, lo cual corresponde a la masa esperada. Para el producto de polaridad media y el menos polar, se obtuvo un  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 802.6455$  en ambos casos. Sin embargo, no se logró elucidar un producto que correspondiera con esta masa.



Esquema 36. Macrolactonización para la síntesis del análogo de xenobactina

## 6. CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar una metodología para la síntesis de péptidos en disolución mediada por microondas. La cual mostró tiempos cortos de reacción con respecto a las reacciones a temperatura ambiente, con rendimientos moderados.
- Es posible que el triptófano necesite de un grupo protector en el nitrógeno del indol, para evitar su descomposición durante las transformaciones a las que es sometido en microondas.
- El triptófano no se ve afectado por las microondas, cuando ya está acoplado a un aminoácido.
- Se llevó a cabo la síntesis total del análogo de xenobactina **65**, utilizando la metodología desarrollada en microondas en combinación con reacciones a temperatura ambiente.
- La metodología de acoplamiento en microondas desarrollada, funciona también para acoplar péptidos, como lo fue en el caso de la formación del hexapéptido, que se acopló el dipéptido **67**, con el tetrapéptido **74**.



## 7. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### NOTAS

- Los reactivos utilizados para la síntesis de los compuestos fueron de marca Sigma-Aldrich, y los disolventes empleados en las reacciones y purificaciones, fueron destilados de acuerdo a lo descrito en la literatura.<sup>[47]</sup>
- El equipo de microondas utilizado para los acoplamientos de los aminoácidos fue Monowave 300, marca Anton Paar.
- Se utilizó sílica gel de malla 230-400 como fase estacionaria en las cromatografías en columna. La técnica empleada fue de tipo flash.<sup>[48]</sup>
- El avance de las reacciones fue observado mediante el uso de cromatoplasas Macherey-Nagel, usando como reveladores, una lámpara de UV de onda corta, yodo sólido y ninhidrina al 0.1% en agua/etanol.
- Los espectros de infrarrojo (IR) se adquirieron usando un espectrofotómetro IR Bruker Tensor 27.
- En la descripción de los espectros de IR, (I) significa muy intensa, (i) intensa, (m) media, (b) baja intensidad, (A) muy ancha, (a) ancha, (f) fina, (F) muy fina y las bandas están en una escala de  $\text{cm}^{-1}$ .
- Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), se obtuvieron en un equipo Bruker Avance 300 MHz y un Bruker Avance III 400 MHz.
- En RMN- $^1\text{H}$ , la multiplicidad se describe de la siguiente manera; (s): singulete, (d): doblete, (dd): doble de dobles, (m): multiplete, (sa): singulete ancho, (cd): cuarteto de dobletes y (J): constante de acoplamiento.
- Las rotaciones ópticas fueron determinadas en un espectropolarímetro Jasco, J720.
- Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrofotómetro de masas modelo 1200 Infinity Series, empleando la técnica de ionización por electrospray (ESI<sup>+</sup>).
- Los análisis de HPLC se adquirieron en un cromatógrafo Agilent 1200 Series Binary SL, con un detector de UV con arreglo de diodos y un espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000 APCI.
- Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Fischer-Jones.

## Boc-L-Thr-D-Val-OMe (71)

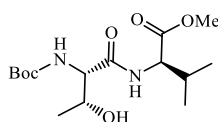
En un vial de 10 mL para microondas, se adicionaron 0.1001 (0.46 mmol) g de Boc-L-Thr **68**, 0.0845 g (0.50 mmol) de D-Val-OMe-HCl, 0.0772 g (0.50 mmol) de HOBt, 0.1800 g de HT, 0.0961 g (0.50 mmol) de EDC y 5 mL de THF. El vial se colocó en el reactor de microondas a 70 °C durante 10 min, con una rampa de potencia de 0 – 40 W. Terminado el tiempo, se filtró la mezcla sobre celita y se lavó con AcOEt. Se adicionaron 10 mL de AcOEt al filtrado y se lavó con ácido cítrico (4 x 2mL), con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% (4 x 2.5 mL) y con salmuera (3 x 2 mL). Después, la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna en un sistema 70:30 Hex/AcOEt, seguido de un sistema 60:40 Hex/AcOEt. Finalmente, se obtuvieron 0.1093 g (p.f.= 96 °C) de un sólido blanco, siendo el 72% de rendimiento.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 7.08 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.53 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.46 (dd, J = 8.7, 4.8 Hz, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.07 (d, J=7.9 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.30 (s, 1H), 2.19 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.20 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.9 Hz, 3H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 172.3, 172.0, 156.7, 80.6, 66.9, 58.5, 57.5, 52.4, 30.8, 28.4, 19.2, 18.6, 17.8.

**IR (ATR):** (FTIR por reflectancia ATR) λ<sup>-1</sup> (cm<sup>-1</sup>), 3484.39 (m, a), 3437.51 (m, a), 3386.51 (m, a), 3351.60 (m, a), 3242.65 (m, A), 1741.19 (m, f), 1702.39 (l, F), 1650.04 (l, f), 1516.65 (i, a).

**RO:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +2 (C= 0.1 g/100 mL, MeOH)



71

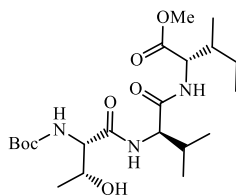
## Boc-L-Thr-D-Val-L-Ile-OMe (72)

En un matraz de fondo redondo se adicionaron 0.2565 g (0.77 mmol) del dipéptido **71**, 5 mL de THF y 5 mL de LiOH 2.5 N, y se colocó en agitación durante 1 h. Se adicionó hielo seco hasta ver la precipitación de Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en la fase acuosa, y se diluyó la mezcla con 7 mL de AcOEt. Se siguió acidulando con HCl 1 mol/L hasta pH=3. Se extrajo la fase acuosa con AcOEt (4 x 15 mL), se reunieron las fases orgánicas y se lavaron con salmuera (3 x 4mL). Finalmente, se secó la fase orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniendo 0.2241 g (0.70 mmol) del ácido carboxílico, siendo el 91% en crudo.

En un vial de 10 mL para microondas, se adicionaron 0.0981 g (0.30 mmol) g Boc-L-Thr-D-Val-OH, 0.0646 g (0.35 mmol) de L-Ile-OMe-HCl, 0.0513 g (0.35 mmol) de HOBt, 0.1240 g de HT, 0.0645 g (0.35 mmol) de EDC y 4 mL de THF. El vial se colocó en el reactor de microondas a 70 °C durante 10 min, con una rampa de potencia de 0 – 40 W. Terminado el tiempo, se filtró la mezcla sobre celita y se lavó con AcOEt. Se adicionaron 10 mL de AcOEt al filtrado y se lavó con ácido cítrico (4 x 2mL), con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% (4 x 2.5 mL) y con salmuera (3 x 2 mL). Después, la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó al vacío. Se obtuvieron 0.1147 g de un sólido blanco, siendo el 84% de rendimiento en crudo.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 7.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.68 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.27 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 4.09 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.40 (s, 1H), 2.28 – 2.08 (m, 2H), 1.96 – 1.78 (m, 2H), 1.44 (d, J = 1.7 Hz, 9H), 1.30 – 1.09 (m, 5H), 1.00 – 0.80 (m, 12H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 173.2, 172.3, 171.4, 156.4, 80.5, 66.9, 60.0, 58.3, 56.8, 52.4, 37.5, 29.8, 29.6, 28.4, 25.3, 19.7, 19.4, 18.0, 15.7, 11.7.



72

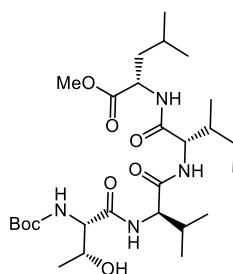
### Boc-L-Thr-D-Val-L-Ile-L-Leu-OMe (73)

En un matraz de fondo redondo se adicionaron 0.1952 g (0.44 mmol) de **72**, 3 mL de THF y 3 mL de LiOH 2.5 N, y se colocó en agitación durante 2 h. Se adicionó hielo seco hasta ver la precipitación de Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en la fase acuosa, y se diluyó la mezcla con 5 mL de AcOEt. Se siguió acidulando con HCl 1 mol/L hasta pH=3. Se extrajo la fase acuosa con AcOEt (4 x 10 mL), se reunieron las fases orgánicas y se lavaron con salmuera (3 x 3mL). Finalmente, se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniendo 0.1890 g (0.44 mmol) del ácido carboxílico, siendo el 100% en crudo.

En un vial de 10 mL para microondas, se adicionaron 0.1084 g (0.25 mmol) g Boc-L-Thr-D-Val-L-Ile-OH, 0.0511 g (0.28 mmol) de L-Leu-OMe·HCl, 0.0437 g (0.28 mmol) de HOBt, 0.1000 g de HT, 0.0540 g (0.28 mmol) de EDC y 5 mL de THF. El vial se colocó en el reactor de microondas a 70 °C durante 10 min, con una rampa de potencia de 0 – 40 W. Terminado el tiempo, se filtró la mezcla sobre celita y se lavó con AcOEt. Se adicionaron 10 mL de AcOEt al filtrado y se lavó con ácido cítrico (4 x 2mL), con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% (4 x 2.5 mL) y con salmuera (3 x 2 mL). Después, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó al vacío. Se obtuvieron 0.1306 g de **73**, siendo el 93% en crudo.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.58 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.32 (m, 5H), 3.71 (sa, 4H), 2.19 (m, 1H), 1.94 (m, 1H), 1.63 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.20 (m, 5H), 0.88 (m, 18H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 172.3, 171.5, 171.2, 170.9, 156.1, 80.3, 66.8, 59.7, 59.2, 58.0, 40.9, 36.7, 29.7, 28.3, 24.8, 22.8, 21.7, 19.6, 18.1, 15.6, 11.3.



73

### ***N*-Ac-L-Thr-OMe (76)**

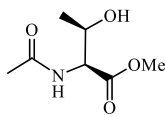
En un matraz de fondo redondo se adicionaron 0.1100 g (0.65 mmol) de **68**, 0.1540 g de HT y 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se colocó la mezcla en agitación durante 30 min, transcurrido el tiempo se adicionaron 78 µL (0.83 mmol) de Ac<sub>2</sub>O y se dejó en agitación por 30 min más. Posteriormente, se evaporó el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al vacío y se filtró la hidrotalcita sobre celita lavando con AcOEt, se lavó la fase orgánica con 2 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 5% m/V. Se colectó la fase orgánica y se extrajo exhaustivamente la fase acuosa con AcOEt. Se reunieron las fases orgánicas, se secaron con NaSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo un sólido blanco (p. f.= 103-104 °C) con un rendimiento del 92%.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 6.51 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.57 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 4.32 (cd, *J* = 6.4, 2.6 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.20 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 171.7, 171.1, 68.0, 57.5, 52.7, 23.1, 20.1.

**IR (ATR):** (FTIR por reflectancia ATR) λ<sup>-1</sup> (cm<sup>-1</sup>), 3277.08 (b, a), 1747.28 (m, f), 1642.72 (m, a), 1542.58 1077.45 (i, F).

**RO:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -10.2 (C= 0.098 g/100 mL, MeOH)



76

### **N-Ac-O-TBDMS-L-Thr (77)**

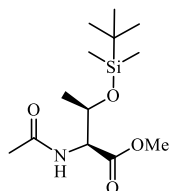
En un matraz de fondo redondo seco se adicionaron 0.1047 g (0.60 mmol) de **76**, 0.0484 g (0.72 mmol) de imidazol y 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, y se colocó en agitación. En un embudo de presión compensada se adicionaron 8 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro y 0.1088 g (0.72 mmol) de TBDMSCI, y se adicionó lentamente a la mezcla anterior. Terminada la adición, se colocó a reflujo la reacción durante 6 h, enseguida se adicionaron 0.0822 g (1.2 mmol) y 0.1088 (0.72 mmol) de TBDMSCI y se continuó a reflujo hasta cumplir 16 h. Al término del tiempo de reflujo, se dejó en agitación durante 12 h. Finalmente, se adicionó 3 mL de agua, se adicionó HCl 1 mol/L hasta pH= 2, se colectó la fase orgánica, y se lavó la fase acuosa 4 veces con 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se reunieron todas las fases orgánicas, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniendo un líquido denso incoloro. Se purificó el producto mediante una cromatografía en columna flash, en un sistema 60:40 Hex/AcOEt, seguido de un sistema 50:50 Hex/AcOEt. Se obtuvo 0.1277 g de un sólido blanco en forma de agujas (p.f.= 48-49 °C) con un rendimiento del 77%.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 6.09 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.55 (dd, *J* = 9.4, 1.8 Hz, 1H), 4.41 (qd, *J* = 6.2, 1.8 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), -0.03 (s, 3H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 171.1, 170.6, 68.9, 57.9, 52.3, 29.8, 25.7, 23.3, 21.0, -4.3, -5.2.

**IR (ATR):** (FTIR por reflectancia ATR) λ<sup>-1</sup> (cm<sup>-1</sup>), 3349.46 (b, a), 3302.84 (b, a), 1753.95 (m, f), 1728.92 (i, f), 1650.98 (i, f), 1535.81 (i, f), 1096.71 (i, f).

**RO:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +3.84 (C= 0.14 g/100 mL, MeOH)



77

### **N-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OMe (78)**

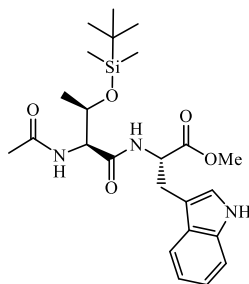
En un matraz de fondo redondo se adicionaron 0.1386 g (0.48 mmol) de **77**, 3 mL de THF y 3 mL de LiOH 2.5 N, y se colocó en agitación durante 2 h. Se adicionó hielo seco hasta ver la precipitación de Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en la fase acuosa, y se diluyó la mezcla con 5 mL de AcOEt. Se siguió acidulando con HCl 1 mol/L hasta pH=3. Se extrajo la fase acuosa con AcOEt (4 x 10 mL), se reunieron las fases orgánicas y se lavaron con salmuera (3 x 3mL). Finalmente, se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniendo 0.1245 g (0.45 mmol) del ácido carboxílico, siendo el 94% en crudo. Al matraz del producto crudo, se adicionaron 0.1269 g (0.50 mmol) de L-Trp-OMe·HCl, 0.0778 g (0.50 mmol), 0.1820 g de HT, 0.0953 g (0.50 mmol) y 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se colocó la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 18 h. Se filtró la mezcla sobre celita, se evaporó al vacío el disolvente, se diluyó con 20 mL de AcOEt y se lavó con ácido cítrico (4 x 2 mL) hasta pH=3, seguido de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% (4 x 2.5 mL) hasta pH=11 y, por último, se lavó con salmuera (3 x 2 mL) hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto fue purificado en una cromatografía en columna con un sistema 50:50 AcOEt/Hex, seguido de un sistema 55:45 AcOEt/Hex. Se obtuvieron 0.1705 g de un sólido blanco (p.f.= 96 °C), siendo un rendimiento del 79%.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 8.28 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.15 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.97 (dt, *J* = 8.2, 5.7 Hz, 1H), 4.32 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.28 (m, 2H), 1.94 (s, 3H), 1.07 (s, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.80 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.04 (s, 3H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm], 171.9, 170.9, 169.4, 136.3, 127.6, 122.8, 122.4, 119.8, 118.6, 111.4, 110.1, 67.8, 58.0, 53.1, 52.4, 28.1, 25.7, 23.3, 17.9, 17.9, -4.9, -5.0.

**IR (ATR):** (FTIR por reflectancia ATR) λ<sup>-1</sup> (cm<sup>-1</sup>), 3302.46 (m, A), 1743.95 (m, f), 1647.18 (i, a), 1518.65 (i, a), 1092.85 (i, f).

**RO:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +12 (C= 0.1 g/100 mL, MeOH)



78

### **N-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-L-Thr-D-Val-L-Ile-L-Leu-OMe (75)**

#### *Hidrólisis de N-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OMe*

En un matraz de fondo redondo se adicionaron 0.1059 g (0.22 mmol) de **78**, 1.5 mL de THF y 1.5 mL de LiOH 2.5 N, y se colocó en agitación durante 1 h. Se adicionó hielo seco hasta ver la precipitación de Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en la fase acuosa. Posteriormente, se diluyó la mezcla con 5 mL de AcOEt, y se aciduló con HCl 1 mol/L hasta pH=3. Se extrajo la fase acuosa con AcOEt (4 x 10 mL), se reunieron las fases orgánicas y se lavaron con salmuera (3 x 3mL). Finalmente, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniendo 0.0986 g (0.21 mmol) del ácido carboxílico, siendo el 96% en crudo.

#### *Desprotección del grupo Boc*

En un matraz de fondo redondo de 2 bocas se colocaron 0.1306 g (0.23 mmol) de **73** y 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro. En una boca se conectó un sistema hacia una trampa de NaOH acuoso y en la segunda boca, se burbujeó HCl hasta saturar el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Finalmente, el disolvente se evaporó a presión reducida.

#### *Formación del hexapéptido (75) a temperatura ambiente*

En un matraz de fondo redondo se adicionaron 0.0503 g (0.11 mmol) de N-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OH (**67**), 0.0590 g (0.12 mmol) de L-Thr-D-Val-L-Ile-L-Leu-OH·HCl (**74**), 0.0181 g (0.12 mmol) de HOBT, 0.0430 g de HT, 0.0230 g (0.12 mmol) de EDC y 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se colocó la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Se filtró la mezcla sobre celita, se evaporó al vacío el disolvente, se diluyó con 20 mL de AcOEt y se lavó con ácido cítrico (4 x 2 mL) hasta pH=3,



seguido de  $K_2CO_3$  al 5% (4 x 2 mL) hasta pH=11 y, por último, se lavó con salmuera (3 x 2 mL) hasta pH neutro. La fase orgánica se secó sobre  $Na_2SO_4$  anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto (**75**) fue purificado en una cromatografía en columna con un sistema 50:50 AcOEt/Hex, seguido de un sistema 45:45:10 AcOEt/Hex/MeOH. Se obtuvieron 0.0700 g de un sólido blanco (p.f.= 154-155 °C), siendo un rendimiento del 71%.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm], 10.75 (s, 1H), 8.34 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.94 (m, 3H), 7.61 (m, 3H), 7.30 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.01 (m, 3H), 4.88 (m, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.30 (m, 5H), 3.96 (m, 2H), 3.58 (s, 3H), 3.13 (dd,  $J = 14.7, 5.0$  Hz, 1H), 2.95 (dd,  $J = 14.7, 8.4$  Hz, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.85 (s, 3H), 1.76 (m, 1H), 1.59 (m, 2H), 1.45 (m, 2H), 1.10 (m, 1H), 0.99 (m, 6H), 0.80 (m, 27H), 0.01 (s, 3H), -0.03 (s, 3H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm], 172.7, 171.3, 171.0, 170.6, 169.7, 169.4, 169.1, 136.0, 127.3, 123.5, 120.8, 118.4, 118.2, 111.2, 109.6, 68.8, 66.8, 58.2, 58.1, 57.4, 56.2, 53.1, 51.6, 50.3, 39.4, 36.3, 30.9, 29.6, 27.9, 25.6, 24.1, 24.1, 22.8, 22.7, 22.6, 21.2, 19.8, 19.3, 19.3, 17.6, 17.4, 15.2, 10.7.

**IR (ATR):** (FTIR por reflectancia ATR)  $\lambda^{-1}$  ( $cm^{-1}$ ), 3281.50 (i, A), 1743.08 (m, a), 1642.32 (l, A), 1526.97 (l, A)

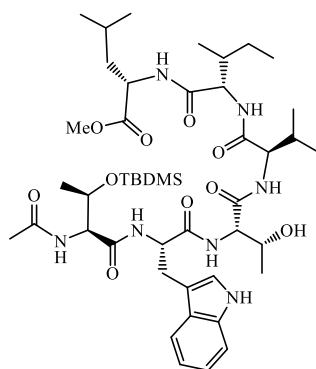
**EMAR (ESI):** m/z  $[M+H]^+$  calculado para  $C_{45}H_{75}N_7O_{10}Si$ : 902.5417, encontrado 902.7269.

**RO:**  $[\alpha]_D^{25} = -15$  (C= 0.108 g/100 mL, MeOH)

#### *Formación del hexapéptido (**75**) en microondas*

En un vial para microondas se adicionaron 0.0200 g (0.043 mmol) de *N*-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OH (**67**), 0.0232 g (0.047 mmol) de L-Thr-D-Val-L-Ile-L-Leu-OH·HCl (**74**), 0.0073 g (0.047 mmol) de HOBT, 0.0170 g de HT, 0.0091 g (0.047 mmol) de EDC y 3 mL THF. El vial se colocó en el reactor de microondas a 70°C durante 10 min, con una rampa de potencia de 0 – 40 w. Terminado el tiempo, se filtró la mezcla sobre celita, se evaporó al vacío el disolvente, se diluyó con 15 mL de AcOEt y se lavó con ácido cítrico (4 x 1.5 mL) hasta pH=3, seguido de  $K_2CO_3$  al 5% (4 x 2 mL) hasta pH=11 y, por último, se lavó con salmuera (3 x 1 mL) hasta pH neutro. La fase orgánica se secó sobre  $Na_2SO_4$

anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto (**75**) fue purificado en una cromatografía en columna con un sistema 50:50 AcOEt/Hex, seguido de un sistema 45:45:10 AcOEt/Hex/MeOH. Se obtuvieron 0.0310 g de un sólido blanco, siendo un rendimiento del 79%.



75

### Análogo de xenobactina (**65**)

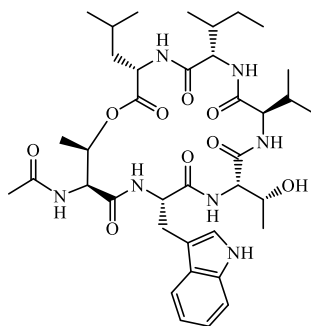
En un matraz de fondo redondo se adicionaron 0.0826 g (0.09 mmol) de **75**, 1 mL de THF y 1 mL de LiOH 2.5 N, y se colocó en agitación durante 2 h. Se adicionó hielo seco hasta ver un sólido blanco en la fase acuosa y se diluyó la mezcla con 5 mL de AcOEt, luego, se siguió acidulando con HCl 1 mol/L hasta pH=3. Se extrajo la fase acuosa con AcOEt (4 x 10 mL), se reunieron las fases orgánicas y se lavaron con salmuera (3 x 3mL). Finalmente, se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniendo 0.0636 g (0.07 mmol) del ácido carboxílico, siendo el 78% en crudo. Al matraz del producto crudo, se adicionaron 0.0160 g (0.1 mmol) de HOBT, 0.0014 g (0.07 mmol) de EDC y 10 mL de CHCl<sub>3</sub> libre de etanol. Se colocó la mezcla a reflujo durante 30 min. Después de este tiempo, se adicionaron 57 µL (0.46 mmol) de BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> y se siguió el reflujo hasta alcanzar las 4 h. Se dejó en agitación durante 15 h. Posteriormente, se evaporó el disolvente a presión reducida y se diluyó el crudo de reacción con 15 mL de AcOEt y se lavó con ácido cítrico (4 x 2 mL), seguido de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% (4 x 2.5 mL) y, por último, se lavó con salmuera (3 x 2 mL). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto fue purificado en una

cromatografía en columna con un sistema 100% AcOEt, seguido de un sistema 100% acetona. Se obtuvieron 0.0144 g de un sólido blanco (p.f.= 122-123 °C), siendo un rendimiento del 27%.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm], <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.86 (s, 1H), 7.88 (m, 3H), 7.70 (dd, *J* = 8.7, 4.3 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.14 (m, 1H), 1.91 (s, 3H).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm], 171.9, 171.8, 171.4, 170.8, 170.2, 169.93, 168.8, 136.2, 127.2, 123.5, 121.0, 118.4, 111.4, 109.5, 76.06.

**EMAR (ESI):** m/z [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>38</sub>H<sub>57</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>: 756.4291, encontrado 756.5952.



65

## 8. REFERENCIAS

1. Rastogi, S.; Shukla, S.; Kalaivani, M.; Singh, G. N. Peptide-based therapeutics: quality specifications, regulatory considerations, and prospects, *Drug Discovery Today*, **2019**, 24, 148 – 162.
2. Jolene, L. L.; Dun, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, 26, 2700 – 2707.
3. Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug Discovery Today* **2015**, 20, 1, 122 – 128.
4. Chi-Lung-Lee, A.; Harris, J. L.; Khanna, K. K.; Hong, J. A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 1 – 21.
5. Ciociola, A. A.; Cohen, L. B.; Kulkarni, P. How drugs are developed and approved by the FDA: Current process and future directions, *Am. J. Gastroenterol.* **2014**, 109, 620 – 623.
6. Draghi, C.; Denis, F.; Tolédano, A.; Letellier, C. Parameter identification of a model for prostate cancer treated by intermittent therapy, *Journal of theoretical biology* **2019**, 461, 117 – 132.
7. Farmacia San Pablo <https://www.farmaciasanpablo.com.mx/> (accessed Oct 22, 2019).
8. U. S. Food and Drug Administration Home Page <https://www.fda.gov/> (accessed Nov 30, 2019).
9. Jones, J. *The chemical synthesis of peptides*, Clarendon press: Oxford, 1994.
10. Himaja, M.; Patidar, N.K.; Karigar, A. A.; Ramana, M. V.; Munirajasekhar, D. Microwave assisted synthesis and antimicrobial activity of Halolitoralin A and its *N*-alkylated analogs, *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* **2011**, 2, 6, 1837-1841.
11. McMurry, J. Biomolecules: Amino acids, peptides, and proteins. *Organic chemistry*, Thomson Brooks/Cole: U.S.A., 2008; 1016 – 1029.
12. Carey, F. A. Amino acids, peptides and proteins, *Organic Chemistry*, McGraw-Hill: New York, 2008; 1107 – 1150.
13. Nelson D. L.; Cox M. M. Amino acids, peptides and proteins. *Principles of biochemistry*; W. H.
14. Koehnke, J.; Naismith, J.; van der Donk, W.A. *Cyclic peptides. From bioorganic synthesis to applications*, Royal Society of Chemistry: England, 2018.
15. Kitagaki, J.; Shi, G.; Miyauchi, S.; Murakami, S.; Yang, Y. Cyclic depsipeptides as potential cancer therapeutics, *Anti-Cancer Drugs* **2015**, 26, 3, 259 – 271.

16. Bhushan, R.; Brückner, H. Use of Marfey's reagent and analogs for chiral amino acid analysis: Assessment and applications to natural products and biological systems, *J. Chromatogr B.* **2011**, 879, 3148 – 3161.
17. Grundmann, F.; Kaiser, M.; Kurz, M.; Schiell, M.; Batzer, A.; Bode, H. B. Structure determination of the bioactive depsipeptide xenobactin from *Xenorhabdus* sp. PB30.3, *RSC Adv.* **2013**, 3, 22072–22077.
18. Dreyer, J.; Rautenbach, M.; Booyesen, E., van Staden, A. D.; Deane, S. M.; Dicks, M. T. *Xenorhabdus khoisanus* SB10 produces Lys-rich PAX lipopeptides and a Xenocoumacin in its antimicrobial complex, *BMC Microbiology* **2019**, 19, 2 – 11.
19. Dreyer, J.; Malan, A. P.; Dicks, L. M. Bacteria of the Genus *Xenorhabdus*, a Novel Source of Bioactive Compounds, *Front. Microbiol.* **2018**, 9, 1 – 13.
20. Benoiton, N. L. *Chemistry of peptide synthesis*, Taylor & Francis Group: U.S.A., 2006.
21. *Methods of Organic Chemistry. Synthesis of peptides and peptidomimetics*; Goodman, M., Felix, A., Moroder, L., Toniolo, C., Eds.; Workbench edition volume E 22a; Georg Thieme Verlag Stuttgart: New York, 2004.
22. Bodanszky, M.; *Principles of peptide synthesis*, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1993.
23. Morales-Serna, J. A.; Jaime-Vasconcelos, M. A.; García-Ríos, E.; Cruz, A.; Angeles-Beltrán, D.; Lomas-Romero, L.; Negrón-Silva, G. E.; Cárdenas, J. Efficient activity of magnesium-aluminium hydrotalcite in the synthesis of amides, *RSC Adv.* **2013**, 3, 23046–23050.
24. Debecker, D. P.; Gaigneaux, E. M.; Busca, G. Exploring, tuning, and exploiting the basicity of hydrotalcites for applications in heterogeneous catalysis, *Chem. Eur.* **2009**, 15, 3920 – 3935.
25. Niculescu-Duvaz, D.; Scanlon, I.; Niculescu-Duvaz, I.; Springer, C. J. A higher yielding synthesis of the clinical prodrug ZD2767P using di-protected 4-[N,N-bis(2-hydroxyethyl)amino]phenyl chloroformate, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 6919 – 6922.
26. Gabriele, B.; Attya, M.; Fazio, A.; Di Domna, L.; Plastina, P.; Sindona, G. A new and expedient total synthesis of ochratoxin A and d<sub>5</sub>-ochratoxin A, *Synthesis* **2009**, 11, 1815 – 1820.
27. Bodanszky, M.; *Peptide chemistry. A practical textbook*, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1993.
28. Crisma, M.; Valle, G.; Moretto, V.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Albericio, F. Reactive intermediates in peptide synthesis: Molecular and crystal structures of HOAt and HOOBt, and some ester and amide derivatives of HOBt, HOAt and HOOBt, *Letters in Peptide Science* **1998**, 5, 247 – 258.

29. Varnava, K. G.; Sarojini, V. Making solid-phase peptide synthesis greener: A review of the literature, *Chem. Asian J.* **2019**, 14, 1088 – 1097.
30. Kopple, K. D. Synthesis of cyclic peptides, *J. Pharm. Sci.* **1972**, 61, 9, 1345 – 1356.
31. Lambert, J. N.; Mitchell, J. P., Roberts, K. D. The synthesis of cyclic peptides, *J. Chem. Soc.* **2001**, Perkin Trans 1, 471 – 484.
32. Velázquez, J. R. Nuevo método de macrolactonización utilizando boro trifluor etil éter ( $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ ). Tesis de licenciatura, UNAM, CDMX, 2004.
33. Morales-Serna, J. A.; Sánchez, E.; Velázquez, R.; Bernal, J.; García-Ríos, E.; Gaviño, R.; Negrón-Silva, G.; Cárdenas, J. Highly efficient macrolactonization of  $\omega$ -hydroxy acids using benzotriazole esters: synthesis of Sansalvamide A, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4940–4948.
34. Serway, R. A.; Jewett, J. W. Electromagnetic waves. *Physics for scientists and engineers*. Thompson Brooks/Cole: 2004; 1080 – 1082.
35. Hayes, B.L. Introduction to microwave chemistry. *Microwave synthesis. Chemistry at the speed of light*, CEM Publishing: U.S.A., 2002; 11 – 18.
36. Kremsner, J. M.; Stadler, A. *A chemist's guide to microwave synthesis. Basic, equipment & application examples*, Anton Paar: Austria, 2013.
37. Yu, H. M.; Chen, S. T.; Wang, K. T. Enhanced Coupling Efficiency un Solid-Phase Peptide Synthesis by Microwave Irradiation, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 18, 4781 – 4784.
38. Čemažar, M.; Craik, D. J. Microwave-assisted Boc-solid phase peptide synthesis of cyclic cysteine-rich peptides, *J. Pept. Sci.* **2008**, 14: 683–689.
39. Bacsa, B.; Desai, B.; Dibó, G., Kappe, C. O., Rapid solid-phase synthesis using thermal and controlled microwave irradiation, *J. Pept. Sci.* **2006**, 12, 633–638.
40. Galanis, A. S.; Albericio, F.; Grøtli, M. Solid-Phase Synthesis in Water Using Microwave-Assisted Heating, *Org. Lett.* **2009**, 20, 11, 4488 – 4491.
41. Lloyd-Williams, P.; Sánchez, A.; Carulla, N.; Ochoa, T.; Giralt, E. Synthetic Studies on Threonines. The Preparation of Protected Derivatives of D-allo and L-allo Threonine for Peptide Synthesis, *Tetrahedron* **1997**, 53, 9, 3369 – 3382.
42. Bagley, M. C.; Glover, C. Synthesis of methyl sulfomycin, sulfomycinic amide and sulfomycine, degradation products of the sulfomycin thiopeptide antibiotics, *Tetrahedron* **2006**, 62, 66 – 72.
43. Cheng, L.; Wu, X.; Lu, Y. Direct asymmetric three-component organocatalytic *anti*-selective Mannich reactions in a purely aqueous system, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1018–1020.

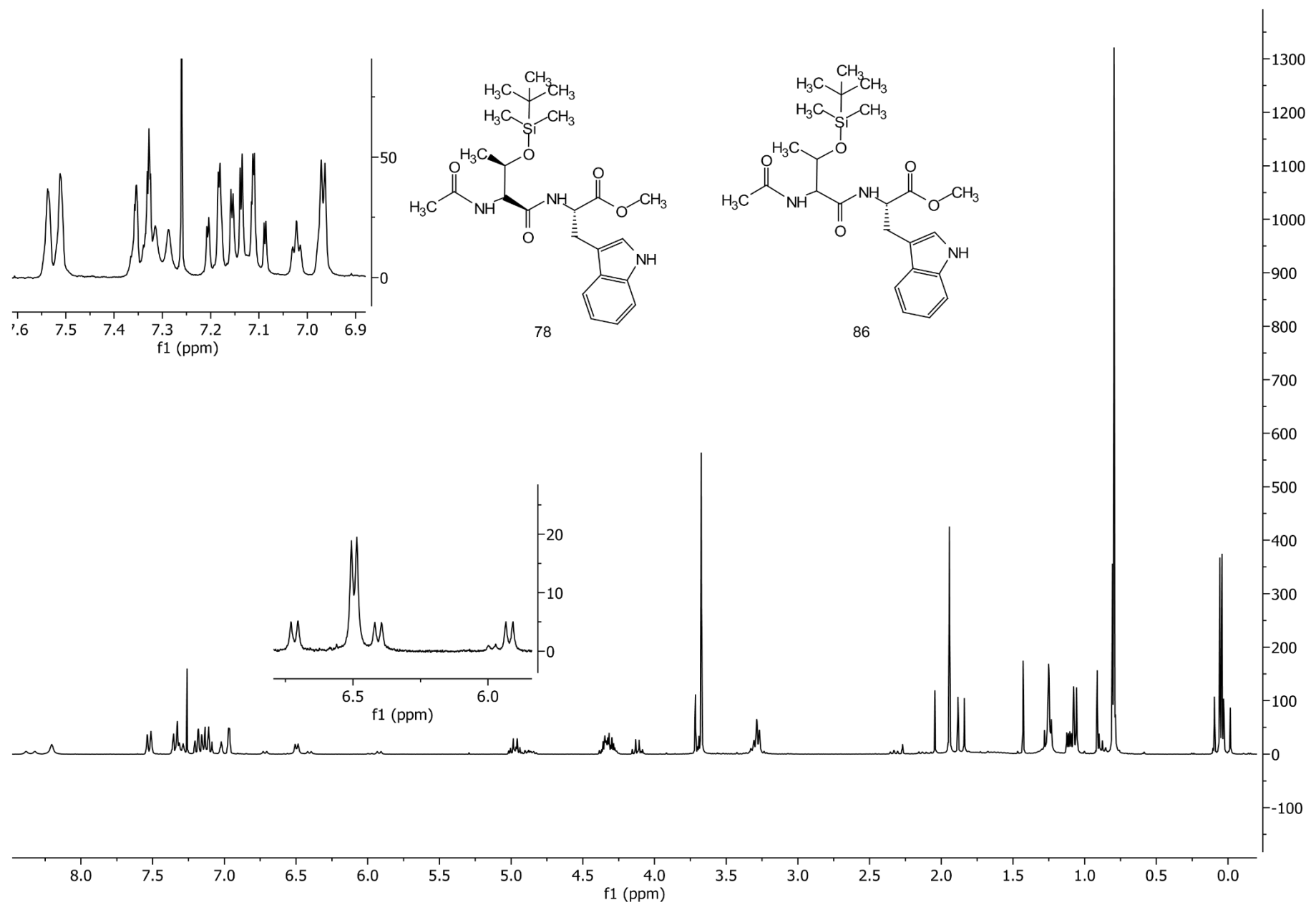
44. Luo, Y.; Evindar, G.; Fishlock, D.; Lajoie, G. Synthesis of *N*-protected *N*-methyl serine and threonine, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 3807–3809.
45. Mathieu, R.; Baurand, A.; Schmitt, M.; Gachet, C. Bourguignon J. Synthesis and biological activity of 2-alkylated deoxyadenosine biphosphate derivatives ad P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1769–1779.
46. Morales-Serna, J. A.; García-Ríos, E.; Bernal, J.; Paleo, E.; Gaviño, R.; Cárdenas, J. Reductions of carboxylic acids using esters of benzotriazole as high-reactivity intermediates, *Synthesis* **2011**, 9, 1375 – 1382.
47. Armarego, W. L. F.; Chai, C.L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier Science: USA, 2003.
48. Still, W.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with modern Resolution, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2935.

## **9.ANEXOS**

### **9.1 Espectros de RMN**

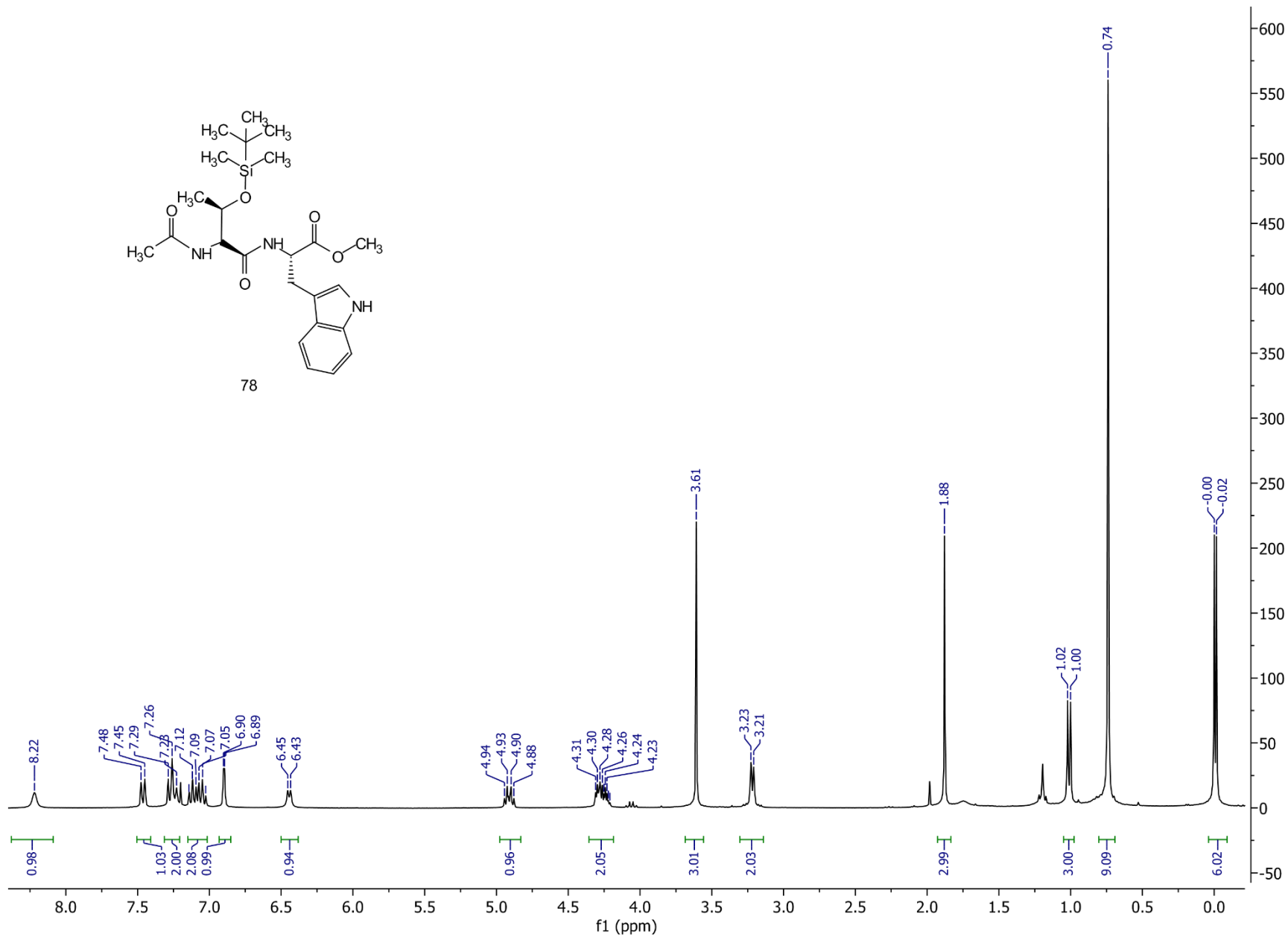
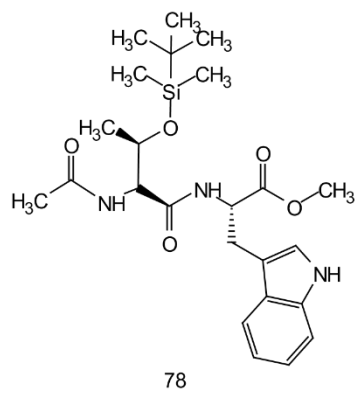


{ 72 }

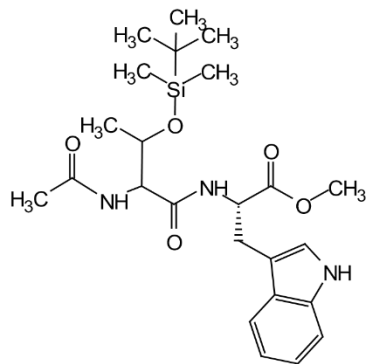


Espectro 1. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Diastereoisómeros de la reacción de formación del *N*-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OMe.

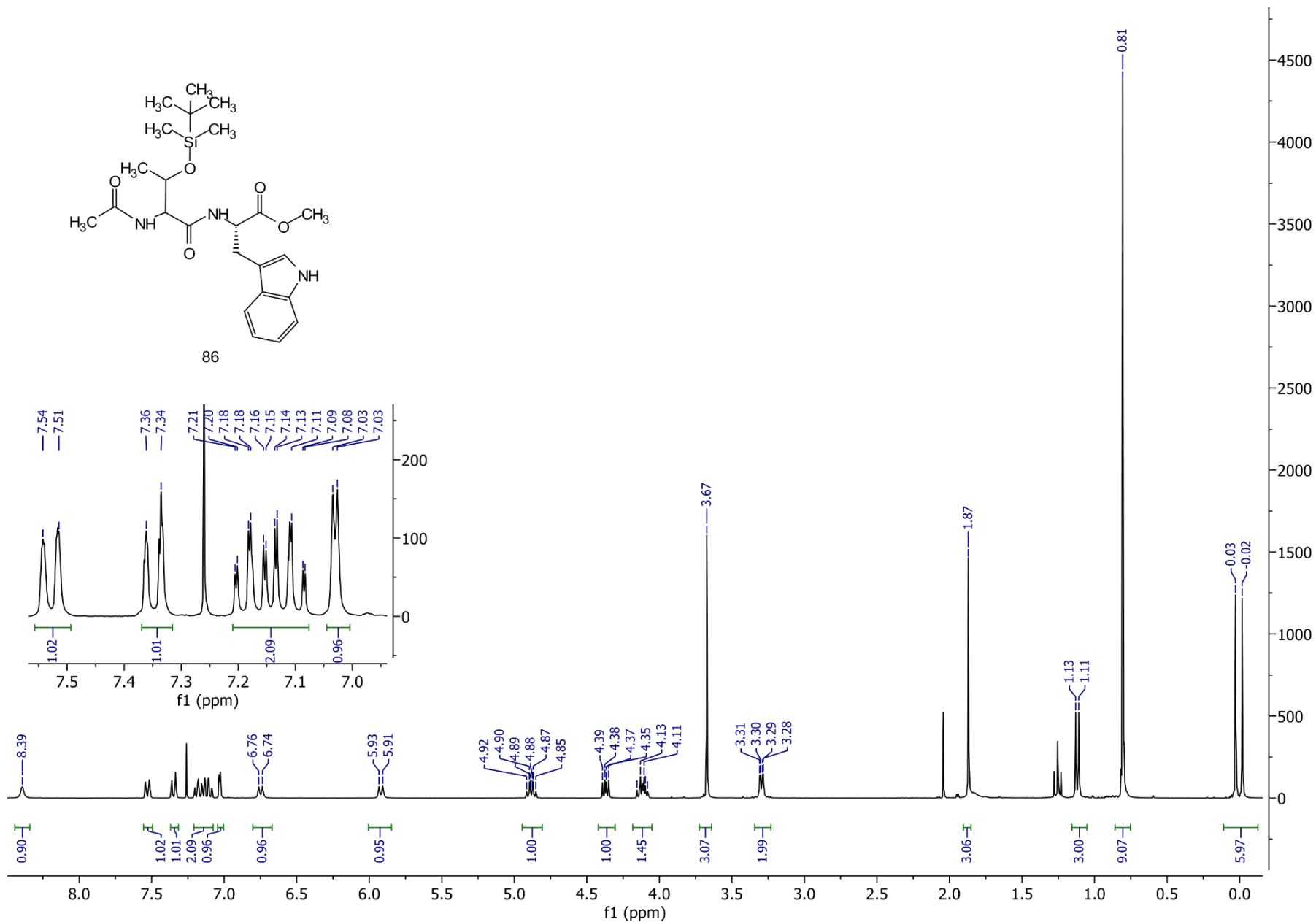
73



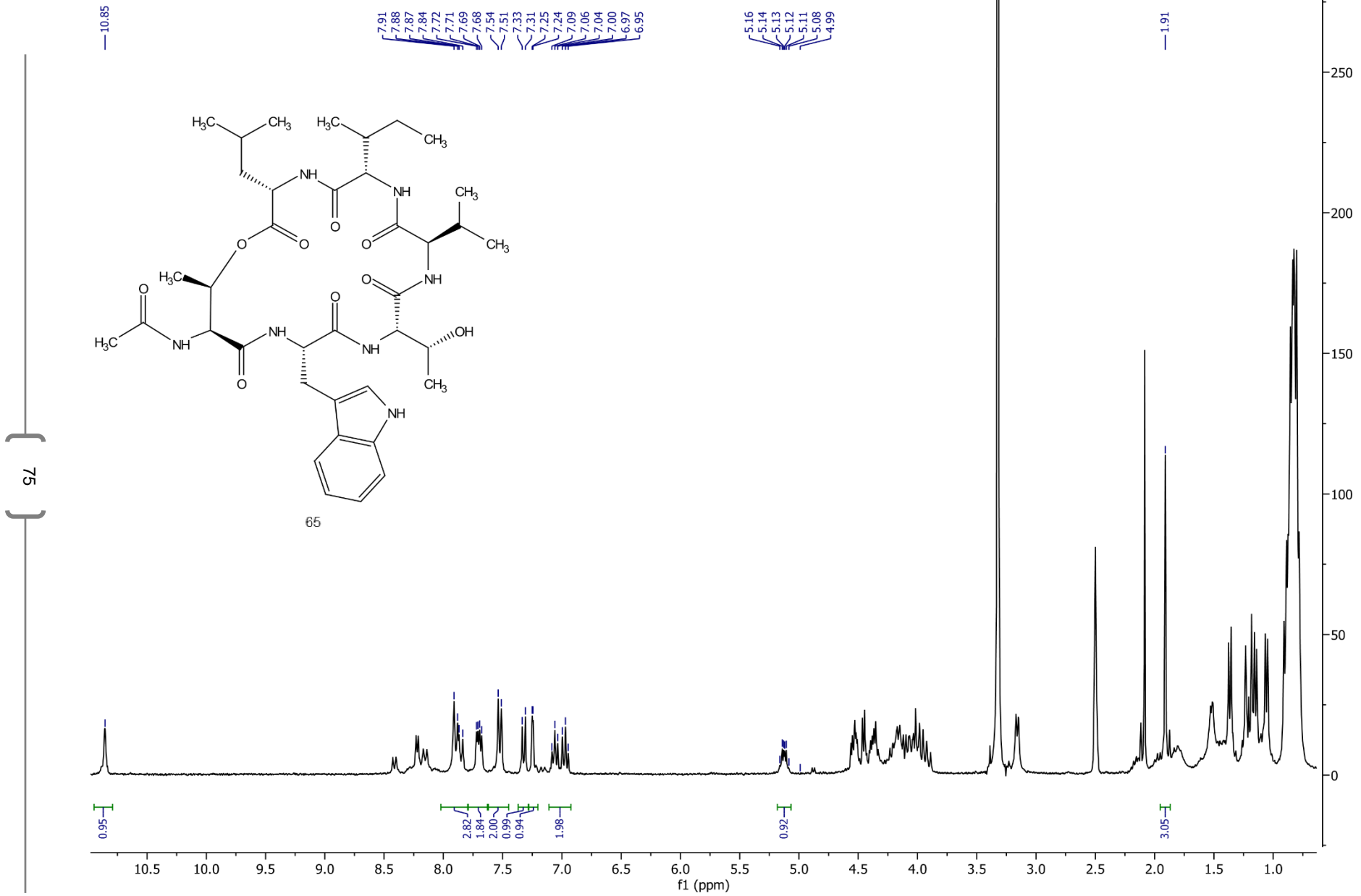
Espectro 2. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>). N-Ac-O-TBDMS-L-Thr-L-Trp-OMe.



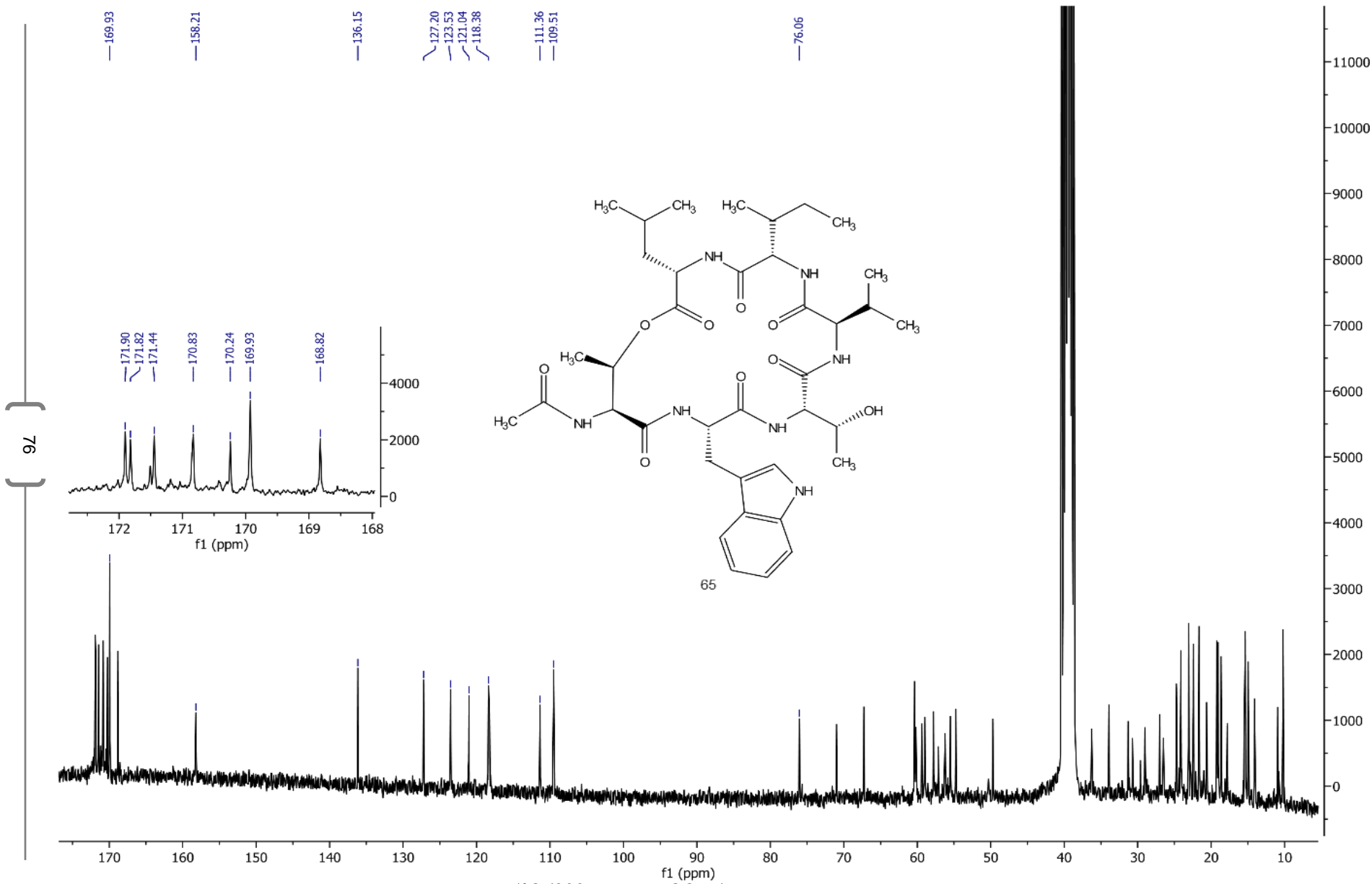
86



Espectro 3. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Diastereoisómero 86.



Espectro 4. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>). Análogo de la xenobactina. .



Spectro 5. RMN-<sup>13</sup>C (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>). Análogo de la xenobactina. .