



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Síntesis de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído dietil
acetal como potencial sustrato de la aldehído
deshidrogenasa (PaKauB) de *Pseudomona
aeruginosa*.**

TESIS

Que para obtener el título de
Química Farmacéutico Biológica

PRESENTA

Arianna Carmona Anguiano

Director de tesis

Dr. José Ignacio Regla Contreras

Asesor de tesis

M. en C. Erick Alberto Correa Padilla



Ciudad de México

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

- AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES por la beca de ayudante de INVESTIGADOR NACIONAL NIVEL III (expedientes de ayudante y de investigador: **884435 / 9516**) recibida durante el desarrollo de este proyecto de investigación.
- Al Programa de Apoyo al Posgrado y la Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM, por el apoyo financiero otorgado en el proyecto **IN220317**.
- AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA por el apoyo financiero otorgado en el proyecto CONACYT **CB-2016-283524**.
- A la Unidad de Servicios para la Industria y la Investigación (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM y al Instituto de Ecología A.C por el apoyo en los análisis espectroscópicos.
- A Israel Bonilla, técnico del laboratorio de resonancia magnética nuclear, del Instituto de Ecología, A.C. por la adquisición de los espectros de resonancia magnética nuclear de 500 MHz.

Agradecimientos

A mis abuelos Oguilvie y Miguel por todo su amor, sus bendiciones diarias y apoyo incondicional, sin ustedes esto no hubiera sido posible.

A mi madre Nadia por guiarme con su sabiduría y su amor, gracias por siempre darme la confianza y acompañarme en todo momento.

A mi hermana Camila y Joaquín, mi nueva familia, por su amor y apoyo en este último paso.

Al Dr. Regla y el Mtro. Correa por compartirme su conocimiento, gracias por su paciencia y su apoyo en todo momento, al igual que mis compañeros de laboratorio, especialmente Diego, gracias por siempre compartirme tu alegría a la vida.

A mis amigos, hermanos de vida, Miguel, Jassibe y Erick por jamás soltar mi mano, no soltaré la suya.

A ti, por tu amor y apoyo en todo momento de la carrera.

A mi amada UNAM, gracias por todos los regalos de vida que me diste y me continúas dando, conocimiento, amigos, amores...

Por mi raza hablará el espíritu.

Abreviaturas**AcOH** = Ácido acético**ALDH** = aldehído deshidrogenasa**ADP** = Adenosín difosfato**AMADHs** = Aminoaldehído deshidrogenasas**ATP** = Adenosín trifosfato**BADH** = Betaína Aldehído Deshidrogenasa**Cbz** = Cloroformiato de bencilo**CCF** = Cromatografía de capa fina**CPO** = Cloroperoxidasa**D₂O** = Óxido de deuterio**DCM** = Diclorometano**DMF** = Dimetilformamida**DMP** = Periodinano de Dess-Martin**EtOH** = Etanol**FmocCl** = Cloruro de flourenilmetiloxicarbonil**GABA** = Ácido γ -aminobutiríco**GB** = Glicina Betaína*i*-**PrOH** = Isopropanol**LiAlH₄** = Hidruro de litio y aluminio**MeOH** = Metanol**MHz** = Megahercio**MTBE** = Metil tert-butil éter**NAD(P)⁺** = Nicotinamida Adedina Dinucleótido Fosfato**Na₂SO₄** = Sulfato de sodio**Ni-Raney** = Niquel Raney**NH₄OH** = Hidróxido de amonio**PaKauB** = AMADH perteneciente a la familia ALDH27**Pd(OH)₂** = Hidróxido de Paladio**PCC** = Clorocromato de piridinio**RMN ¹³C** = Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C**RMN ¹H** = Resonancia Magnética Nuclear de ¹H**SOCl₂** = Cloruro de tionilo

Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN	7
1.1	PSEUDOMONAS	9
1.2	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	9
1.2.1	PATOGENICIDAD Y RESISTENCIA	10
1.3	ENZIMAS	11
1.4	ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS (ALDHs)	13
1.5	AMINOALDEHÍDO DESHIDROGENASAS (AMADHs)	15
1.5.1	FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS AMADH'S BACTERIANAS	16
1.5.2	ESPECIFICIDAD DE LAS AMADH'S POR EL SUSTRATO ALDEHÍDO	20
1.6	ESTRATEGIAS SINTÉTICAS PARA LA SÍNTESIS DE AMINOALDEHÍDOS	20
1.6.1	REACTIVIDAD DE LOS ALDEHÍDOS.	21
1.6.2	SÍNTESIS DE AMINAS A PARTIR DE ALDEHÍDOS.	25
1.6.3	ESTRATEGIAS SINTÉTICAS PARA DIETILACETAL DE γ -GLUTAMIL- γ -AMINOBUTIRALDEHÍDO.	27
1.7	ÁCIDOS CARBOXÍLICOS Y REACTIVIDAD	28
1.8	SÍNTESIS DE AMIDAS	29
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
3	HIPÓTESIS	32
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVO GENERAL	33
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES	33
5	MATERIAL Y MÉTODOS	34
5.1	REACTIVOS	34
5.2	DISOLVENTES	34
5.3	MATERIAL	34
5.4	EQUIPOS E INSTRUMENTOS	35
5.5	TÉCNICAS EXPERIMENTALES	36
6	PARTE EXPERIMENTAL	37
6.1	SÍNTESIS DE DIETILACETAL DE γ -GLUTAMIL- γ -AMINOBUTIRALDEHÍDO (1)	37
6.1.1	ÁCIDO <i>N</i> -((BENCILOXI)CARBONIL)-L-GLUTÁMICO (2)	37
6.1.2	ANHÍDRIDO <i>N</i> -((BENCILOXI)CARBONIL)-L-GLUTÁMICO (3)	37
6.1.3	ÁCIDO <i>N</i> -((BENCILOXI)CARBONIL)-L-GLUTÁMATO DE BENCILO (4)	38
6.1.4	<i>N</i> ² -((BENCILOXI)CARBONIL)- <i>N</i> ⁵ -(4',4'-DIETOXIBUTIL) GLUTAMINATO DE BENCILO (5)	39
6.1.5	DIETILACETAL DE γ -GLUTAMIL- γ -AMINOBUTIRALDEHÍDO (1)	39

<u>7</u>	<u>RESULTADOS</u>	<u>41</u>
<u>8</u>	<u>ANÁLISIS DE RESULTADOS</u>	<u>44</u>
<u>9</u>	<u>CONCLUSIÓN</u>	<u>49</u>
<u>10</u>	<u>REFERENCIAS</u>	<u>50</u>

1 Introducción

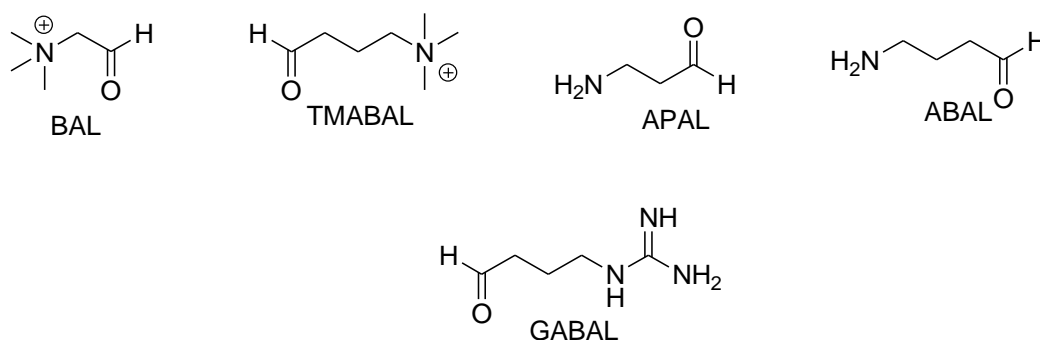
La superfamilia aldehído deshidrogenasa (ALDH) es un grupo de enzimas dependientes de Nicotinamida Adedina Dinucleótido Fosfato (NAD(P)⁺) que oxidan una gran variedad de aldehídos endógenos y exógenos a sus correspondientes ácidos carboxílicos.^{1,2} Se piensa que las ALDHs son un blanco potencial de fármacos contra el patógeno oportunista humano *Pseudomonas aeruginosa*, debido a la función esencial que realizan en rutas metabólicas fundamentales de la bacteria, la cual causa serias infecciones. Sin embargo, el tratamiento de estas infecciones es muy difícil debido a la gran resistencia adquirida por esta bacteria contra los antibióticos comúnmente utilizados.^{3,4} Por ello, se están buscando activamente nuevas estrategias para combatir a este importante patógeno.

Entre el grupo de enzimas antes mencionado, destacan las aminoaldehído deshidrogenasas (AMADHs) que participan en procesos fisiológicos importantes como el catabolismo de arginina,^{5,6} de poliaminas,⁷ de carnitina,⁸ y de colina,⁹ las cuales pueden ser utilizadas por la bacteria como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, así como en la biosíntesis de osmoprotectores.¹⁰

P. aeruginosa contiene genes que codifican al menos cuatro enzimas AMADHs: una perteneciente a la familia ALDH9 de la superfamilia de las ALDHs y tres a la familia ALDH27. La BADH de *P. aeruginosa* (*PaBADH*), perteneciente a la familia ALDH9, es la enzima mejor caracterizada, de la cual se cuenta con datos fisiológicos, bioquímicos y estructurales¹¹ esta enzima participa en la respuesta de la bacteria al estrés osmótico, así como en la degradación de colina. Se ha observado que su inhibición produce una detención del crecimiento in vitro de la bacteria.¹²

Por otra parte, en humanos existe una sola AMADH, que también pertenece a la familia ALDH9, a la que se le ha involucrado en procesos fisiológicos muy importantes como la síntesis del osmoprotector glicina betaína (GB),¹³ el que además es un importante donador de grupos metilo,¹⁴ de la carnitina,¹⁵ y del neurotransmisor GABA,^{16,17} así como de la degradación de poliaminas destoxicación del DOPAL,^{18,19} un aldehído implicado en la generación de la enfermedad de Parkinson,²⁰ del metilglioal²¹ y de aldehídos tóxicos como el 3-aminopropionaldehído y 4-aminobutiraldehído.²²

Estas enzimas pueden oxidar, con diferentes grados de eficiencia catalítica, aldehídos pequeños que poseen un grupo trimetilamino en su estructura, tales como betaína aldehído (BAL) y 4-trimetilaminobutiraldehído (TMABAL); un grupo ω-amino primario, como 3-aminopropionaldehído (APAL), 4-aminobutiraldehído (ABAL) y otros aldehídos con grupos cargados similares como 4-guanidinobutiraldehído (GABAL).



Esquema 1. Estructuras de los sustratos de la AMADH de *P. aeruginosa*.

Para poder diseñar un inhibidor selectivo contra las AMADHs de la bacteria es necesario realizar estudios básicos que nos permitan conocer su especificidad por el sustrato aldehído. Para ello se requiere la síntesis de aldehídos que no están disponibles comercialmente, por lo cual, en este proyecto, se llevará a cabo la síntesis

de dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (**1**) que puede ser potencial sustrato de las AMADHs de *P. aeruginosa*.

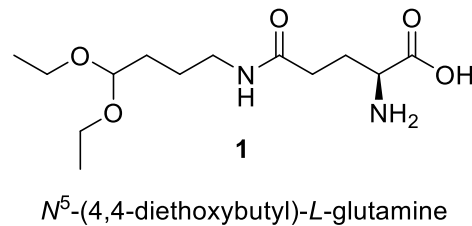


Figura 1. Estructura de dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído, *Marco teórico*

1.1 Pseudomonas

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, son bacilos Gram negativos rectos o curvos, su diámetro oscila entre 0.6 a 2.0 μm , son aerobios, no esporulados y presentan movimiento gracias a sus flagelos.

Las *Pseudomonas* son de vida libre, se encuentran en materiales orgánicos en descomposición, donde también toman un importante papel en la degradación de éste, se encuentran en el suelo, en aguas estancadas, algunas forman parte de la flora intestinal de varias especies animales y del hombre. Ciertas especies son patógenas para plantas, otras causan infecciones a animales y solo unas pocas especies como *Pseudomonas aeruginosa* son patógenos para el hombre.²³

1.2 Pseudomonas aeruginosa

La *Pseudomonas aeruginosa* se identificó por primera vez en 1882 por Gessard.²⁴ Es una bacteria gram negativa, tiene forma de bastón, es esporógena y monoflagelada, tiene color nacarado y olor a uva o tortilla y crece a una temperatura de 25°C a 37°C, pero lo que la distingue de las muchas otras especies de *Pseudomonas* es su capacidad para crecer a 42°C.

El genoma de *P. aeruginosa* consiste en un solo cromosoma circular, su tamaño consta entre 5.5–7.0 Mb y tiene un alto contenido de G + C (65–67%). Debido al tamaño que posee su genoma, *P. aeruginosa* codifica en amplio número de enzimas para varias rutas metabólicas, dándole una alta versatilidad nutricional.

Además, alrededor del 8% de su genoma codifica genes reguladores, lo que la hace capaz de adaptarse a ambientes de crecimiento muy complejos.⁴

1.2.1 Patogenicidad y resistencia

Pseudomonas aeruginosa un microorganismo ubicuo, es decir, tiene la capacidad de sobrevivir en una variedad de condiciones ambientales. No solamente causa enfermedades a plantas y animales, sino que también es el principal patógeno humano oportunista, responsable de una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales, las cuales se complican debido a su resistencia intrínseca a diversos antibióticos.²⁵ Debido a que se ha detectado como parte de la flora normal corporal, rara vez causa enfermedades en individuos sanos, las infecciones por *P. aeruginosa*, particularmente afecta a pacientes con enfermedades severas o con inmunodeficiencia, es decir, cuando se alteran las barreras normales de la piel y mucosas, pacientes con heridas, quemaduras, entubación endotraqueal, o en pacientes en estado de inmunodepresión, como diabetes mellitus, cáncer, SIDA, o neutropenia²⁶ y es la primera causa de mortalidad en enfermos de fibrosis quística.^{27,9}

Los antibióticos que se han utilizado para combatir a *Pseudomonas aeruginosa* son: aminoglucósidos (amikacina, gentamicina y tobramicina), quinolonas (ciprofloxacina), β -lactámicos (piperacilina, ceftazidina, imipenem, meropenem y aztreonam) y polimixinas (colomicin, colistin) entre otros.²⁸

Su resistencia se debe a la combinación de varios factores:

- Es intrínsecamente resistente a los agentes antimicrobianos debido a la baja permeabilidad de su pared celular.
- Tiene la capacidad genética para expresar un amplio repertorio de mecanismos de resistencia.
- Puede volverse resistente a través de la mutación en los genes cromosómicos que regulan los genes de resistencia.
- Puede adquirir genes de resistencia adicionales de otros organismos a través de plásmidos, transposones y bacteriófagos.²⁹
- Definitivamente, la estancia hospitalaria prolongada especialmente en unidades de cuidado intensivo y la selección de los antibióticos son los factores que favorecen la aparición de cepas multirresistentes. Este hecho convierte a la infección por *P. aeruginosa* en un verdadero problema de salud pública, que afecta no solo el curso de la mejora del paciente, sino que aumenta la estancia hospitalaria y el costo de los servicios de salud.

1.3 Enzimas

Las enzimas son, de forma natural, un recurso renovable. Se pueden producir en distintos organismos como hongos, levaduras, bacterias y animales, etc. Son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí.³⁰ Las enzimas son catalizadores biológicos naturales, los cuales son agentes químicos que disminuyen la energía de activación y aumentan la velocidad de reacción. Presentan una alta especificidad por sus sustratos, esto les permite seleccionar a una molécula correcta (selectividad), aún entre moléculas de idéntica naturaleza como los enantiómeros.

La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su estructura tridimensional; en esta se forman cavidades, llamadas “sitio activo”, las cuales muestran afinidad por las moléculas específicas (sustratos) que se convertirán en productos. La combinación de grupos funcionales químicos presentes en estas cavidades genera un conjunto de interacciones covalentes y no covalentes entre la proteína y el sustrato, lo cual da lugar a la transformación del sustrato y genera un producto. Funcionan a temperaturas y presiones moderadas, ambientales en muchos casos, reduciendo así el impacto económico asociado a la necesidad de energía.

Como cualquier catalizador, al finalizar la transformación del sustrato y liberarse el producto del sitio activo, la enzima regresa a su estado original y puede involucrarse en un nuevo ciclo de catálisis ya que las concentraciones que se utilizan son muy pequeñas y no se consumen en el proceso.³¹ Se pueden usar durante varios ciclos de un proceso, siempre que se cuente con los métodos adecuados para recuperarlas. La naturaleza proteica de las enzimas las hace de fácil biodegradación al final de su vida útil, reduciendo así la generación de desechos recalcitrantes.³²

El disolvente natural de las enzimas es el agua, por lo que su utilización no implica el uso de disolventes orgánicos. Sin embargo, en caso de ser necesario, las enzimas también pueden trabajar en presencia de estos disolventes.

En las bacterias existen varios tipos de enzimas que son requeridas para su crecimiento y replicación, algunos ejemplos de estas en enzimas son la enzima NAD-deshidrogenasa, que participa en el transporte de electrones y generación de adenosín trifosfato (ATP), para esta última, también se utiliza la ATPasa de membrana; enzima que cataliza la reacción reversible entre adenosina (ADP) y ATP.

En las bacterias aerobias, la reducción de oxígeno genera radicales libre que son muy tóxicos para las bacterias, entre los más importantes se encuentra el superóxido, el cual es reducido a peróxido de hidrógeno (el cual también es tóxico) por la superóxidodismutasa, que a su vez es reducido a oxígeno molecular y agua por la enzima catalasa y peroxidasa.

Para la regulación del metabolismo de las bacterias, se debe saber que no solo está regulado por reacciones, sino también por la concentración de los nutrientes en el medio y de eso se encargan las enzimas, como ejemplo la enzima fosfofructoquinasa la cual es activada o inhibida según la relación de ATP y ADP, regulando así la producción de glucosa.³³

También existen las fosfatasas, enzimas que catalizan la eliminación de grupos fosfato (PO_4^{3-}) y dan lugar a la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos.

En el cuerpo humano existen 6 tipos de enzimas, una de ellas son las oxidorreductasas que catalizan reacciones de óxido reducción. La mayoría de estas enzimas se llaman deshidrogenasas,³⁴ ejemplos de éstas son las aldehídesdeshidrogenasas que es la enzima responsable de la oxidación de los aldehídos a sus respectivos ácidos carboxílicos.

1.4 Aldehído deshidrogenasas (ALDHs)

Los aldehídos **(2)** son grupos funcionales formados por carbonilos ($\text{C}=\text{O}$) enlazados a un átomo de hidrógeno y una cadena R que puede ser alquílica o arílica. Tiene un enlace π entre carbono y oxígeno, y es electrófilo debido a la presencia del orbital π^* . Son compuestos altamente reactivos, se utilizan en procesos de síntesis como intermediarios o productos y se generan en seres vivos a partir de precursores endógenos y exógenos.³⁵

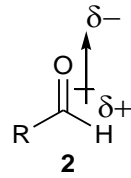


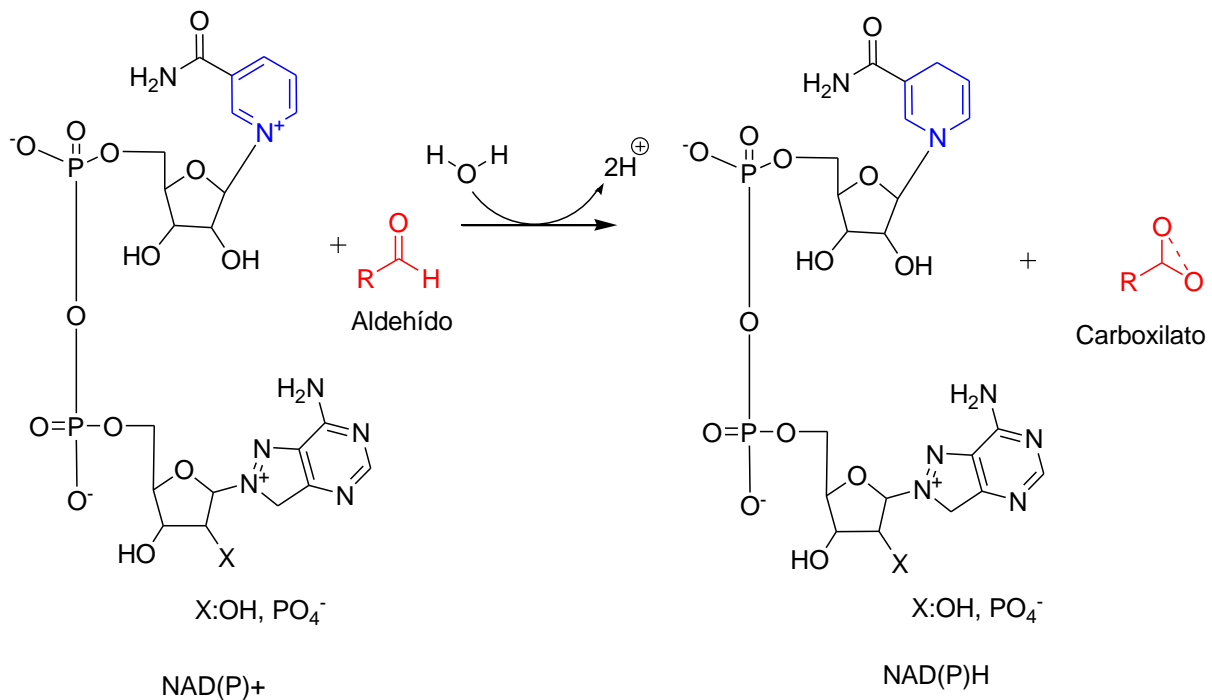
Figura 2. Estructura de aldehído.

Los aldehídos son altamente tóxicos para las células aún en concentraciones bajas, debido a que interaccionan con los grupos aminos de las proteínas, por ello existen enzimas que los convierten en sus derivados de ácidos carboxílicos los cuales no son tóxicos. Algunas de estas enzimas son las aldehído deshidrogenasas (ALDHs). Estas enzimas se distribuyen ampliamente de las bacterias a los humanos. Su actividad se observó hace 50 años y a partir de esto muchos tipos de ALDHs han sido caracterizadas basándose en sus características fisicoquímicas, propiedades enzimológicas, localización subcelular y su distribución tisular.³⁶

El sistema de nomenclatura para los miembros de la superfamilia ALDH se estableció en 1999. Todos los genes tienen el mismo símbolo raíz "ALDH", seguido de un número arábigo que indica la familia. La designación de la familia es seguida por una letra que representa la subfamilia dada y otro número que significa el gen individual dentro de esa subfamilia. Las pautas se basan en alineamientos por pares entre secuencias de aminoácidos para cualquier conjunto dado de ALDH. Las secuencias que comparten * 40% de identidad o más pertenecen a la misma familia ALDH. Las secuencias que comparten * 60% de identidad o más se agrupan en la misma subfamilia. Las subfamilias y números de genes se designan cronológicamente después de su identificación.³⁷

La superfamilia de las ALDHs se divide aproximadamente en 27 familias de proteínas, las cuales catalizan la oxidación irreversible de una gran variedad de aldehídos endógenos y exógenos a sus correspondientes ácidos carboxílicos,

utilizando como coenzima al nucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) o el nucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADP⁺).³⁸



Esquema 2. Reacción general catalizada por las ALDHs.

Algunas ALDHs presentan alta especificidad por aldehídos que son sus sustratos, mientras que otras utilizan aldehídos con estructuras moleculares parecidas.

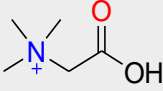
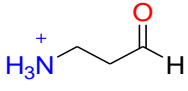
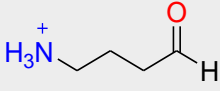
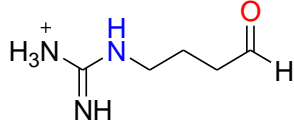
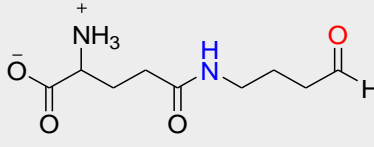
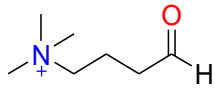
1.5 Aminoaldehído deshidrogenasas (AMADHs)

Se ha encontrado que cinco familias de enzimas ALDHs muestran actividad como aminoaldehído deshidrogenasa (AMADH), es decir, son enzimas que catalizan la oxidación irreversible de ω-aminoaldehídos a aminoácidos usando como coenzima NAD(P)⁺. Estas son las familias ALDH9 (presentes en animales, bacterias y hongos), ALDH10 (plantas, algunas bacterias y hongos), ALDH25, ALDH26 y ALDH27 (solo en bacterias).³⁹

1.5.1 Funciones fisiológicas de las AMADH's bacterianas

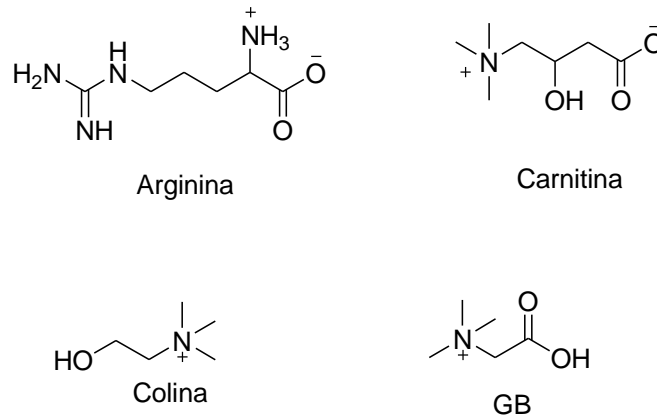
Dependiendo del organismo en que se encuentren, las AMADHs bacterianas pueden estar implicadas en varios procesos fisiológicos importantes. Algunas participan en la oxidación de BAL, ya sea para sintetizar GB,^{40,41} o como parte del catabolismo de colina como es el caso de *P. aeruginosa*.⁴² Algunas de las enzimas reportadas en estas rutas son la γ -glutamyl- γ -aminobutiraldehído deshidrogenasa PuuC⁴³ y la γ -aminobutiraldehído deshidrogenasa YdcW de *E. coli*, la 3-aminopropionaldehído deshidrogenasa de especies de *Pseudomonas* y de *Arthrobacter*^{44,45} y la guanidinbutiraldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp. Los sustratos usados por estas enzimas son: γ -glutamyl- γ -aminobutiraldehído, 4-aminobutiraldehído, 3-aminopropionaldehído y 4-guanidinobutiraldehído, respectivamente. Los productos ácidos de las reacciones catalizadas son transformados en una serie de reacciones posteriores en succinato, que se incorpora al ciclo de Krebs. Los sustratos descritos en la tabla 1, son intermediarios metabólicos importantes en los organismos procariontas.

Tabla 1. Aminoaldehídos usados como sustratos de las AMADHs bacterianas.

Sustratos	Estructura	Función fisiológica
Betáina aldehído (BAL)		Formado en la ruta de oxidación de colina,
3-aminopropionaldehído (APAL)		Formado en el catabolismo de espermina,
γ-aminobutiraldehído (ABAL)		Formado en el catabolismo de espermidina y putrescina, que a su vez son intermediarios en el catabolismo de arginina, cuando se lleva a cabo por la ruta de la descarboxilación
γ-guanidinobutiraldehído (GABAL)		Es un intermediario en el catabolismo de arginina cuando se lleva a cabo por la ruta de deshidrogenación,
γ-glutamilaminobutiraldehído		Es un intermediario del catabolismo de putrescina y, por lo tanto, también en el catabolismo de arginina
γ-trimetilaminobutiraldehído (TMABAL)		Es producido en una reacción de rompimiento del aldol del 3-hidroxi-N6,N6,N6-trimetil-L-lisina en la biosíntesis de carnitina en animales.

Debido a su especificidad relativamente amplia las AMADH pueden estar involucrados en varios procesos fisiológicos importantes en organismos como *P. aeruginosa*.⁴⁶ Participan en el catabolismo de arginina, poliaminas⁴⁷, carnitina y

colina⁹, como fuente de carbono, nitrógeno y energía, y en la síntesis de glicina betaína (GB), un osmoprotector producido en una amplia variedad de organismos en respuesta al estrés osmótico.



Esquema 3. Estructuras de moléculas asociadas a las AMADHs.

Pseudomonas aeruginosa contiene genes que codifican al menos cuatro enzimas AMADHs, una de la familia ALDH9 y tres de la familia ALDH27. PaKauB es una AMADH perteneciente a la familia ALDH27 que participa en la oxidación de distintos aminoaldehídos como γ -guanidinobutiraldehído (γ -GABAL), γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (γ -GLUABAL), γ -aminobutiraldehído (ABAL) provenientes del catabolismo de arginina, putrescina, agmatina⁴⁰, espermidina como se muestra en el esquema 4.⁴⁸

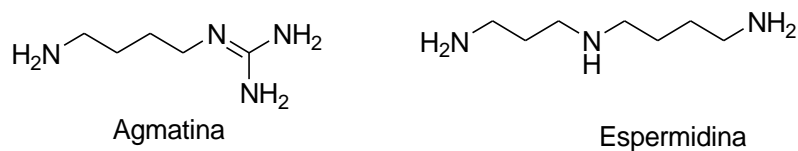
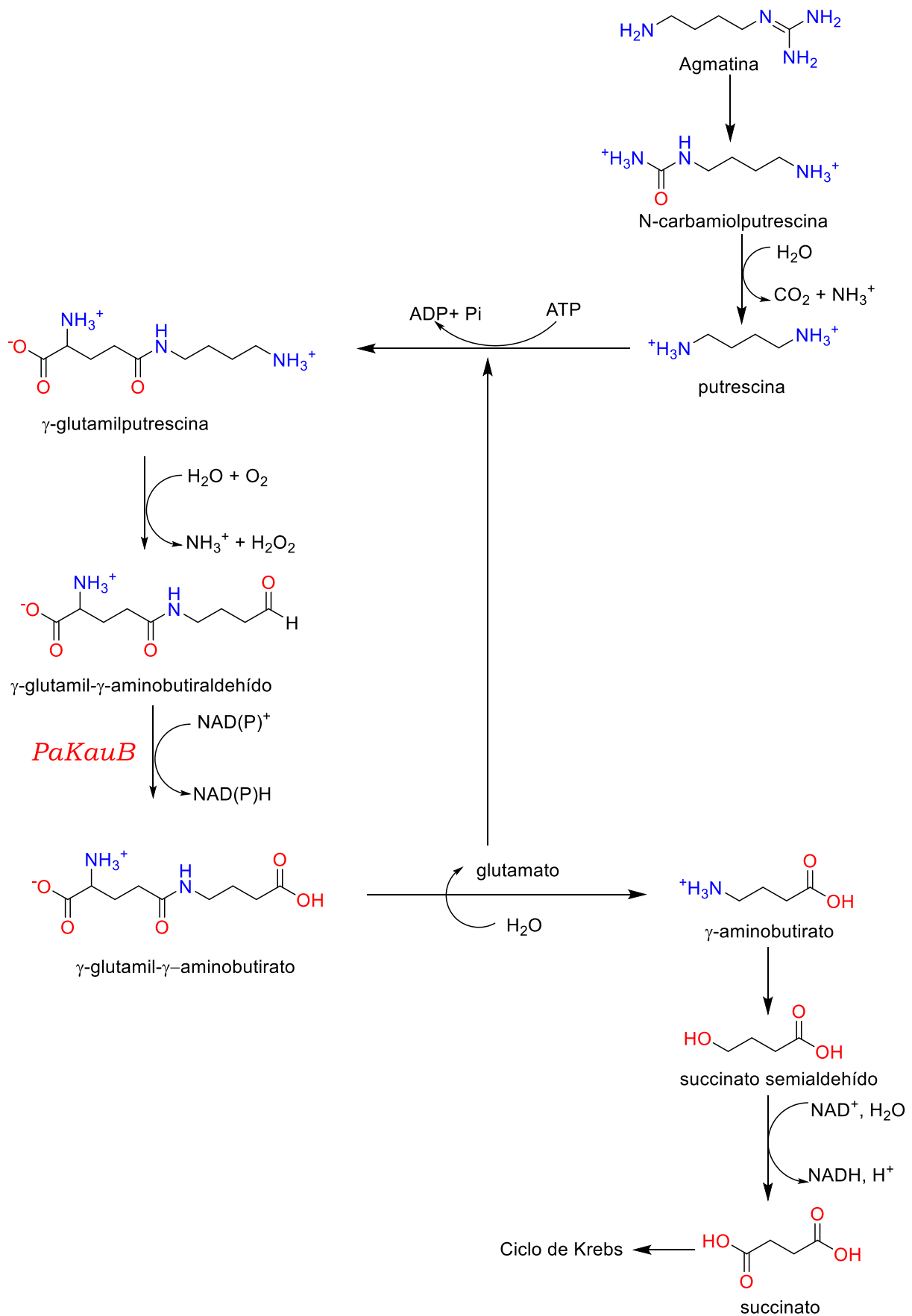


Figura 3. Estructura química de agmatina y espermidina.

Dada la importancia de estas rutas, consideramos que la enzima PaKauB es importante para la defensa y supervivencia de la bacteria y que, incluso, podría ser un blanco potencial de fármacos.

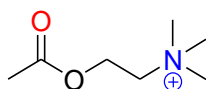


Esquema 4. Ruta de glutamación propuesta para el catabolismo de la putrescina.

1.5.2 Especificidad de las AMADH's por el sustrato aldehído

Los aldehídos que se utilizan como sustratos por las AMADHs tienen en su estructura un átomo de nitrógeno correspondiente a grupos con carga positiva como grupos amonio, amonio cuaternario o guanidino.⁴⁹

La especificidad por el sustrato de las AMADHs radica en el reconocimiento de este, en un sitio conformado por tres o cuatro residuos aromáticos denominado "caja aromática" donde mediante interacciones de tipo catión- π , las nubes electrónicas de los residuos aromáticos dan estabilidad al grupo que tiene la carga positiva, de manera similar a los receptores de acetilcolina; además todas las AMADHs exhiben una superficie de potencial electrostático negativo en el túnel de entrada del aldehído⁵⁰, debido a los grupos carboxilo e hidroxilo de la cadena lateral o los grupos carbonilo de la cadena principal. Se sabe que los residuos de serina y glutamato están relacionados con actividad catalítica de la enzima PaKauB.



Acetilcolina

Figura 4. Estructura química de acetilcolina.

1.6 Estrategias sintéticas para la síntesis de aminoaldehídos

Para poder estudiar la especificidad de las AMADH's en el reconocimiento por el sustrato aldehído es necesario obtener diversos aldehídos, los cuales muchos no se encuentran comercialmente disponibles y es necesario obtenerlos mediante síntesis química.

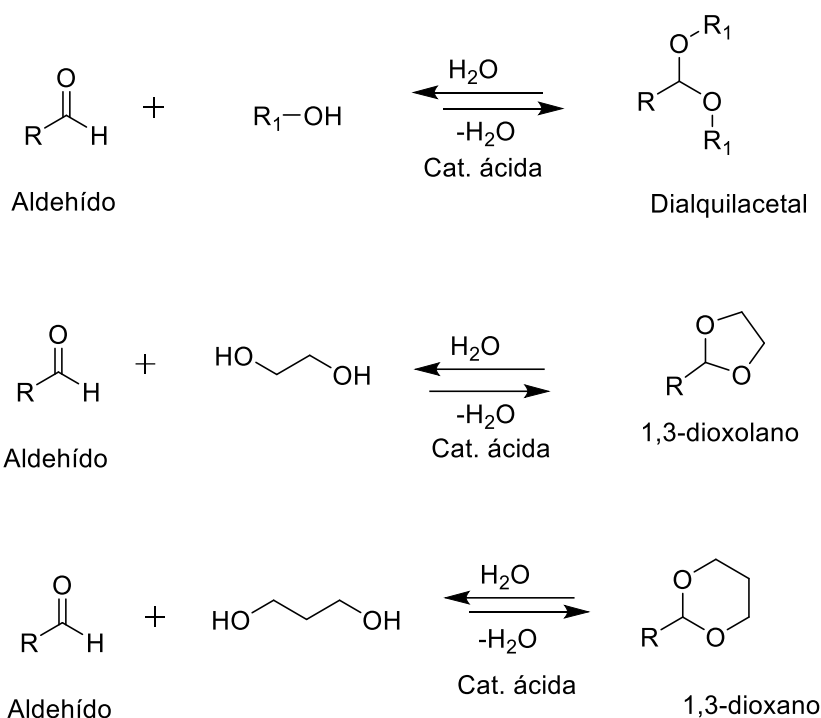
1.6.1 Reactividad de los aldehídos.

Para abordar el estudio de la síntesis de aminoaldehídos se debe tomar en cuenta que los aldehídos son susceptibles a oxidación espontánea y ataques nucleofílicos indeseables, por ejemplo, el ataque de un grupo amino, lo que disminuye rendimientos y pureza de productos en las reacciones y procedimientos donde se manipulen estos compuestos.

Una manera muy eficaz de evitar estas reacciones indeseables es convertir los aldehídos en acetales, por ser menos propensos a la oxidación y son estables en presencia de bases y nucleófilos fuertes. Éstos se preparan a partir de los aldehídos correspondientes y dos moléculas de alcohol con catálisis ácida con la pérdida de una molécula de agua, o bien por acetalización inducida con cantidades catalíticas de α -quimotripsina de los aldehídos en presencia de los correspondientes alcoholes bajo condiciones neutras y con altos rendimientos.⁵¹

Cuando se requiere el aldehído inicial, el acetal puede ser hidrolizado al aldehído original con catálisis ácida en presencia de agua. Esta fácil interconversión hace a los acetales atractivos como grupos protectores de aldehídos.

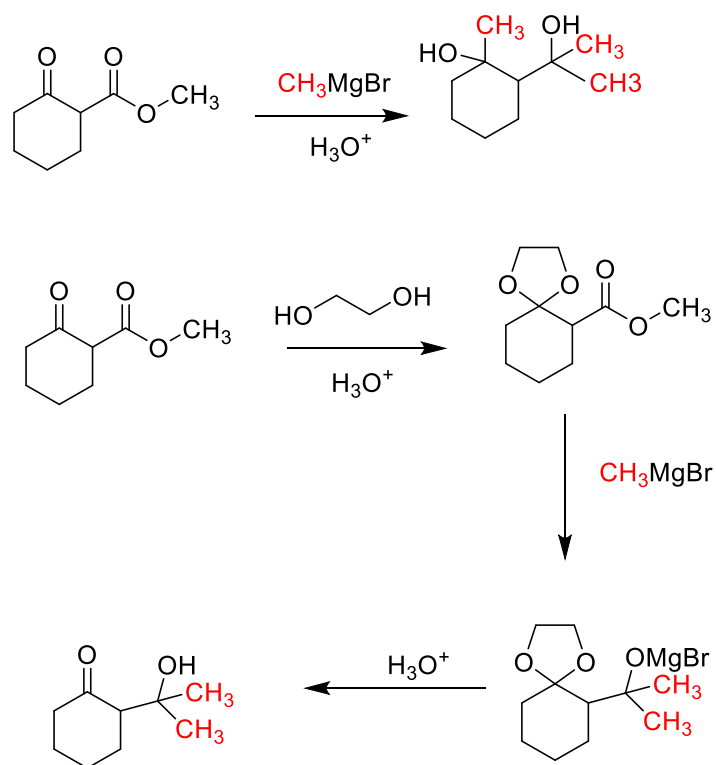
Suelen emplearse etilenglicol para generar los compuestos 1,3-dioxolano, o 1,3-propanodiol para generar los compuestos 1,3-dioxano. Se utilizan como grupos protectores en síntesis orgánica y algunos compuestos naturales tienen acetales en sus moléculas.



Esquema 5. Conversión de aldehídos a acetales con catálisis ácida.

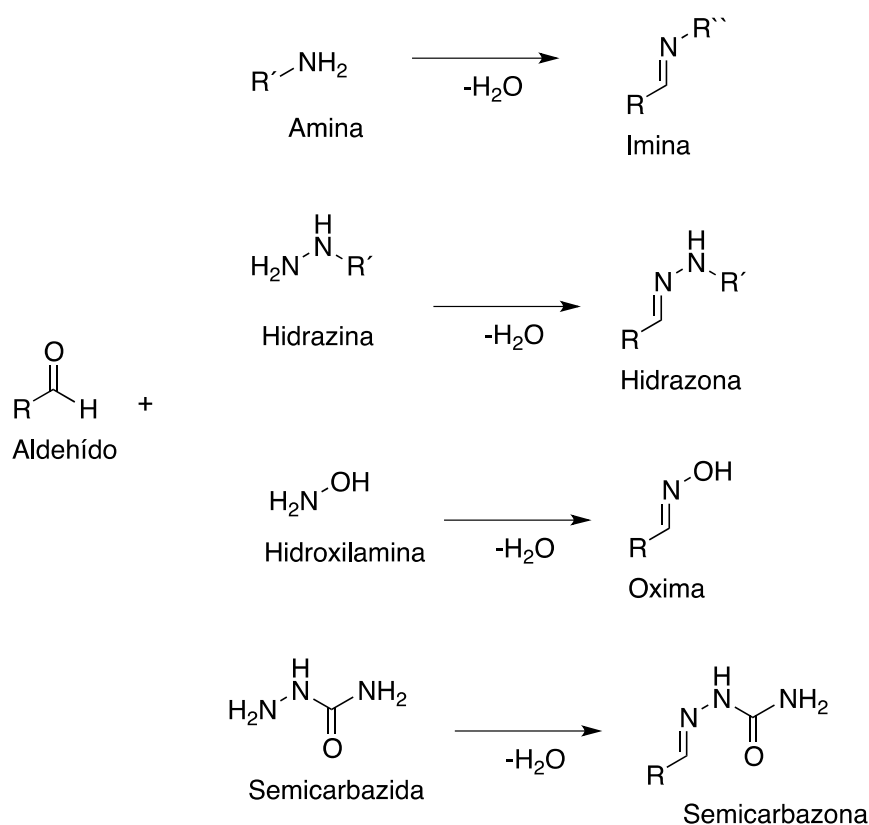
La desventaja de estos grupos protectores es la baja estabilidad en medios ácidos y pierden una molécula de agua, por lo cual, siempre se deben buscar condiciones para eliminar el agua del seno de la reacción.

En el siguiente ejemplo se muestra el uso de los acetales como grupos protectores en síntesis orgánica; debido a que un reactivo de Grignard reacciona más fácilmente con una cetona que con un éster, por lo que se debe cetalizar la cetona previamente a la reacción con el reactivo de Grignard, esto no se podría hacer sin un grupo protector porque los reactivos de Grignard reaccionan con mayor velocidad con las cetonas que con los ésteres.⁵²



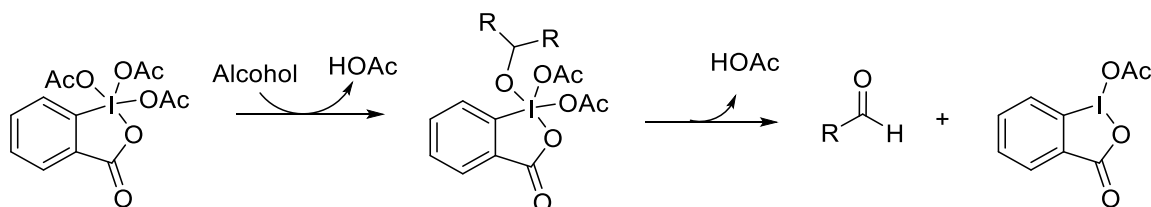
Esquema 6. Protección de cetona con acetal.

Otros grupos protectores que, como las iminas, las hidrazonas sustituidas, las oximas y semicarbazonas por mencionar algunos, pueden ser utilizados. La formación de estos grupos protectores se basa en el carácter electrofílico del grupo carbonilo, el cual debido al efecto inductivo del oxígeno este es capaz de aceptar un par electrónico de un nucleófilo como un grupo NH (de amina, hidrazina, hidroxilamina o una semicarbazida) en donde se lleva a cabo una reacción de condensación con la pérdida de una molécula de agua.

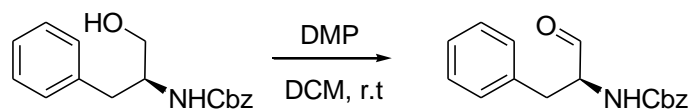


Esquema 7. Reacciones de condensación entre el grupo aldehído y algunos grupos nucleofílicos NH.

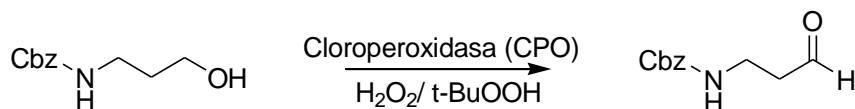
Otra estrategia para la obtención de aminoaldehídos es la oxidación de aminoalcoholes *N*-protegidos para obtener los aminoaldehídos *N*-protegidos correspondiente. El principal oxidante reportado es el periodinano de Dess-Martin (DMP)^{53, 54, 55} aunque también se encuentran reportados métodos enzimáticos muy eficaces como el uso de la cloroperoxidasa (CPO)⁵⁶.



Esquema 8. Síntesis de aldehído mediante la oxidación de un alcohol.

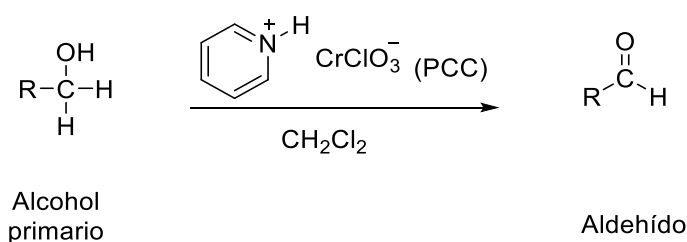


Esquema 9. Oxidación del Benciloxicarbonil (Cbz)-(S) fenilalaninol⁵⁷ a su respectivo aldehído utilizando periodinano de Dess-Martin.



Esquema 10. Oxidación catalizada por CPO de N-Cbz-3-aminopropanol a N-Cbz-3-aminopropanal.

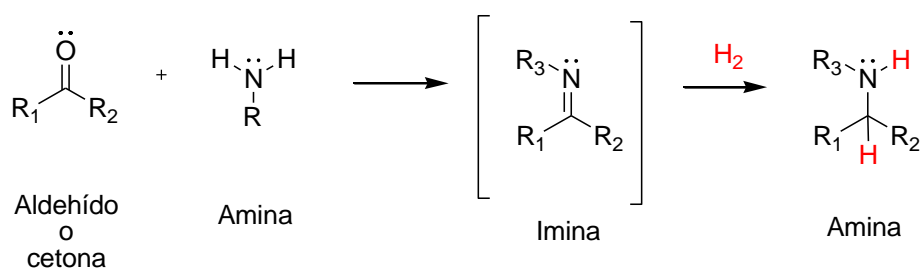
También puede usarse compuestos de cromo como el clorocromato de piridinio (PCC), un complejo de trióxido de cromo con piridina y ácido clorhídrico, soluble en disolventes no polares como DCM; o el reactivo de Collins que es un complejo de trióxido de cromo y piridina y que es especialmente útil para la oxidación de compuestos sensibles a los ácidos.



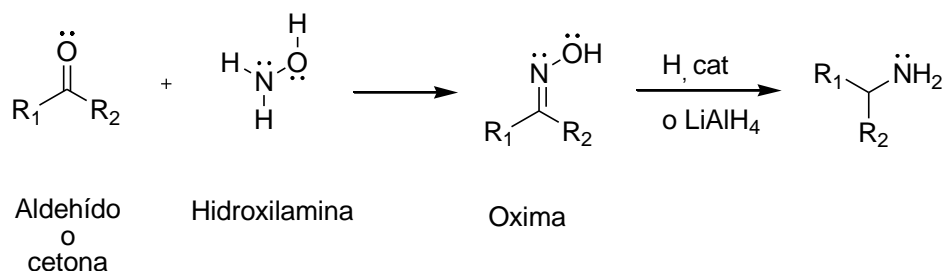
Esquema 11. Oxidación catalizada por PCC de un alcohol primario a un aldehído.

1.6.2 Síntesis de aminas a partir de aldehídos.

Otra estrategia sintética para la obtención de aminas involucra la reducción de iminas u oximas.

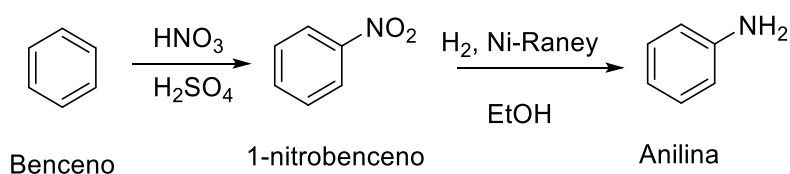


Esquema 12. Síntesis de aminas mediante reducción de iminas.



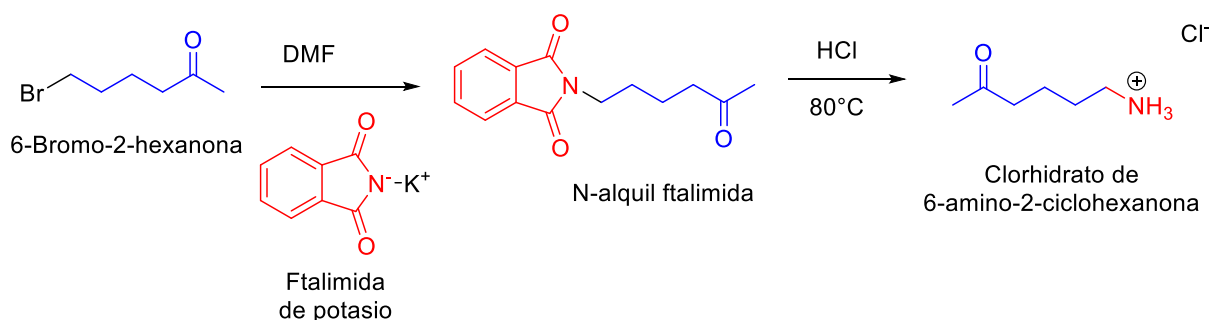
Esquema 13. Síntesis de aminas mediante reducción de oximas.

Otra estrategia a la que se puede recurrir para la obtención de amino compuestos es la reducción de grupos nitro,^{58, 59} mediante condiciones de reducción con un metal en medio ácido $\text{NH}_4\text{Cl} / \text{Zn}$, uso de sulfuros de amonio o hidrogenación catalítica con $\text{H}_2/\text{Pd}/\text{C}$, $\text{H}_2/\text{Ni-Raney}$ o $\text{N}_2\text{H}_4/\text{Mg}$.



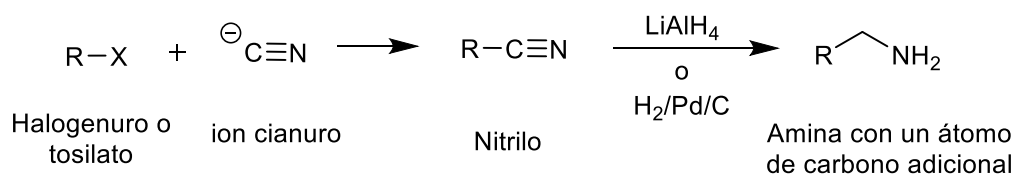
Esquema 14. Reducción de nitrobenzeno a anilina.

Una metodología general para la síntesis de compuestos aminocarbonílicos es la síntesis de Gabriel que se utiliza para la síntesis de aminas primarias en dos etapas a partir de halogenuros de alquilo, en las que la ftalimida de potasio se alquila primero y la *N*-alquilftalimida se hidroliza posteriormente.⁶⁰



Esquema 15. Obtención de 6-amino-2-hexanona mediante la síntesis de Gabriel.

Otro método para introducir grupos amino con el aumento de un átomo de carbono consiste en la sustitución del ion cianuro (^-CN) sobre halogenuros de alquilo para generar el nitrilo (R-CN) y posterior reducción de nitrilo para generar la amina.



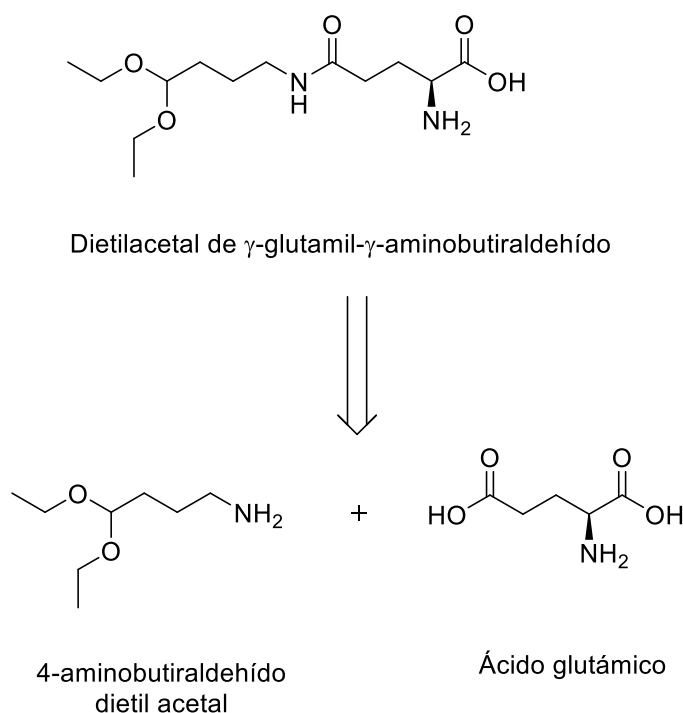
Esquema 16. Obtención de una amina a partir de un halógeno.

El ion cianuro (CN^-) es un buen nucleófilo, desplaza los grupos salientes de los halogenuros y tosilatos de alquilo primarios y secundarios no impedidos dando lugar a un grupo nitrilo (R-CN) como producto. Los nitrilos se reducen a aminas primarias usando cantidades estequiométricas de agentes reductores como el hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) o por hidrogenación catalítica. Por ejemplo, se ha reportado que el complejo Co promueve la hidrogenación en condiciones suaves a $80\text{ }^\circ\text{C}$ bajo $50\text{ bar}/\text{H}_2$. Tradicionalmente, los catalizadores de metales nobles como Pt/C y Pd/C se han utilizado para la hidrogenación de nitrilos, que generalmente demostraron una alta actividad catalítica.⁶¹ Se pueden sintetizar aminas a partir de nitrilos entonces en el caso de los aminoaldehídos se pueden preparar a partir de nitriloacetales o nitriloaldehídos.

1.6.3 Estrategias sintéticas para dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído.

El γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído es uno de los sustratos más importantes para el estudio de la PaKauB, este compuesto se genera por hidrólisis ácida del dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído en forma previa a los ensayos con la enzima, de esta manera se mantiene el dietilacetal en forma estable por tiempo indefinido sin presentar degradación.

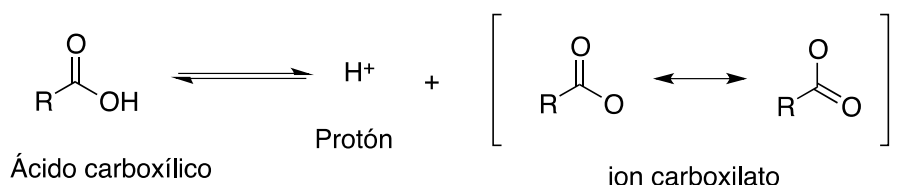
Uno de los sustratos de PaKauB más interesantes y poco disponibles es el γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído que se genera *in situ* a partir del dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído, el cual, mediante un análisis retrosintético, se dedujo que las materias primas adecuadas para la obtención de la amida correspondiente es el ácido glutámico y el correspondiente aminoacetal.



Esquema 17. Retrosíntesis de dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído.

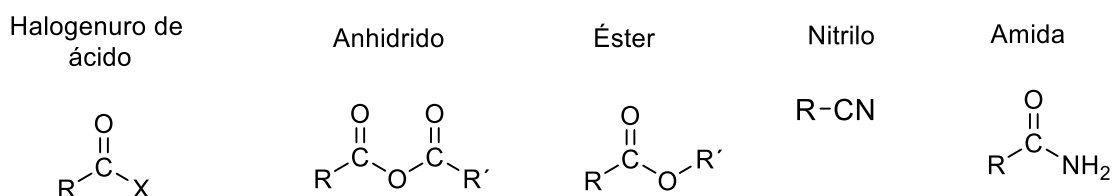
1.7 Ácidos carboxílicos y reactividad

A la combinación de un grupo carbonilo y un hidroxilo se le conoce como grupo carboxilo. Los compuestos que contienen el grupo carboxilo son claramente ácidos por su capacidad de donar protones por disociación y se les llama ácidos carboxílicos. A la base conjugada del ácido carboxílico se le conoce como ion carboxilato, un ion que se estabiliza por resonancia y por lo tanto esta favorecida la donación del protón.



Esquema 18. Disociación del ácido carboxílico.

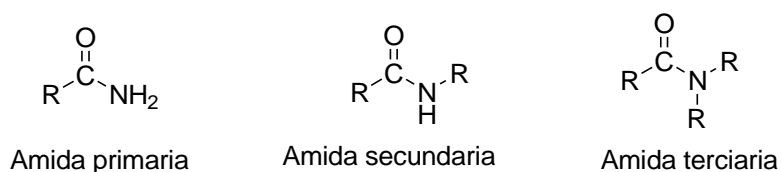
Los derivados de ácidos carboxílicos son compuestos que por medio de una hidrólisis ya sea ácida o básica producen ácidos carboxílicos. Los derivados de ácido son, en orden de reactividad, los halogenuros de ácido, los anhídridos, ésteres, nitrilos y amidas.



Esquema 19. Derivados de ácidos carboxílicos.

1.8 Síntesis de amidas

Las amidas representan uno de los grupos funcionales más comunes en la química orgánica, medicinal y de materiales, y también se encuentran en todos los péptidos y proteínas.

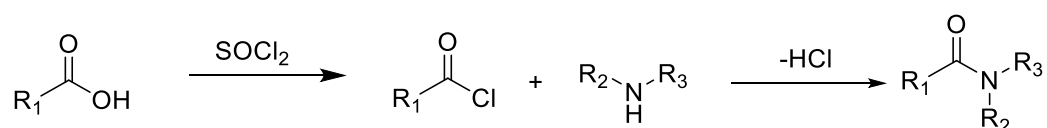


Esquema 20. Tipos de amidas.

Las amidas se obtienen a partir de derivados de ácidos carboxílicos activados a través de una reacción de sustitución nucleofílica con aminas. Entre los derivados de ácidos carboxílicos más utilizados en la síntesis de amidas se encuentran los cloruros de acilo y los anhídridos.

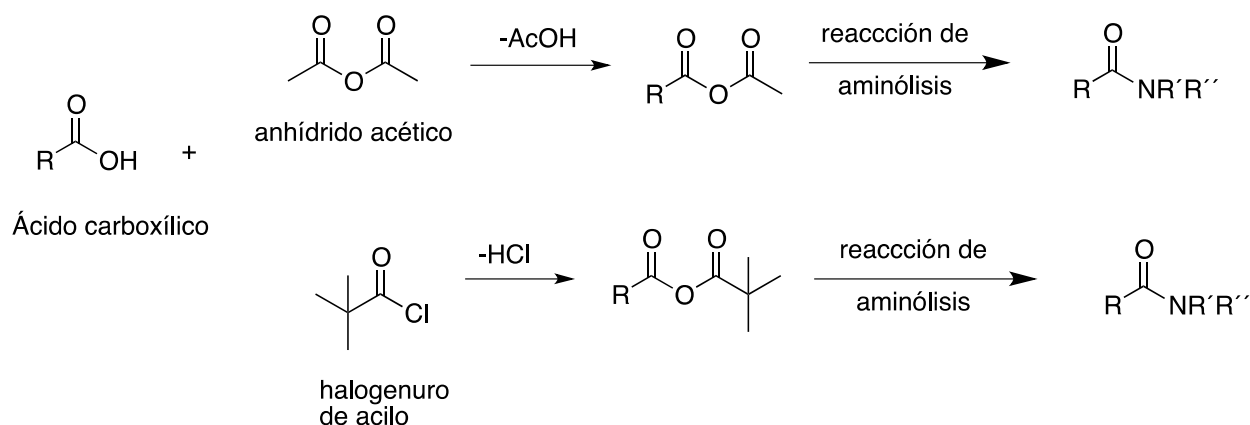
La amidación de los ácidos carboxílicos a través de los cloruros de acilo suelen ser un proceso de dos pasos, que implica primero la conversión del ácido en el cloruro de acilo seguido del acoplamiento con la amina. Para el caso de los anhídridos suele ser un proceso similar en dos pasos: la formación del anhídrido desde el ácido carboxílico y el posterior acoplamiento con la amina.

La conversión de los ácidos carboxílicos en cloruros de acilo se lleva a cabo utilizando diversos reactivos, como el cloruro de benzolio, dicloruro de ftaloilo, cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo.⁶²



Esquema 21. Síntesis de amidas, utilizando cloruro de tionilo como activador del ácido carboxílico.

Para el caso de los anhídridos de ácido estos se pueden formar por tratamiento térmico con anhídrido acético o con un halogenuro de acilo en presencia de una base.



Esquema 22. Síntesis de amidas a partir de anhídridos de ácidos carboxílicos.

2 Planteamiento del problema

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista en humanos que constituye un grave problema de salud debido a las infecciones, principalmente nosocomiales que produce en especial, en pacientes con enfermedades severas o con inmunodeficiencia.

Estas enfermedades se complican debido a la resistencia que tiene a los antibióticos comúnmente utilizados en la práctica médica. De aquí que surja la necesidad de nuevos fármacos capaces de superar esta resistencia bacteriana.

Existen estudios que sugieren que *P. aeruginosa* es dependiente de la actividad de la enzima PaKauB para subsistir bajo las condiciones de los sitios de infección, por lo que PaKauB puede ser un potencial blanco para el desarrollo de nuevos tratamientos contra infecciones de *P. aeruginosa*.

Es necesario identificar los sustratos de la enzima y la caracterización de la actividad enzimática de PaKauB. Por lo que es necesaria la síntesis de una serie de aldehídos con átomos de nitrógeno espaciados por una cadena de uno a cuatro átomos de carbono.

3 Hipótesis

Es posible sintetizar el dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído como precursor *in situ* del γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído a partir del ácido L-glutámico y el dietil acetal de 4-aminobutiraldehído para el estudio de potenciales sustratos de la enzima PaKauB.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Sintetizar el dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído como potencial sustrato de la PaKauB.

4.2 Objetivos particulares

- Establecer metodologías adecuadas para la síntesis de los precursores de dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído.
- Realizar la caracterización de los compuestos intermediarios sintetizados.

5 Material y métodos

5.1 Reactivos

- Dietilacetal de 4-aminobutiraldehído
- Ácido clorhídrico
- Ácido L-glutámico
- Alcohol bencílico
- Anhídrido acético
- Carbonato de sodio
- Cloroformiato de bencilo
- Cloruro de pivaloilo
- Ninhidrina
- Paladio/C al 5%
- Sulfato de sodio anhidro
- Trietilamina

5.2 Disolventes

- Ácido acético
- Acetato de etilo
- Diclorometano anhidro
- Heptano
- Hidróxido de amonio (20-30%)
- Isopropanol
- Metanol
- Metil *tert*-butil éter
- Tolueno

5.3 Material

- Capilares
- Cámaras de elución
- Columnas cromatográficas
- Embudos de diferentes diámetros
- Embudo de adición de diferentes capacidades

- Embudos de separación de diferentes capacidades
- Equipo de destilación simple
- Mangueras para vacío
- Manómetro
- Matraz esférico de tres bocas diferentes capacidades
- Matraz esférico de diferentes capacidades
- Matraz Erlenmeyer de diferentes capacidades
- Micropipetas de 10, 200, 1000 μL
- Papel indicador de pH
- Pipetas Pasteur
- Pipetas graduadas de diferentes capacidades
- Probetas de diferentes capacidades
- Pinzas de tres dedos
- Refrigerantes
- Soporte universal
- Termómetro de -10 a 250 $^{\circ}\text{C}$
- Termómetro de alcohol -20 a 20 $^{\circ}\text{C}$
- Trampa de humedad
- Tubos Eppendorf de 0.6 y 1.5 mL
- Vasos de precipitados de diferentes capacidades
- Frascos de hidrogenación de diferentes capacidades

5.4 Equipos e instrumentos

- Agitador mecánico
- Balanza analítica BEL Engineering
- Balanza semianalítica Denver Instrument
- Bomba de alto vacío
- Canastillas de calentamiento
- Equipo de RMN 300 MHz (^1H) y 75 MHz (^{13}C) Eclipse Jeol
- Espectrofotómetro de masas Jeol AX505HA
- Estufa
- Lámpara UV 254/366 nm
- Parrilla de agitación y calentamiento

- Recirculador de agua Lauda K2RD
- Reostato Staco Energy
- Rotavapor Buchi R-124

5.5 Técnicas experimentales

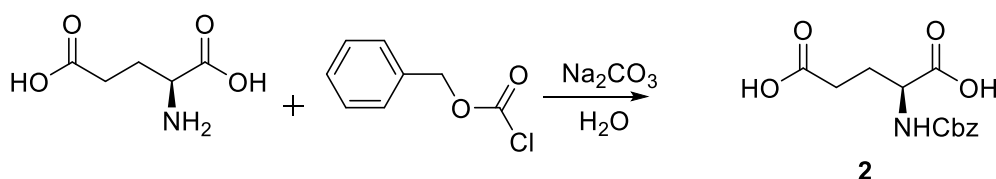
- Cromatografía
- Destilación
- Extracción
- RMN ^1H (Resonancia Magnética Nuclear ^1H)
- RMN ^{13}C (Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C)

6 Parte experimental

Los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C del dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III de 500 MHz de intensidad de campo. El espectro se realizó en D_2O como disolvente.

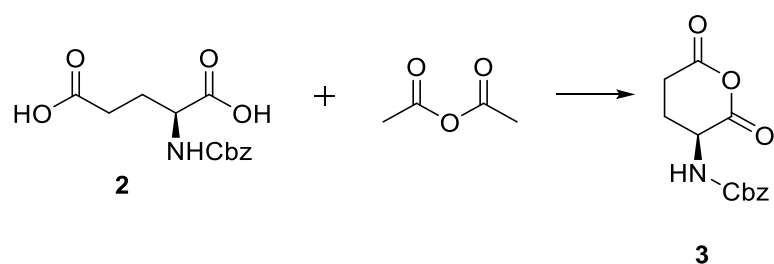
6.1 Síntesis de dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (1)

6.1.1 Ácido *N*-((benciloxi)carbonil)-L-glutámico (2)



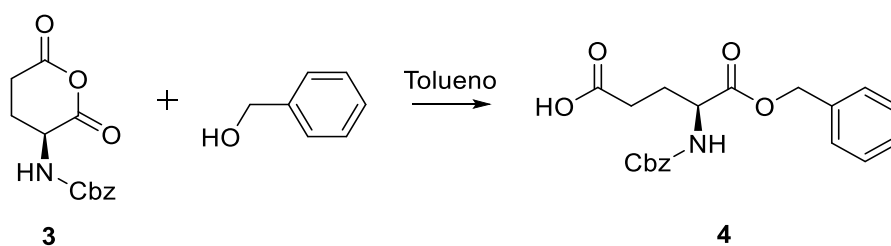
A un matraz esférico de tres bocas de 250 mL provisto de agitación mecánica, termómetro y embudo de adición, se adicionaron 7 g (47.6 mmol) de ácido glutámico, 156.8 mL de agua y 20.16 g (190.4 mmol) de carbonato de sodio. Posteriormente el matraz se colocó en baño de hielo, al alcanzar $0\text{ }^\circ\text{C}$, se adicionó gota a gota durante 2 horas 10.22 mL (71.4 mmol) de cloroformiato de bencilo, cuidando que la temperatura no aumentara, se retiró el baño de hielo y se dejó en agitación por 2 horas. Se verificó el avance de la reacción por CCF [iPrOH/ NH_4OH (20-30%) 7:3 v/v], utilizando ninhidrina como revelador. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación y se lavó con AcOEt (2x20 mL), la fase acuosa se acidificó hasta $\text{pH} = 3$ con HCl 1N, se extrajo con AcOEt (3x20 mL), se lavó la fase orgánica con salmuera (1x20 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se concentró y se llevó a sequedad con vacío. Se obtuvieron 12.7 g (95% de rendimiento) de un sólido blanco.

6.1.2 Anhídrido *N*-((benciloxi)carbonil)-L-glutámico (3)

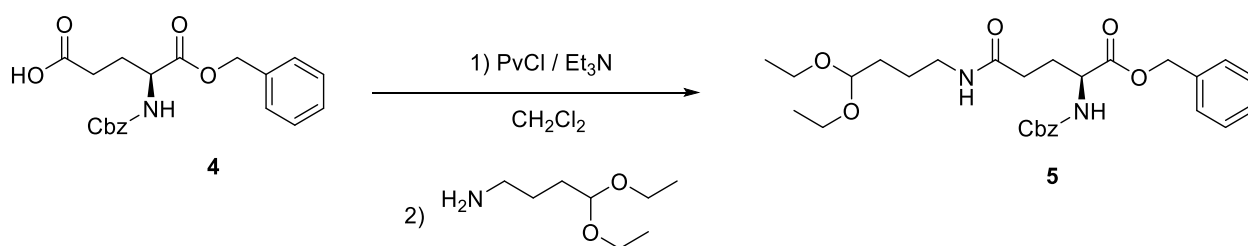


A un matraz esférico de 100 mL provisto de agitación magnética se adicionaron 12.61 g (44.86 mmol) del compuesto **2** y 43 mL de anhídrido acético. Se calentó a 70 °C durante 4 horas y se verificó el avance de la reacción por CCF (MTBE/Heptano/AcOH, 2:1:0.1 v/v). Se concentró y se llevó a sequedad con vacío hasta obtener 11.68 g de un producto oleoso naranja (99% de rendimiento).

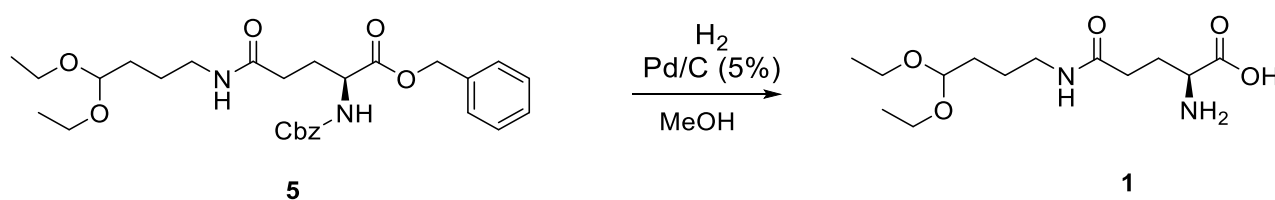
6.1.3 Ácido *N*-((benciloxi)carbonil)-L-glutámico de bencilo (**4**)



A un matraz esférico de 250 mL provisto de agitación magnética se adicionaron 11.68 g (41.55 mmol) del intermediario **3**, 100 mL de tolueno y se agitó a 60 °C hasta disolución. Se adicionaron 4.8 mL de alcohol bencilico, se calentó a 100 °C por 3 horas y se verificó el avance de reacción por CCF (MTBE). Se concentró en el rotavapor y se llevó a sequedad con vacío. Se purificó por cromatografía en columna (Heptano-MTBE, 1:1 v/v) obteniendo 6.5 g de un sólido blanco. (40% de rendimiento).

6.1.4 *N*²-((benciloxi)carbonil)-*N*⁵-(4',4'-dietoxibutil) glutaminato de bencilo (**5**)

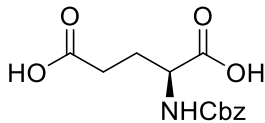
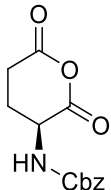
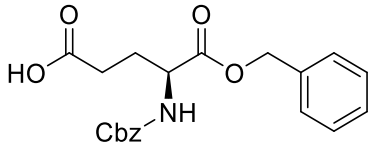
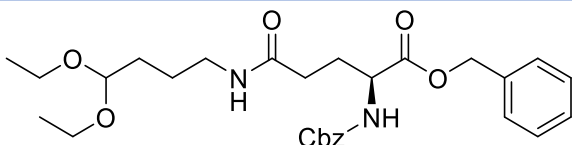
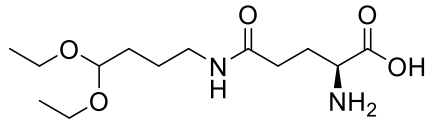
A un matraz esférico de tres bocas de 100 mL provisto de agitación magnética y termómetro se adicionaron 1.5 g (4.02mmol) de **4**, 25 mL de diclorometano anhidro y 1.22 mL (8.78 mmol) de trietilamina. Se enfrió a 0 °C, se adicionó 540 µL (4.41 mmol) de cloruro de pivaloilo y se agitó por 15 minutos. Se verificó el avance de la reacción por CCF, realizando el *quenching* en MeOH (MTBE/Heptano, 1:1 v/v). Se procedió a adicionar 780 µL (4.38 mmol) de dietilacetal 4-aminobutiraldehído y se agitó por 10 minutos. Se verificó el fin de la reacción por CCF (MTBE/Heptano, 1:1). La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación y se lavó con salmuera (3x15 mL), se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentró en el rotavapor y se llevó a sequedad con vacío. Se purificó por columna (Heptano-MTBE, 1:1) y el producto resultante se dejó en solución.

6.1.5 Dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (**1**)

A la solución del compuesto **5** se le adicionó una parte de metanol, 100 mg de Pd/C al 5% y se colocó en el hidrogenador con 60 lb de presión inicial y finalizó con 59 lb. Se verificó el término de la reacción por CCF (MTBE/Heptano, 4:1), la misma placa se eluyó nuevamente [iPrOH/NH₄OH 7:3 v/v] y se reveló con ninhidrina. Se filtró

sobre celita, se concentró y se secó con vacío. Se obtuvieron 134 mg (53%) de sólido blanco p.f. 170 °C con descomposición. RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 4.56 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.72 – 3.58 (m, 3H), 3.58 – 3.44 (m, 2H), 3.12 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.41 – 2.21 (m, 2H), 2.04 (dd, *J* = 14.1, 7.7 Hz, 2H), 1.60 – 1.51 (m, 2H), 1.51 – 1.40 (m, 2H), 1.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). RMN-¹³C (126 MHz, D₂O) δ 174.44, 173.85, 102.85, 62.56, 54.12, 38.95, 31.57, 30.39, 26.52, 23.48, 14.29.

7 Resultados

NOMBRE	ESTRUCTURA	RENDIMIENTO
Ácido N-(benciloxicarbonil) glutámico (2)		12.7 g (95%)
Anhídrido N-benciloxicarbonilglutámico (3)		11.68 g (99%)
Ácido N-benciloxicarbonil-1-benciloxil-5-L-glutámico (4)		6.5 g (40%)
Glutaminato de N2-(benciloxicarbonil)-N5-(4',4'-dietoxi)-1-butilbencilo (5)		Se empleó sin purificar.
Dietilaceta de γ-glutamil-γ-aminobutiraldehído I (1)		134mg (53%)

Caracterización espectroscópica del Dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (1).

Se obtuvieron los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C (DEPTQ 135) dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (1). Se muestran en la figura 5 y 6 respectivamente.

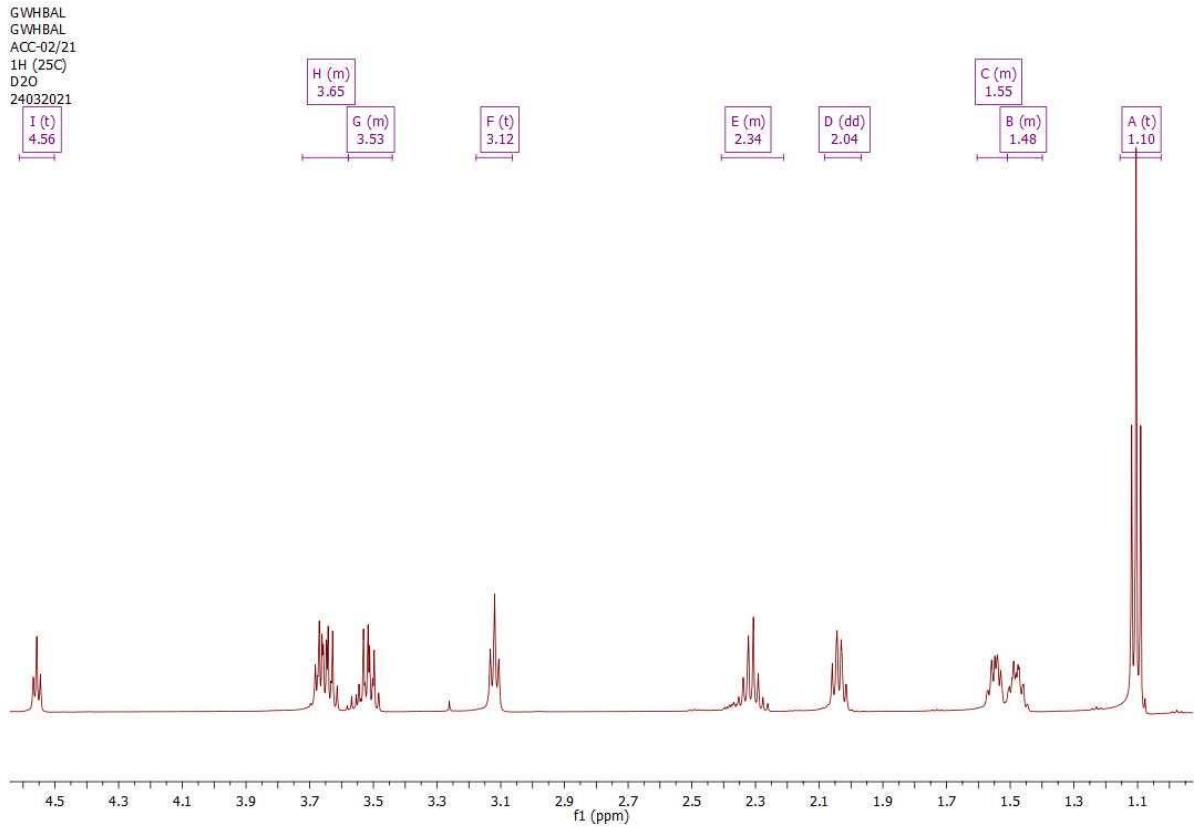


Figura 5. Espectro de RMN- ^1H para el dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (1)

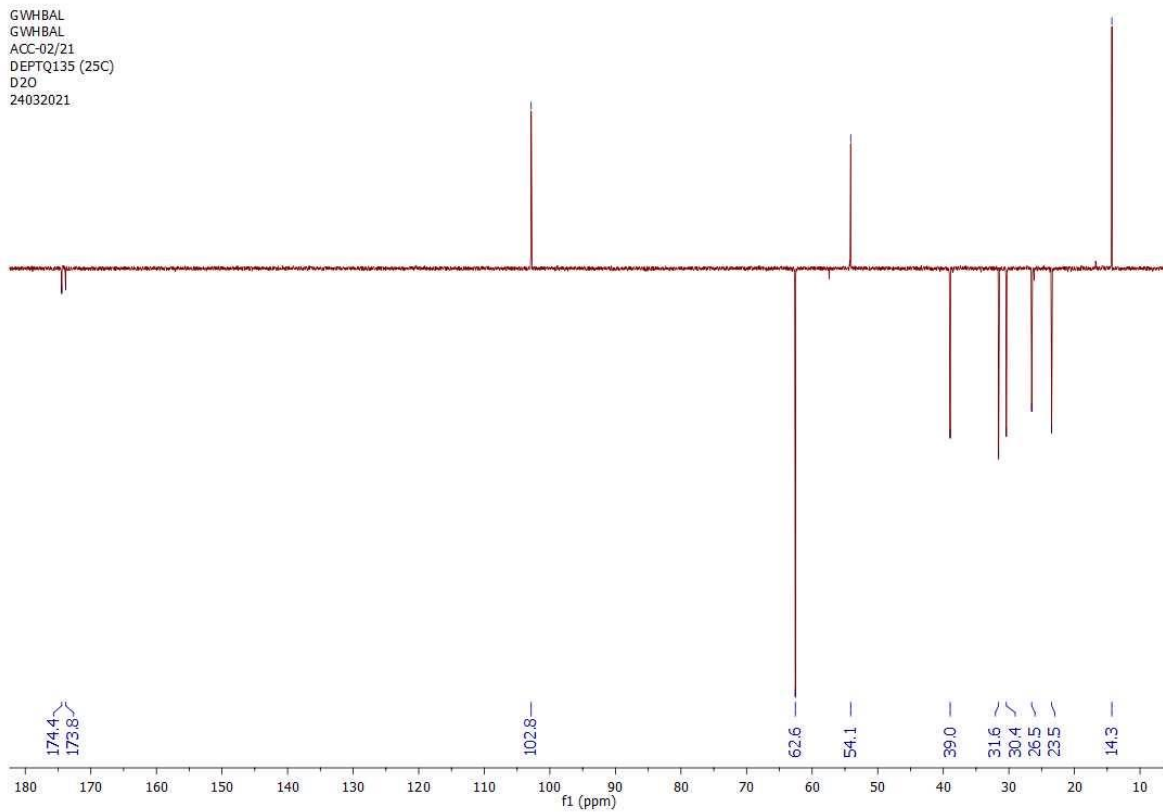
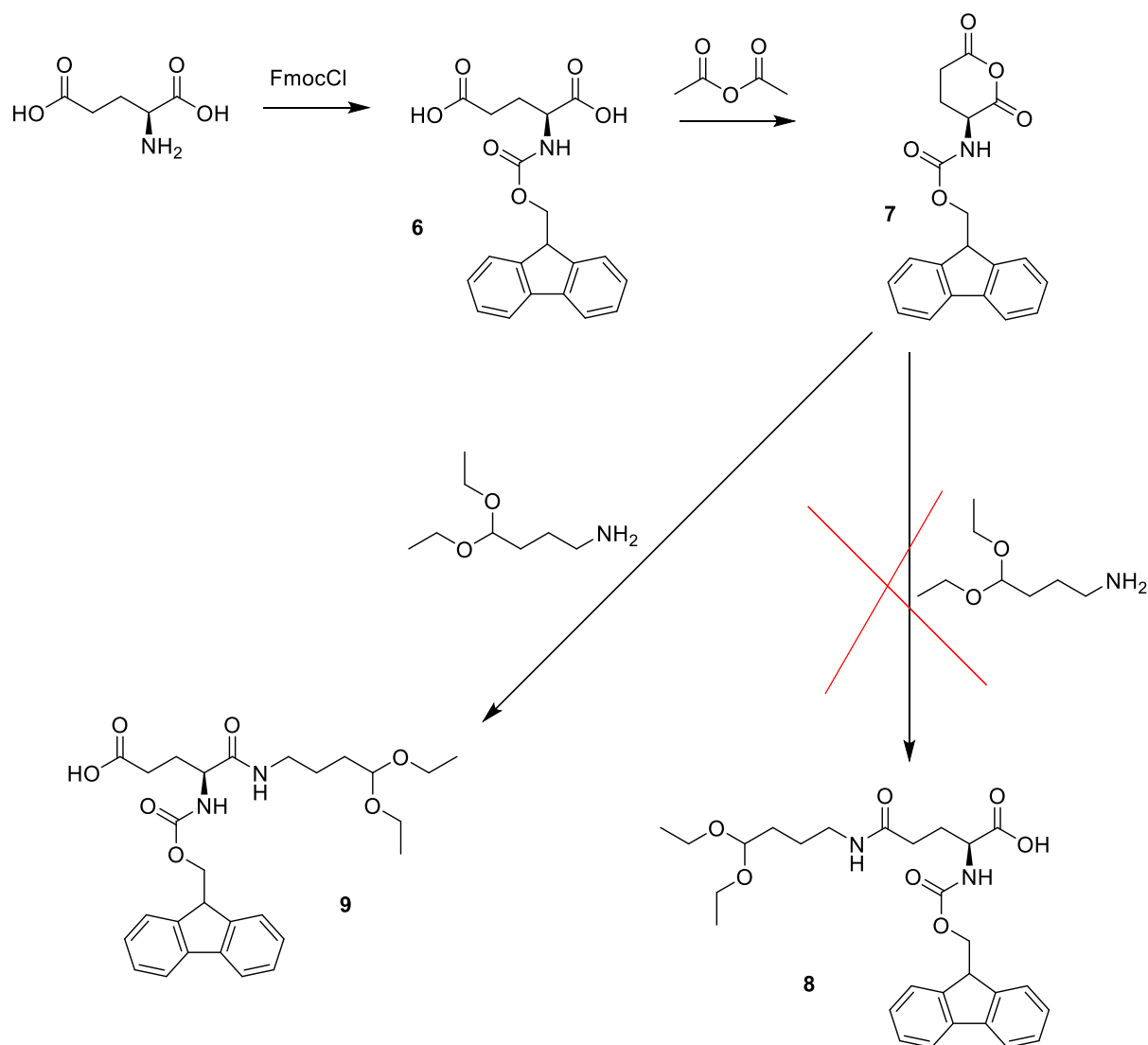


Figura 6. Espectro de RMN- ^{13}C (DEPTQ-135) para el dietilacetal γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (1).

El compuesto (1) obtenido en el laboratorio, una vez que fue caracterizado se envió al Laboratorio de Estructura, Función y Evolución de Proteínas, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM para ser evaluado como potencial sustrato del enzima PaKauB de *Pseudomonas sp.*

8 Análisis de resultados

Para la preparación de la amida **1** se probaron dos rutas, en la primera se protegió la amina del ácido L-glutámico con FmocCl, de acuerdo con las condiciones establecidas por Greene and Wuts⁶³ obteniendo el compuesto **6**. Posteriormente se sintetizó el anhídrido cíclico **7**,⁶⁴ se adicionó el dietilacetal 4-aminobutiraldehído, con el objetivo de que se adicionara sobre el carbonilo menos impedido y se generara la amida **8**, sin embargo, se obtuvo la amida **9** por lo cual se cambió la ruta de síntesis por una donde se realizó la apertura del anhídrido cíclico con alcohol bencílico para generar el éster sobre el carbonilo de la posición 1 y funcionalizar el carboxilo de la posición 5 hacia la formación de la amida (esquema 23). Dado que el éster bencílico se puede hidrogenolizar para formar el ácido carboxílico correspondiente, se optó por cambiar también el grupo protector *N*-Fmoc por el grupo protector *N*-Cbz, el cual también se remueve en condiciones de hidrogenólisis, por lo que se buscó realizar dos transformaciones en un paso de síntesis.



Esquema 23. Ruta de síntesis inicial que se planteó para el compuesto 1.

Esta nueva ruta comenzó protegiendo la amina del ácido glutámico con cloroformiato de bencilo obteniendo el compuesto **2** de acuerdo con lo reportado por Nirmalahrudaya C.⁶⁵ Pero cambiando el disolvente por diclorometano anhidro. Después se sintetizó del anhídrido cíclico **3**, por tratamiento del compuesto **2** con Ac_2O a temperatura ambiente,⁵⁷ sin embargo, la reacción no finalizó durante las dos horas que reporta el autor, por lo que se extendió el tiempo de agitación. Se observó avance de reacción hasta las 24 horas pero no se dio la conversión total de la materia prima. Debido a esto, se modificó el proceso calentando la mezcla de reacción a $70\text{ }^\circ\text{C}$ por 4 horas, confirmando el fin de reacción.

Se continuó con la apertura del ciclo **3** con alcohol bencílico en tolueno para obtener el éster **5**.⁵⁸ Este se intentó purificar mediante extracciones ácido-base, sin éxito, por lo que se purificó por columna cromatográfica.

Para realizar el producto **5** (el esquema se muestra en la sección 7 “parte experimental”) se siguió la metodología descrita por López-Ortíz M.⁶⁶ La purificación de este producto se realizó por cromatografía en columna, donde después de concentrar las fracciones se observó una impureza en el punto de aplicación, la cual no se caracterizó. Después de varios lotes se infirió que el calentamiento en el rotavapor era la causa de la descomposición del producto y se optó por no concentrar dejando el producto puro en solución y dar paso a la hidrogenación catalítica.

Para realizar la hidrogenólisis⁶⁷ del grupo protector *N*-Cbz y del éster bencílico, se utilizó Pd(OH)₂ como catalizador y AcOEt como disolvente. La reacción duró dos horas y media, sin embargo, no se obtuvo el rendimiento esperado, por lo que se cambiaron las condiciones de reacción reemplazando el catalizador por Pd/C al 5% y AcOEt por la mezcla MeOH y MTBE observando que el tiempo de reacción disminuyó a una hora. Al verificar el producto en placa se observó que no se tenía impureza alguna.

Con respecto a la caracterización espectroscópica del compuesto final (**1**), en la figura 7 se muestra el espectro de RMN-¹H del dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (**1**) que se obtuvo en un equipo Bruker Avance III de 500 MHz de intensidad de campo. El espectro se realizó en D₂O como disolvente.

En 4.5 ppm se observa un triplete que integra para 1H el cual corresponde al protón del metino del acetal (posición 3), en la zona entre 3.70-3.61 ppm aparece un conjunto de señales que integran para 3H, dichas señales corresponden a un doble de dobles que aparece en 3.68 ppm e integra para 1H y corresponde al protón del

metino α' del segmento del glutamato. Los 2H que faltan en el intervalo entre 3.70 y 3.61 ppm corresponden a 2H de los metilenos en las cadenas de etilo del grupo acetal (posición 2), mientras que la señal que aparece entre 3.58 -3.48 ppm corresponde a los otros dos hidrógenos de los metilenos restantes en dicho segmento. La señal de 3.1 ppm corresponde a los protones del metileno de la posición γ , la señal de 2.3 ppm corresponde a los hidrógenos que se encuentran vecinos al carbonilo de la amida, es decir, la posición γ' , mientras que la señal de 2.0 ppm corresponde a los hidrógenos diastereoméricos de la posición β' hidrogeno de la posición α al carboxilo, las señales alrededor de 1.5 ppm corresponden al sistema de los metilenos α y β del dietilacetal. Los metilos salen en la señal de 1.1 ppm la cual integra para 6H (posición 1).

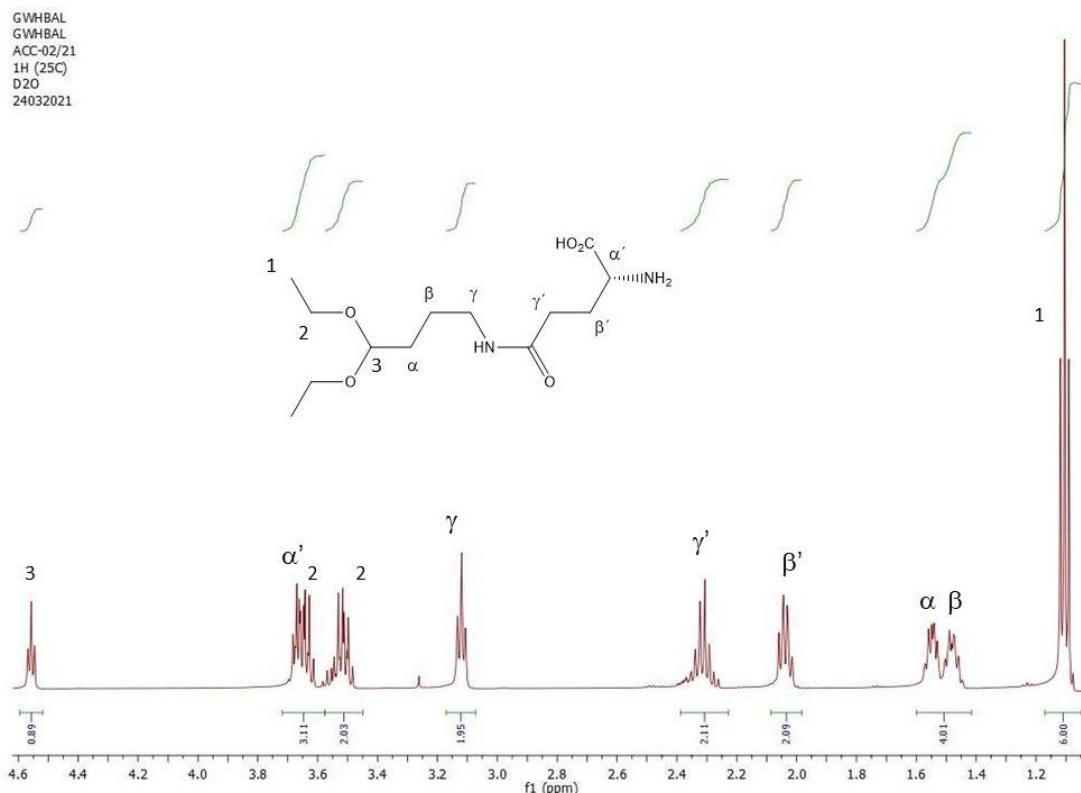


Figura 7. Espectro de RMN-¹H para el dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (1).

Se confirmó la presencia de todos los átomos de carbono mediante RMN- ^{13}C . En la figura 8 se muestra el DEPTQ-135. Las dos señales que aparecen en 174.4 y 173.3 ppm corresponden a los carbonilos de amida y ácido carboxílico, la señal de 102.85 corresponde al carbono del acetal, el de 62.56 ppm corresponde a los metilenos de los etilos del grupo acetal, mientras que los metilos aparecen en 14.2 ppm. En la zona que aparece entre 40 y 20 ppm aparecen 5 señales correspondientes a los metilenos de la molécula, tres para el segmento del γ -aminobutiraldehído y dos para el segmento del ácido glutámico. El metino del carbono α' del ácido glutámico aparece en 54.12 ppm.

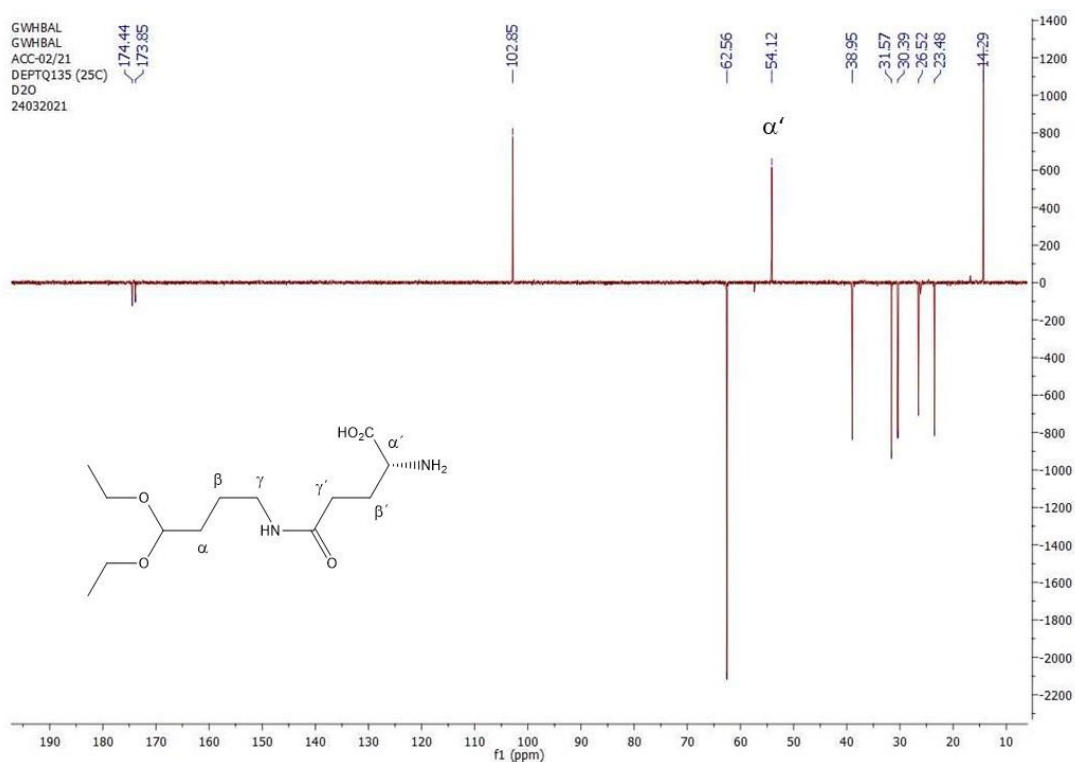


Figura 8. Espectro de RMN- ^{13}C (DEPTQ-135) para el dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (1).

9 Conclusión

- Se logró obtener el compuesto dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído (1).
- El compuesto antes mencionado se caracterizó por RMN- ^1H , RMN- ^{13}C (DEPTQ-135).
- El dietilacetal de γ -glutamil- γ -aminobutiraldehído se evaluó como un potencial sustrato de la PaKauB en el Laboratorio de Estructura, Función y Evolución de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

10 Referencias

-
- ¹ Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR. *Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism*. Chem Biol Interact. 2000; 1–19.
 - ² Sophos N, Pappa A, Ziegler TL, Vasiliou V. Aldehyde Dehydrogenase Gene Superfamily. Chem Biol Interact. 2011;132:255–63.
 - ³ Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Laethem Y, Mesaros N, Glupczynski Y, Nordmann P, et al. *Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium*. Clin Microbiol Infect. 2007;13(6):56–78.
 - ⁴ Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Medical Microbiology. 2015, 753–768.
 - ⁵ Jann a, Stalon V, Wauven C V, Leisinger T, Haas D. N₂-Succinylated intermediates in an arginine catabolic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci. 1986;83(13):37–41.
 - ⁶ Jann A. Matsumoto H HD. The Fourth Arginine Catabolic Pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. J Gen Microbiol. 1988;134(4):43–53.
 - ⁷ Large P. Enzymes and pathways of polyamine breakdown in microorganisms. Mol Microbiol. 1992;88:24–62.
 - ⁸ Wargo MJ. Choline Catabolism to Glycine Betaine Contributes to *Pseudomonas aeruginosa* Survival during Murine Lung Infection. 2013;8(2):1–8.
 - ⁹ Velasco García R, Ramírez Romero MA, Mujica Jiménez C, Muñoz Clares RA. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning , over-expression in *Escherichia coli* , and regulation by choline and salt. Arch Microbiol. 2006;185:14–22.
 - ¹⁰ Wargo MJ, Hogan DA. Identification of genes required for *Pseudomonas aeruginosa* carnitine catabolism. 2019;(2009):1–9
 - ¹¹ González-Segura L, Rudiño-Piñera E, Muñoz-Clares RA, Horjales E. The Crystal Structure of A Ternary Complex of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* Provides New Insight into the Reaction Mechanism and Shows A Novel Binding Mode of the 2'-Phosphate of NADP⁺ and A Novel Cation Binding Site. J Mol Biol
 - ¹² Zaldívar-Machorro VJ, López-Ortiz M, Demare P, Regla I, Muñoz-Clares RA. The disulfiram metabolites S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both in vitro and in situ, and arrest bacterial growth. Biochimie. 2011;93(2):286–95.
 - ¹³ Pietruszko R, Chern MK. Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix. Chem Biol Interact. 2001;130–132:193–9.
 - ¹⁴ Lever M, Slow S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. Clin Biochem. 2010;43(9):732–44.

-
- ¹⁵ Vaz FM, Fouchier SW Ofman R, Sommer M, Wanders RJA. Molecular and biochemical characterization of rat γ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J Biol Chem.* 2000;275(10):3–4.
- ¹⁶ Kikonyogo A, Pietruszko R. Aldehyde dehydrogenase from adult human brain that dehydrogenates γ -aminobutyraldehyde: purification, characterization, cloning and distribution. *Biochem J.* 1996;316(1):17–24.
- ¹⁷ Putrescine, a source of γ -aminobutyric acid in the adrenal gland of the rat. *Biochem J.* 251: 559-562
- ¹⁸ Marchitti SA, Deitrich RA, Vasiliou V. Neurotoxicity and Metabolism of the Catecholamine-Derived 3, 4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and The Role of Aldehyde Dehydrogenase. *Environ Heal.* 2007;59(2):25–50.
- ¹⁹ Goldstein DS, Sullivan P, Holmes C, Miller GW, Alter S, Strong R, et al. Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2013;126(5):591–603.
- ²⁰ Li SW, Lin TS, Minteer S, Burke WJ. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and hydrogen peroxide generate a hydroxyl radical: Possible role in Parkinson's disease pathogenesis. *Mol Brain Res.* 2001;93(1):1–7.
- ²¹ Morgenstern J, Fleming T, Schumacher D, Eckstein V, Freichel M, Herzig S, et al. Loss of glyoxalase 1 induces compensatory mechanism to achieve dicarbonyl detoxification in mammalian Schwann cells. *J Biol Chem.* 2017;292(8):32–38.
- ²² Wood PL, Khan MA, Moskal JR. The concept of "aldehyde load" in neurodegenerative mechanisms: Cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line. *Brain Res.* 2007;1145(1):6-15.
- ²³ Llop, A., Valdés-Depena, V., Zuazo JL. *Microbiología y parasitología médica.* Médicas C, editor. La Habana; 2001. 8-15.
- ²⁴ Wilson R, Dowling R. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax.* 1998;1–9.
- ²⁵ Luján Roca DÁ. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica Latinoam.* 2014;48(4):65–74.
- ²⁶ Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2000;2(9):51–60.
- ²⁷ Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends Microbiol.* 2016;24(5):32–37.
- ²⁸ Gómez CA, Leal AL, Pérez M de J, Navarrete ML. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: understanding a dangerous enemy. *Rev la Fac Med.* 2005;53(1):27–34

- ²⁹ Martínez P Espinal P, Máttar S. Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a β -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Asoc Colomb Infectología*. 2007;11(1):6–15.
- ³⁰ Ramírez Ramírez J, Ayala Aceves M. Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *Rev Digit Univ*. 2014;15(12):1–13.
- ³¹ Montiel C, Bustos I. Procesos enzimáticos amigables con el ambiente. *Rev Digit Univ*. 2014;15:1–9.
- ³² Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(6):697–720.
- ³³ Varela G, Grotiuz G. Fisiología y metabolismo bacteriano. 1st ed. *Bacteriano F y metabolismo*, editor. Uruguay; 2000. 43–58.
- ³⁴ Chang YF, Ghosh P, Rao V V. I-Pipecolic acid metabolism in human liver: I- α -amino adipate δ -semialdehyde oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Protein Struct Mol*. 1990;1038(3):5-300
- ³⁵ Wade LG. *Organic chemistry*. Sixth edit. Pearson PH, editor. 2006. 1330.
- ³⁶ Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem*. 1998;251(3):549–57
- ³⁷ Brocker C, Vasiliou M, Carpenter S, Carpenter C, Nebert DW, Vasiliou V, et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. 2013;189–210.
- ³⁸ Muñoz Clares RA, Velasco Garcia R. Genio y figura de la betaína aldehído deshidrogenasa. 200; 20-23.
- ³⁹ Perozich J, Nicholas H, Wang B, Lindahl R, Hempel J. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. 1999; 37–46
- ⁴⁰ Samsonova NN, Smirnov S V, Novikova AE, Ptitsyn LR. Identification of *Escherichia coli* K12 YdcW protein as a c-aminobutyraldehyde dehydrogenase. 2005;579: 7–12.
- ⁴¹ Kurihara S, Oda S, Kato K, Kim HG, Koyanagi T, Kumagai H, et al. A Novel Putrescine Utilization Pathway Involves γ -Glutamylated Intermediates of *Escherichia coli* K-12. 2005;280(6): 2–8.
- ⁴² Grisel S, Gruez A, Valencia C, Tegoni M, Cambillau C. Crystal Structure and Kinetics Identify *Escherichia coli* YdcW Gene Product as a Medium-chain Aldehyde Dehydrogenase. 2004; 29–41.
- ⁴³ Yang Z, Lu CD. Functional genomics enables identification of genes of the arginine transaminase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2007;189(11): 45–53.
- ⁴⁴ Padmanabhan R.; Tchen T. Aminoaldehyde dehydrogenases from a *Pseudomonas* species grown on polyamines. *Arch Biochem Biophys*. 1972;150(2): 31–41.
- ⁴⁵ Tanaka K. Purification and characterization of aminopropionaldehyde dehydrogenase from

Arthrobacter sp . TMP-1. 2001;195:1–6.

⁴⁶ Chou HT, Kwon D, Hegazy M, Lu C. Transcriptome Analysis of Agmatine and Putrescine Catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. 2008;190(6): 66–75.

⁴⁷ Herrera CG, Luis J, Servín C, Ferriz Martínez RA, De La K, Carbot T, et al. Poliaminas: Pequeños Gigantes De La Regulación Metabólica. 2014;33(2):7-51.

⁴⁸ Riveros-Rosas H, González-Segura L, Julián-Sánchez A, Díaz-Sánchez ÁG, Muñoz-Clares RA. Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chem Biol Interact.* 2013;202: 51–61.

⁴⁹ Cardona Cardona YV. Clonación, sobreexpresión y caracterización cinética y estructural de la enzima aminoaldehído deshidrogenasa PA5312 (PaKauB) de *Pseudomonas aeruginosa*. 2017; 135.

⁵⁰ Diaz-Sanchez AG, Gonzalez-Segura L, Mujica-Jimenez C, Rudino-Pinera E, Montiel C, Martinez-Castilla LP, et al. Amino Acid Residues Critical for the Specificity for Betaine Aldehyde of the Plant ALDH10 Isoenzyme Involved in the Synthesis of Glycine Betaine. *Plant Physiol.* 2012;158(4): 70–82.

⁵¹ Jian-Lian Dong, Li-Si-Han Yu, and Jian-Wu Xie. A Simple and Versatile Method for the Formation of Acetals/Ketals Using Trace Conventional Acids, : *ACS Omega* 2018, 3, 4974–4985.

⁵² Camps García, Pelayo; Vázquez Cruz S. Fundamentos de síntesis de fármacos. Barcelona U de, editor. 2005. Barcelona; 209.

⁵³ Cassimjee KE, Marín SR, Berglund P. Synthesis of Cyclic Polyamines by Enzymatic Generation of an Amino Aldehyde In Situ. 2012;1–3.

⁵⁴ Reza G, Shadegan HA, Ahmadpour R. Clean and highly selective oxidation of alcohols by the $\text{PhI}(\text{OAc})_2 / \text{Mn}(\text{TPP})\text{CN} / \text{Im}$ catalytic system. *J Chem Res.* 2007; 2–6.

⁵⁵ Mestrom L, Bracco P, Hanefeld U. Amino Aldehydes Revisited. *Eur J Org Chemistry.* 2017; 19–25.

⁵⁶ Masdeu G, Pérez-trujillo M, López-santín J, Álvaro G. Chloroperoxidase-catalyzed amino alcohol oxidation : Substrate specificity and novel strategy for the synthesis of N -Cbz-3-aminopropanal. *Process Biochem.* 2016;51(9): 04–11.

⁵⁷ Mestrom L, Bracco P, Hanefeld U. Amino Aldehydes Revisited. *Eur J Org Chemistry.* 2017; 19–25.

⁵⁸ Alsunaidi ZHA, Cundari TR, Wilson AK. Toward a More Rational Design of the Direct Synthesis of Aniline : A Density Functional Theory Study. 2017; 5-9.

⁵⁹ Mendoza MS, Sánchez AV, Manrique CG. Reducción de nitrocompuestos utilizando el sistema $\text{Pd} / \text{H}_2 \text{N-NH}_2 / \text{Mw}$. 2013;24(3): 47–50.

⁶⁰ Lee C, Lee J, Na H, Yoon D, Miyaji H, Cho W, et al. Cis- and Trans-Strapped Calix (4)pyrroles Bearing Phthalimide Linkers: Synthesis and Anion-Binding Properties. *J Org Chem.* 2005;(70): 67–74.

-
- ⁶¹ Wang J, Tang Q, Jin S, Wang Y, Yuan Z, Chi Q. Mild and selective hydrogenation of nitriles into primary amines over a supported Ni catalyst. 2020; 49–55.
- ⁶² Leggio A, Belsito EL, Luca G De, Gioia ML Di, Leotta V, Romio E. RSC Advances One-pot synthesis of amides from carboxylic acids activated using thionyl chloride. 2016; 68–75.
- ⁶³ Greene PWGT. Greene's protective groups in organic synthesis. 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006. 76–82.
- ⁶⁴ Lee D-H. Synthesis and Anticonvulsant Activity of (R) - and (S) -3- (Carbobenzyloxy-amino-1-glutarimidooxy) esters. 2013;25(14): 2–7.
- ⁶⁵ Yoshino R, Tokairin Y, Konno H. Synthesis of fully protected (2R,3R,4S)-4-amino-7-guanidino-2,3-dihydroxy heptanoic acid. Tetrahedron Lett. 2017;58(16): 4–6.
- ⁶⁶ López-Ortíz M, Herrera-Solís A, Luviano-Jardón A, Reyes-Prieto N, Castillo I, Monsalvo I, et al. Chemoenzymatic synthesis and cannabinoid activity of a new diazabicyclic amide of phenylacetylricinoleic acid. Bioorganic Med Chem Lett. 2010;20(11): 1–4.
- ⁶⁷ Ghosh SK, Ganzmann C, Gladysz JA. Tetrahedron : Asymmetry Synthesis of a series of x - dimethylaminoalkyl substituted ethylenediamine ligands for use in enantioselective catalysis. Tetrahedron: Asymmetry. 2015;26(21–22):1273–80.