



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

FORMACIÓN DEL ENLACE PEPTÍDICO EN MEDIO ACUOSO

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

**PRESENTA
ITZEL CHACÓN LICONA**

**TUTOR
DR. RICARDO JORGE CÁRDENAS PÉREZ**



CDMX

2022



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet

VOCAL: Dr. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez

SECRETARIO: Q.F.B. Ana Adela Sánchez Mendoza

1er. SUPLENTE: Dr. Agustín Palma de la Cruz

2° SUPLENTE: M. en C. Luis Alejandro Díaz Flores

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 2 – 8

DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES

INSTITUTO DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. José Antonio Morales Serna

SUSTENTANTE:

Itzel Chacón Licona

Índice

Glosario	3
Introducción	4
Antecedentes	6
Configuración de los aminoácidos naturales	7
Síntesis de aminoácidos	7
<i>Síntesis de Gabriel y malónica</i>	8
<i>Síntesis de Strecker</i>	8
Síntesis de péptidos	9
<i>Método de Curtius</i>	11
<i>Método de Fischer</i>	12
<i>Anhídridos mixtos</i>	13
<i>Agentes acoplantes</i>	15
Hipótesis	21
Objetivos	21
Objetivos generales	21
Objetivos particulares	21
Análisis de resultados	22
Síntesis de la secuencia BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-Ala-OBn	22
Condiciones de reacción	23
Base	24

Tiempo de reacción	25
Reacción de acoplamiento	26
<i>BOC-Leu-Ala</i>	26
<i>BOC-Leu-Ala-Leu</i>	30
<i>BOC-Leu-Ala-Leu-Ala</i>	32
<i>BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile</i>	34
<i>BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-Ala-OBn</i>	36
Procedimiento experimental	41
Síntesis de BOC-Leu	41
Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala	42
Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala-Leu	43
Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala-Leu-Ala	44
Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile	45
Síntesis de tosilato éster bencílico de L-alanina	46
Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-Ala-OBn	49
Conclusiones	50
Referencias	51

Glosario

CDMT	2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina
TFFH	fluoro-N,N,N',N'-tetrametilformamidinio hexafluorofosfato
BTFHH	fluoro-N,N,N',N'-bis(tetrametileno)formamidinio hexafluorofosfato
DFTH	1,3-dimetil-2-fluoro-4,5-dihidro-1H-imidazolio hexafluorofosfato
IBCF	cloroformado de isobutilo
DCC	diciclohexilcarbodiimida
Host	1-hidroxibenzotriazol
DCU	diciclohexilurea
EDC	<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
BDDC	bis[[4-(2,2-dimetil-1,3-dioxolil)]metol]-carbodiimida
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
BOC	<i>ter</i> -butoxicarbonilamida
Leu	leucina
Ala	alanina
Ile	isoleucina
OBn	O-bencilo
THF	tetrahidrofurano
Ccf	cromatografía en capa fina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia

Introducción

En el transcurso de los últimos años, el mar con su inmensa diversidad biológica se ha convertido en la principal fuente natural de moléculas con aplicaciones farmacológicas, lo cual resulta lógico si consideramos que su extensión abarca el 70% del planeta y su diversidad biológica el 95% de la biósfera. En la búsqueda de organismos marinos productores de moléculas de interés, la atención se centra en especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de un movimiento lento y primitivos desde el punto de vista filogenético; la supervivencia de los organismos que las poseen se basa en la generación de productos químicos resultado de un metabolismo secundario de elevada complejidad, que se utilizan para el ataque y la defensa frente a otras especies. En un ambiente acuoso, la comunicación entre organismos vivos depende de la solubilidad de los compuestos químicos en agua. Estos compuestos usados en la comunicación pueden tener estructuras químicas complejas y pesos moleculares elevados.

El estudio de un producto marino consta de varias etapas:

- Recolección del espécimen.
- Determinación de su taxonomía.
- Aislamiento de extractos o moléculas.
- Elucidación estructural.
- Evaluación de actividad farmacológica.
- Diseño de rutas sintéticas de compuestos activos.

En ocasiones no resulta rentable la extracción de los metabolitos secundarios de una fuente natural o el cultivo controlado de las especies, cuyo hábitat natural se encuentra en ecosistemas complejos que dependen de otros organismos. De esta manera, la ruta sintética de un compuesto activo permite asegurar el suministro, independiente a la fuente natural, de la molécula activa

para su comercialización, así como la optimización de sus propiedades químicas y farmacológicas a través de la síntesis de compuestos semejantes.

Los péptidos cíclicos han jugado un rol crucial en la investigación farmacéutica, se encuentran entre los compuestos precursores más prometedores debido a su flexibilidad conformacional y a su alta estabilidad en sistemas vivos, en comparación a sus homólogos lineales. Los péptidos cíclicos representan una familia de metabolitos secundarios producidos por organismos marinos y microorganismos terrestres¹. Los organismos marinos son una fuente rica en péptidos cíclicos biológicamente activos², cuyas estructuras pueden contener aminoácidos no esenciales como unidad principal dentro del ciclo. La dificultad se encuentra en aislar cantidades significativas y con alta pureza de estos péptidos cíclicos para estudios farmacológicos y toxicológicos³.

Con el descubrimiento de péptidos biológicamente activos, la síntesis de estos ha dado lugar a la generación de innumerables estrategias y rutas de síntesis, para alcanzar procesos más eficientes. Es de esperarse que los nuevos procedimientos sean aplicables a la producción práctica de péptidos⁴, aunque el papel clásico de la química orgánica es proporcionar una síntesis inequívoca, lo cual permanece como una de las principales motivaciones en la síntesis de péptidos. Las dificultades en la síntesis de péptidos y el sustancial tiempo requerido para la preparación de una cadena larga de oligopéptidos siguen siendo los motivos principales para el desarrollo de técnicas⁵ que permitan la fácil construcción de una cadena mediante simples operaciones repetitivas, las cuales sean sometidas a mecanización y quizás automatización. Es así como a pesar de que ya existen metodologías establecidas para la síntesis de oligopéptidos, el tópico no se encuentra agotado. La utilización de materias primas costosas o bien el uso de condiciones especiales de reacción, son aspectos que también se deben considerar y que en algunas ocasiones, sobre todo a nivel industrial, no son accesibles.

Antecedentes

El término “péptido” proviene de pepsis que significa productos de digestión de proteínas, denota compuestos relativamente pequeños, los cuales son similares a las proteínas, excepto que éstas son sustancias de alto peso molecular. No hay una línea definida entre estos dos grupos de materiales; moléculas que se encuentran constituidas por 100 o más residuos de aminoácidos son usualmente consideradas como proteínas y aquellas que contienen un número menor de residuos como péptidos. Sin embargo, la química es esencialmente igual cuando el número de aminoácidos incrementa en un compuesto.

Aunque comúnmente se indican los aminoácidos como estructuras que contienen un grupo amino y un grupo carboxilo, ciertas propiedades, tanto físicas como químicas no concuerdan con tales estructuras; presentan una reacción ácido-base intramolecular y se encuentran principalmente en la forma de un ión zwitter, son sales internas y por lo tanto tienen propiedades físicas asociadas con las sales⁶. El grupo carboxílico pierde un protón, dando lugar a un ión carboxilato, y el grupo amino se protona y da lugar a un ión amonio, la naturaleza dipolar de los aminoácidos hace que éstos tengan propiedades particulares:

1. A diferencia de las aminas y de los ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, los aminoácidos son sólidos cristalinos no volátiles que tienen punto de fusión o descomponen a temperaturas relativamente altas.
2. Son insolubles en disolventes no polares, mientras que son apreciablemente solubles en agua.
3. Los aminoácidos son menos ácidos que los ácidos carboxílicos y menos básicos que la mayoría de las aminas.

Configuración de los aminoácidos naturales

Tal como se obtienen por hidrólisis ácida o enzimática de las proteínas, todo aminoácido, salvo la glicina, contiene por lo menos un centro estereogénico, resultando ópticamente activo. En la figura 1 se representa la proyección de Fischer del enantiómero (*S*) de la alanina, con la cadena de carbonos en la vertical y el carbono carbonílico en la parte superior; se puede observar que la (*S*)-alanina tiene una configuración similar a la del L-(–)-gliceraldehído, con el grupo amino a la izquierda de la proyección. Como su estereoquímica es similar a la del L-(–)-gliceraldehído, a los (*S*)-aminoácidos naturales se les clasifica como L-aminoácidos (Figura 1).

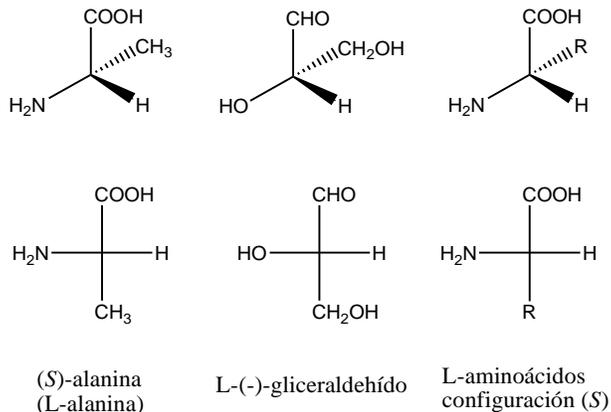


Figura 1. Proyección de Fischer del enantiómero (*S*) de la alanina.

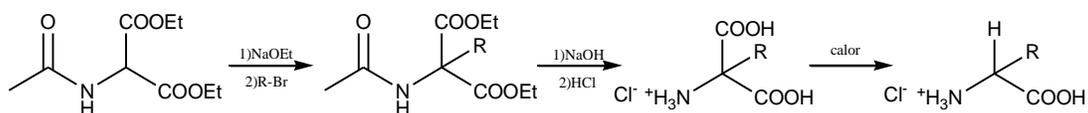
Síntesis de aminoácidos

La síntesis de aminoácidos es una tarea que rara vez se realiza, ya que éstos se pueden obtener hidrolizando proteínas y separando la mezcla de aminoácidos, aunque generalmente los aminoácidos están disponibles comercialmente, o bien se podría realizar a través de un método general de síntesis de aminoácidos. En la literatura existen descritas una gran cantidad de

estrategias de síntesis de estos compuestos, entre las cuales sobresalen por su eficiencia, simplicidad o elegancia las siguientes:

Síntesis de Gabriel y malónica

La síntesis está basada en el 2-acetamido malonato de dietilo que se puede aplicar en la mayoría de los casos. La formación del carbanión con etóxido de sodio para dar lugar a la C-alkilación correspondiente, es seguida por la saponificación de los grupos éster y la hidrólisis de la acetamida con ácido clorhídrico con la concomitante descarboxilación (Esquema 1).

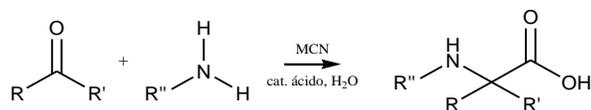


Esquema 1. Combinación de síntesis de Gabriel y malónica.

El clorhidrato obtenido es convertido a la forma de ión zwitter por neutralización con hidróxido de sodio mientras que el NaCl permanecerá en solución, el aminoácido libre usualmente se separará en forma de cristal. Es importante mencionar que esta síntesis ofrece como producto una mezcla racémica de los enantiómeros D y L del aminoácido, los cuales pueden ser separados para obtener las formas enantioméricamente puras.

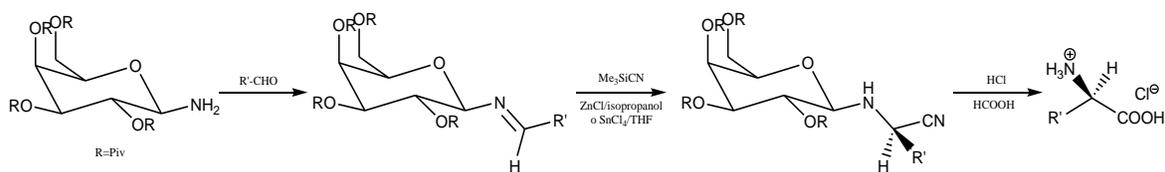
Síntesis de Strecker

La reacción de Strecker, es una reacción multicomponente para sintetizar aminoácidos a partir de aldehídos o cetonas. Normalmente, se condensa en presencia de un cianuro metálico, catalizador ácido y agua, generalmente cianuro de potasio, para formar un α -aminonitrilo⁷. El mecanismo comienza con la reacción catalizada del carbonilo con la amina para dar la imina correspondiente, que es atacada por el cianuro para tener el intermediario nitrilo, el cual se hidroliza posteriormente para producir el aminoácido correspondiente. Un método bien establecido para la síntesis de aminoácidos racémicos (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de Strecker.

El desarrollo de métodos de síntesis asimétrica de Strecker usando auxiliares quirales⁸ y catalizadores quirales, tales como carbohidratos (Esquema 3), aminas quirales o bases de Schiff quirales, han demostrado ser un método selectivo eficiente para la preparación de aminoácidos.



Esquema 3. Síntesis de Strecker usando un carbohidrato como auxiliar quiral.

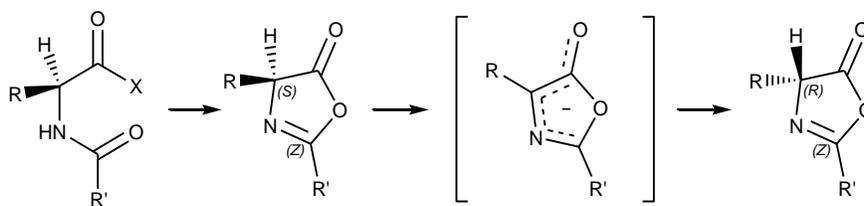
Síntesis de péptidos

La síntesis general de oligopéptidos⁹, con una secuencia bien definida de aminoácidos, resulta ser una tarea poco convencional, a pesar de que pudiera resultar simple pensar solo en la formación de una serie de enlaces C-N de amida para construir la secuencia peptídica deseada; sin embargo, aún existe la necesidad de llegar a conseguir la perfección observada en la naturaleza, sobre todo cuando se habla de conservar la estereoquímica de los aminoácidos durante la síntesis en el laboratorio.

A nivel estratégico general, la formación del enlace peptídico requiere de la protección del grupo amino de uno de los aminoácidos y la protección del grupo carboxilo del otro. En consecuencia quedan disponibles para reaccionar el extremo amino libre de uno de ellos con el extremo carboxilo libre del otro. Como producto de la reacción se tiene un dipéptido protegido en sus extremos amino y carboxilo, de modo que para continuar con la secuencia peptídica deseada es

necesario realizar la desprotección de alguno de los extremos. Esta desprotección requiere el uso de otra reacción química adicional, la cual no debe afectar a la unión peptídica y debe lograr al mismo tiempo una eficiente eliminación del grupo protector. Además, en el caso de que alguno o ambos aminoácidos tengan cadenas funcionalizadas protegidas previamente, la reacción de desprotección no deberá afectar tampoco a alguno de estos últimos grupos protectores. De este modo, la elección de los grupos protectores, tanto en las cadenas laterales como en los grupos funcionales potencialmente formadores del enlace peptídico, es un aspecto importante que se debe considerar previamente de manera cuidadosa.

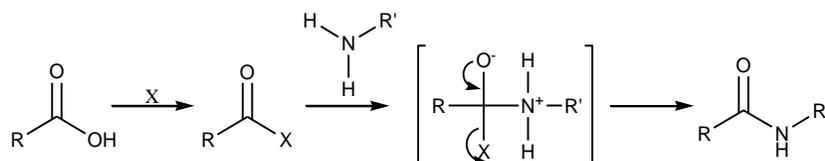
La mayor complejidad en la síntesis radica en otros aspectos, como la protección adecuada de los grupos funcionales que no intervienen en la formación del enlace peptídico y en la prevención de la epimerización como reacción secundaria durante un proceso de formación de enlace peptídico. La epimerización o racemización, es una reacción secundaria que suele presentarse en el carbono de la posición α del extremo carboxilo de un aminoácido activado durante una reacción de acoplamiento peptídico, donde ocurre la pérdida de la quiralidad como consecuencia de la abstracción del protón; a través de la formación de una oxazolona (Esquema 4).



Esquema 4. Esquema del proceso de epimerización

Los enlaces amida son sintetizados a partir de la unión de ácidos carboxílicos y aminas; sin embargo, energéticamente la formación de una amida es un proceso que requiere temperaturas y condiciones de reacción que resultan inadecuadas para muchos péptidos, por lo que la formación del enlace peptídico requiere de otras condiciones de reacción para llevarse a cabo. Esa alternativa es

el uso de diferentes derivados de los ácidos carboxílicos, que desde un punto de vista energético son compuestos más apropiados para acceder al estado de transición generador del enlace peptídico. Por esta razón, es necesario primero activar el ácido carboxílico, un proceso que usualmente se realiza sustituyendo el grupo OH del ácido por un átomo o grupo electroattractor⁹, el cual haga al carbono del carboxilo lo suficientemente electrofílico para facilitar el ataque nucleofílico del grupo amino (Esquema 5).

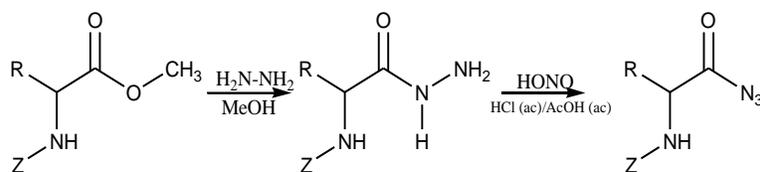


Esquema 5. Principio del proceso de activación para la formación del enlace amida.

Para activar los ácidos carboxílicos, existe una cantidad ilimitada de opciones de grupos electroattractores y, por lo tanto de métodos de activación y acoplamiento de aminoácidos, de los cuales algunos de los más importantes son:

Método de Curtius

Es el método más antiguo que ha perdurado y suele ser utilizado aún hasta nuestros días. Una de las razones de su uso es la baja racemización que presentan las acil-azidas derivadas de los aminoácidos y péptidos involucrados. Sin embargo, pueden perder su pureza óptica cuando se encuentran en presencia de un exceso de base. El método consiste en la formación de acil-azida de un aminoácido éster o un péptido a partir de hidracinas, las cuales se pueden obtener por hidracinólisis de los ésteres correspondientes. El proceso general de formación de la acil-azida se lleva a cabo al hacer reaccionar la correspondiente acil-hidracina con nitrito de sodio y una mezcla acuosa de ácido clorhídrico y ácido acético a baja temperatura o bien con un nitrito alquílico en condiciones ácidas y anhidras (Esquema 6).¹⁰



Esquema 6. Método general para la formación de acil-azidas

Este procedimiento ofrece como ventaja la transformación directa de un éster metílico a la acil-azida correspondiente, realizándose la transformación de un grupo protector a un grupo activante. Sin embargo, las desventajas que presenta este método es la posibilidad de obtener isocianatos a través de la transposición de Curtius y la lenta formación del enlace peptídico. Para evitar la transposición es necesario trabajar a temperaturas bajas y altas concentraciones.

Método de Fischer

Otro de los métodos para formar el enlace peptídico es realizar la activación del grupo carboxilo a través de la formación del cloruro de acilo correspondiente¹¹, seguido de la reacción con un grupo amino bajo las condiciones de Schotten-Baumann. La formación de cloruros de acilo se ha realizado con reactivos como el cloruro de pivaloilo, bicloruro de ftaloilo, cloruro de tionilo, cloruro de oxalilo, ácido tricloroisocianúrico y CDMT (2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina), los cuales son muy agresivos como para ser compatibles con sustratos sensibles, además muchos cloruros de acilo de aminoácidos se ciclan espontáneamente formando oxazolonas y como consecuencia, se obtienen péptidos racémicos; por lo que el método es usado en acoplamiento de aminoácidos impedidos estéricamente. De forma alternativa se han utilizado fluoruros de ácido, los cuales son más estables frente a la humedad y frente a grupos funcionales lábiles en condiciones ácidas; entre los reactivos utilizados se encuentra el ácido trifluoroisocianúrico, TFFH (Fluoro-N,N,N',N'-tetrametilformamidinio hexafluorofosfato), BTFFH (Fluoro-N,N,N',N'-bis(tetrametilen)formamidinio hexafluorofosfato) y DFTH (1,3-dimetil-2-fluoro-4,5-dihidro-1H-imidazolio hexafluorofosfato) (Figura 2).¹²

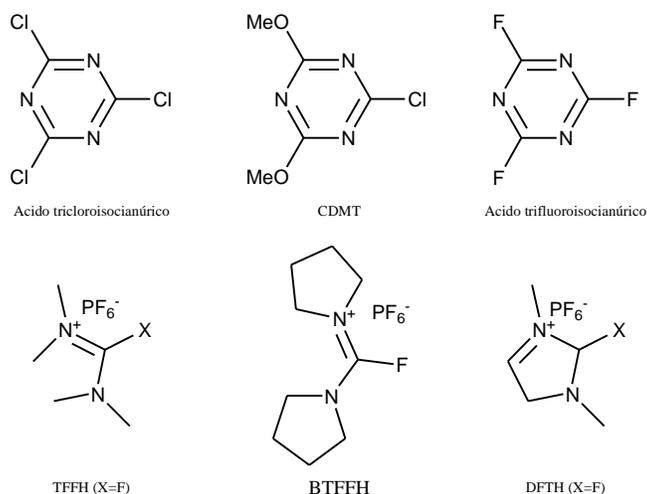


Figura 2. Reactivos generadores de halogenuros de acilo.

Anhídridos mixtos

Uno de los métodos de acilación más simples y eficientes es el tratamiento de aminas u otros nucleófilos con anhídridos de ácidos carboxílicos. Para garantizar que la reacción de acilación proceda como se desea, es necesario que exista una diferencia considerable entre las densidades electrónicas de ambos grupos carbonilos que conforman el anhídrido mixto y que el grupo carbonilo del aminoácido o péptido protegido sea el centro electrofílico más fuerte y presente un menor impedimento estérico. Los anhídridos mixtos resuelven el problema al tener sólo un grupo carbonilo susceptible de ataque por amina. Los anhídridos mixtos tales como los anhídridos mixtos del ácido isovalérico o trimetilacético (piválico) se suelen generar in situ. Asimismo, se han utilizado anhídridos mixtos del ácido carbónico, que son producidos mediante el uso de cloroformatos, en presencia de una base terciaria y el péptido o aminoácido protegido. En estos intermediarios la electrofilia del grupo carbonilo correspondiente a la parte del ácido carbónico se encuentra reducida por efecto de los dos átomos de oxígeno unidos directamente al carbonilo. El reactivo más utilizado para formar los anhídridos del ácido carbónico es el cloroformiato de isobutilo (IBCF) (Figura 3).

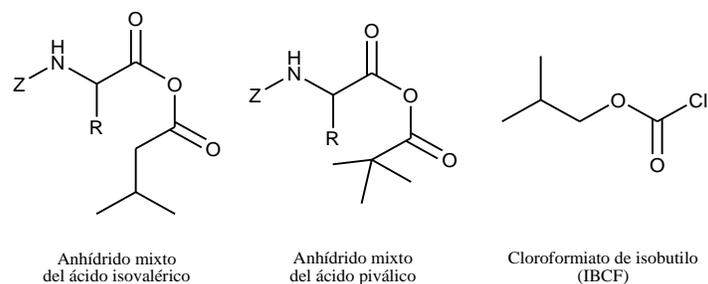
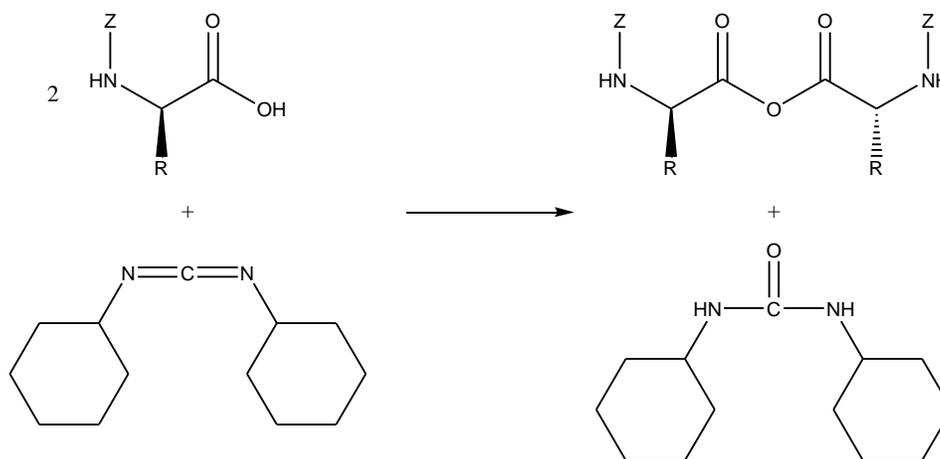


Figura 3. Anhídridos mixtos utilizados

Un problema relacionado con los anhídridos mixtos es la formación de un subproducto de acilación no deseado. La solución para este problema fue la utilización de anhídridos simétricos, los cuales al reaccionar con un grupo amino generan un solo tipo de amida. Sin embargo, la pérdida de un mol del aminoácido o péptido protegido no resulta viable debido al trabajo y costo relacionado con su preparación.

El método resurgió con el uso de la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) para la formación de anhídridos simétricos de aminoácidos protegidos,⁹ utilizando dos moles del ácido carboxílico y un mol de DCC se favorece la formación de los anhídridos simétricos que se convierten en las especies predominantes en la mezcla de reacción, sin necesidad de aislar el anhídrido (Esquema 7).



Esquema 7. Anhídrido simétrico obtenido con DCC.

Agentes acoplantes

Una estrategia alternativa para llevar a cabo la activación del grupo carboxilo, es la transformación de la función carboxílica en una función éster. En este caso, se tiene la ventaja de que no existe un segundo agente acilante, pues solo existe un centro electrofílico a diferencia de cuando se usan anhídridos mixtos. En el uso de ésteres para activar un ácido carboxílico existen diferentes propuestas; una de ellas parte de un modelo en el que un éster metílico se activa mediante su sustitución con un grupo fuertemente electroattractor. Una propuesta para el uso de ésteres activados se relaciona con una analogía bioquímica: el grupo acetilo presente en la forma de tioéster en la coenzima A¹³, se establece que los ésteres de tiofenilo de aminoácidos protegidos deben solo una parte de su reactividad al hecho de que sean tioésteres, en mayor grado la habilidad que presentan para formar amidas bajo condiciones relativamente suaves se debe al hecho de que sean ésteres de arilo. Como un paso lógico se introdujo el uso de estos compuestos a los cuales, para incrementar su reactividad, se adicionaron grupos electroattractores al anillo aromático. Como ejemplo tenemos el uso de ésteres de *p*-nitrofenol, los ésteres de pentaclorofenilo y los ésteres de pentafluorofenilo. Los ésteres activados de pentafluorofenilo son en general más reactivos que los ésteres de pentaclorofenilo, lo que se explica por el mayor impedimento estérico de los átomos de cloro presentes. De este modo, el uso de ésteres de pentafluorofenilo se ha popularizado bastante en macrolactamizaciones, en donde por lo general es necesario aislarlos y purificarlos antes de ser utilizados como agentes acilantes. Sin embargo, también se ha descrito la formación *in situ* de ésteres de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en presencia de EDC.¹⁴

Como ésteres activados se han utilizado también a los derivados O-acilados de las hidroxilaminas sustituidas, usando como modelo los ésteres de *N*-hidroxiftalimida. También se han utilizado los ésteres de *N*-hidroxisuccinimida (Figura 4).⁶

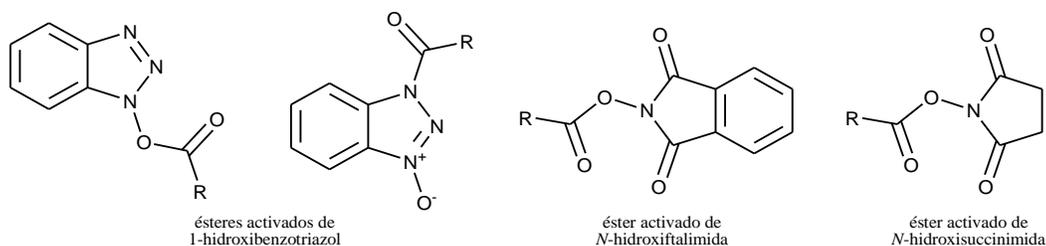
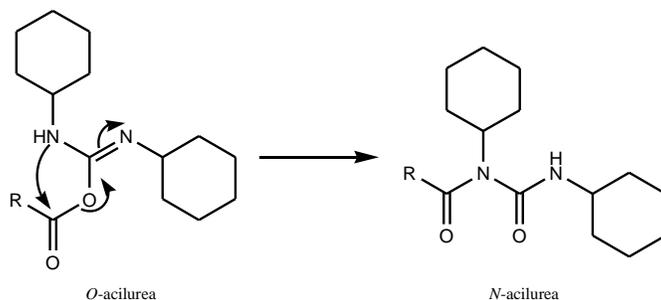


Figura 4. Derivados O-acilados.

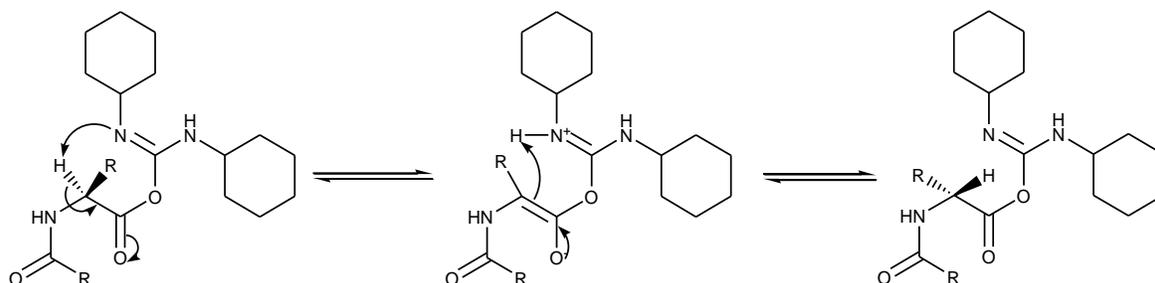
Las carbodiimidas fueron los primeros agentes acoplantes en ser utilizados para la formación de ésteres activados. La diciclohexilcarbodiimida (DCC) ha sido el agente deshidratante más utilizado para activar grupos carboxilos en la síntesis de péptidos por más de 50 años; ha sido utilizado para formar anhídridos simétricos, ésteres o como agente acoplante de forma directa, fue propuesto como un reactivo que realiza la formación del enlace peptídico.¹⁵ El primer paso comprende la reacción del oxígeno –OH del ácido carboxílico con el enlace doble de la DCC, no obstante su uso conlleva ciertas limitaciones:

- El subproducto formado; la diciclohexilurea (DCU) es usualmente insoluble en el disolvente de la reacción, por lo que puede ser removido por filtración, pero frecuentemente contamina los productos del acoplamiento.
- La formación de una *N*-acilurea como subproducto no deseado suele presentarse con todas las carbodiimidas. La transposición ocurre cuando se da el ataque nucleofílico intramolecular del átomo de nitrógeno hacia el grupo carbonilo en la *O*-acilurea (Esquema 8).



Esquema 8. Formación de *N*-acilurea

La activación del ácido carboxílico con DCC puede conducir a la epimerización del carbono alfa del grupo carboxilo mediante la abstracción del hidrógeno α por el nitrógeno básico en la *O*-acilurea, especialmente importante cuando hay grupos activantes ácidos en la posición α . En este proceso, la estabilización por puente de hidrógeno de la forma enólica del intermediario juega un papel importante (Esquema 9).



Esquema 9. Mecanismo de racemización en el intermediario *O*-acilurea.

Para encontrar una solución a estas limitaciones desde la aplicación de la DCC a la formación del enlace amida, se propuso el uso de carbodiimidas, tales como: *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), bis[[4-(2,2-dimetil-1,3-dioxolil)]metil]-carbodiimida (BDDC), *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) solubles en agua¹⁶ y otros disolventes orgánicos y su eficiencia es comparable con la DCC y la EDC (Figura 5).

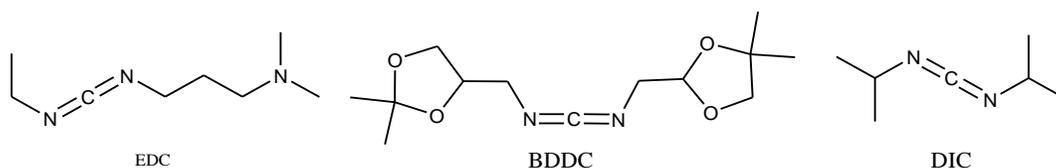
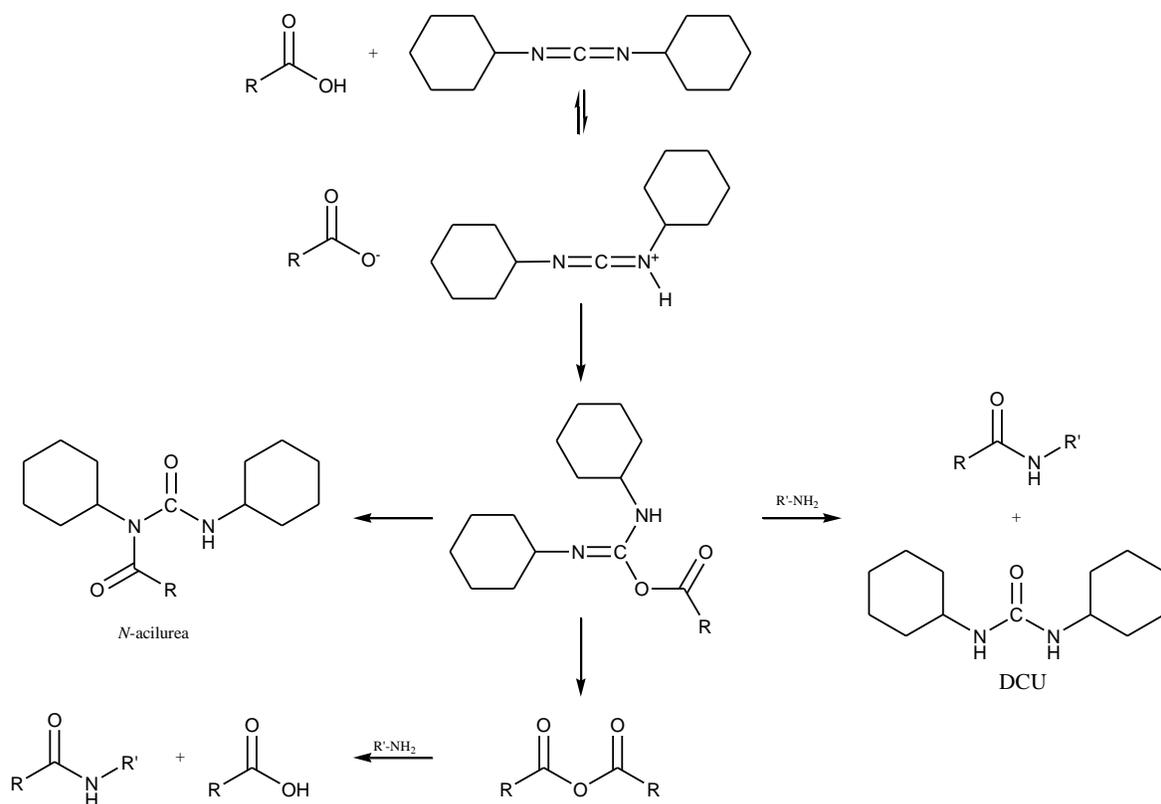


Figura 5. Estructura de carbodiimidas comunes.

La formación del enlace peptídico mediante el uso de carbodiimidas puede explicarse a través de dos rutas: la primera en la que el componente amino ataca nucleofílicamente el intermediario *O*-acilurea, y la segunda en donde la *O*-acilurea reacciona con el componente carboxilo para generar un anhídrido simétrico.

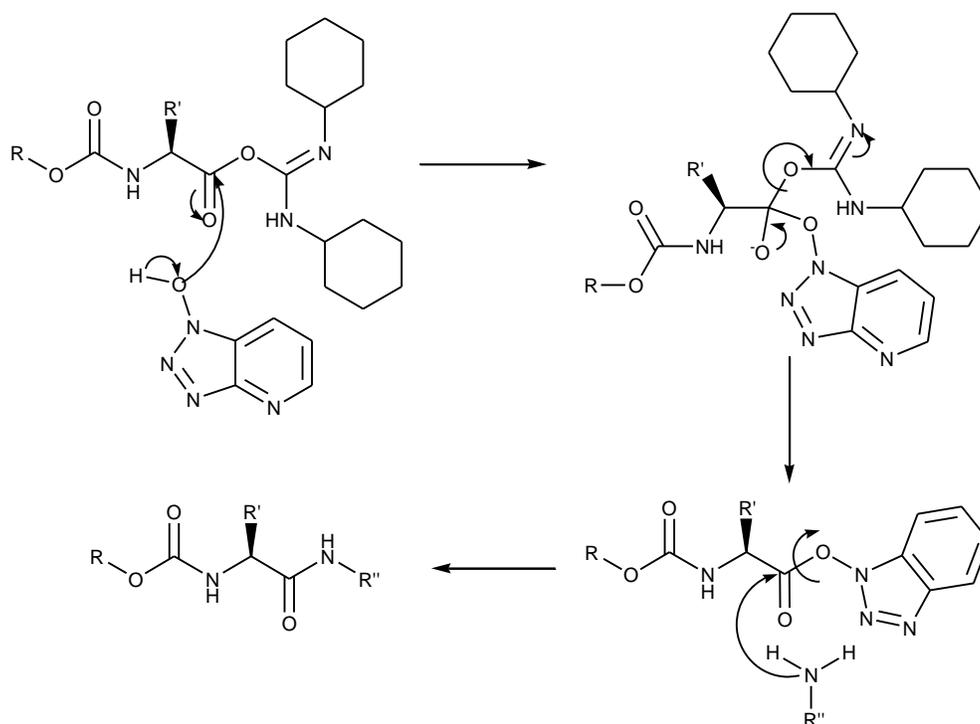


Esquema 10. Acoplamiento usando DCC.

Si el componente carboxílico es un aminoácido protegido es posible usar dos moles del aminoácido por cada mol de carbodiimida, por tanto, se favorecería la formación de anhídridos simétricos y disminuiría la concentración de *O*-acilurea libre, de este modo se reduce la probabilidad de que ocurra la transposición que genera la *N*-acilurea (Esquema 10).

Para reducir el nivel de epimerización cuando se utilizan carbodiimidas como agentes acoplantes en la formación del enlace peptídico, se introdujo el uso del 1-hidroxibenzotriazol¹⁶ (HOBt) como un aditivo, demostrando que cuando es utilizado los rendimientos de reacción son más altos y los niveles de epimerización disminuyen. Su aplicación como nucleófilos auxiliares produce un cambio importante, pues genera rutas alternas para llegar a la formación del enlace peptídico. Inicialmente el HOBt trabaja reaccionando con la *O*-acilurea para dar el

éster activo OBt (Esquema 11), el cual mejora la reactividad del éster activado favoreciendo el acercamiento de la amina *vía* enlace de hidrógeno.



Esquema 11. Mecanismo de activación de 1-hidroxibenzotriazol.

Muchas sales son frecuentemente asociadas con agentes basados en 1-hidroxibenzotriazol y probablemente representan la clase más amplia de agentes acoplantes; incluyendo sales de fosfonio¹⁸, uronio¹⁹ e imonio²⁰ (Figura 6).

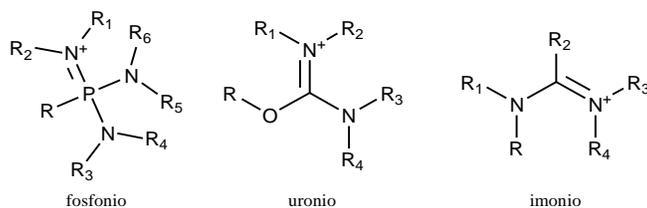


Figura 6. Sales asociadas con agentes basados en 1-hidroxibenzotriazol.

Los agentes basados en 1-hidroxibenzotriazol representan probablemente la clase más amplia de agentes acoplantes y aunque se han reportado diferencias en su reactividad, prácticamente la diferencia es muy pequeña son reactivos que

generalmente funcionan muy bien para la formación de los ésteres activados de hidroxibenzotriazol.

La formación del enlace peptídico en condiciones cada vez más accesibles, tanto desde el punto de vista químico como económico, es uno de los objetivos principales en la industria de la síntesis de péptidos. Teniendo esto en mente, se busca desarrollar una nueva metodología en fase líquida para la síntesis de péptidos.

En la síntesis en fase líquida, la formación del enlace peptídico se realiza de manera general mediante pasos sucesivos de acoplamiento-desprotección, así es como surge la propuesta de una metodología en fase líquida en la que se llegue a la formación de péptidos lineales evitando el paso de desprotección, y por consiguiente el aislamiento del producto.

Hipótesis

El carácter nucleofílico del nitrógeno de los aminoácidos permite formar el enlace peptídico en medio acuoso.

Objetivos

Objetivos generales

- Desarrollar un protocolo de síntesis que permita la formación del enlace peptídico en medios acuosos.
- Demostrar que dicha metodología puede ser útil en la síntesis de oligopéptidos.
- Contribuir al desarrollo de procesos altamente eficientes aplicados a la síntesis de péptidos.

Objetivos particulares

- Desarrollar una metodología para la formación del enlace peptídico en medios acuosos.
- Construir una secuencia peptídica de manera lineal sin aislar productos intermedios.
- Optimizar el uso de los agentes acoplantes en la activación del grupo carboxilo de cada acoplamiento.
- Demostrar que las condiciones de reacción para el acoplamiento de aminoácidos no generan epímeros o hidrólisis del enlace peptídico.

Análisis de resultados

Para probar la metodología, es necesario establecer una secuencia de síntesis lineal a desarrollar.

Síntesis de la secuencia BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-Ala-OBn

Halobacillus litoralis es una cepa bacteriana que fue aislada de un sedimento salino en Huanghai. Impulsados por la actividad antifúngica y antibacteriana que presenta el cultivo de la cepa en pruebas *in vitro*, la cepa fue fermentada y de los extractos correspondientes aislaron tres ciclopéptidos (Figura 7): Halolitoralina A, Halolitoralina B y Halolitoralina C²¹.

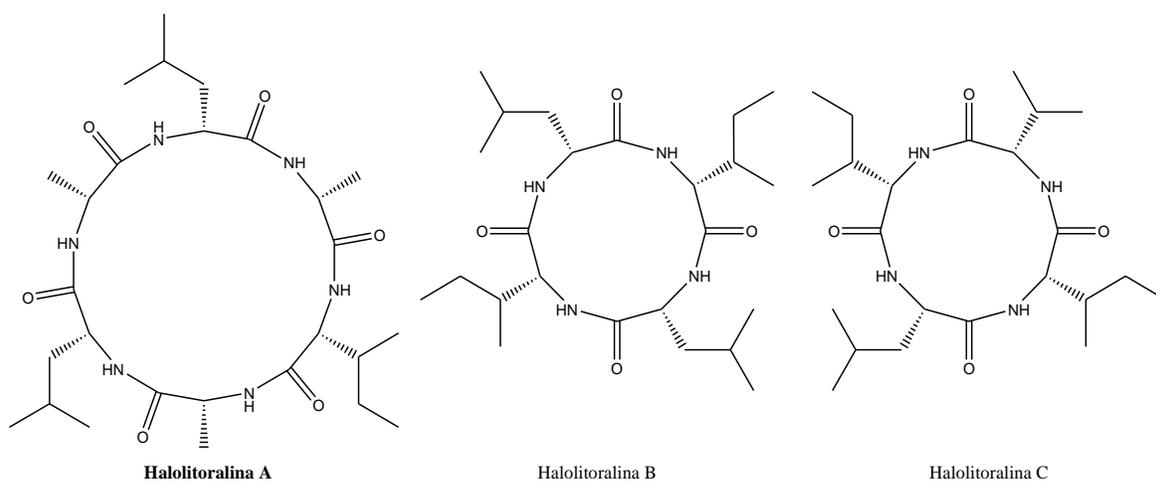


Figura 7. Ciclopéptidos de Halolitoralina.

La actividad antifúngica de Halolitoralina A, B y C fue probada *in vitro* contra dos hongos *Candida albicans* y *Tricophyton rubrum*, además de cuatro hongos que amenazan los cultivos: *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* y *Fusarium graminearum*. Los tres ciclopéptidos mostraron actividad antifúngica moderada, siendo Halolitoralina A la más activa de ellos en todos los casos. Adicionalmente los tres ciclopéptidos mostraron actividad antitumoral gástrica humana *in vitro*.

La síntesis total de Halolitoralina A ya se ha llevado a cabo mediante síntesis convergente²². En este trabajo, se propone una metodología alternativa para realizar la síntesis lineal en solución de la secuencia peptídica correspondiente (Figura 8).

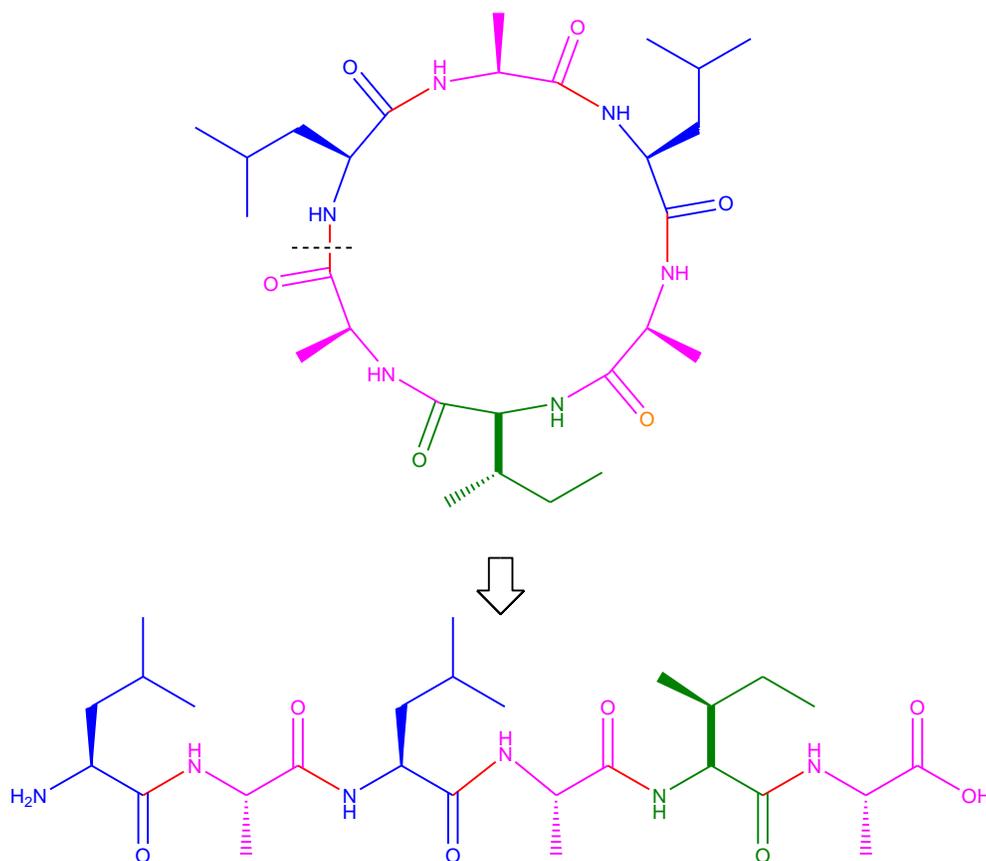


Figura 8. Secuencia de síntesis lineal

La eficiencia de la metodología está determinada por diferentes variables como los aminoácidos, la secuencia, la base, el tiempo de reacción y los disolventes empleados.

Condiciones de reacción

En la metodología propuesta se elige como estrategia de síntesis lineal la dirección N→C mediante acoplamiento sucesivos en los extremos carboxílicos,

para lograr el acoplamiento en un solo paso, es necesario omitir los pasos de protección y desprotección de los aminoácidos. Por lo tanto, es necesario utilizar los aminoácidos en la forma de ión zwitter, los aminoácidos contienen dos grupos funcionales con capacidad nucleofílica, sin embargo, el carácter del grupo amino es mayor. Si los aminoácidos contienen un grupo ácido y un grupo básico pueden reaccionar como tales dependiendo de las circunstancias; en una solución acuosa básica pierde un protón y da lugar al anión carboxilato y el grupo amino libre, permitiendo el acoplamiento en la dirección elegida. De acuerdo a la metodología se requiere iniciar la síntesis con un aminoácido *N*- protegido para realizar el primer acoplamiento. El grupo amino se protege como *ter*-butoxicarbonilamida (BOC) debido a su practicidad, tanto para formación como para eliminación del grupo protector.

Otro aspecto a considerar es la formación de los ésteres de hidroxibenzotriazol mediante el uso de DCC y HOBt, se proponen como intermediarios reactivos a los ésteres activados de hidroxibenzotriazol (Figura 4), los cuales son formados de manera aislada⁵. Es necesario obtenerlos de manera cuantitativa en un disolvente que garantice su formación, los disolventes más adecuados para formar los ésteres de hidroxibenzotriazol, en diferentes modelos, son los disolventes clorados como el CHCl₃ y CH₂Cl₂⁵.

Debido a las condiciones en las que se forma el enlace peptídico; los aminoácidos en medio acuoso y los ésteres activados de hidroxibenzotriazol en un medio orgánico, se elige un medio de reacción que considere ambas condiciones. El disolvente orgánico debe ser miscible con el agua por lo que se seleccionó el tetrahidrofurano (THF) el cual se usará para realizar el acoplamiento.

Base

La solución acuosa básica para la formación del carboxilato es un factor fundamental en la metodología, ya que los aminoácidos son susceptibles a formar epímeros en ambientes excesivamente básicos. Para determinar el tipo de base

se comparó el resultado y el rendimiento de las reacciones llevadas a cabo con dos diferentes bases: NaOH 1N y NaHCO₃ en cantidades equimolares al aminoácido (Tabla 1).

<i>Base</i>	<i>Dipéptido</i>	<i>Tripéptido</i>	<i>Tetrapéptido</i>	<i>Pentapéptido</i>
<i>NaOH 1N</i>	82%	76%	92%	79%
<i>NaHCO₃</i>	90%	57%	20%	71%

Tabla 1. Comparativo de bases.

A pesar de los resultados favorables obtenidos con NaOH, no deja de ser un riesgo la epimerización, por lo que si se considera que los aminoácidos se agregan en exceso, entonces se puede contemplar la posibilidad de no agregar una cantidad equimolar. Agregar un 15% menos de NaOH de la cantidad necesaria, lo cual no afecta el rendimiento de la reacción.

Tiempo de reacción

El tiempo de reacción establecido para la reacción de acoplamiento era de 18h y de acuerdo a las observaciones realizadas, se comprobó que el tiempo requerido es de 1h, en la primera hora de reacción se observa la desaparición de la materia prima (los ésteres de benzotriazol) por cromatografía en capa fina y transcurridas las 20 horas no se observa un aumento en el rendimiento de la reacción (Tabla 2).

<i>Tiempo</i>	<i>Dipéptido</i>	<i>Tripéptido</i>	<i>Tetrapéptido</i>	<i>Pentapéptido</i>
<i>20 h</i>	77%	90%	58%	55%
<i>1 h</i>	82%	76%	92%	79%

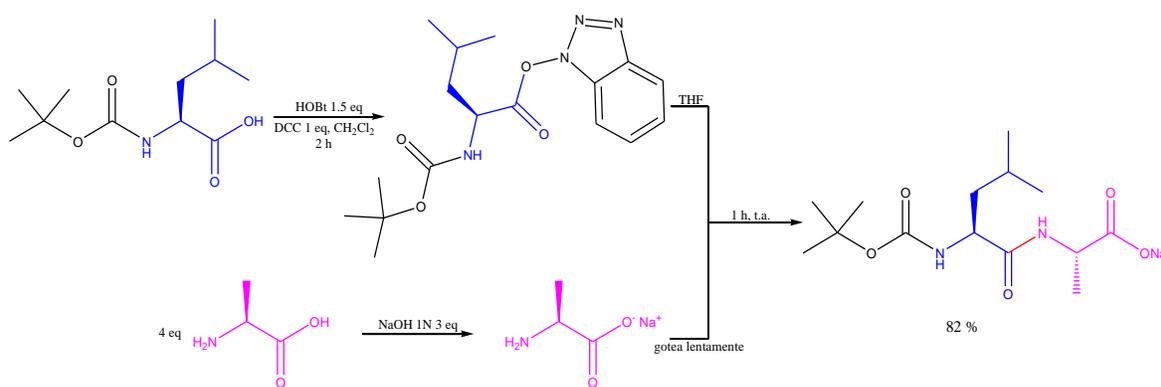
Tabla 2. Comparativo de rendimiento vs tiempo de reacción.

Así es como se determina que 1 h es suficiente para completar el acoplamiento de los aminoácidos y que el cambio en 20 h no es significativo y representa un gasto energético mayor, lo que se busca es obtener un mejor rendimiento en el menor tiempo posible.

Reacción de acoplamiento

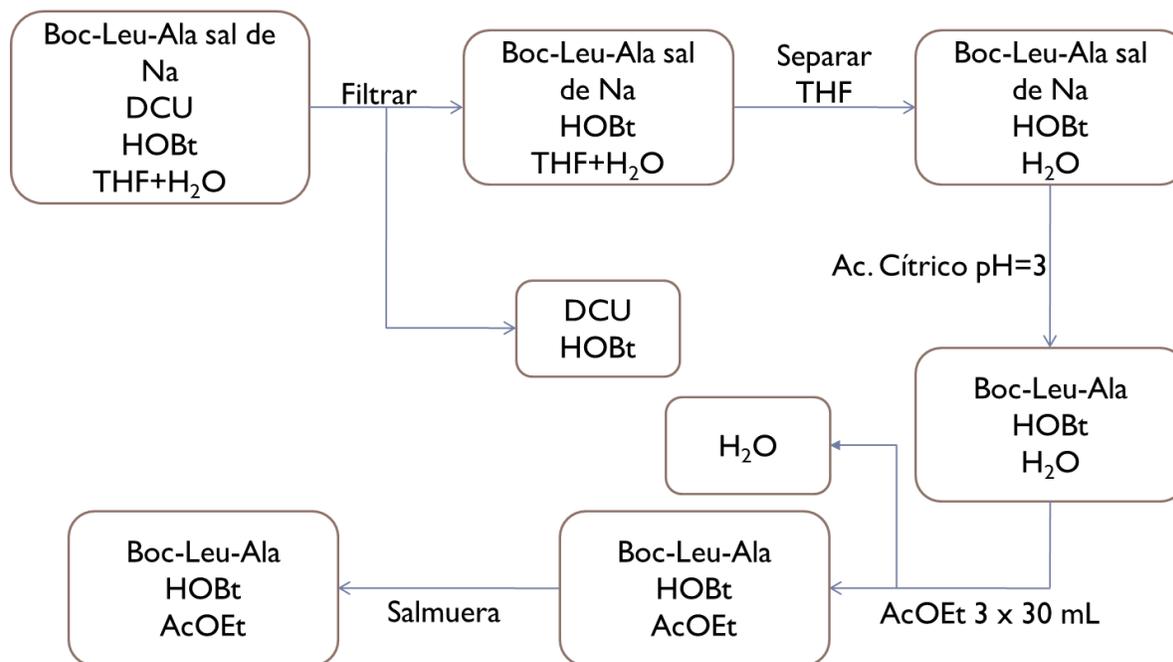
BOC-Leu-Ala

Para iniciar con el proceso de síntesis se realizó la activación de BOC-Leucina en diclorometano usando DCC y HOBT para formar los ésteres activados; en esta metodología los ésteres activados son formados de manera independiente, a diferencia de otros métodos que involucran la formación de los ésteres de hidroxibenzotriazol *in situ* en presencia del aminoácido para formar el enlace peptídico. El avance de la reacción de formación de los ésteres activados se realiza por cromatografía en capa fina, finalizada la formación de éstos, el diclorometano se evapora a sequedad y la mezcla de reacción se redissuelve en THF. Posteriormente se adiciona la disolución de la sal de sodio de alanina a la mezcla de los ésteres activados disueltos en THF (Esquema 12). En el transcurso de una hora de reacción se verifica la desaparición de los ésteres activados mediante cromatografía en capa fina.



Esquema 12. Formación del dipéptido.

Al término de la reacción se obtiene una mezcla del dipéptido en forma de sal de sodio, HOBt y DCU. La reacción se trabaja de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental y al final se obtiene una mezcla del dipéptido BOC-Leu-Ala y HOBt (Esquema 13).



Esquema 13. Diagrama de trabajo de reacción.

Para verificar la formación del producto deseado y la ausencia de epímeros se obtuvo el espectro de RMN- ¹H en CDCl₃ (Espectro 1). En el espectro de RMN- ¹H se pueden observar las señales correspondientes al HOBt y al dipéptido BOC-Leu-Ala. Las señales correspondientes al HOBt son las siguientes: La señal múltiple 7.9 ppm corresponden a los protones H-4 y H-7, la señal en 7.5 ppm, se asigna a los protones de las posiciones 5 y 6 del anillo de HOBt, a campo alto en 7.1 ppm se observa una señal doble ($J = 7$ Hz) que pertenece al protón del grupo *N*-H del enlace peptídico y a campo más alto un quinteto en 4.56 ppm que corresponde al hidrógeno de la posición α del carbonilo de la alanina. En 5.79 ppm una señal doble ancha y en 4.25 ppm una señal ancha, ambas señales se asignan al residuo de leucina, al protón del nitrógeno de carbamato y al hidrógeno α al

carbonilo, respectivamente. Para calcular el rendimiento y la proporción de ambos compuestos se usó la integral de las señales en 7.9 ppm de HOBT (2H) y 7.1 ppm para el dipéptido (1H). Ejemplo del cálculo:

	<i>Desplazamiento (ppm)</i>	<i>Integral</i>	<i>Protones</i>	<i>Relación I/P</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>(PM)/R</i>
<i>HOBT</i>	7.9	1.00	2	0.5	135	67.5
<i>Dipéptido</i>	4.56	0.48	1	0.48	302	144.96

$$0.48(302.29) + 0.5(135) = 212.46$$

$$144.96 \rightarrow 212.46$$

$$x \rightarrow 2.362$$

$$x = 1.612 \text{ g dipéptido (5.336 mmol)}$$

$$67.5 \rightarrow 212.46$$

$$x \rightarrow 2.362$$

$$x = 0.750 \text{ g HOBT (5.558 mmol)}$$

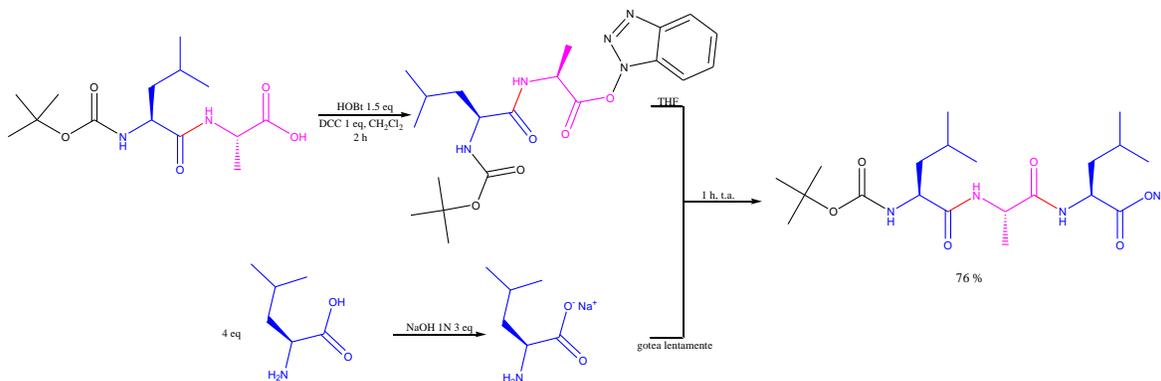
$$1.96 \text{ g} \rightarrow 100 \%$$

$$1.612 \text{ g} \rightarrow \mathbf{82.25 \% Rendimiento}$$

En el caso del dipéptido, se puede realizar la asignación del espectro, pero a medida que crece la secuencia peptídica, resulta poco práctico asignar cada señal, ya que los desplazamientos de los hidrógenos α carbonilo de cada aminoácido son muy cercanos, sin embargo, la RMN sigue utilizándose para verificar la formación de los productos.

BOC-Leu-Ala-Leu

El acoplamiento se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental. Al término de la reacción se obtiene una mezcla del tripéptido en forma de sal de sodio, HOBt y DCU. La reacción se trabaja de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental y al final obtenemos una mezcla del tripéptido BOC-Leu-Ala-Leu y HOBt (Esquema 14).

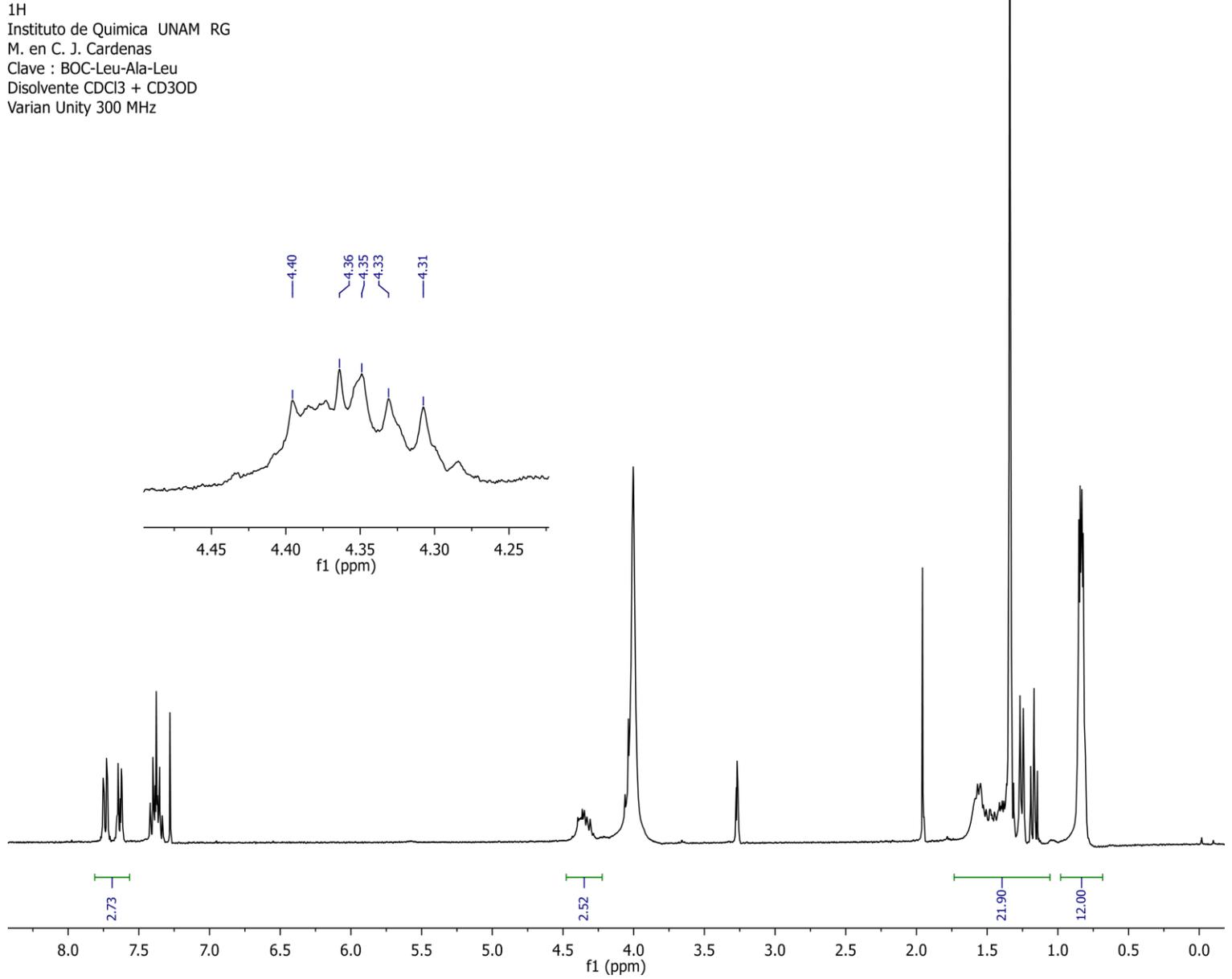


Esquema 14. Formación del tripéptido.

Para verificar la formación del producto deseado y la ausencia de epímeros se obtuvo el espectro de RMN- ^1H en $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (Espectro 2).

¹H
Instituto de Química UNAM RG
M. en C. J. Cardenas
Clave : Boc-Leu-Ala-Leu
Disolvente CDCl₃ + CD₃OD
Varian Unity 300 MHz

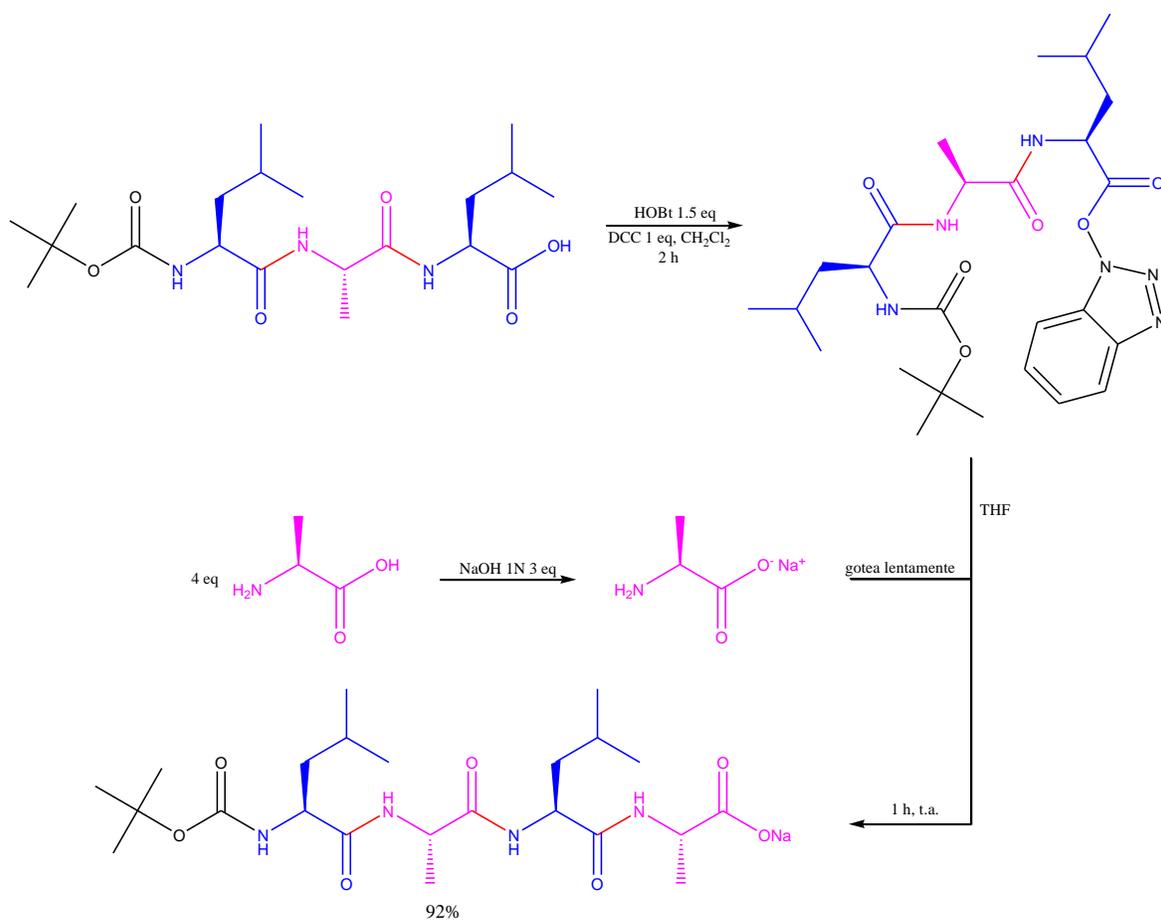
Espectro 2. Boc-Leu-Ala-Leu RMN- ¹H en CDCl₃/MeOD.



BOC-Leu-Ala-Leu-Ala

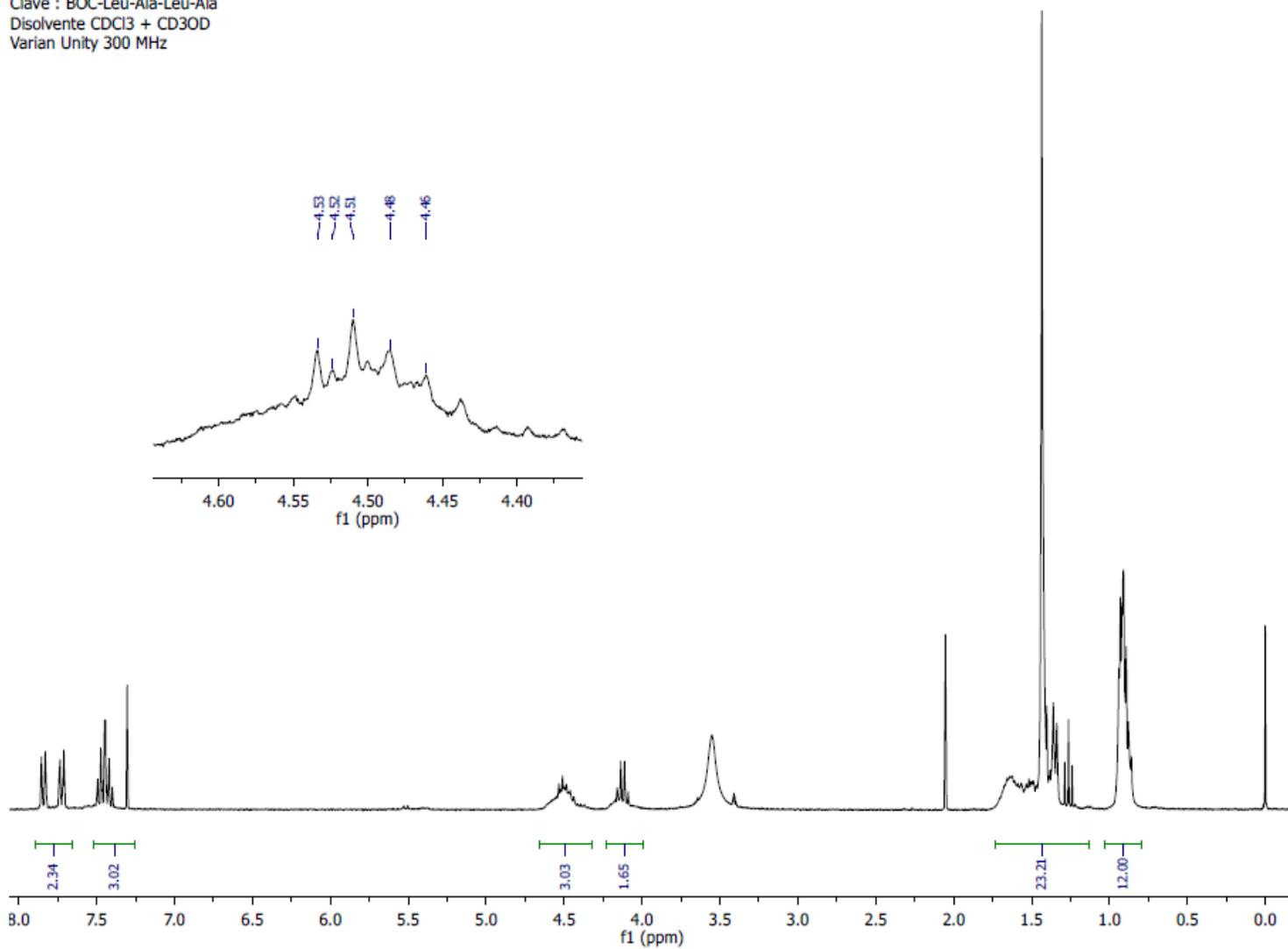
El acoplamiento se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental. Al término de la reacción se obtiene una mezcla del tetrapéptido en forma de sal de sodio, HOBT y DCU. La reacción se trabaja de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental y al final obtenemos una mezcla del tetrapéptido BOC-Leu-Ala-Leu-Ala y HOBT (Esquema 15).

Para verificar la formación del producto deseado y la ausencia de epímeros se obtuvo el espectro de RMN- ^1H en $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (Espectro 3).



Esquema 15. Formación del tetrapéptido.

¹H
Instituto de Química UNAM RG
M. en C. J. Cardenas
Clave : BOC-Leu-Ala-Leu-Ala
Disolvente CDCl₃ + CD₃OD
Varian Unity 300 MHz

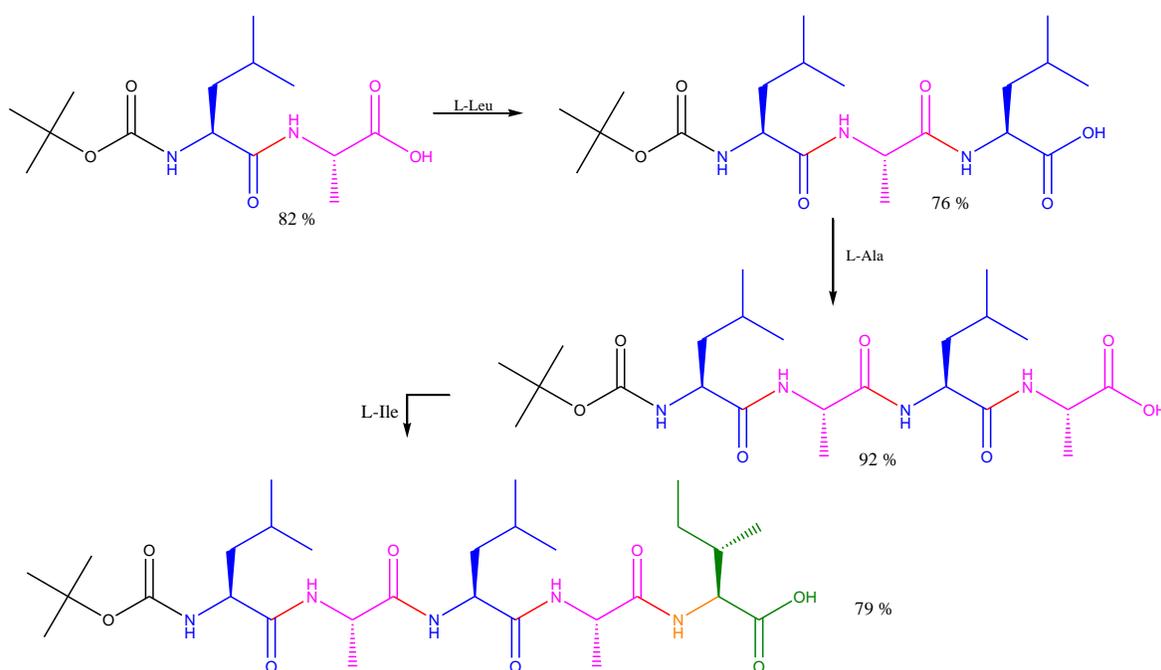


Espectro 3. Boc-Leu-Ala-Leu-Ala RMN- ¹H en CDCl₃/MeOD.

BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile

El acoplamiento se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental. Al término de la reacción se obtiene una mezcla del pentapéptido en forma de sal de sodio, HOBT y DCU. La reacción se trabaja de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental y al final se obtiene una mezcla del pentapéptido BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile y HOBT (Esquema 16).

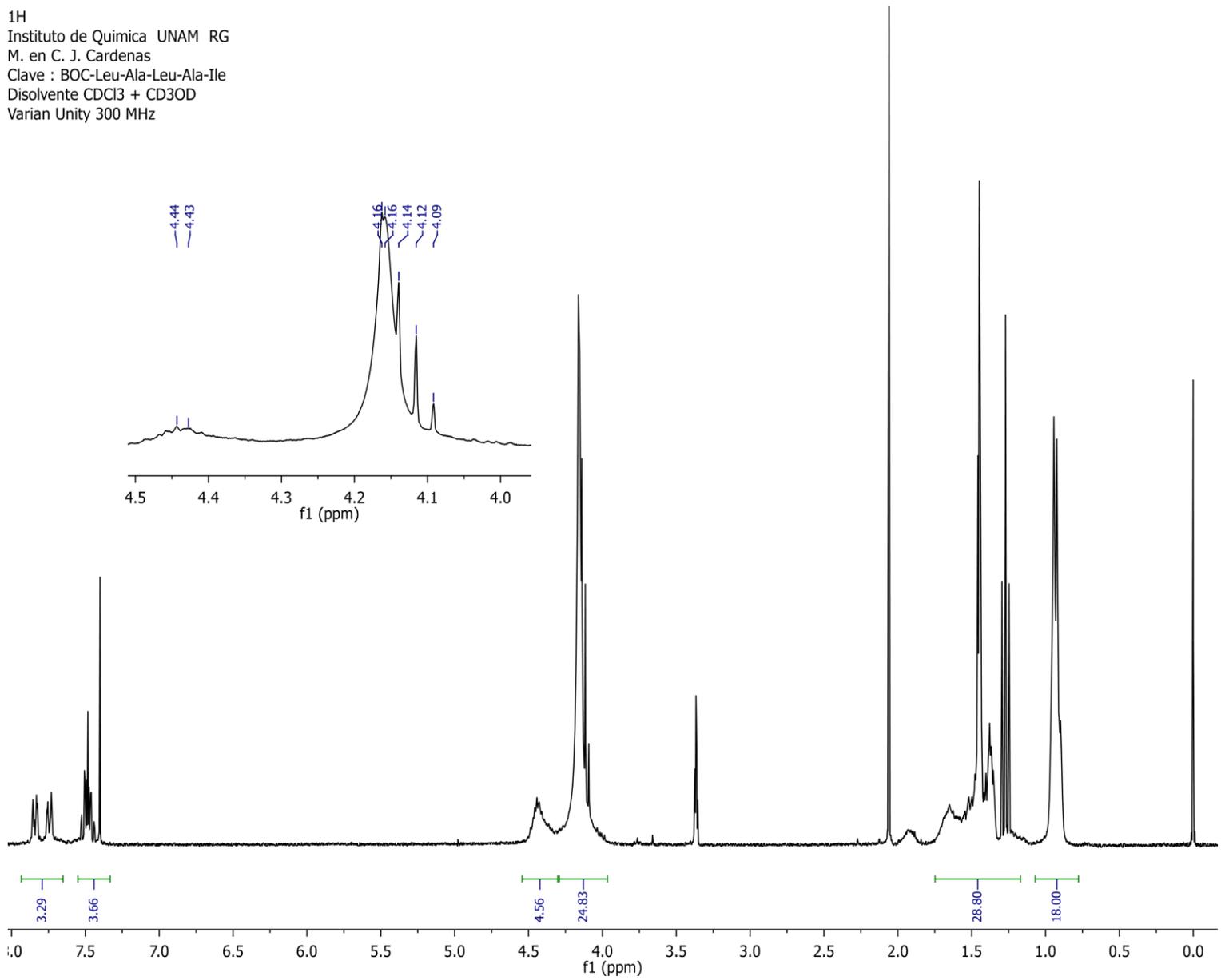
Para verificar la formación del producto deseado y la ausencia de epímeros se obtuvo el espectro de RMN- ^1H en $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (Espectro 4).



Esquema 16. Secuencia de acoplamiento peptídico.

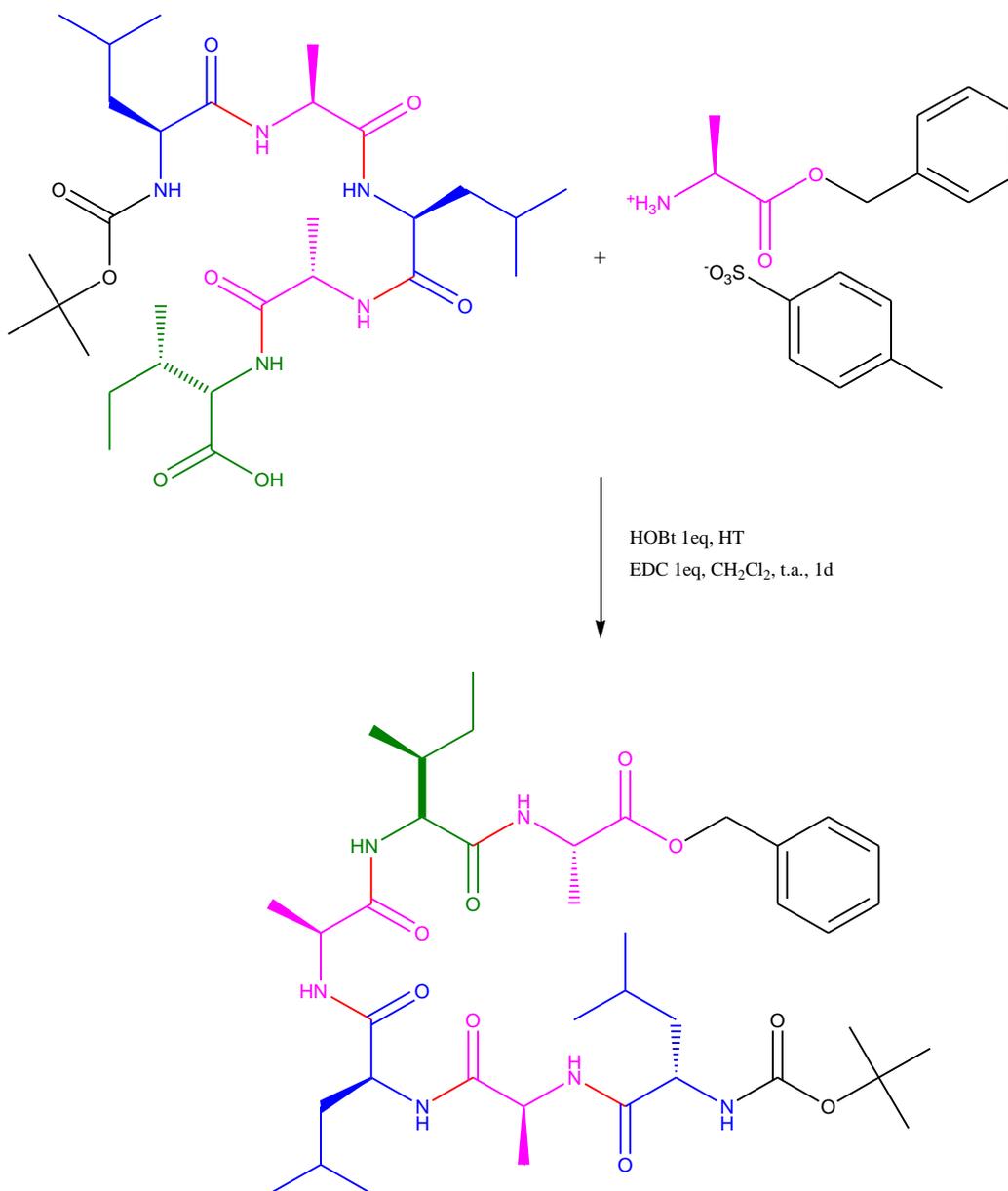
¹H
Instituto de Química UNAM RG
M. en C. J. Cardenas
Clave : Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile
Disolvente CDCl₃ + CD₃OD
Varian Unity 300 MHz

Espectro 4. Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile RMN-¹H en CDCl₃/MeOD.



BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-Ala-OBn

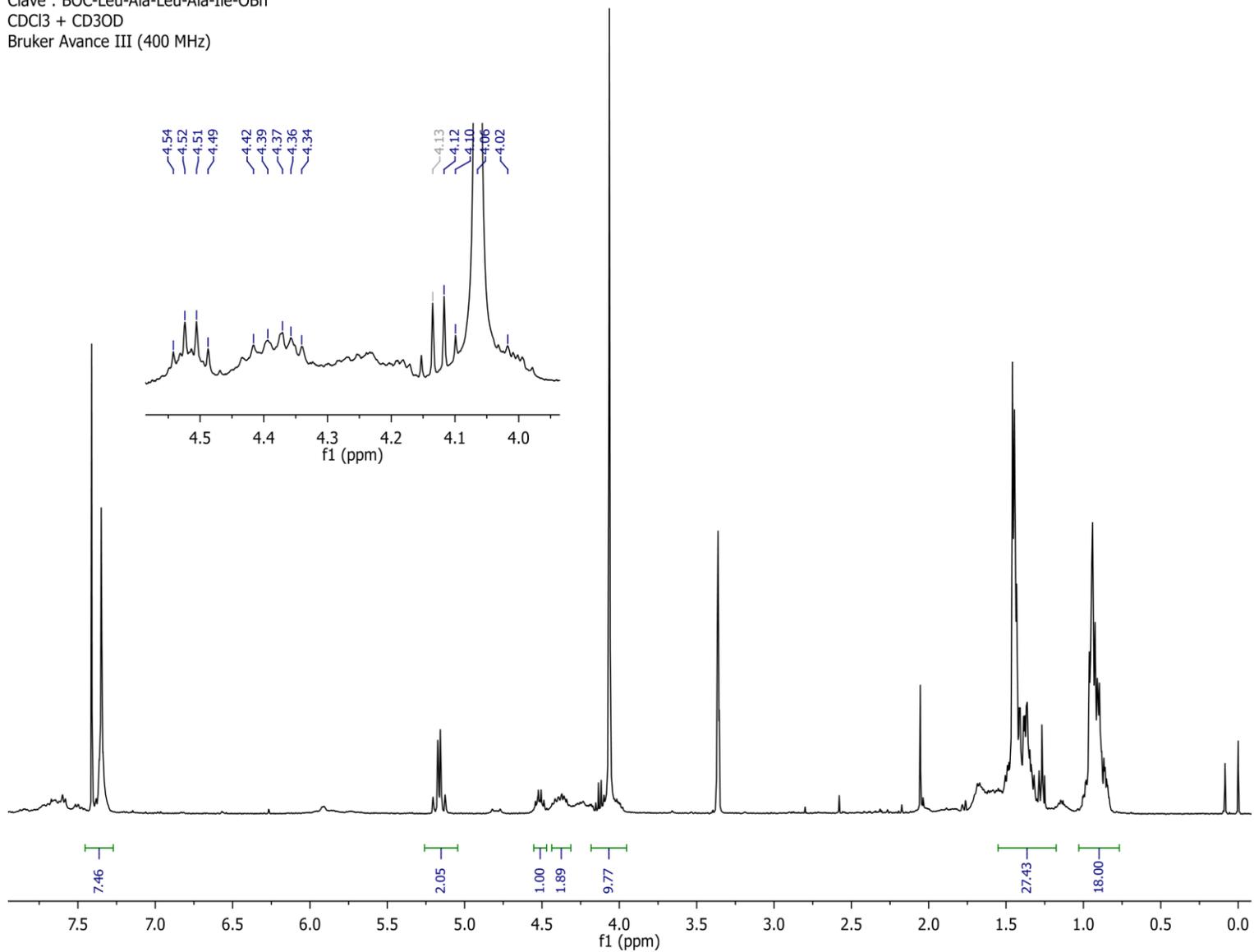
El acoplamiento se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental. Al término de la reacción se obtiene una mezcla del hexapéptido neutro, hidrotalcita y HOBt. La reacción se trabaja de acuerdo al procedimiento descrito, obteniéndose el hexapéptido neutro (Esquema 17).

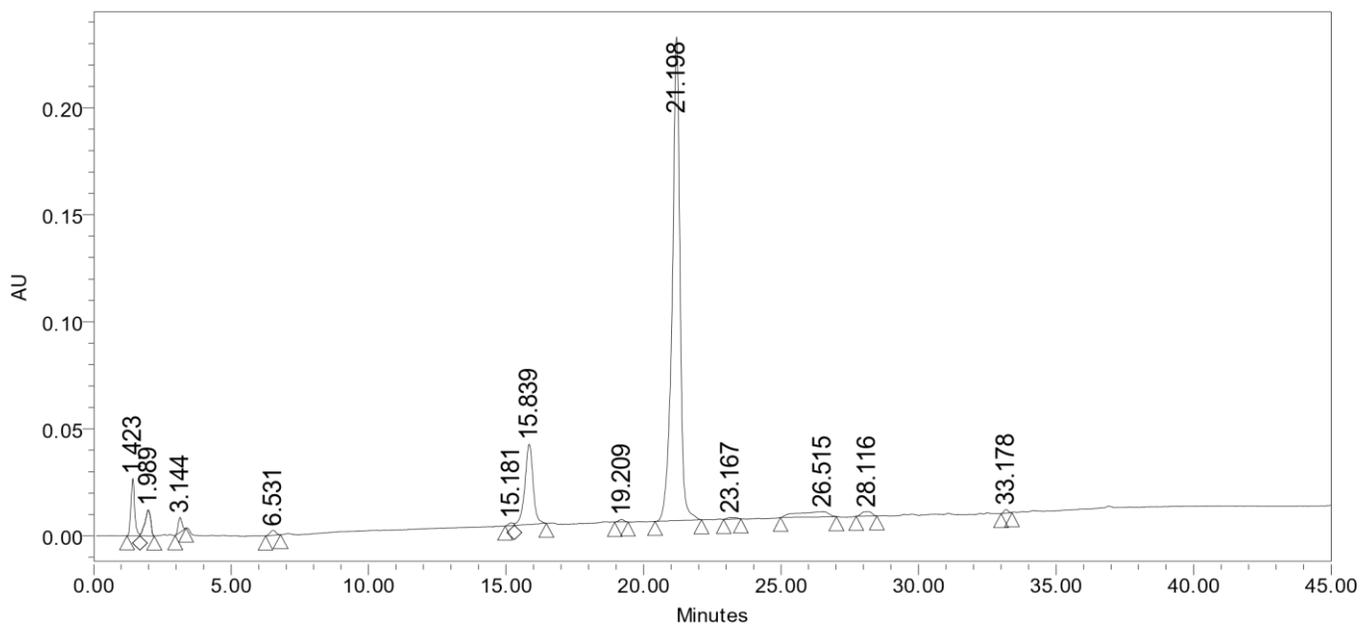


Esquema 17. Formación del hexapéptido.

Instituto de Química UNAM RG
M. en C. J. Cardenas
Clave : BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-OBn
CDCl₃ + CD₃OD
Bruker Avance III (400 MHz)

Espectro 5. Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-OBn RMN-¹H en CDCl₃/MeOD.





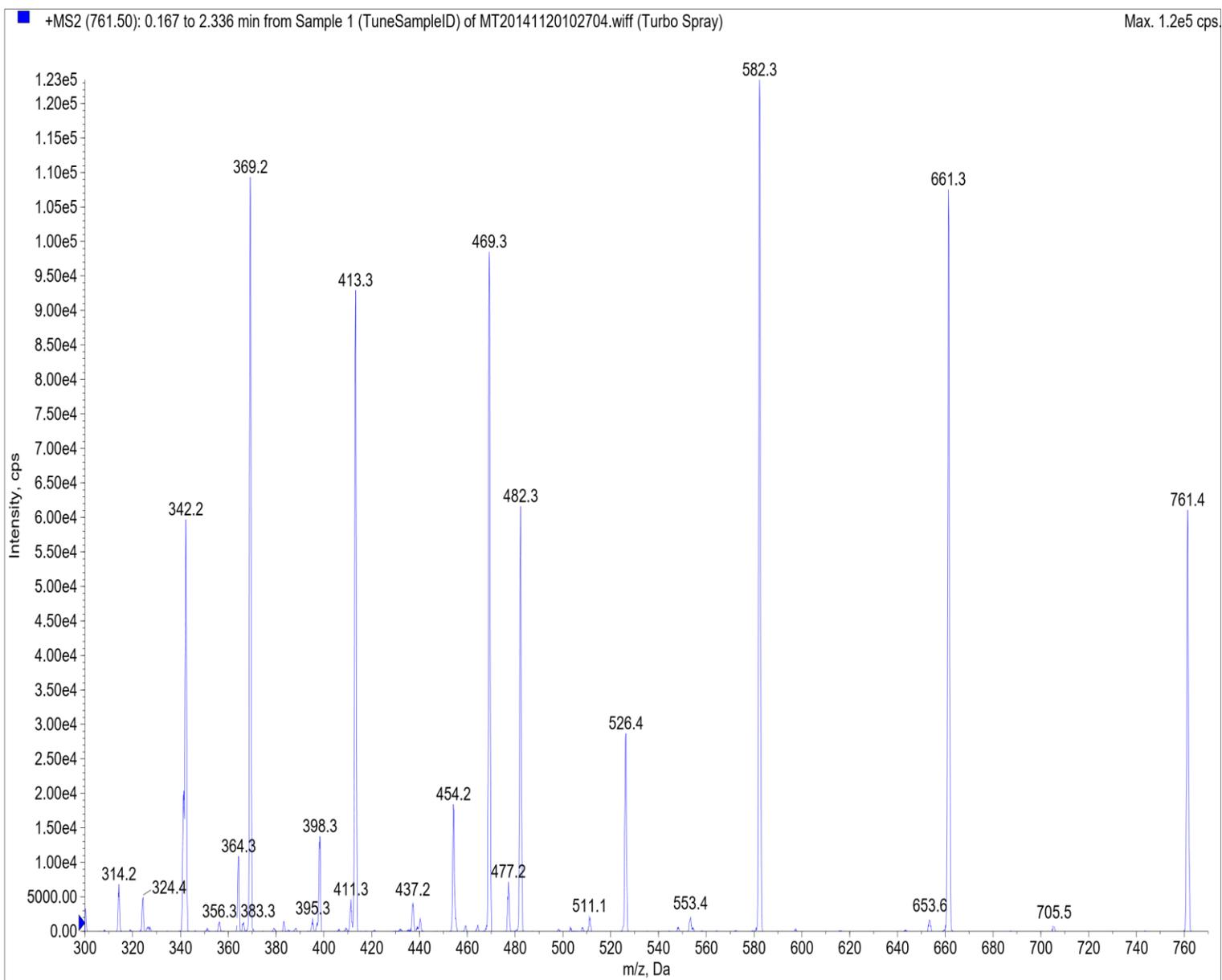
Cromatograma 1. Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-Ala-OBn.

SampleName 2-29; Vial 1; Injection 4; Channel W2996 ; Date Acquired 11/11/2014 04:56:52 p.m.

Peak Results

	Name	RT	Area	% Area	Int Type	Processed Channel Descr.
1		1.423	251506	4.13	BV	PDA 220.0 nm
2		1.989	179033	2.94	VB	PDA 220.0 nm
3		3.144	65335	1.07	BB	PDA 220.0 nm
4		6.531	35427	0.58	BB	PDA 220.0 nm
5		15.181	16972	0.28	BV	PDA 220.0 nm
6		15.839	776054	12.74	VB	PDA 220.0 nm
7		19.209	16953	0.28	BB	PDA 220.0 nm
8	✓	21.198	4465524	73.30	BB	PDA 220.0 nm
9		23.167	16935	0.28	BB	PDA 220.0 nm
10		26.515	195755	3.21	BB	PDA 220.0 nm
11		28.116	54464	0.89	BB	PDA 220.0 nm
12		33.178	18442	0.30	BB	PDA 220.0 nm

Espectro 6. Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-Ala-OBn ESI-MS-MS.



Durante la cromatografía se recolectaron fracciones de forma continua, las fracciones de interés corresponden al tiempo de retención 21.198 (Cromatograma 1). Estas fracciones se analizaron para obtener el espectro de masas-masas (Espectro 6).

Es importante destacar que se trata de una metodología en la cual se omiten las purificaciones intermedias, descartando el uso de columnas cromatográficas y se evita la reacción de desprotección del ácido carboxílico, se pretende que sea un método rápido de síntesis de péptidos. Por otra parte, el seguimiento de la síntesis se realiza únicamente a través de RMN-¹H, esto forma parte de la búsqueda de una metodología rápida y altamente eficiente en la cual no se requiera realizar experimentos adicionales o seguimiento mediante HPLC, ya que implicaría tiempo y un costo adicional entre cada acoplamiento.

Procedimiento experimental

Los reactivos empleados son de marca Aldrich y los disolventes empleados en las reacciones y en la purificación de los productos se destilaron y secaron de acuerdo a lo descrito en la literatura.

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios Macherey-Nagel, usando como revelador una lámpara de UV y una solución de ninhidrina en ácido acético.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H se obtuvieron en espectrómetros Bruker-Avance de 300 MHz.

Síntesis de BOC-Leu

L-leucina (2.5 g, 19 mmol), se suspende en agua (19 mL), dioxano (15 mL) y lentamente se adiciona NaOH 1N (19 mL); esta mezcla se mantiene en agitación con un baño de hielo-agua. En otro matraz se pesa pirocarbonato de ditertbutilo (4.58 g, 20.9 mmol) y se disuelve en dioxano (15 mL). Esta última disolución se adiciona lentamente en frío a la disolución de L-leucina, la mezcla de reacción se agita por una hora a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de reacción se evapora el disolvente (mezcla dioxano-agua) a presión reducida hasta dejar un residuo de entre 15-20 mL, el residuo se acidula con ácido cítrico hasta pH=3 y la mezcla se transfiere a un embudo de separación; el producto es extraído con AcOEt (3 x 25 mL); la fase orgánica se lava con salmuera hasta pH neutro, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y el disolvente es destilado a presión reducida.

Se obtiene un líquido incoloro (3.8 g, 86 % de rendimiento).

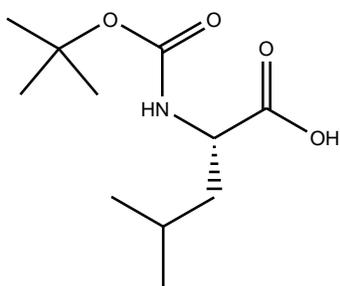


Figura 9. BOC-Leu

Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala

En un matraz se pesa BOC-Leu (1.5 g, 6.48 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0.99 g, 6.48 mmol) junto con dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (1.33 g, 6.48 mmol) y se adicionan 80 mL de CH₂Cl₂, la mezcla se agita por una hora a temperatura ambiente, después se evapora el CH₂Cl₂ a presión reducida para finalmente adicionar 50 mL de THF. **(A)**

En un matraz aparte se pesa L-alanina (2.3 g, 25.94 mmol) y se agregan 28 mL de H₂O, lentamente y en agitación se agregó NaOH 1N (24 mL, < 25.94 mmol). **(B)**

El matraz **(A)** que contiene los ésteres activados de hidroxibenzotriazol de BOC-Leu (BOC-Leu-OBt) se mantiene en agitación a temperatura ambiente, mientras gota a gota se adiciona la sal de sodio de alanina contenida en el matraz **(B)** previamente preparado. Terminada la adición se mantiene en agitación por una hora.

Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se filtra al vacío sobre celita para separar la dicitclohexilurea (DCU) generada durante la reacción y HOBt. El filtrado se coloca en un embudo de separación para extraer el THF añadiendo AcOEt (2 x 20 mL). La fase acuosa se acidula con ácido cítrico sólido en agitación hasta pH=3 y el producto se extrae con AcOEt (3 x 30 mL), los extractos orgánicos se reúnen y son lavados con salmuera hasta pH neutro, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida.

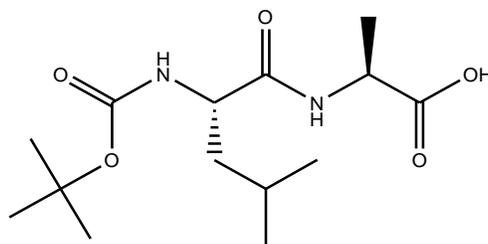


Figura 10. BOC-Leu-Ala

Se obtiene un sólido blanco (1.6 g, 82 % de rendimiento).

Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala-Leu

Se coloca en un matraz el producto anterior que contiene 1.6 g de BOC-Leu-Ala (5.34 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (30 mg, 0.2 mmol) que representa el 3.6 % de HOBt necesario para realizar el acoplamiento debido a que dentro de la mezcla de producto se conservan 750 mg, de acuerdo al rendimiento calculado por RMN, y dicitohexilcarbodiimida (DCC) (1.0 g, 5.07 mmol). Se adicionan 80 mL de CH₂Cl₂, la mezcla se agita por una hora a temperatura ambiente, después se evapora el CH₂Cl₂ a presión reducida y finalmente se adicionan 45 mL de THF. **(A)**

En un matraz aparte se pesó L-leucina (2.6 g, 20.2 mmol) y se le agregó 22 mL de H₂O, lentamente y en agitación se agrega NaOH 1N (18 mL, < 20.2 mmol). **(B)**

El matraz **(A)** que contiene el BOC-Leu-Ala-OBt se mantiene en agitación a temperatura ambiente, mientras gota a gota se adiciona la sal de sodio de leucina contenida en el matraz **(B)** previamente preparado. Terminada la adición se mantiene en agitación por una hora.

Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla de reacción se filtra al vacío para separar la dicitohexilurea (DCU) generada durante la reacción y HOBt. El filtrado se coloca en un embudo de separación para extraer el THF añadiendo AcOEt (2 x 20 mL). La fase acuosa se acidula en agitación con ácido cítrico hasta pH=3 y el producto se extrae con AcOEt (3 x 30 mL), los extractos orgánicos se reúnen y

son lavados con salmuera hasta pH neutro, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida.

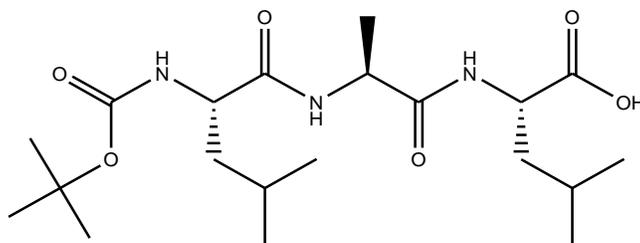


Figura 11. BOC-Leu-Ala-Leu

Se obtiene un sólido blanco (1.7 g, 76 % de rendimiento).

Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala-Leu-Ala

Se coloca en un matraz el producto anterior que contiene 1.7 g de BOC-Leu-Ala-Leu (4.04 mmol), el hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (120 mg, 0.78 mmol) que representa el 20% de HOBt necesario para realizar el acoplamiento debido a que dentro de nuestra mezcla de producto se conservan 620 mg de acuerdo al rendimiento calculado por RMN, dicitohexilcarbodiimida (DCC) (834 mg, 4.04 mmol). Se adicionan 80 mL de CH₂Cl₂, la mezcla se agita por una hora a temperatura ambiente, después se evapora el CH₂Cl₂ a presión reducida y finalmente se adicionan 35 mL de THF. **(A)**

En un matraz aparte se pesa L-alanina en su forma de ión zwitter (1.4 g, 16.19 mmol) y se le agrega 18 mL de H₂O, lentamente y en agitación se agregó NaOH 1N (14 mL, < 16.19 mmol). **(B)**

El matraz **(A)** que contiene el BOC-Leu-Ala-Leu-OBt se mantiene en agitación a temperatura ambiente, mientras gota a gota se adiciona la sal de sodio de alanina contenida en el matraz **(B)** previamente preparado. Terminada la adición se mantiene en agitación por una hora.

Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se filtra al vacío para separar la Diciclohexilurea (DCU) generada durante la reacción y HOBt. El filtrado se coloca en un embudo de separación para extraer el THF añadiendo AcOEt (2 x 20 mL). En agitación la fase acuosa se acidula con ácido cítrico hasta pH=3 y el producto se extrae con AcOEt (3 x 30 mL), los extractos orgánicos se reúnen y son lavados con salmuera hasta pH neutro, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida.

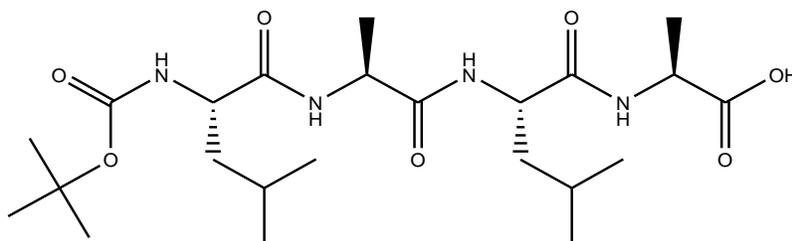


Figura 12. BOC- Leu-Ala-Leu-Ala

Se obtiene un sólido blanco (1.8 g, 92 % de rendimiento).

Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile

Se coloca en un matraz el producto anterior que contiene 1.8 g de BOC-Leu-Ala-Leu-Ala (3.83 mmol), el hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (118 mg, 0.77 mmol) que representa el 20% de HOBt necesario para realizar el acoplamiento debido a que dentro de nuestra mezcla de producto conservamos 572 mg de acuerdo al rendimiento calculado por RMN, diciclohexilcarbodiimida (DCC) (789 mg, 3.83 mmol). Se adicionan 80 mL de CH₂Cl₂, la mezcla se agita por una hora a temperatura ambiente, después se evapora el CH₂Cl₂ a presión reducida y finalmente se adicionan 30 mL de THF. **(A)**

En un matraz aparte se pesa L-isoleucina en su forma de ión zwitter (2.0 g, 15.32 mmol) y se le agregó 17 mL de H₂O, lentamente y en agitación se agrega NaOH 1N (13 mL, < 15.32 mmol). **(B)**

El matraz (A) que contiene el BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-OBt se mantiene en agitación a temperatura ambiente, mientras gota a gota se adiciona la sal de sodio de isoleucina contenida en el matraz (B) previamente preparado. Terminada la adición se mantiene en agitación por una hora.

Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla es filtrada al vacío para separar la Diciclohexilurea (DCU) generada durante la reacción y HOBt. El filtrado se coloca en un embudo de separación para extraer el THF añadiendo AcOEt (2 x 20 mL). La fase acuosa se acidula en agitación con ácido cítrico hasta pH=3 y el producto se extrae con AcOEt (3 x 30 mL), los extractos orgánicos se reúnen y son lavados con salmuera hasta pH neutro, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida.

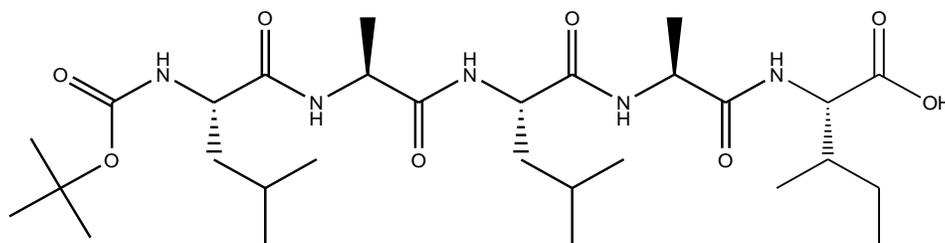


Figura 13. BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile

Se obtiene un sólido blanco (1.8 g, 79 % de rendimiento).

Síntesis de tosilato éster bencílico de L-alanina

Se pesa L-alanina (10 g, 112.36 mmol), ácido p-toluensulfónico hidratado (21.8 g, 114.61 mmol), se adiciona alcohol bencílico (29 mL, 281 mmol) y Tolueno (70 mL). La mezcla se calienta a reflujo, el agua formada durante la reacción se colecta con una trampa Dean-Stark. La reacción finaliza cuando se ha colectado el total de agua formada durante la reacción (4 mL), se deja enfriar a temperatura ambiente.

Finalizada la reacción el disolvente se destila a presión reducida para eliminar el tolueno, posteriormente se enfría en un refrigerador a -18°C y se filtra para separar

el producto cristalizado del alcohol bencílico. El producto se recrystaliza en AcOEt/Hex (Espectro7).

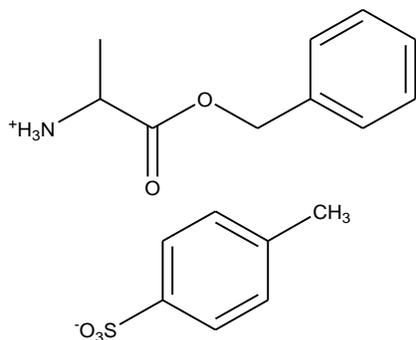
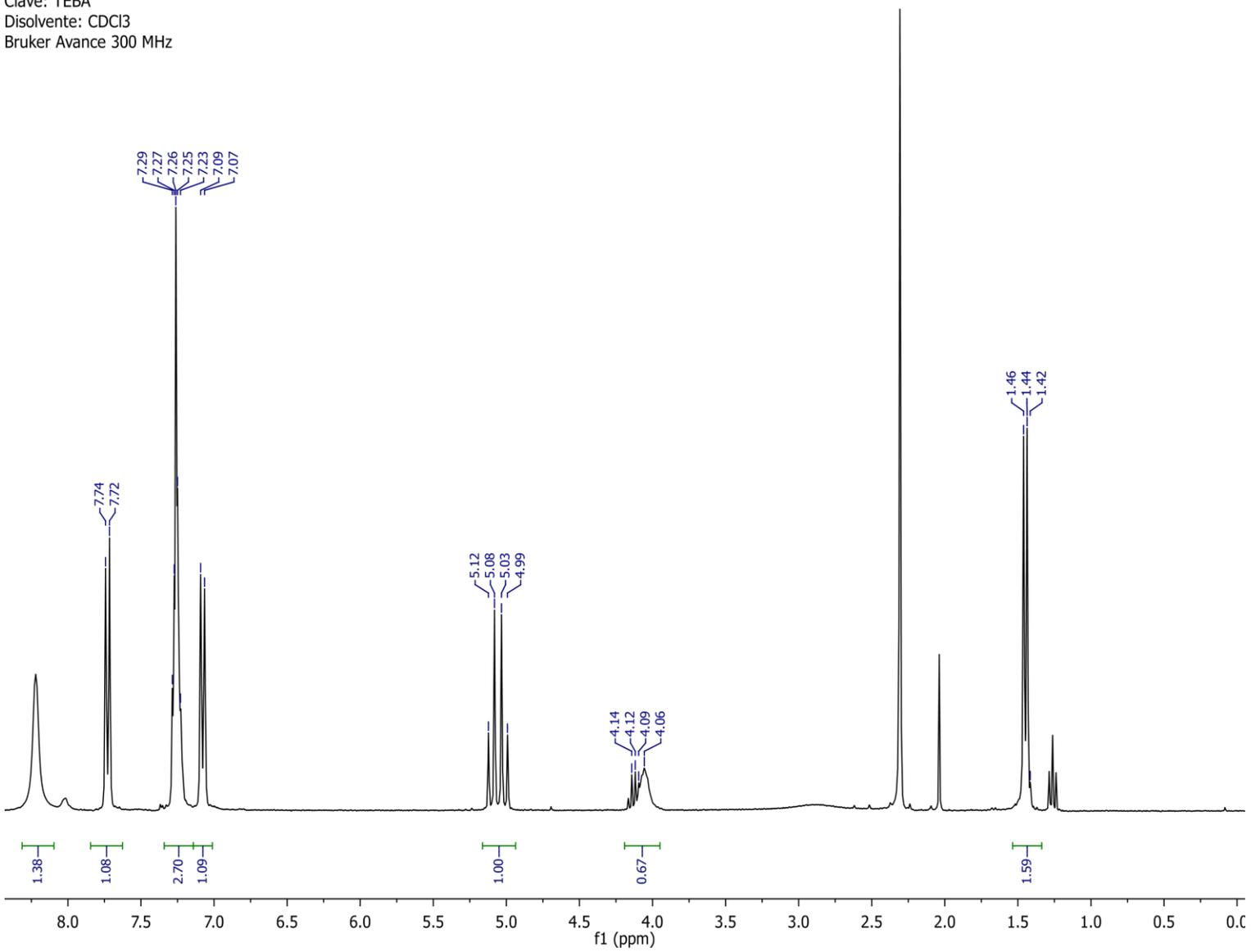


Figura 14. Tosilato éster bencílico de alanina

Se obtiene un sólido blanco (20.3 g, 51 % de rendimiento). p.f.: 113-114 °C.

Instituto de Quimica UNAM RG
M. en C. J. Cardenas
Clave: TEBA
Disolvente: CDCl3
Bruker Avance 300 MHz

Espectro 7. Tosilato éster bencilico de alanina ¹H en CDCl₃.



Método para el acoplamiento de BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-Ala-OBn.

Se colocan BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile (400 mg, 0.67 mmol), tosilato del éster bencílico de alanina (259 mg, 0.74 mmol), hidrotalcita (400 mg), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (11 mg, 0.072 mmol) que representa el 10% de HOBt necesario para realizar el acoplamiento debido a que dentro de nuestra mezcla de producto se conservan 47 mg de acuerdo al rendimiento calculado por RMN, los cuales se disuelven en 80 mL de CH₂Cl₂ y se agrega *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (140 mg, 0.74 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente por veinte horas.

Transcurrido el tiempo de reacción se detiene la agitación y la mezcla de reacción se filtra utilizando una columna empacada con celita para retener la hidrotalcita. El filtrado se lava con K₂CO₃ 7% (3 x 30 mL), ácido cítrico 10% hasta pH=3 finalmente con salmuera hasta pH neutro. Se seca sobre CaCl₂, se filtra y evapora el disolvente a presión reducida.

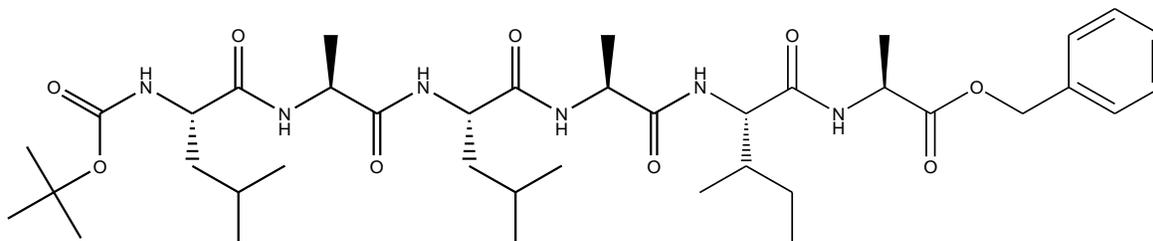


Figura 15. BOC-Leu-Ala-Leu-Ala-Ile-Ala-OBn

Se obtiene un sólido blanco (361 mg, 70 % de rendimiento).

Se analizó el crudo de reacción por HPLC y con las fracciones de interés que corresponden al tiempo de retención 21.198 (Cromatograma 1), se obtuvo el espectro de masas-masas.

Conclusiones

Este trabajo se desarrolló con una secuencia lineal definida, lo cual disminuye las variables en la metodología y ayuda a determinar las mejores condiciones de reacción. La síntesis total que requería la desprotección de los grupos funcionales no fue de especial interés ya que en el grupo se han desarrollado con anterioridad métodos de formación de ciclopeptidos.

La aplicación de la metodología será delimitada por la secuencia peptídica elegida, el rendimiento del acoplamiento puede verse modificado de acuerdo al entorno químico en el que se encuentra, pero nos aporta una referencia para realizar futuras síntesis. Durante el desarrollo de la metodología resulta conveniente contar con procesos eficientes y económicos, que reduzcan el tiempo entre cada acoplamiento, y experimentos sencillos que no comprometan la calidad de los péptidos.

Al optimizar la metodología, se logra formar el enlace peptídico y se evita el paso de desprotección del ácido carboxílico, lo que reduce el número de pasos y tiempo en la síntesis de un oligopeptido, así como el consumo de reactivos. Por lo que se puede considerar una síntesis sucesiva más ecológica.

Referencias

1. a) R. Süssmuth, J. Müller, H. Von Döhren; I. Molnár, *Nat. Prod. Rep.*, 2011, **28**, 99. b) G. S. Bagavananthem, R. Lemmens-Gruber, *Mar. Drugs*, 2010, **8**, 810. c) K. Sivonen, N. Leikoski, D. P. Fewer, J. Jokela, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **86**, 1213.
2. a) Ch. W. Gruber, *Biopolimers Peptide Science*, 2010, **94**, 565. b) S. Namjoshi, H. A. E. Benson, *Biopolimers Peptide Science*, 2010, **94**, 673. c) W. E. Housen, M. Jaspars, *Chem. Bio. Chem.*, 2010, **11**, 1803.
3. a) H. Sancheti, J. A. Camarero, *Adv. Drug Deliver Rev.*, 2009, **61**, 908. b) A. A. Waheed, E. O. Freed, *ACS Chem. Biol.*, 2008, **3**, 745.
4. a) A. Patgiri, M. Z. Menzenski, A.B. Mahon, P. S. Arora, *Nat. Protoc*, 2010, **5**, 1857. b) J. Ilesinghe, C. X. Guo, R. Garland, A. Ahmed, B. Van Lierop, J. Elaridi, W. R. Jackson, A. J. Robinson, *Chem. Commun.*, 2009, 295. c) A. Pintér, G. Haberhauer, *Synlett*, 2009, **19**, 3082.
5. a) J. A. Morales-Serna, E. García-Ríos, J. Bernal, E. Paleo, R. Gaviño, J. Cárdenas, *Synthesis*, 2011, 1375. b) J. A. Morales-Serna, E. García-Ríos, E. Paleo, R. Gaviño, J. Cárdenas, A. Vera, G. García, *Synthesis*, 2010, 4261. c) J. A. Morales-Serna, E. García-Ríos, J. Bernal, R. Gaviño, J. Cárdenas; R. Velázquez, G. Negron-Silva, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 4940. d) J. A. Morales-Serna, R. Gaviño, J. Cárdenas, G. Negron-Silva, E. Sánchez, L. Lomas, N. Guerra, *ARKIVOC*, 2005, **6**, 428.
6. M. Bodanszky, *Peptide Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin 1993.
7. a) D. Enders, J. P. Shilvock, *Chem. Soc. Rev.*, 2000, **29**, 359. b) A. A. Sathe, D. R. Hartline, A. T. Radosevich, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 5040. c) A. Strecker, *Liebigs Ann. Chem.*, 1850, **75**, 27.
8. H. Kunz, W. Sager, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1987, **26**, 557.

9. M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, *Springer-Laboratory*, Berlin 1993.
10. J. Jones, The chemical synthesis of peptides, *Clarendon Press-Oxford*, 1994.
11. E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1903, **36**, 2094.
12. S. Han, Y. Kim, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 2447.
13. a) M. Gordon, J.G. Miller, A. R. Day, *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 1946. b) M. Gordon, J.G. Miller, A.R. Day, *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 1245.
14. G. L. Pernía, J. D. Kilburn, J. W. Essex, R. J. Mortishire-Smith, M. Rowley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 10220.
15. J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 1067.
16. J. C. Sheehan, J. J. Hlavka, *J. Org. Chem.*, 1956, **21**, 439.
17. W. Köning, R. Geiger, *Chem. Ber.*, 1970, **103**, 788.
18. a) B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, G. Selve, *Tetrahedron Lett.*, 1975, 1219. b) J. Coste, D. Le Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 205. c) T. Høeg-Jensen, M. H. Jakobsen, A. Holm, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 6387.
19. a) V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.*, 1978, 1269. b) R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillesen, *Tetrahedron Lett.*, 1989, **30**, 1927. c) L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hannay, C. Mügge, H. Wenschunch, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 441.
20. P. Li, J. C. Xu, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 721.
21. L. Yang, R. Tan, Q. Wang, W. Huang, Y. Yinc, *Tetrahedron Letters*, 2002, **43**, 6545.
22. a) M. Himaja, N. K. Patidar, A. A. Karigar, M. V. Ramana, D. Munirajasekhar, *IJRAP*, 2011, **2**, 1837. b) R. Dahiya, D. Pathak, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2007, **72**, 101.