

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Síntesis y caracterización de *N*-Carbamoil-*O*-(*N*-*meso*-dipirrolilmetilen)- $\alpha$ -  
péptidos con posible actividad biológica”**

**Tesis**

Que para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Químicas**

Presenta:

**Q.F.B. Mario Solorio López**

Asesora: D.C. Judit A. Aviña Verduzco

Coasesor: D.C. Luis Chacón García

Morelia Michoacán, Agosto del 2013

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la D.C. Judit Araceli Aviña Verduzco y el D.C. Luis Chacón García, en el Laboratorio de Síntesis Orgánica del Instituto de Investigaciones Químico – Biológicas, perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y se realizó con financiamiento del proyecto 131812 de Ciencia Básica aprobado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y del proyecto 2.34 de la Coordinación de la Investigación Científica (CIC).

Gracias al apoyo otorgado por CONACyT por la beca otorgada durante la realización de este proyecto, con el número de becario 264404.

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

- ✦ 7º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y Primer Encuentro de Tesistas y Beneficiarios del Programa de Becas-Tesis CONACYT-CECTI celebrado del 30 al 31 de Octubre del 2012 en Morelia, Michoacán.
- ✦ 9ª Reunión de Investigación en Productos Naturales “Dra. Luisa Urania Román Marín”, celebrado del 29 al 31 de Mayo del 2013 en Mineral de la Reforma, Hidalgo.

## ÍNDICE

Símbolos, abreviaturas, acrónimos y fórmulas	1
Lista de compuestos	4
Resumen	6
Abstract	8
I. Introducción	10
II Antecedentes	14
1. Péptidos	14
1.1 Péptidos como antibióticos	15
2. Dipirroles y macrociclos de pirrol	21
III. Justificación	26
IV. Objetivo	27
1. Objetivo general	27
2. Objetivos específicos	27
V. Discusión de resultados	29
1. Síntesis de los compuestos objetivo	29
2. Pruebas de correlación con ADN	70
VI. Parte experimental	78
1. Aspectos generales	78
2. Método general para la <i>N</i> -protección de a.a. con CbzCl	79
3. Método general para la <i>N</i> -protección de a.a. con Boc <sub>2</sub> O	80
4. Método general para <i>O</i> -protección de a.a.	81
5. Procedimiento general para las reacciones de acoplamiento	82
6. Método general de Hidrólisis básica	86
7. Procedimiento general para el acoplamiento con el acetal <b>12</b>	89
8. Método general de oxidación	92
9. Procedimiento general para la formación	94

del sistema dipirrólico

10.	Titulación de dipirroles con TBA-F	98
VII.	Conclusiones	99
VIII.	Referencias.	102
VIII.	Anexos	107

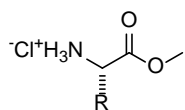
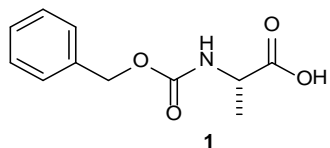
### Símbolos, abreviaturas, acrónimos y fórmulas.

°C	Grados Celcius
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de Protón
a.a.	Aminoácido
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ala	Alanina
arg	Arginina
Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Nitrato de bismuto
BiCl <sub>3</sub>	Cloruro de bismuto
Bn	Bencilo
Boc	Ter-butyl carbonato
Boc <sub>2</sub> O	Di-tert-butyl dicarbonato
<i>c</i>	Señal cuádruple
Cbz	Bencilcarboxiloxi
CbzCl	Cloroformiato de bencilo
CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Cloruro de metileno deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
COSY	Correlated spectroscopy (espectroscopía de correlación homonuclear)
<i>d</i>	Señal doble
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Señal doble de dobles
<i>ddd</i>	Señal doble de doble de dobles
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DIEA	Diisopropil etil amina
<i>dt</i>	Señal doble de triples
F <sup>-</sup>	Ion fluoruro

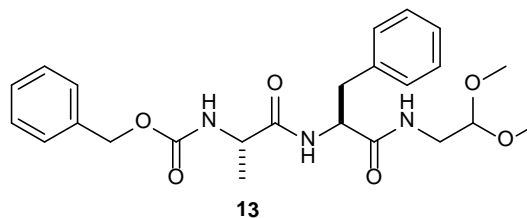
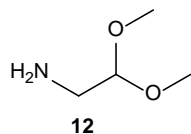
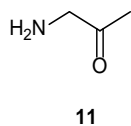
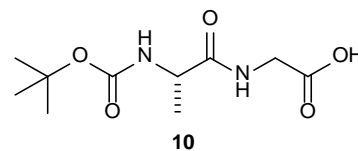
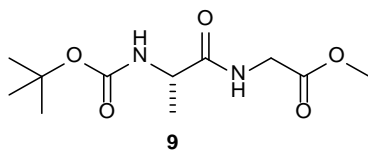
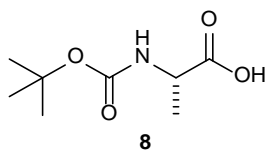
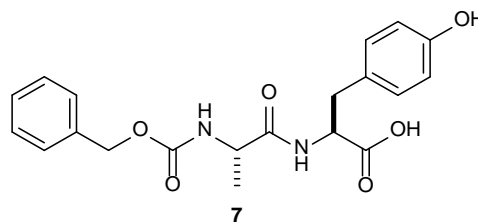
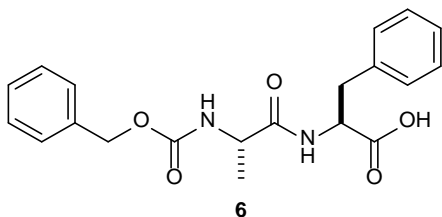
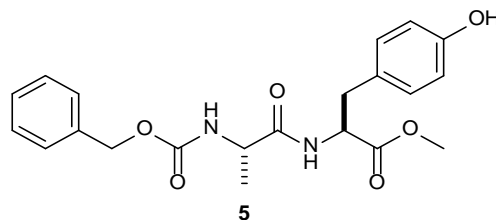
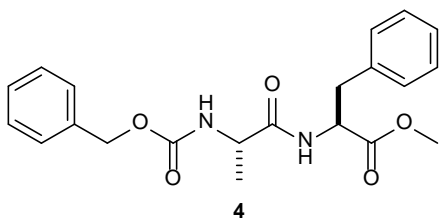
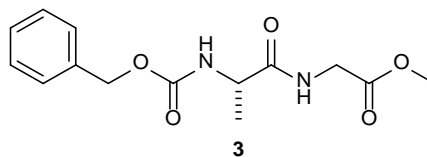
fen	Fenilalanina
gli	Glicina
GP	Grupo protector
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
HETCOR	Heteronuclear correlated spectroscopy (espectroscopía de correlación heteronuclear)
Hex	Hexano
Hz	Hertz
<i>i</i> -BBCl, <i>i</i> -BCF	Cloroformiato de isobutilo
II $\alpha$ D	$\alpha$ -Dextrina Yodo-Litio
K <sub>1</sub> , K <sub>2</sub>	Constantes de afinidad
<i>L</i> -	Levógiro
leu	Leucina
LiOH	Hidróxido de litio
<i>m</i>	Señal múltiple
M	Solución Molar
MeLi	Metilitio
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
Met	Metionina
Mg	Magnesio
mg	miligramos
Mg <sup>2+</sup>	Ion Magnesio
MHz	Mega Hertz
mL	mililitros
mmol	milimol
N <sub>2</sub>	Nitrógeno molecular

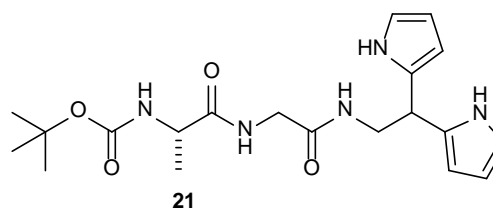
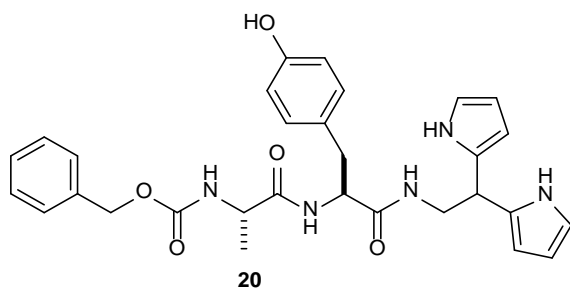
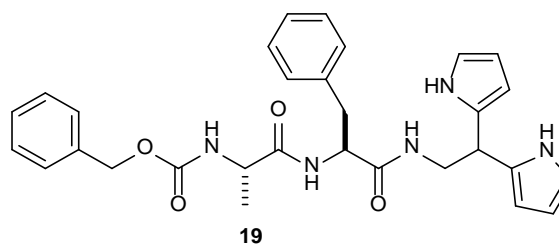
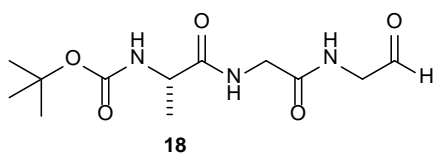
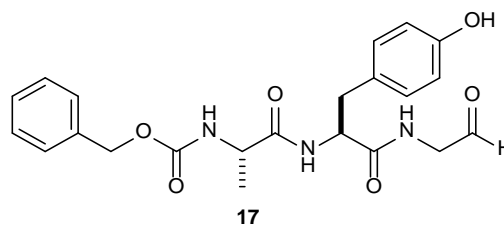
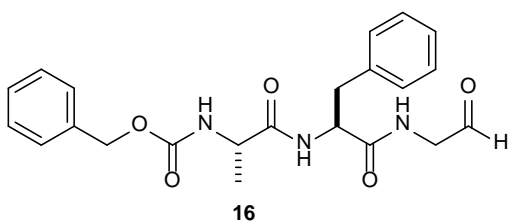
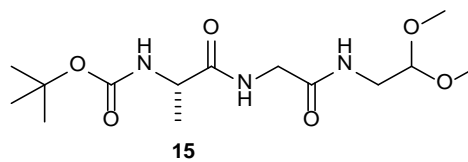
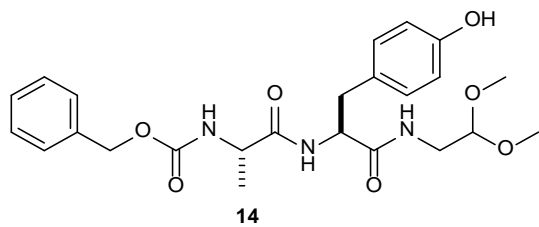
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
p.f.	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
QSAR	Relación estructura actividad cuantitativa
R-	Sustituyente alquilo, acilo, arilo, etc.
RS	Reconocedor de surco
<i>s</i>	Señal simple
<i>sa</i>	Señal ancha
SOCl <sub>2</sub>	Cloruro de tionilo
<i>t</i>	Señal triple
ta	Temperatura ambiente
TBA-F	Fluoruro de tetrabutil amonio
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoracético
THF	Tetrahidrofurano
tir	Tirosina
TLC	Cromatografía en capa fina
TMS	Tetrametil silano
trp	Triptófano
val	Valina
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\delta$	Delta; desplazamiento químico

LISTA DE COMPUESTOS



2a, R = H  
2b, R = Bn  
2c, R = *p*-BnOH

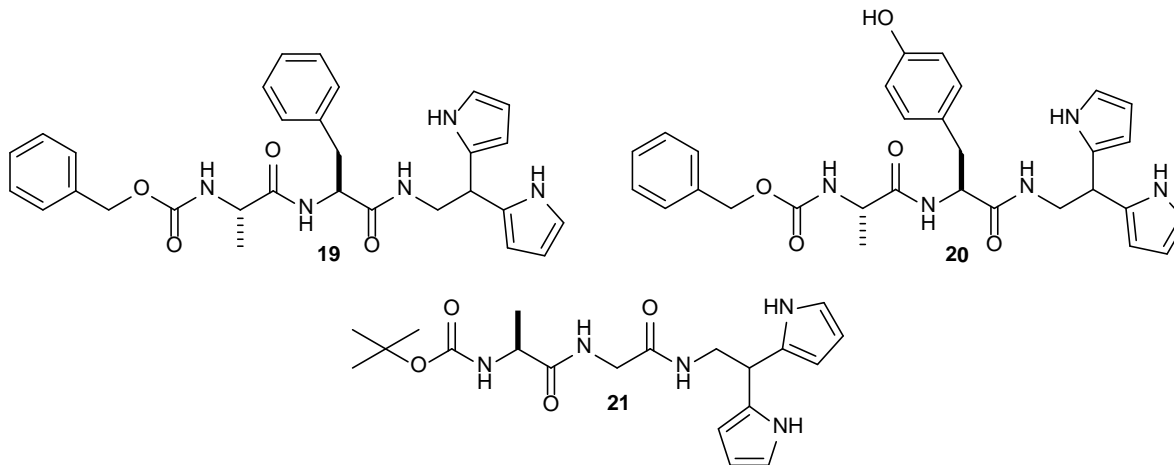




## Resumen

Los antibióticos se definen como compuestos químicos de origen natural o sintético que, en pequeñas cantidades, son capaces de inhibir los procesos vitales de ciertos microorganismos, destruyendo e impidiendo su desarrollo y reproducción.<sup>1</sup> Hasta la época actual, se han descrito, sintetizado y mejorado alrededor de 150 de estos compuestos. Sin embargo, su eficacia se ha visto alterada por su uso excesivo o incorrecto, que conduce a la aparición y proliferación de bacterias resistentes, creando la necesidad de la búsqueda de nuevos fármacos de esta especie capaces de combatir estas multirresistencias.<sup>2</sup>

En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis de compuestos novedosos de tipo *N*-Carbamoil-*O*-(*N*-*meso*-dipirrolilmetilen)- $\alpha$ -péptidos **19**, **20** y **21**. Estos compuestos se proponen como potenciales agentes antibióticos, al actuar como reconocedores de surco, por el reconocimiento selectivo del ADN bacteriano.



Se probó la capacidad de estos compuestos como reconocedores de surco de ADN mediante ensayos de electroforesis en gel, utilizando al plásmido pUCP20 como blanco, probando los compuestos a diferentes concentraciones y en presencia y ausencia de magnesio. Los resultados obtenidos exponen que de las moléculas probadas, sólo el compuesto **19** a 20  $\mu$ g presentó actividad como reconocedor de surco frente al plásmido

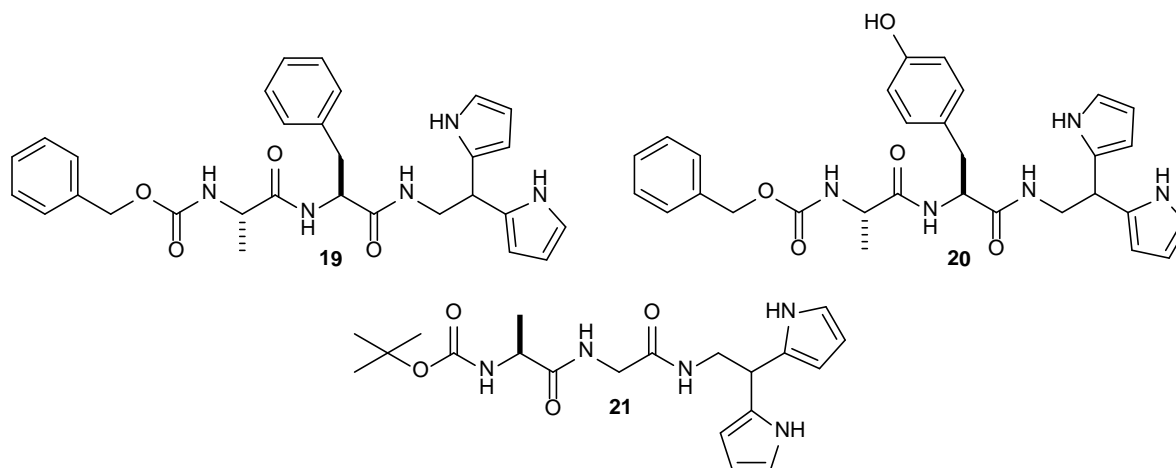
referido en ausencia de magnesio. Los compuestos **19** a 10  $\mu\text{g}$ , **20** y **21** a 10  $\mu\text{g}$  y 20  $\mu\text{g}$ , con y sin magnesio, reconocen al ADN sin embargo, presentan competencia con el revelador Gel Red desplazándolo y observándose bandas menos intensas que indican la interacción del plásmido con el compuesto.

Por otra parte se realizaron pruebas de reconocimiento iónico de estos derivados, demostrando que estos compuestos presentan actividad como reconocedores del ión Fluoruro, exponiendo que el sistema dipirrólico presentaba diferentes constantes de afinidad por el ión, debido a que presentan diferentes sitios de reconocimiento.

## Abstract

Antibiotics are defined as natural or synthetic chemical compounds origin wich, in small quantities, are capable of disabling vital processes of certain microorganisms, destroying and preventing their development and reproduction.<sup>1</sup> Up to date, there have been described, synthesized and improved about 150 of these compounds. Nevertheless, antibiotics efficiency have been diminished by excessive or incorrect use, which had lead to resistant strains appearance and proliferation. This problem motivates the search of new drugs with antibacterial activity against multiresistant bacterial strains.<sup>2</sup>

In the present work the synthesis of the novel compounds (type *N*-Carbamoil-*O*-(*N*-*meso*-dipirrolilmetilen)- $\alpha$ -peptides) **19**, **20** and **21** was carried out. These compounds are proposed to act as potential antibiotic agents by acting as bacterial DNA groove binders.



The activity of these compounds as groove binders of bacterial DNA was tested by electrophoresis assays, using the plasmid pUCP20 as target, proving the compounds at different concentrations and in the presence and absence of magnesium. The results obtained expose that compound **19** at a 20  $\mu$ g without magnesium showed activity as groove binder against the referred plasmid. The compounds **19** to 10  $\mu$ g, **20** and **21** to 10  $\mu$ g and 20  $\mu$ g, with and without magnesium recognize the DNA, however, exhibit competition with the

developer Gel Red displacing the latest, showing less intense bands which indicate the interaction between plasmid and compounds.

In the other hand, ionic recognition property of the compounds was also tested, demonstrating that these compounds are fluoride recognizers, concluding that dipirrolyc system hold different affinity constants for the ion, due to different anion recognizing sites.

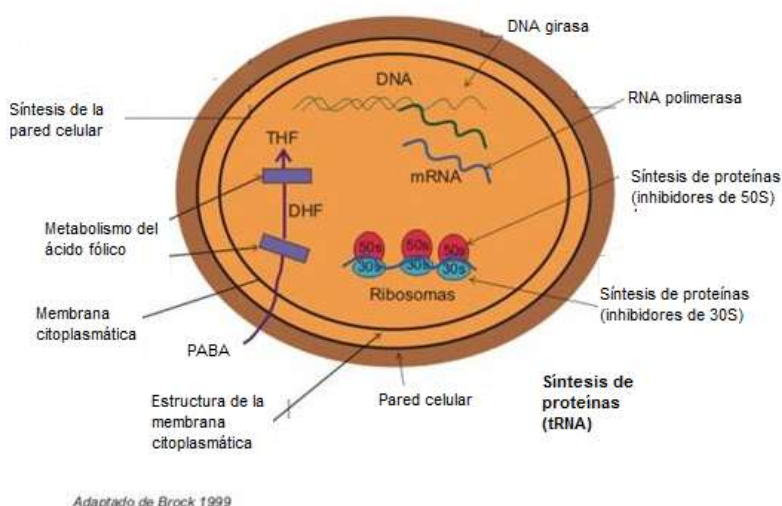
## I. Introducción

Las civilizaciones, desde sus inicios, han dedicado parte de su cultura al estudio y búsqueda de sustancias que les ayudaran a contrarrestar ciertos padecimientos que aquejaban a la población en cuestiones de salud, incrementando el interés en el estudio de fuentes naturales que resultaran eficientes ayudando a minimizar trastornos y decesos ocasionados por las diferentes enfermedades que afectaban a la sociedad. Sin embargo fue hasta principios del siglo pasado cuando se clasificó a algunos de estos padecimientos como enfermedades infecciosas y a las sustancias que las contrarrestaban como antibióticos.

Los antibióticos son compuestos químicos, originalmente producidos exclusivamente por bacterias y hongos, capaces de inhibir los procesos vitales de ciertos microorganismos. Hoy en día, gracias al gran avance de la ciencia, el conocimiento progresivo de las fórmulas de diversos antibióticos (principalmente de aquellos de origen natural), y la necesidad de nuevos y mejores fármacos de este tipo, se ha abierto la posibilidad de su preparación sintética partiendo de bases químicas, aumentando la importancia en el campo de la síntesis de compuestos de esta especie.<sup>1</sup>

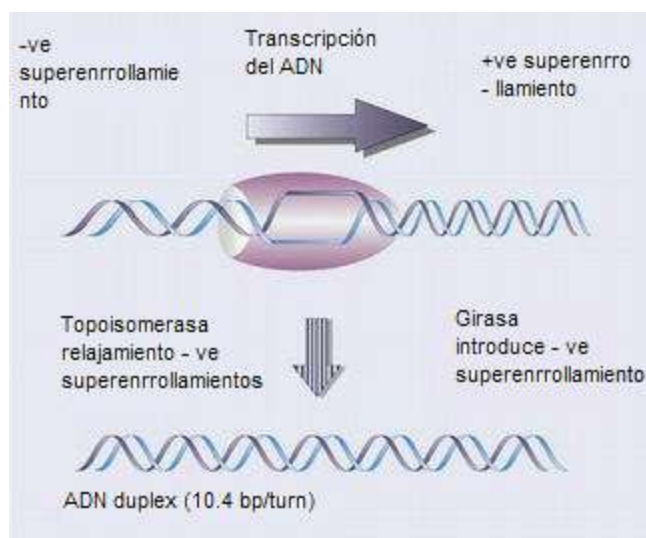
Desde que el uso de los antibióticos comenzó y hasta la época actual, se han descrito, sintetizado y mejorado alrededor de 150 de estos compuestos, clasificados principalmente en 6 grandes grupos:  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, sulfonamidas y quinolonas. Sin embargo, la eficacia se ha visto alterada por el uso excesivo o inadecuado, que conduce a la aparición y proliferación de bacterias resistentes a los antibióticos de uso clínico común, dando lugar a la existencia de cepas bacterianas multirresistentes altamente patógenas que causan daño a la población. En Latinoamérica tenemos infecciones endémicas debido a factores culturales, climáticos y económicos. Por lo anterior, surge una cultura científica en la búsqueda de compuestos quimioterápicos dirigidos a combatir las multirresistencias bacterianas. Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo a su mecanismo de acción molecular. Así, se cuenta por ejemplo con los inhibidores en la biosíntesis de la

pared celular (penicilinas, cefalosporinas, cicloserina, vancomicina, bacitracina, etc.), inhibidores en la síntesis de proteínas (cloranfenicol, macrólidos, amiglicósidos, mupiracina, puromicina, eritromicina, etc.), inhibidores de la síntesis de ADN (fluoroquinolonas, novabiocina, etc.), entre otros (Figura 1).<sup>2, 3</sup>



**Figura 1.** Blancos de acción en las células bacterianas (Brock 1999).

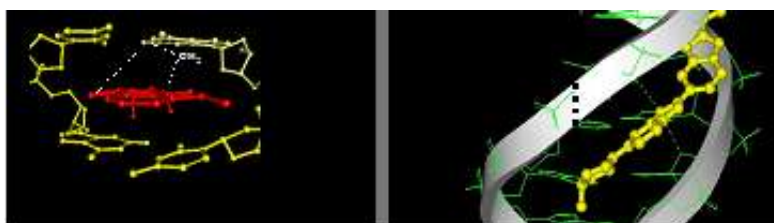
Dentro de los antibióticos inhibidores de la síntesis de ADN cabe mencionar un grupo importante: el de los inhibidores de la girasa y la topoisomerasa IV, ambas enzimas ubicuas de las bacterias,<sup>4</sup> que son responsables de cambiar la topología del ADN mediante la ruptura del enlace fosfodiéster del ADN en una o ambas hebras con la finalidad de generar cambios en el superenrollamiento y liberar tensión durante los procesos de replicación del ADN (Figura 2).



**Figura 2.** Transcripción del ADN, enzimas girasa y topoisomerasa IV (Maxwell, 1997).

Los inhibidores de las topoisomerasas, que forman complejos ternarios con el ADN, tienen en general la característica de unirse fuertemente al material genético mediante uno de dos mecanismos posibles:

- Intercalación; moléculas planas se insertan entre los pares de bases de Watson y Crick
- Reconocedores de surco (RS); moléculas lineales que se unen al surco menor o mayor mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals e interacciones electrostáticas.<sup>5</sup> En donde el ligando puede sufrir el fenómeno conocido como helicoicidad<sup>6</sup> y adoptar la forma de la doble hélice (Figura 3).



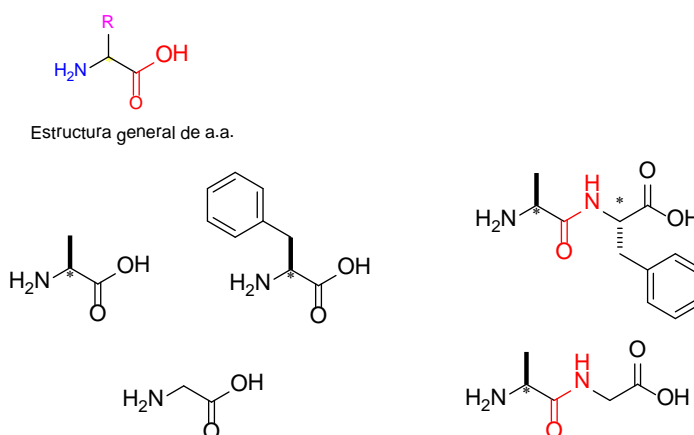
**Figura 3.** Mecanismo de interacción con el ADN de: Intercalación (izquierda) vs. Reconocimiento de surco (derecha), (Chacón, 2005).

Estructuralmente, los reconocedores de surco cuentan con diversas funcionalidades; destacando las de tipo amidas o aminas.<sup>7</sup> Se ha demostrado que la distancia entre los grupos capaces de formar puentes de hidrógeno con el ADN se encuentra relacionado con la distancia que mantienen los pares de bases de 3.6 Å.<sup>6</sup>

## II. Antecedentes

### 1. Péptidos

Los péptidos son biopolímeros que forman parte de las estructuras más básicas que conforman a los organismos vivos. Los monómeros que conforman a los péptidos son los aminoácidos (a.a.). La unión entre dos aminoácidos, por la condensación del grupo carboxilo de un a.a. y el grupo amino del otro, da lugar a un dipéptido mediante la formación de un enlace tipo amida denominado enlace peptídico como se muestra en la figura 4.<sup>8</sup>



**Figura 4.** Estructura general de un aminoácido y algunos ejemplos (izquierda) y algunos dipéptidos, donde se puede observar la formación del enlace peptídico tipo amida (derecha).

A su vez, los aminoácidos pertenecen al grupo de moléculas fundamentales para la vida. Es así que bajo la presencia de estas biomoléculas está sustentada la teoría más aceptada sobre el inicio de la vida. En la naturaleza tienen la particularidad de que se presentan mayoritariamente en la forma *L*, excepto la glicina que carece de centro quiral.<sup>8</sup>

Presentan como estructura fundamental un carbono asimétrico (carbono  $\alpha$ ) unido a cuatro grupos distintos: un grupo amino y un grupo carboxilo, un hidrógeno y una cadena

lateral (R) (Figura 4). Es ésta cadena R la que confiere las diferencias físicas y químicas entre un aminoácido y otro.<sup>9</sup>

Los descubrimientos realizados durante los últimos años en el campo de la química de péptidos han tenido como consecuencia un aumento considerable en el desarrollo de metodologías sintéticas, principalmente en el uso de diferentes grupos protectores<sup>10</sup> y la innovación de las técnicas y reactivos de acoplamiento, ya sea en solución o estado sólido.<sup>9</sup>

Como resultado de lo anterior, estas áreas han atraído la atención de químicos orgánicos y han revolucionado varios de los aspectos de la síntesis química. De esta manera, la diversidad estructural de los aminoácidos, así como la necesidad de diferentes condiciones de reacción para llevar a cabo los procesos de acoplamiento requieren el uso de estrategias sintéticas, grupos protectores y reactivos de acoplamiento hechos a la medida, para cada caso en particular.

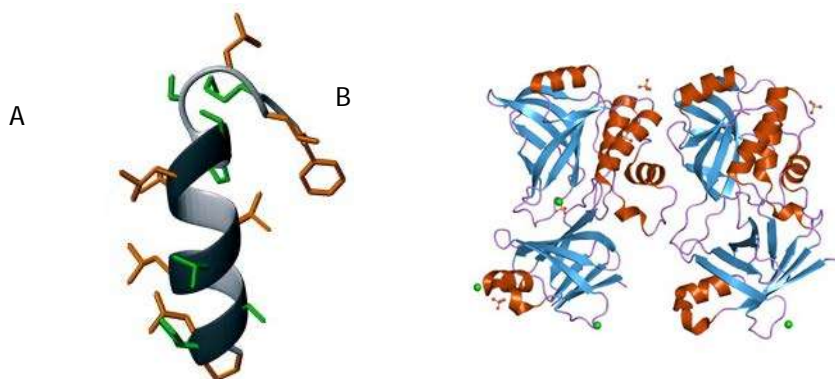
La importancia de los aminoácidos y péptidos radica en que estas moléculas forman parte de complejos moleculares y biopolímeros que resultan fundamentales en procesos vitales de los seres vivos, como enzimas, proteínas, membranas celulares, autacoides, etc.

## **1.1 Péptidos como antibióticos**

La diversidad funcional de los aminoácidos y péptidos, así como su amplia distribución en la naturaleza, ha dado lugar a que estas biomoléculas atraigan la atención y el interés de químicos, farmacéuticos, y otros profesionales relacionados, para el estudio explotando la actividad de los péptidos en diversas áreas, tal es el caso de la química farmacéutica y la medicina, en la búsqueda de nuevas entidades activas que funjan como antibióticos.

A lo largo de la segunda mitad del siglo pasado, se han descrito varios péptidos, de origen natural, que presentan actividad antibiótica, clasificados en dos grupos, péptidos cuya

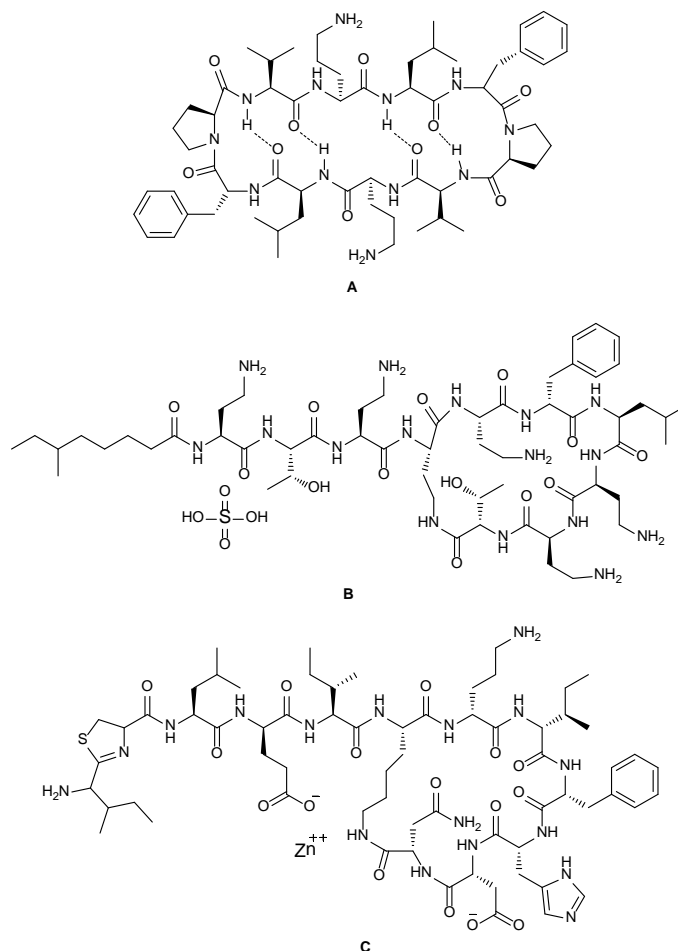
síntesis es vía no ribosomal (gramicidina, polimixina, bacitracinas y glicopéptidos, etc.), producidos principalmente en bacterias y péptidos de origen ribosomal obtenidos de células eucariotas, como componentes mayoritarios del sistema inmunológico propio de cada especie. Aunque los primeros se han descrito, sintetizado y probado describiendo su importancia clínica, los péptidos naturales (o ribosomales) representan una nueva oportunidad para la química medicinal, al ahondar en sus usos en la terapéutica alentadas por las funciones inmunológicas que algunos ejercen dentro de las especies, así como el estudio de derivados peptídicos con potencial clínico.<sup>11</sup> Siendo así, en la actualidad se han descrito alrededor de 800 estructuras de base peptídica de los cuales algunos incluso ya se encuentran como parte del tratamiento de alguna enfermedades, alternando su uso ya sea como agentes antibióticos de amplio espectro como la hemocidina derivada de la hemoglobina, ó como agentes específicos sobre factores de virulencia, como la estafostatina, que actúa sobre la síntesis de proteasas en *S. aureus* (Figura 5).<sup>12</sup>



**Figura 5.** A) Hemocidina y B) Estafostatina. Estructuras de base peptídica usadas en tratamientos contra algunas infecciones bacterianas.

Gracias a estos nuevos descubrimientos, se ha incrementado el interés en el estudio y síntesis de péptidos antimicrobianos de cadena corta con características hidrofóbicas y carga positiva como por ejemplo los derivados de la gramicidina, polimixina B, bacitracina, etc. (Figura 6), lo que permite alterar la bicapa lipídica de los microorganismos, produciendo pérdida de iones y sustancias metabólicas lo cual les causa la muerte. Debido al mecanismo de

acción de estos péptidos, resulta difícil para los microorganismos modificar la estructura de su membrana para evadir y crear resistencia, por lo que estos péptidos tienen un gran potencial como agentes terapéuticos efectivos.<sup>11</sup>

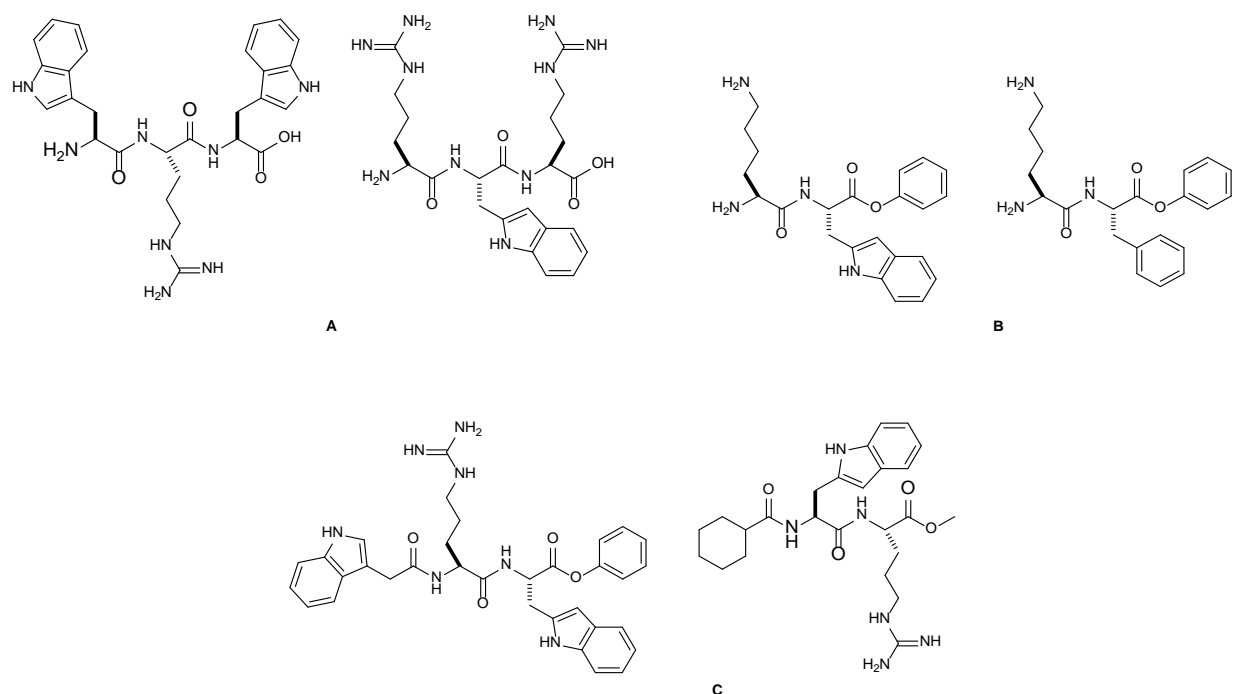


**Figura 6.** A) Gramicidina, B) Polomixina B, C) Bacitracina. Péptidos antimicrobianos hidrofóbicos de carga positiva.

En este mismo contexto, la hidrofobicidad y la carga neta positiva de los péptidos confieren alta selectividad en la actividad antibacteriana. La carga positiva de los péptidos facilita la interacción de estos con las cargas negativas de las membranas celulares, concediendo sinergismo entre péptidos y antibióticos. Tal es el caso de la tetraciclina y el  $\alpha$ -dextrina yodo-litio (II $\alpha$ D) los cuales, confinados a diversos péptidos conformados

principalmente por prolina, alanina y fenilalanina,<sup>13, 14</sup> resultan letales a las cepas resistentes para éstos mismos antibiótico con ausencia de la cadena peptídica.

Asimismo, destacan aquellos péptidos involucrados en la defensa propia del organismo, como la clase de péptidos antibióticos ricos en arg y trp. Algunos estudios han revelado que fragmentos peptídicos derivados de estos compuestos, formados por cadenas de 2 a 5 residuos de aminoácidos, poseen actividad antimicrobiana tan potente como el péptido del cual derivan, y que al ser funcionalizados selectivamente en alguno de sus grupos terminales *N*-, *O*- (figura 7), logran presentar, en la mayoría de los casos, un incremento en la actividad antimicrobiana.<sup>15, 16, 17</sup>

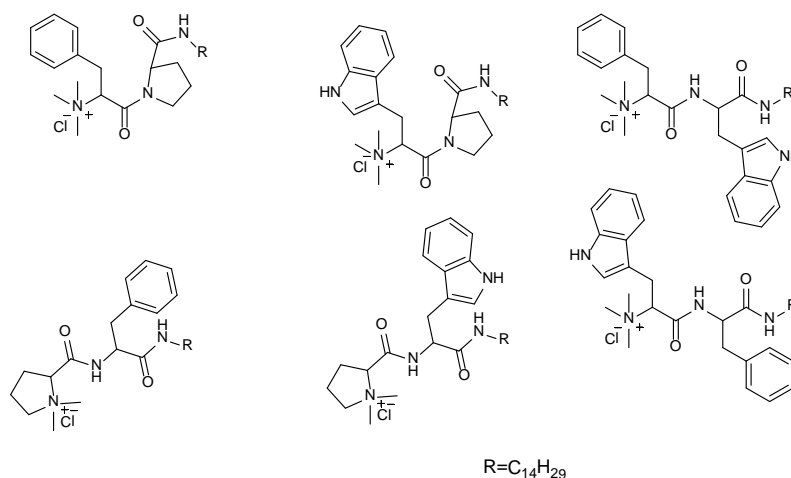


**Figura 7.** Péptidos de cadena corta con actividad antimicrobiana. A) péptidos libres, B) péptidos *O*-protegidos, C) péptidos diprottegidos.

En este sentido, Ryszard *et al.* reportaron la síntesis de una serie de dipéptidos basados en aminoácidos como ala, met, gli, val, leu, fen, tir, funcionalizados con ácido *N*<sup>3</sup>-(4-

metoxifumaroil)-*L*-2,3-diaminopropanoico (inhibidor irreversible de la enzima glucosamina-6-fosfato sintetasa en bacterias y hongos),<sup>18</sup> demostrando que estos dipéptidos inhibían el crecimiento de un cierto número de microorganismos, en especial, *Candida albicans*.<sup>19</sup>

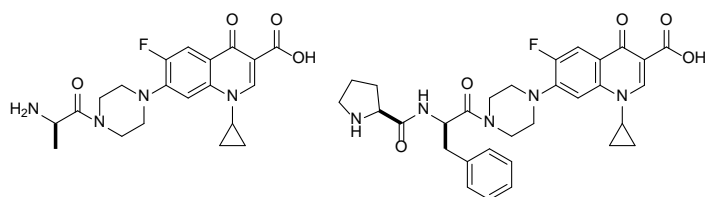
También se reportó la síntesis y evaluación antibacteriana de dipéptidos alanina *N*-terminales funcionalizados con grupos fosfónicos derivados del 1-amino-alcanofosfonato,<sup>20</sup> y la síntesis de dipéptidos anfífilos de base catiónica (Figura 8).<sup>21</sup> La actividad antibacteriana y antifúngica fue evaluada, resultando, en todos los casos, que estos dipéptidos funcionalizados mostraban una considerable actividad antibiótica.



**Figura 8.** Dipéptidos anfífilos.

Por otra parte, se ha demostrado que la secuencia de a.a. de algunos péptidos antimicrobianos es codificada por el ADN, como el caso de la histogranina, derivada de las histonas, la cual presenta un mecanismo de acción similar al de las quinolonas, es decir, que involucran a la ADN girasa.<sup>22</sup>

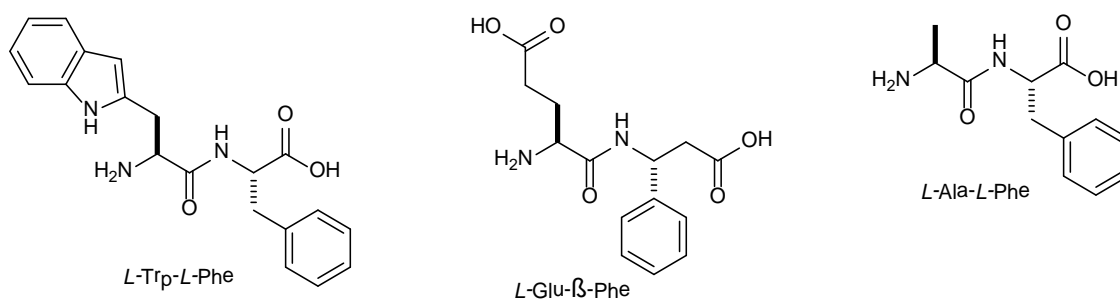
Chacón, Aviña, Machuca y Valencia (2010), reportaron la síntesis y estudio antibacteriano de una variedad de aminoacil fluoroquinolonas, las cuales presentaron actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, superando en algunos casos a su análogo ciprofloxacino (figura 9).<sup>23, 24</sup>



**Figura 9.** Algunas aminoacil fluoroquinolonas reportadas por Chacón, Aviña *et al.* (2010)

Es claro entonces, que la incorporación de péptidos y aminoácidos en antibióticos, o el uso de péptidos como agentes terapéuticos abre la puerta a la búsqueda de nuevas entidades activas vislumbrando una importante aplicación de péptidos en la industria farmacéutica, una necesidad urgente desde la introducción de los antibióticos.

Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo se han diseñado estructuras péptidicas (Figura 10) con actividad citotóxica mediante estudios de relación estructura actividad cuantitativa (QSAR) utilizando 1600 descriptores teóricos y haciendo un análisis de regresión lineal múltiple asistido por inteligencia artificial por algoritmos genéticos.<sup>25</sup> En este trabajo se demostró que estos péptidos presentan la ventaja de ser capaces de reconocer al ADN mediante interacciones típicas de un reconocedor de surco, y podrían incrementar su afinidad por el material genético de manera similar a las fluoroquinolonas reconociendo al  $Mg^{2+}$  al ser funcionalizados.

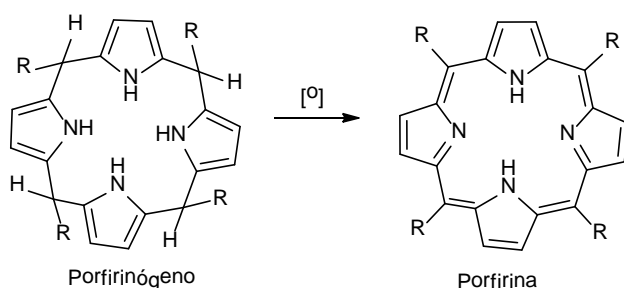


**Figura 10.** Péptidos evaluados mediante QSAR como reconocedores de surco.

## 2. Dipirroles y macrociclos de pirrol

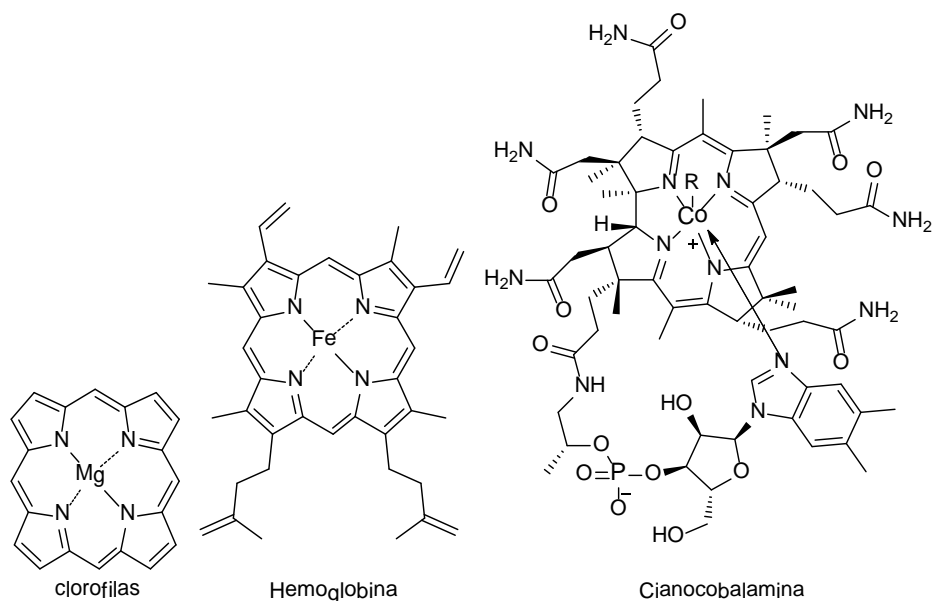
Los porfirinógenos son macrociclos que consisten en cuatro anillos de pirrol unidos en la posición  $\alpha$  (2 y 5) y en la posición *meso* por un carbono con hibridación  $sp^3$ .

En la química de los porfirinógenos el contenido de átomos de hidrógeno en la posición *meso* es quien determina su oxidación para la formación de porfirinas aromáticas (Figura 11). Sin embargo, los porfirinógenos totalmente *meso*-sustituidos no dan lugar a porfirinas.<sup>26</sup>



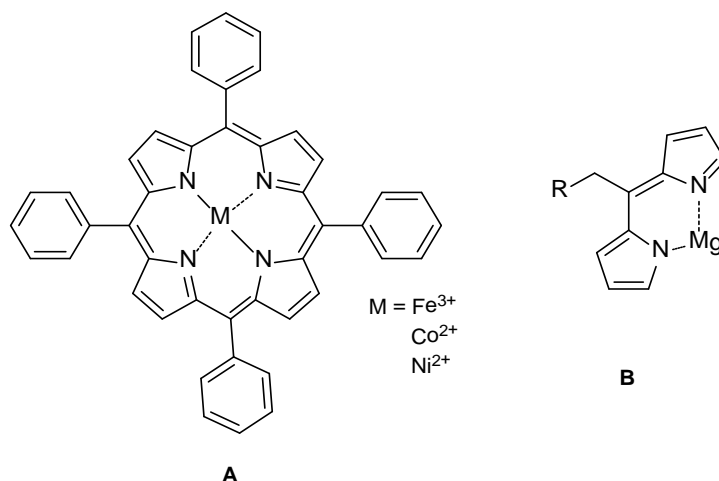
**Figura 11.** Diferencia entre porfirinógeno y porfirina

En la naturaleza encontramos sistemas macrocíclicos polipirrólicos que presentan fuertes interacciones con metales, como es el caso de las porfirinas, como el grupo hemo, que es un sistema de este tipo con interacción con hierro, las clorofilas con el magnesio y la cianocobalamina con el cobalto (Figura 12).



**Figura 12.** Sistemas macrocíclicos de pirrol que se pueden encontrar de manera natural.

Por otro lado, se han reportado macrociclos de pirrol con gran potencial y uso analítico en el reconocimiento selectivo de bases nitrogenadas y sus respectivos nucleósidos, la unión selectiva de aniones e iones inorgánicos, así como el reconocimiento selectivo de las estructuras diméricas, es decir, dipirroles, tanto a moléculas como a iones metálicos, principalmente magnesio (figura 13).<sup>26, 27</sup>



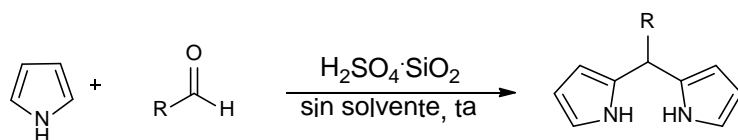
**Figura 13.** Sistemas policíclicos de pirrol, A) Metaloporfirina de Král,  
B) Interacción dipirrol – Mg

Dadas las propiedades de estos macrociclos en diversas áreas, se ha incrementado el interés en la búsqueda de procesos sintéticos factibles para la obtención de este tipo de estructuras policíclicas derivadas del pirrol. Siendo así, y en la búsqueda precisa de estas técnicas, es como recientemente han aparecido con gran interés y aplicaciones, el estudio de los precursores diméricos de estos ciclos, los dipirroles.

De esta manera, la búsqueda de metodologías en la síntesis orgánica para la obtención de dipirroles ha cobrado auge en las últimas décadas, siendo descritas variedad de condiciones en presencia de varios catalizadores tal como el ácido *para*-toluensulfónico,<sup>28</sup> TiCl<sub>4</sub>,<sup>29</sup> y tetrafluoroborato de pirrolidinio,<sup>30</sup> entre otros. Sin embargo, estos métodos vienen acompañados de varias desventajas tales como largos tiempos de reacción,<sup>31 - 33</sup> el uso de catalizadores y ácidos bastante caros,<sup>29, 34, 35</sup> y que usualmente conllevan la necesidad de destilar, una vez terminada la reacción, el exceso de pirrol que queda en la reacción.<sup>36</sup>

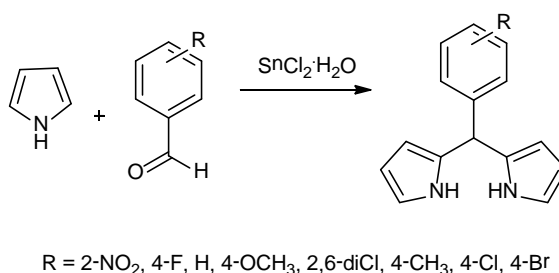
Gracias al desarrollo en los últimos años de la llamada de la química verde, nuevas metodologías se han descrito, con procedimientos factibles y poco contaminantes, de buenos rendimientos, bajos tiempos de reacción y uso de reactivos poco agresivos, basadas principalmente en la condensación entre pirrol y aldehídos con el uso de catalizadores ácidos (orgánicos o de Lewis), en ausencia de solventes orgánicos, como la síntesis de dipirroles y calix-pirroles reportada por Chacón *et al.*, donde el compuesto carbonílico precursor del ciclo era a la vez el solvente de reacción.<sup>37</sup>

En este sentido encontramos metodologías como las descritas por Zhang *et al.*,<sup>38</sup> quienes encontraron que al utilizar gel de sílice tratada con ácido sulfúrico, resultó ser un eficiente y reutilizable catalizador para la obtención de dipirroles de manera simple y práctica (Figura 14).



**Figura 14.** Síntesis de dipirroles de Zhang *et al.* (2010).

También se cuenta con el trabajo reportado por Kabeer *et al.*,<sup>39</sup> los cuales describen la síntesis de dipirroles *meso*-sustituídos en ausencia de solvente, utilizando  $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  como catalizador (figura 15), obteniendo altos rendimientos utilizando aldehídos aromáticos (92-97%).



**Figura 15.** Síntesis de varios dipirrometanos *meso*-sustituídos.

Otras metodologías que han sido descritas con éxito en la síntesis de dipirroles, basados en la condensación ácida de pirrol con aldehídos han utilizado catalizadores como yodo,<sup>40, 41</sup> HCl acuoso,<sup>42</sup> TFA,  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{BF}_3\text{O}(\text{Et})_2$ ,<sup>43, 44</sup> y sales de Bismuto<sup>37</sup> obteniendo en todos los casos buenos rendimientos, tiempos cortos de reacción y condiciones suaves y poco agresivas al ambiente.

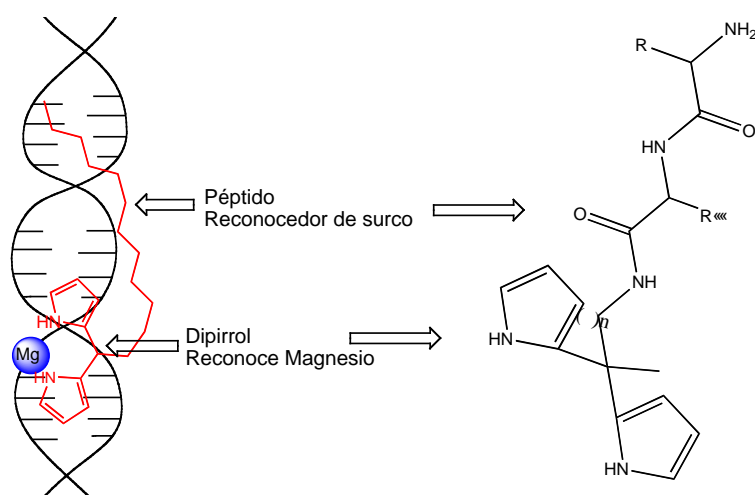
Se ha reportado también el uso de dipirroles como material de partida en la síntesis de gran variedad de porfirinas sustituidas, así como precursores de calixpirroles y corroles, demostrándose que estas estructuras diméricas presentan potencial como precursores, sensores y catalizadores quirales, receptores moleculares, receptores de iones inorgánicos, síntesis orgánica e industria farmacéutica, siendo también usados como catalizadores y ligandos en química organometálica por su capacidad ionófora.

Es importante hacer hincapié en esta última propiedad que describen los dipirroles, ya que, como se mencionó anteriormente, presentan gran afinidad, entre otros metales, por el magnesio. Esto es importante ya que el magnesio juega un rol imprescindible en los sistemas biológicos participando en procesos como la contracción y relajación muscular, funcionamiento de ciertas enzimas en el organismo, producción y transporte de energía y biosíntesis de proteínas, esto en los organismos eucariotas.<sup>45</sup> Por otro lado, el magnesio también juega un papel importante en los organismos procariontes como las bacterias, donde entre otras propiedades como las nutrimentales, destaca sin lugar a duda uno de los modelos más aceptados de la replicación del ADN, que sugiere que el magnesio juega un papel importante en esta etapa al formar el complejo *and*-girasa, existiendo una interacción electrostática y/o covalente entre las bases del ADN, el ión  $Mg^{2+}$  así como los grupos fosfato durante la enscripción de la doble hebra catalizada por la enzima topoisomerasa.<sup>25</sup>

Es por esto que se abre un nuevo camino a los dipirroles, aprovechando estas propiedades como reconocedores de iones, y más específicamente, aprovechando su alta afinidad al actuar sobre el magnesio, siendo en sistemas biológicos un posible blanco, explorando más específicamente sus posibles utilidades entre otras posibilidades, como agente terapéutico por reconocimiento selectivo del magnesio contra infecciones bacterianas.

### III. Justificación

Con base en los antecedentes citados, es comprensible que péptidos diseñados a *ex profeso* como reconocedores de surco, acoplados a sistemas dipirrólicos, presenten una alta afinidad por el ADN, mediante interacciones típicas de un RS por parte del péptido y la interacción del sistema dipirrólico con el magnesio. Esta interacción se facilita por el tamaño del sistema y el acomodo no cónico de los dipirroles, beneficiándose y viéndose así fortalecida por este sistema la interacción entre el péptido y el ADN (figura 16).



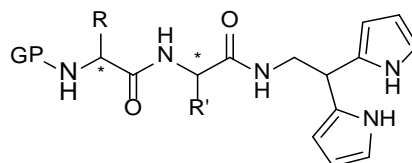
**Figura 16.** Interacción ADN – Péptido acoplado a dipirrol

La búsqueda, diseño y síntesis de nuevas entidades con potencial actividad biológica es un reto al que nos enfrentamos día a día, dadas las problemáticas que se presentan para la sociedad en el sector salud, creando una necesidad urgente en la obtención de nuevos compuestos potencialmente activos.

## IV. Objetivos

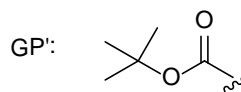
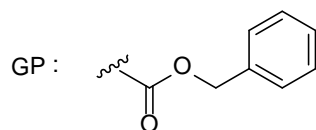
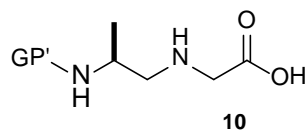
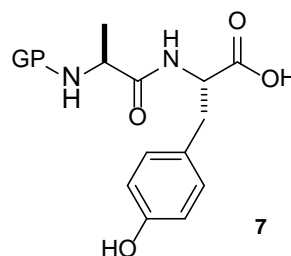
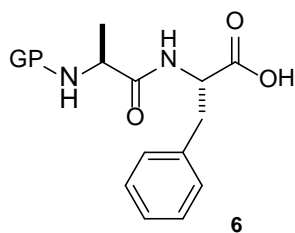
### 1. Objetivo General

Sintetizar derivados peptídicos acoplados a sistemas dipirrólicos y evaluar su afinidad por el ADN.

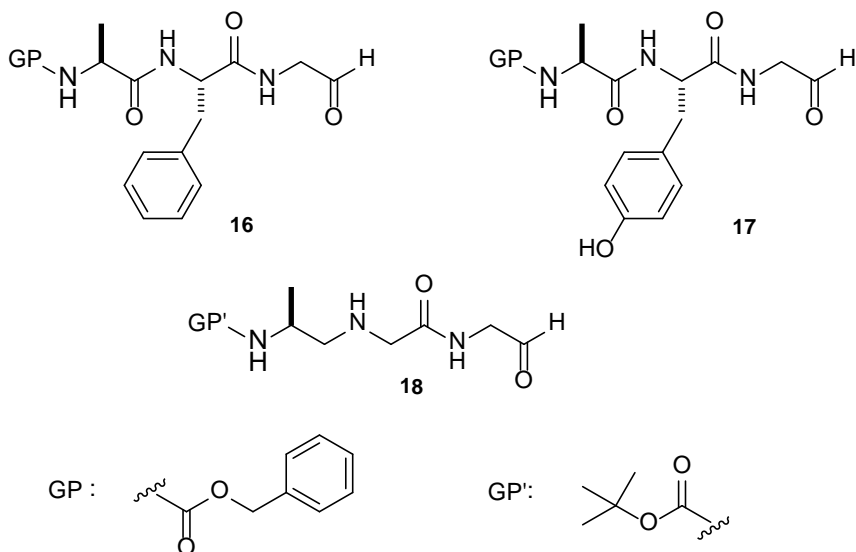


### 2. Objetivos Específicos

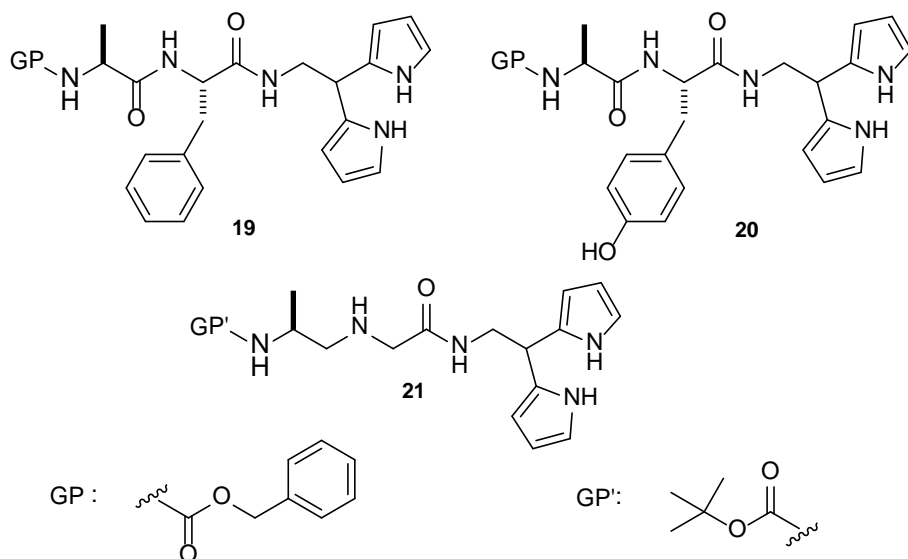
- A. Obtener los péptidos *N*-Gp-*L*-alanil-glicina, *N*-Gp-*L*-alanil-*L*-fenilalanina, *N*-Gp-*L*-alanil-*L*-tirosina y caracterizarlos mediante técnicas espectroscópicas.



B. Preparar los derivados aldehídicos de los péptidos sintetizados.



C. Sintetizar y caracterizar mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones los derivados dipirrólicos correspondientes.



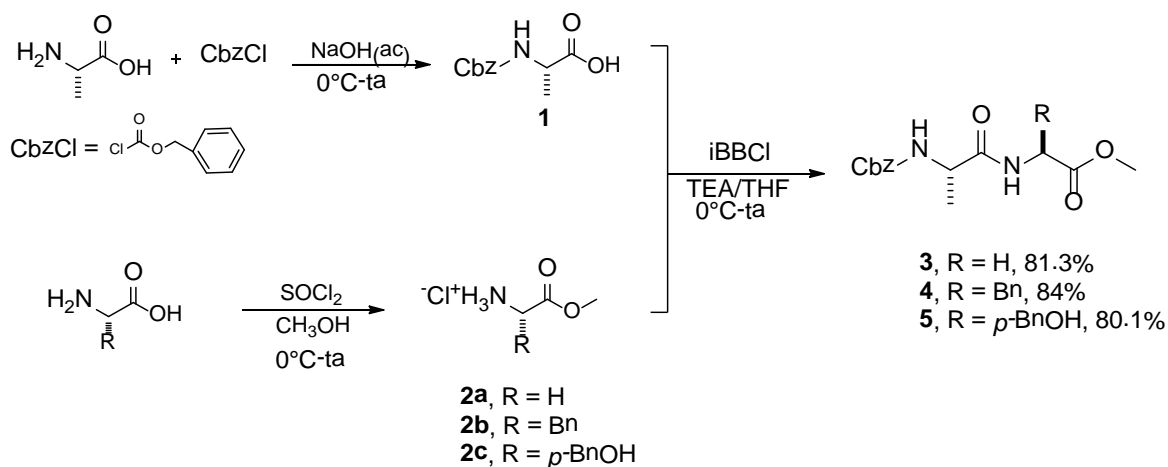
D. Evaluar la actividad biológica de los compuestos sintetizados, mediante ensayos de electroforesis en gel y corroborar así su afinidad por el ADN.

## V. Discusión de Resultados.

### 1. Síntesis de los compuestos objetivo.

Acorde con los objetivos planteados, la primera parte del proyecto consistió en la selección de los péptidos a sintetizar, la configuración de los aminoácidos empleados y el planteamiento de la estrategia sintética a seguir. Los aminoácidos empleados fueron todos de configuración *L*, forma en la que los encontramos en la naturaleza, a excepción de la glicina que carece de centro quiral. Los péptidos sintetizados fueron seleccionados en base al estudio teórico QSAR, anteriormente reportado de péptidos como reconocedores de surco de ADN.<sup>26</sup>

Una vez hecho lo anterior, se llevó a cabo entonces la preparación de los péptidos diprottegidos *N*-Cbz-*L*-alanil-glicina-OMe **3**, *N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-fenilalanina-OMe **4** y *N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-tirosina-OMe **5** de acuerdo al Esquema 1. Para esto primero se llevó a cabo la *N*-protección de la *L*-alanina mediante la formación del carbamato de Cbz y la *O*-protección de los aminoácidos glicina, *L*-tirosina y *L*-fenilalanina, a través de la formación del éster metílico correspondiente. Se procedió con el acoplamiento de los aminoácidos protegidos mediante el empleo de cloroformiato de isobutilo (*i*-BBOCI) que funge como agente activador, trietil amina (TEA) como base y tetrahidrofurano anhidro (THF) como disolvente.

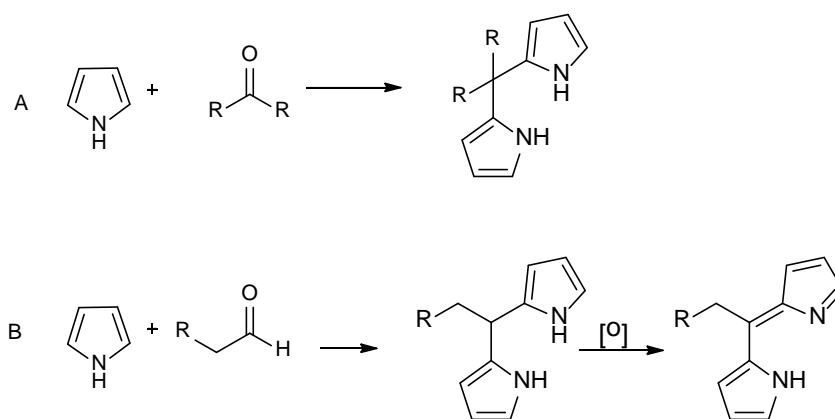


**Esquema 1** Obtención de los péptidos **3**, **4** y **5**.

Los compuestos **3**, **4** y **5** se purificaron por el método de cromatografía en columna usando como fase sólida gel de sílice, en un sistema eluyente Hex-AcOEt (7:3) para los péptidos **3** y **4** y Hex-AcOEt (1:1) para el **5**. Después de purificados, los compuestos se obtuvieron en forma de un sólido amorfo de color blanco, solubles en diclorometano (DCM) con un rendimiento de 84.00% para el péptido **4**, y del 81.30% y 80.10% para los dipéptidos **3** y **5**, respectivamente. Es importante señalar que para la síntesis del compuesto **5**, la tirosina sólo fue protegida en *O*-terminal mediante la formación del éster metílico, dejando libres el *N*-terminal (el cual participaría en la formación del enlace peptídico) y el -OH del sustituyente *p*-BnOH de la cadena lateral, este último grupo puede llegar a generar competencia durante la reacción dando lugar a la formación de subproductos; sin embargo el rendimiento alto obtenido, así como la poca observación de subproductos, nos indica la alta selectividad de la reacción, así como del grupo activante y los grupos funcionales que participan en la reacción de acoplamiento.

Una vez obtenidos los péptidos **3**, **4** y **5**, el siguiente objetivo era incorporar el fragmento aldehído/cetónico para obtener el intermediario adecuado para la incorporación del sistema dipirrólico.

La importancia del intermediario cetónico o aldehídico, radica en la necesidad de un carbonilo de esta naturaleza para poder llevar a cabo el anclaje entre el péptido y el dipirrol, aunado a que la reacción para introducir el sistema polipirrólico ocurre de acuerdo a una condensación tipo aldólica favorecida con carbonilos de este tipo. Esta clase de condensaciones ocurren sobre uno de los carbonos alfa del pirrol y el carbono  $sp^2$  del compuesto carbonílico. Cuando el carbono carbonílico es de naturaleza cetónica (que es donde ocurre la condensación por ataque nucleofílico y denominada en este tipo de sistemas como posición *meso*), la condensación da lugar a un carbono con hibridación  $sp^3$  en la posición *meso*. En el caso de aldehídos, al ocurrir la condensación con el pirrol, el sistema tiende a la aromaticidad dándole mayor estabilidad, ya que el hidrógeno en la posición *meso* determina la oxidación del sistema para la formación del conjugado aromático correspondiente, permaneciendo una hibridación  $sp^2$  sobre el carbono de la posición *meso* (Esquema 2).



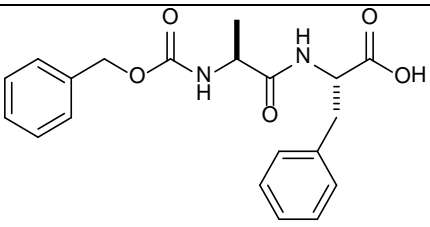
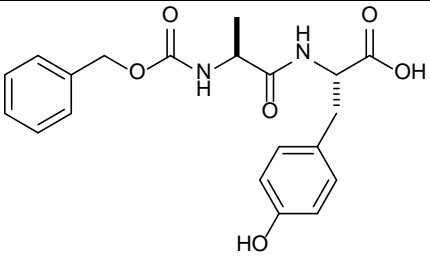
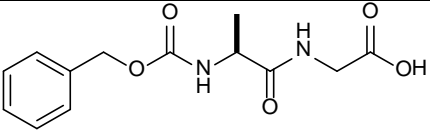
**Esquema 2.** A) Dipirrol proveniente de cetona, B) Dipirrol proveniente de aldehído.

Para poder incorporar la fracción que servirá de enlace entre el péptido y el dipirrol, fue necesario obtener el dipéptido en su forma carboxilo terminal libre.

Para lograr esto, se llevó a cabo la *O*-desprotección de los compuestos **3**, **4** y **5**, mediante hidrólisis básica, utilizando hidróxido de litio (LiOH) como base y un sistema de disolventes TFH/H<sub>2</sub>O/MeOH, obteniéndose los compuestos en buen rendimiento, como se

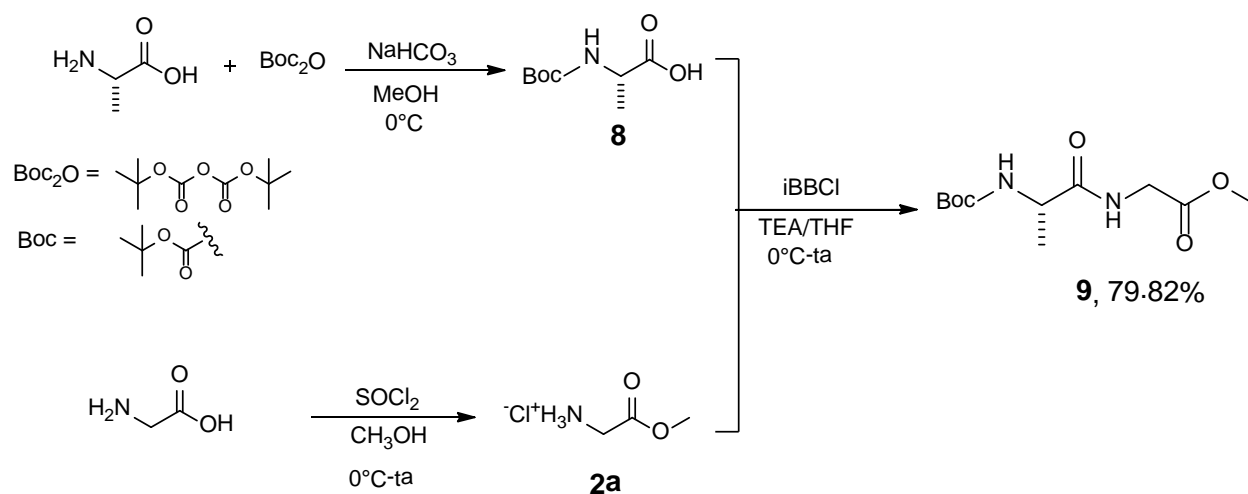
indica en la Tabla 1. Es importante señalar que en el caso del compuesto **3** la reacción no procedió como se esperaba ya que el producto obtenido no era el producto deseado.

**Tabla 1** Hidrólisis básica de los compuestos **3**, **4** y **5**.

Péptido	Rendimiento	Aspecto Físico
 <p style="text-align: center;"><b>6</b></p>	85.3%	Sólido blanco amorfo
 <p style="text-align: center;"><b>7</b></p>	82.24%	Sólido amarillo amorfo
 <p style="text-align: center;"><b>3a</b></p>	-----	-----

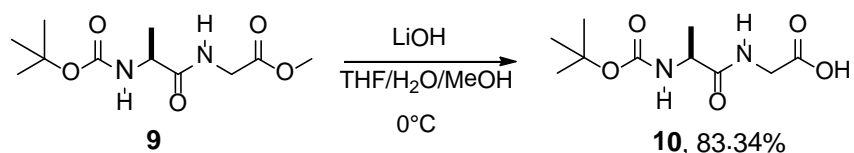
Para el caso del compuesto **3**, como se mencionó anteriormente, la reacción no dio el producto deseado, inclusive modificando las condiciones de reacción. Algunos de los subproductos obtenidos, presentaban también la desaparición del grupo protector Cbz.

Dadas las dificultades para la obtención del Cbz-*N*-ala-gli-OH **3a**, se decidió hacer un cambio del grupo *N*- protector, utilizando ahora el grupo Boc *N*-protector de la *L*-alanina. Para esto la *L*-alanina se hizo reaccionar con di-*t*erbutil dicarbonato en metanol y posteriormente se llevó a cabo la formación del péptido Boc-*L*-ala-gli-OMe **9**, por medio de la condensación intermolecular del aminoácido *N*-protegido **8** y el aminoéster **2a**, como se muestra en el Esquema 3.



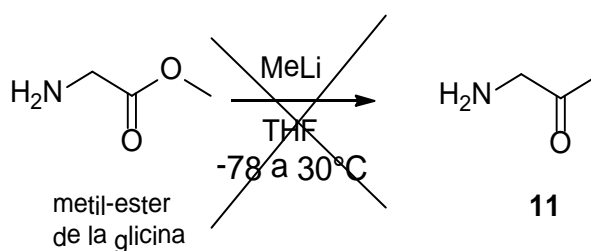
**Esquema 3.** Preparación del dipéptido **9**.

El crudo de reacción de observó como un aceite amarillo ocre, el cual fue llevado a purificación por el método de cromatografía en columna, obteniéndose el dipéptido **9** en un rendimiento del 79.82%. Posteriormente, se llevó a cabo la *O*-desprotección del compuesto **9** mediante una hidrólisis básica, utilizando LiOH como se describe en el Esquema 4, obteniéndose el compuesto **10** en un buen rendimiento del 83.34%.



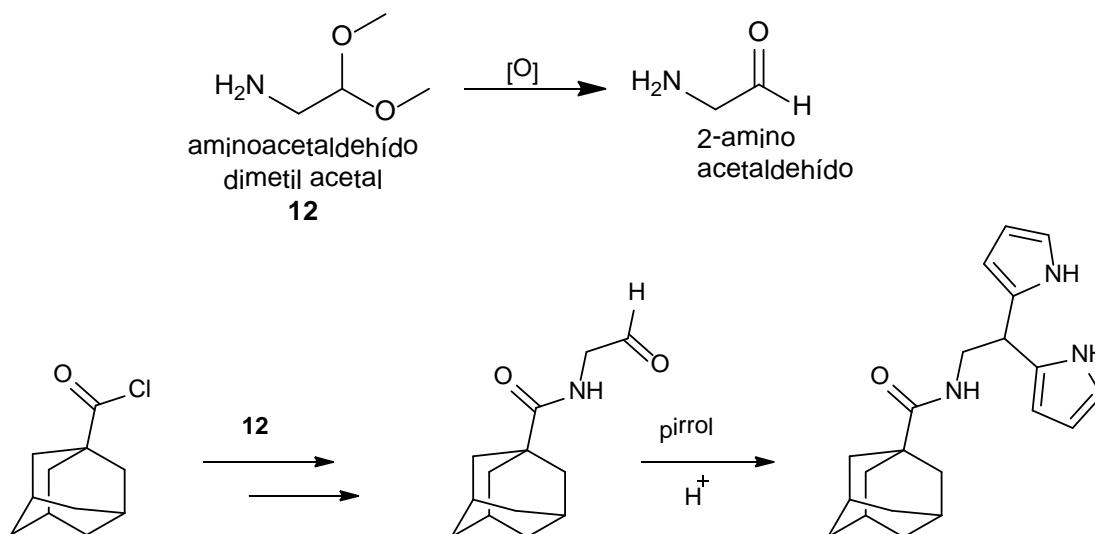
**Esquema 4.** Hidrólisis básica de **9**.

Una vez obtenidos los dipéptidos hidrolizados, el siguiente paso en la ruta sintética, era la incorporación de un precursor que diera lugar a la formación del sistema dipirrólico. En primer lugar, se pretendió que este fragmento fuera de naturaleza cetónica, por lo que se procedió a preparar la metil-cetona **11** derivada del éster metílico de la glicina. La reacción se realizó en atmósfera inerte de N<sub>2</sub>, con metil litio (MeLi) como agente alquilante, THF anhidro como disolvente y variando la temperatura en un rango de -78 a 30°C (Esquema 5). La reacción no procedió de acuerdo a lo esperado, observándose la descomposición de la materia prima, o bien, en algunos casos, recuperándose la misma.



**Esquema 5.** Condiciones de reacción para la preparación de la metil cetona **11**.

Dados los resultados, se decidió tomar una ruta alternativa, en la cual se sustituyó al derivado cetónico por el derivado aldehídico. Para esto se utilizó el aminoacetaldehído dimetil acetal **12**, como el precursor del 2-aminoacetaldehído, que ha sido recientemente descrito en la síntesis de dipirroles, aunque con adamantilo<sup>46</sup>, el cual es un sistema evidentemente más simple que los dipéptidos (Esquema 6).

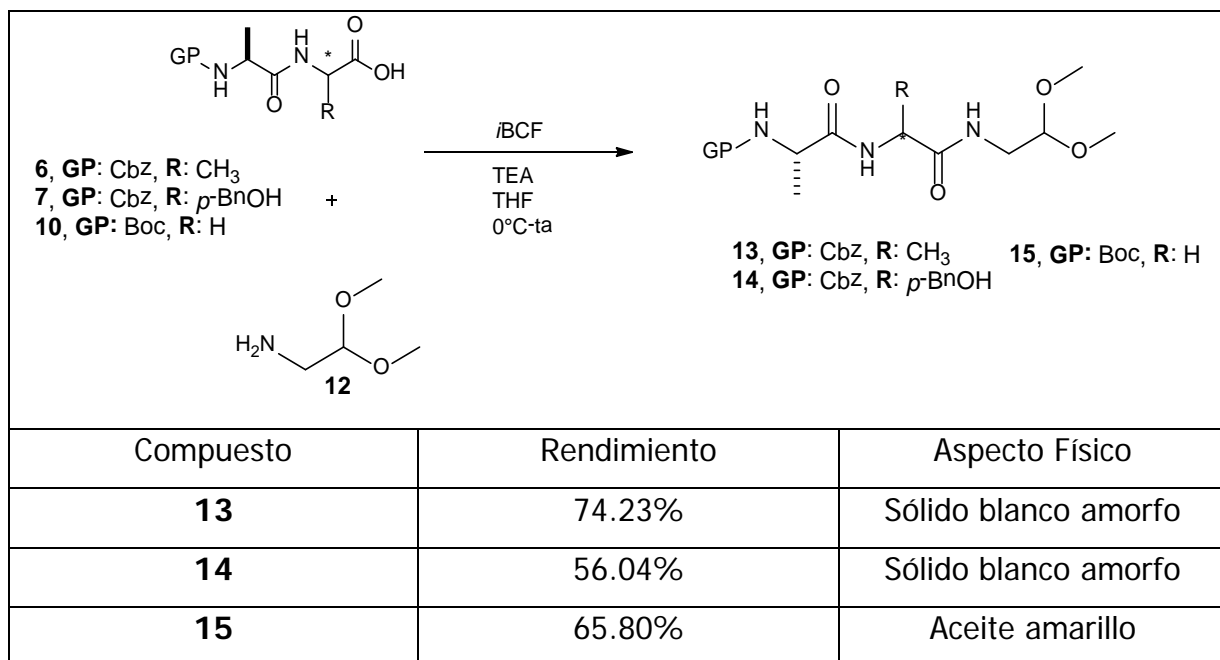


Síntesis de dipirroles a partir de adamantilos funcionalizados con **12**.

#### Esquema 6. Precursor del fragmento aldehído.

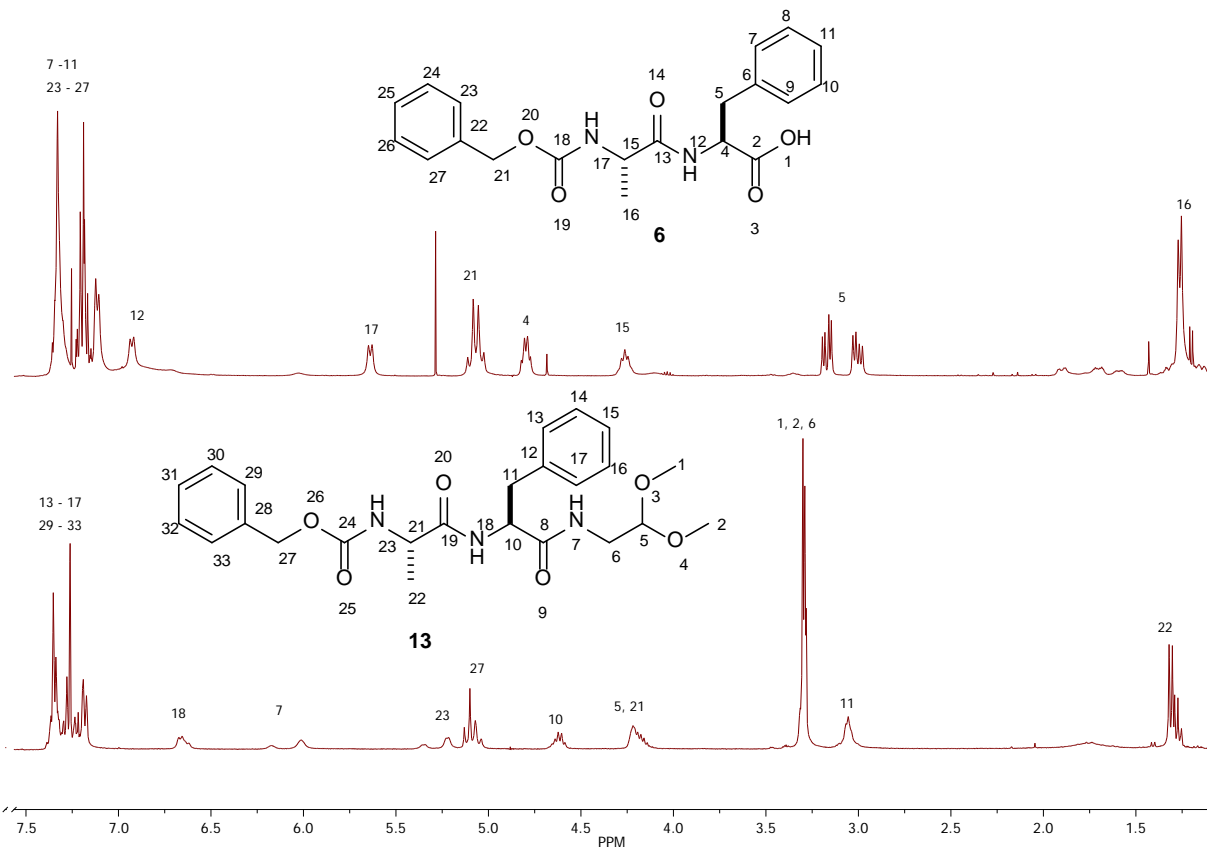
Se llevó a cabo entonces el acoplamiento entre los compuestos **6**, **7** y **10**, y el acetal **12** utilizando *i*-BCF como agente activador del carbonilo, TEA como base y THF anhidro como disolvente y a  $0^\circ\text{C}$ . El crudo de reacción se observó como una mezcla oleosa de color amarillo ocre, que fue sometida a cromatografía en columna de gel de sílice para su purificación, obteniéndose los productos **13**, **14** y **15**, como se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Obtención de los compuestos **13**, **14** y **15**.



Como se puede observar en la Tabla 2, el rendimiento del compuesto **14** es moderado, esto pudiera estar indicando que para la formación de este sistema en particular posiblemente exista competencia con el -OH libre de la tirosina, lo cual daría lugar a la formación de subproductos disminuyendo el rendimiento del producto deseado. Aunque los rendimientos obtenidos van de moderados a buenos, fueron los rendimientos más altos obtenidos, incluso modificando alguna de las condiciones de reacción de acuerdo a cada péptido en particular, siendo en algunos casos el agente activante, la base o los equivalentes del acetal.

A continuación se describen el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 17) del compuesto **13**.



**Figura 17.** Comparación de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H para de los compuestos **6** y **13**.

En la Figura 17 se comparan los espectros de RMN <sup>1</sup>H para de los compuestos **6** y **13**. Ambos espectros comparten las señales características del esqueleto peptídico, siendo estas en 1.31 ppm una señal doble correspondiente al metilo de la alanina H-16 para **6** y H- 22 para **13**; los hidrógenos diastereotópicos H-5 en **6**, se observan como un sistema de señales doble de dobles que van de 3.00 a 3.20 ppm, caso contrario en **13**, donde ahora las condiciones estereoelectrónicas de la nueva molécula formada, cambian su desplazamiento y multiplicidad original siendo ahora una señal múltiple en 3.05 ppm; en 4.21 ppm se puede observar la señal del metino base de alanina H-15 para **6** y H-21 para **13**; en 4.61 ppm se observa una señal doble de dobles que corresponde al metino base de fenilalanina H-4 y H-10 para **6** y **13** respectivamente; en 5.09 ppm se observa la señal del metileno de Cbz H-21 para **6** y H-27 para **13**; finalmente de 7.11 a 7.43 ppm el sistema de señales de los hidrógenos aromáticos del Cbz y la fenilalanina H-7 a 11, H-23 a 27 para **6** e H-13 a 17, H-29 a 33 para **13**. En el

caso particular del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **13**, también se observan nuevas señales, correspondientes a los nuevos protones introducidos por la incorporación del compuesto **12** a la molécula. Así, tenemos que en 3.29 ppm se observa una señal simple intensa, que en primera estancia se puede asignar a los protones de los metoxilos (H-1 y H-2). Resulta interesante destacar que, en primer lugar, la integral no correspondía a estos hidrógenos, ya que ésta mostraba que existían ocho protones y no seis como se esperaba. Gracias al apoyo de la espectroscopía bidimensional (COSY y HETCOR, Figura 18), se observa que esa señal también integraba para los protones H-4, correspondientes al metileno del aminoacetal, explicándose probablemente por el efecto inductivo de los heteroátomos vecinales a ambos hidrógenos. Por otro lado, en 4.21 ppm se observó nuevamente una superposición de señales, esta vez entre el los hidrógenos H-3 y H-17, correspondientes a los metinos base de acetal y base de alanina, respectivamente y finalmente en 6.01 ppm la señal de la amina secundaria H-7 del sistema acetálico.

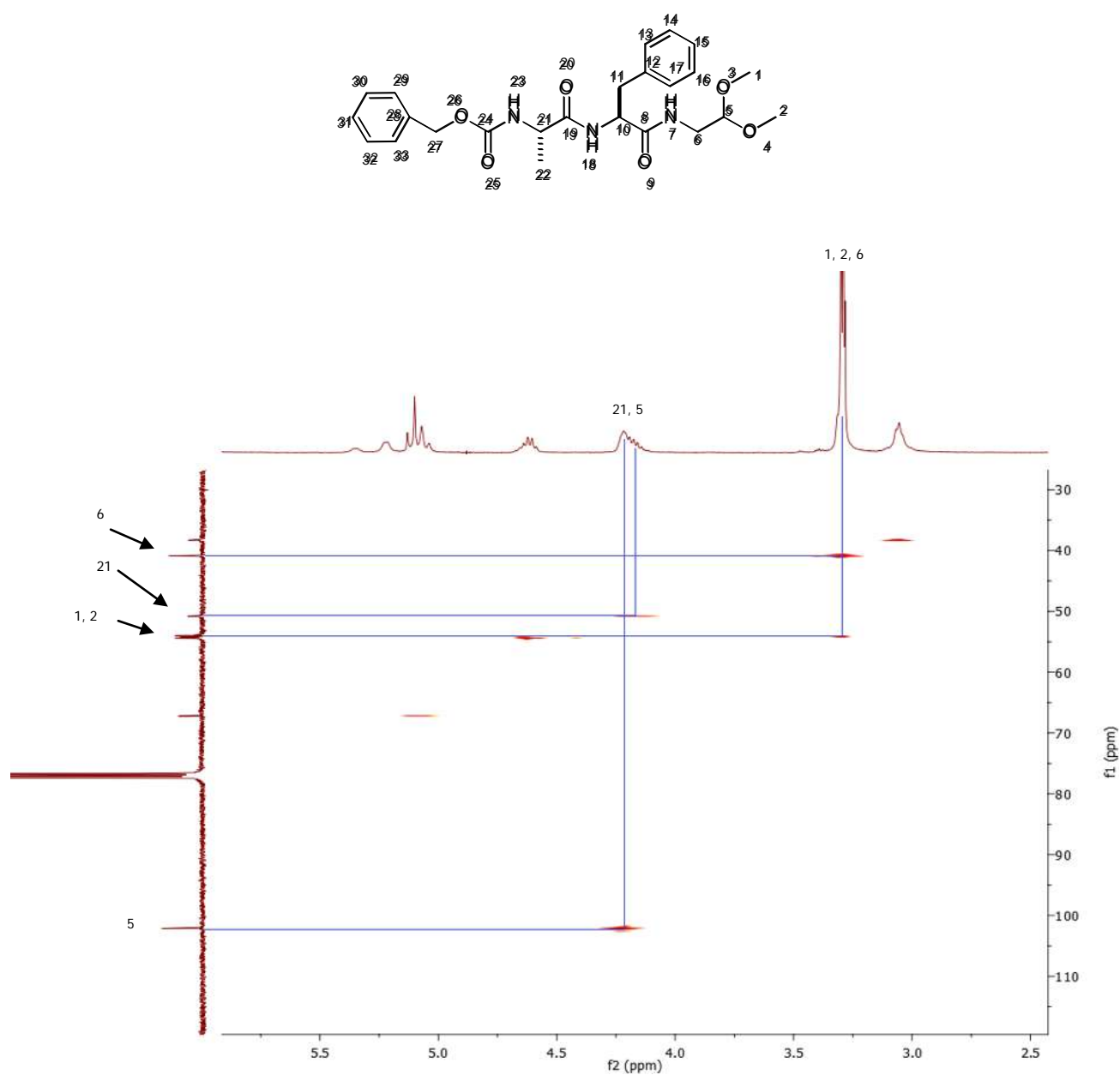
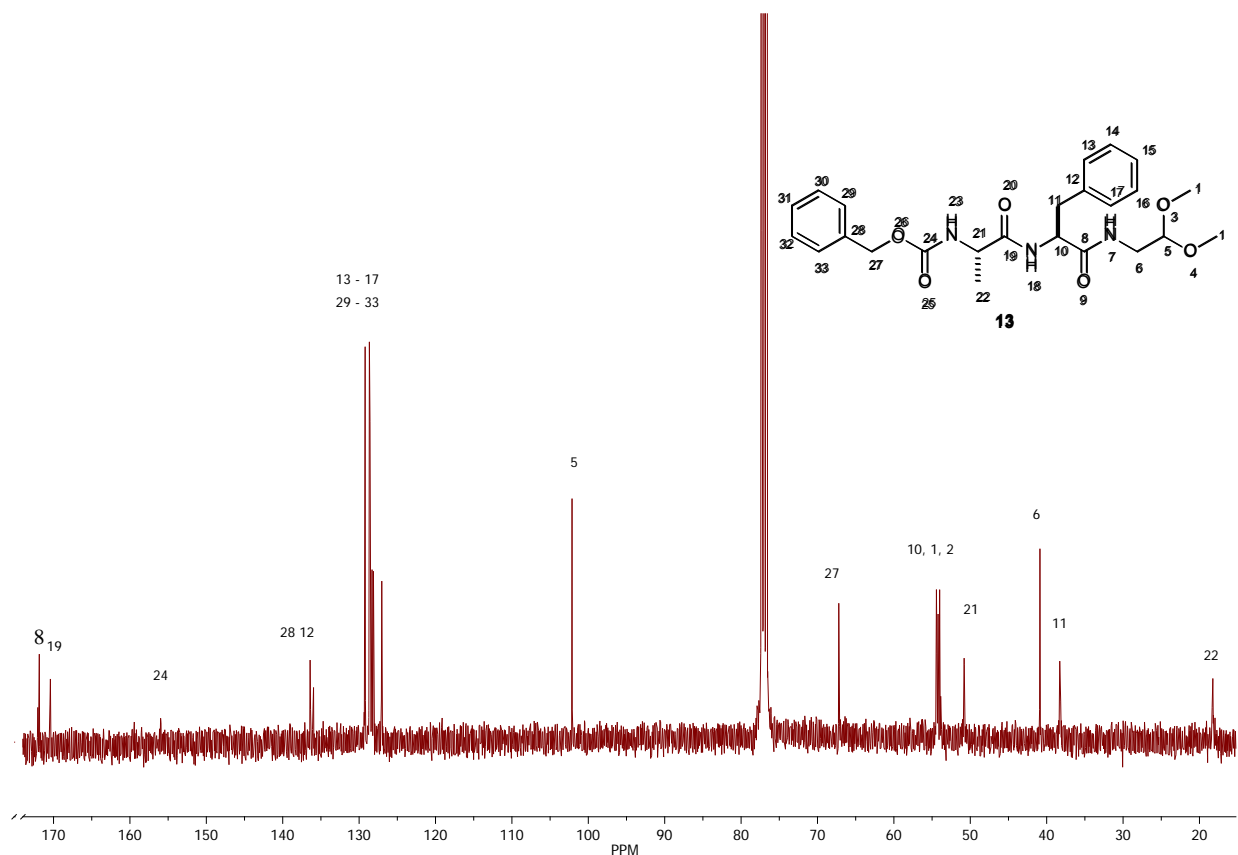


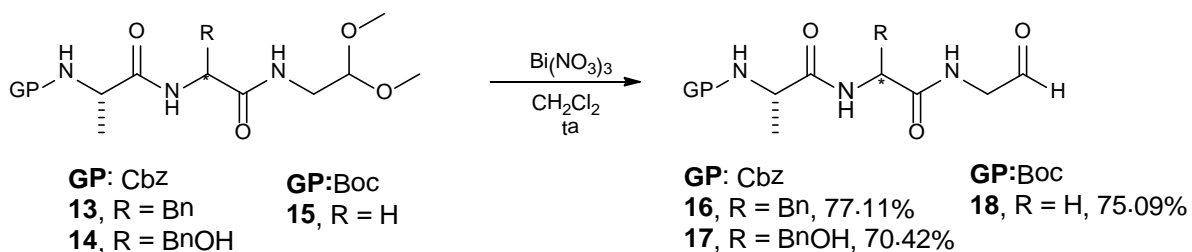
Figura 18. Ampliación del espectro HETCOR del compuesto 13



**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **13**

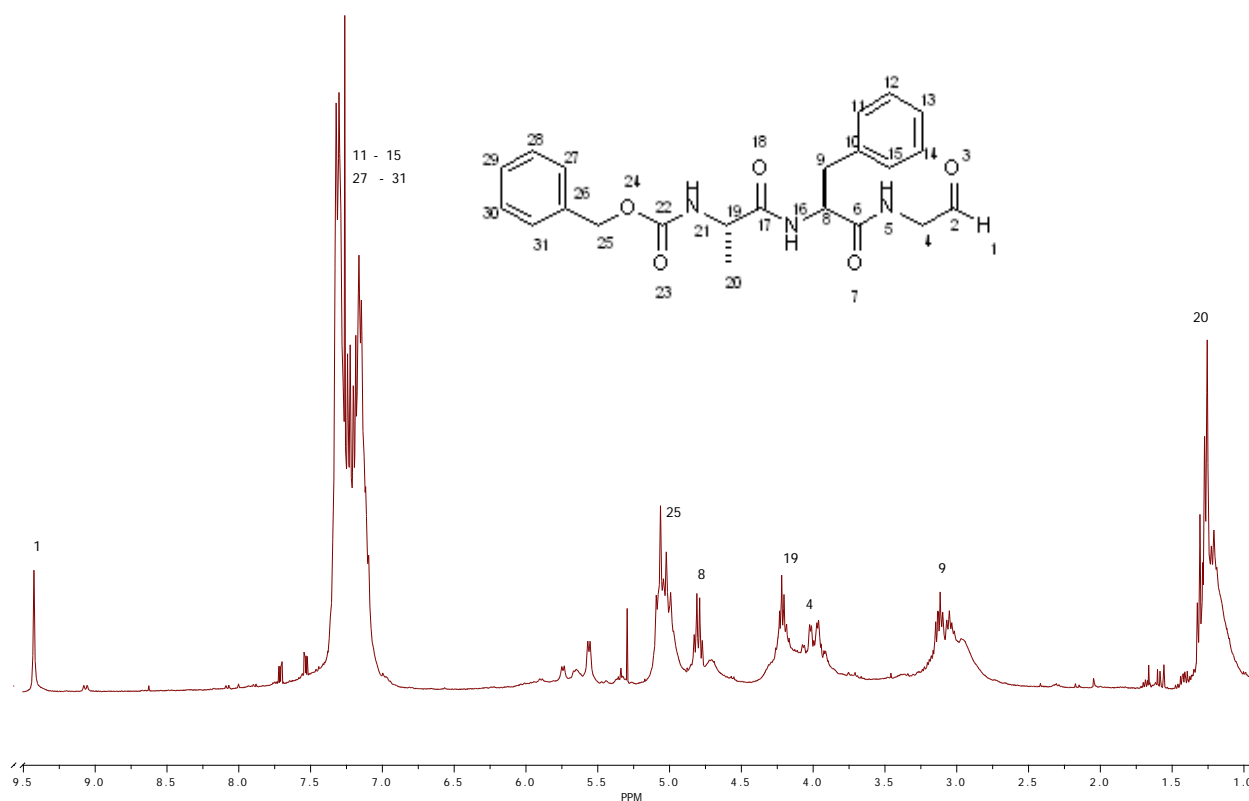
En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la Figura 19 se observan, en 18.25 ppm la señal del metilo de la alanina C-22; en 38.29 ppm la señal del metileno C-11; en 50.81 ppm la señal del metino C-21; 54.01 ppm la señal del metino C-10; en 67.21 ppm la señal del metileno del Cbz C-27; así como de 127.05 a 129.22 ppm se aprecian las señales de los carbonos aromáticos tanto del grupo Cbz C-29 a C-33, como de la fenilalanina C-13 a C-17. Se observan también las señales de los carbonos cuaternarios, *ipso* C-12 y C-28 en 135.98 y 136.43 ppm, respectivamente y los carbonilos C-24, C-19 y C-8, en 156.00, 170.42 y 171.88 ppm, respectivamente, así como las señales correspondientes al nuevo fragmento agregado a la molécula, siendo en 54.44 ppm las señales de los carbonos metilos del acetal C-1 y C-2; en 40.89 ppm el metileno C-6; y en 102.14 ppm el metino base de acetal C-5.

Una vez formados los compuestos **13**, **14** y **15**, el siguiente paso en la ruta sintética consistió en la desprotección del aldehído por medio de una reacción de oxidación. Para lograr esto, y debido al hecho de que los oxidantes fuertes tienden a generar subproductos de reacción, se buscaron condiciones que fueran suaves y evitar o disminuir al máximo reacciones colaterales. En este contexto, la forma óptima de llevar a cabo la reacción fue de acuerdo a la técnica descrita por Bothwell Jason M. *et. al.*, quienes reportaron que las sales de bismuto reaccionan eficientemente y en condiciones suaves de reacción en la oxidación de acetales a aldehídos.<sup>47</sup> Así, se llevó a cabo la reacción de oxidación de los compuestos **13**, **14** y **15** como se muestra en el esquema 7, utilizando Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> como agente oxidante y diclorometano como disolvente. La reacción fue monitorizada por TLC utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina como revelador.



**Esquema 7.** Oxidación de los acetales **13**, **14** y **15**.

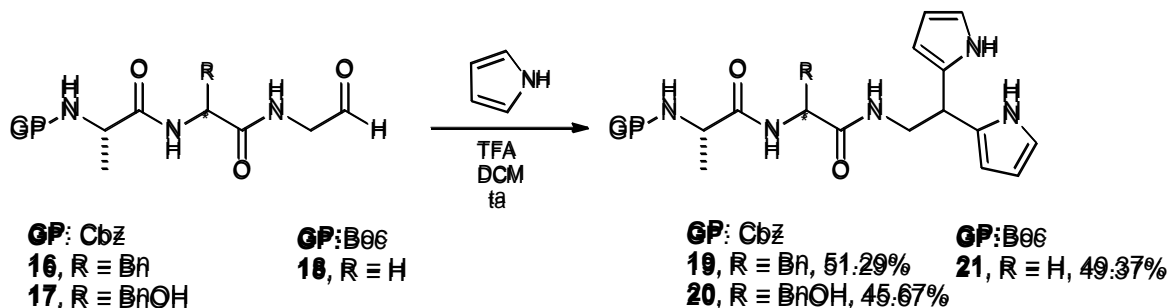
Es importante resaltar que la purificación de los derivados aldehídicos obtenidos resultó complicada, es decir, que al tratar de purificar el crudo de reacción, el producto fue inestable. Por este motivo y dado que el crudo de reacción mostró un producto con pocas impurezas, se decidió continuar la ruta de síntesis utilizando el crudo de reacción, como ha sido descrito en trabajos anteriores<sup>46</sup>. La prevalencia del aldehído en el crudo de reacción se confirmó por RMN de <sup>1</sup>H (Figura 20).



**Figura 20.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto **16**.

Las características más importantes de este espectro se observan a campo bajo en 9.43 ppm donde se observa una señal simple correspondiente al hidrógeno del aldehído formado H-1 y la desaparición en 3.29 ppm de la señal simple de los metoxilos del sistema acetálico del compuesto precursor. Las demás señales que se observan en el espectro son las señales correspondientes al resto de la molécula, es decir, el fragmento peptídico, en 1.26 ppm se observa la señal doble correspondiente a H-20; en 3.09 ppm la señal múltiple de los hidrógenos diastereotópicos H-9; en 3.95 y 4.04 ppm una señal doble de dobles correspondiente al metileno H-4; en 4.20 ppm la señal del metino base de alanina H-19; en 4.80 ppm una señal doble de dobles del metino base de fenilalanina H-8; en 5.06 ppm la señal correspondiente al metileno de Cbz H-25; y finalmente de 6.97 a 7.50 ppm las señales H-11 a H-15 y H-27 a H-31 de los sistemas aromáticos del grupo Cbz y la fenilalanina.

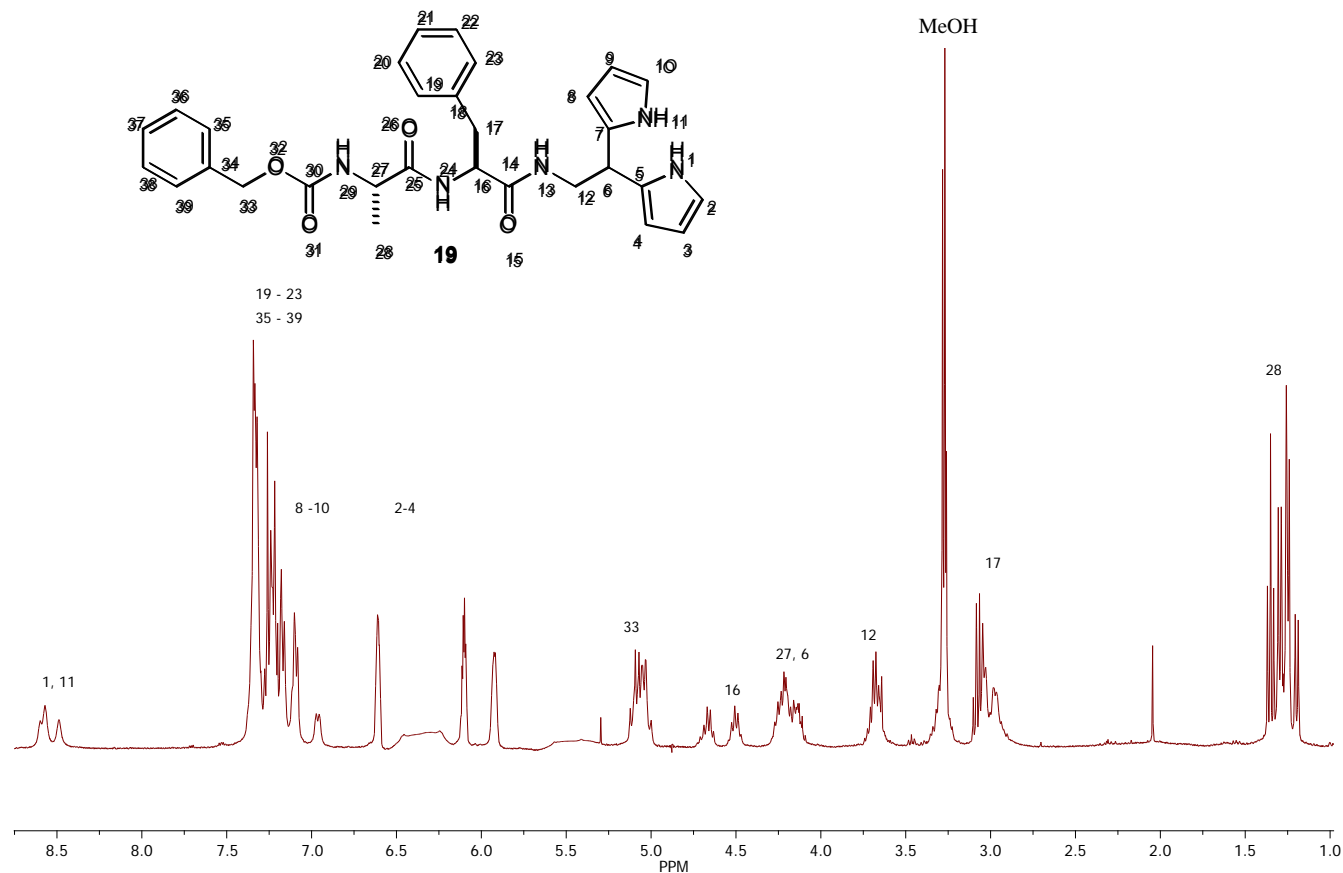
Una vez obtenidos los correspondientes aldehídos, el siguiente paso en la síntesis fue la condensación con el pirrol para formar el sistema dipirrólico. Este tipo de reacciones pueden llegar a presentar el inconveniente de la tetramerización, es decir la formación del porfirinógeno, sobre todo cuando se utiliza pirrol  $\beta$ -insustituído durante la conjugación. Para evitar esto, Sobral Abílio J. F. N. *et al.* (2003),<sup>48</sup> describieron una metodología eficiente para la síntesis de dipirroles, con moderados rendimientos, utilizando métodos basados en la condensación entre aldehídos y pirrol usando como catalizadores ácidos orgánicos e inorgánicos fuertes (por ejemplo TFA, HCl), a temperatura ambiente, por lo que adecuando estas condiciones de reacción a nuestros compuestos en particular, los aldehídos **16**, **17** y **18** fueron sometidos a la reacción de condensación utilizando pirrol y TFA como catalizador en DCM como disolvente, como se representa en el Esquema 8. Se obtuvieron los compuestos **19**, **20** y **21** en moderados rendimientos después de haber sido purificados en placa preparativa de gel de sílice, utilizando como sistema eluyente mezclas de Hex-AcOEt (1:1) para **19**, Hex-AcOEt (2:3) para **20** y Hex-AcOEt (3:7) para **21**.



**Esquema 8.** Obtención de los dipirroles **19**, **20** y **21**.

Al analizar el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el compuesto **19** (Figura 21) se observó que en el sistema dipirrólico los protones de uno de los pirroles del sistema eran química y magnéticamente diferentes a los del otro pirrol, esto es de considerarse, ya que normalmente este tipo de sistemas presentan alta equivalencia en el sistema dipirrólico, resultando extraño que no fuera así en este caso. Este hecho, en una primera explicación, se pensó que se trataba del sistema aromatizado, ya que siendo así, se explicaría la clara diferencia

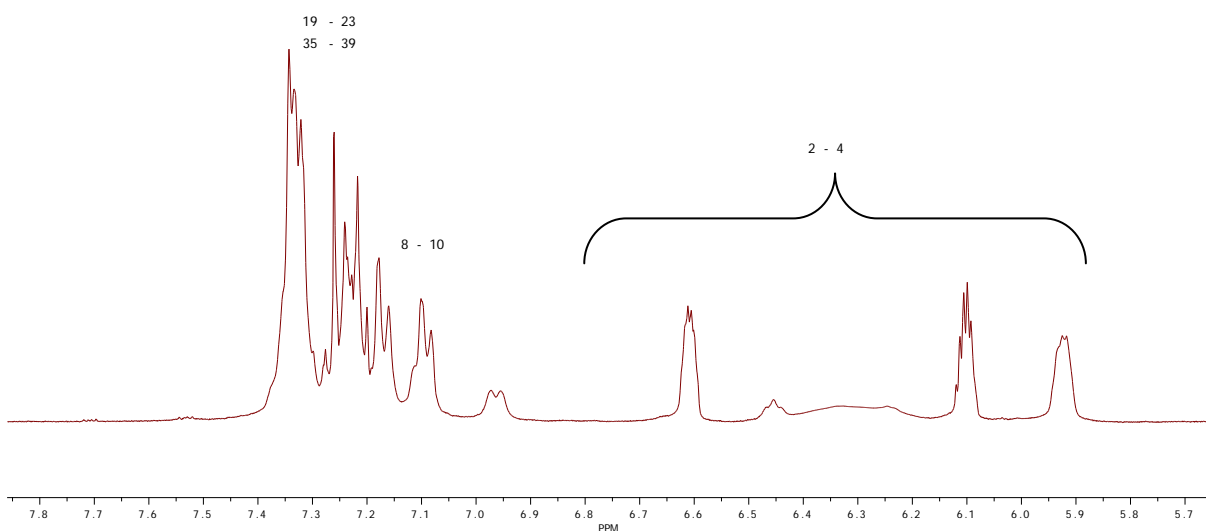
electromagnética de ambas partes del sistema dipirrólico, dado que las integrales que correspondían al sistema no concordaban, siendo que cada señal del sistema dipirrólico solo integraba para una señal y no para dos como se esperaba, teniendo también otras señales cercanas al sistema aromático del Cbz y la fenilalanina, que correspondían al otro fragmento dipirrol. Al analizar detalladamente los espectros COSY (Figura 26), HETCOR (Figura 27) DEPT (Figura 28) y  $^{13}\text{C}$  (Figura 29) permitió asignar todas las señales, así como observar las peculiaridades en el comportamiento de los *N*-H's de cada dipirrol, se observó que se contaba con el sistema no aromático, y que en su lugar, las características del espectro correspondían a otro tipo de interacciones. Por otro lado, el hecho de que existieran dos señales para los *N*-H's dipirrólicos y su comportamiento, dio la pauta para corroborar tanto la presencia del sistema como las interacciones atípicas que se estaban presentando. Cabe resaltar que este tipo de estructuras, es decir, péptidos y aminoácidos acoplados a sistemas dipirrólicos, no habían sido anteriormente descritas, dándonos la primicia y complejidad a la vez al interpretar los espectros derivados de estos sistemas, su comportamiento y el tipo de interacciones que de estas nuevas estructuras pudieran derivar.



**Figura 21.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **19**.

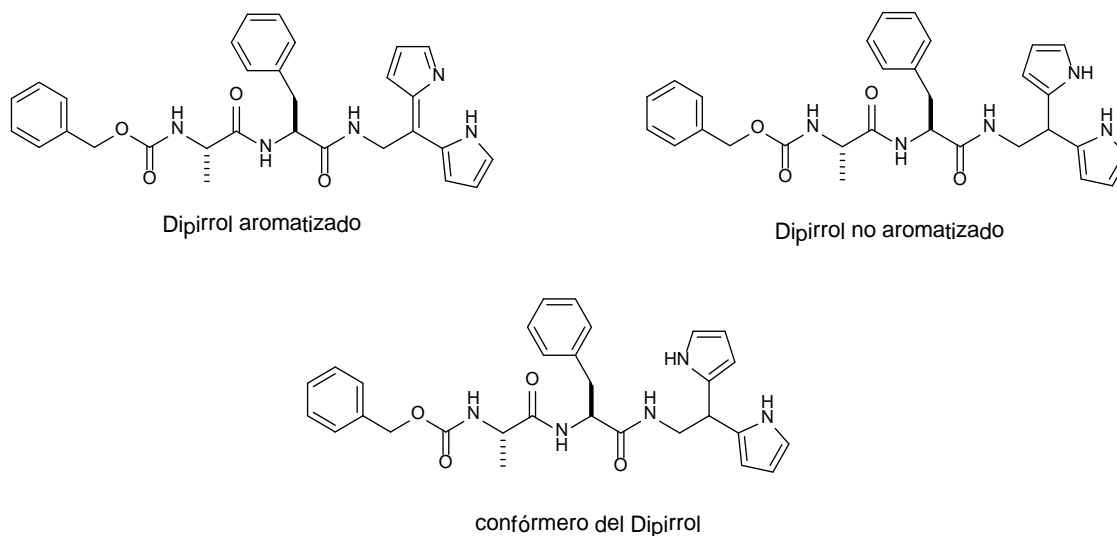
En el espectro ilustrado en la figura 21, se pueden identificar las señales correspondientes al compuesto **19**. En 1.30 ppm se encuentra un sistema de señales dobles que corresponde al metilo de la alanina H-27, las cuales se observan debido a la presencia de confórmeros; en 3.02 ppm el sistema que incluye los hidrógenos diastereotópicos H-17 del metileno de la fenilalanina; en 3.68 ppm la señal del metileno H-12; en 4.19 ppm la señal H-28 que corresponde al hidrógeno del metino base de metilo de la alanina; y en 4.59 ppm la señal de H-16, metino base de bencilo de la fenilalanina. En 5.06 ppm la señal característica del metileno del Cbz H-32; y en la región de los aromáticos (de 7.23 a 7.43 ppm) las señales H-19 a H-23 y H-35 a H-39, que corresponden al sistema aromático de la fenilalanina y del grupo Cbz, respectivamente. Lo interesante de este espectro sucede a campo bajo, en las señales que aparecen desde 5.93 ppm hasta 8.58 ppm y que se pueden observar más

claramente en la expansión del espectro que se muestra en la Figura 22, donde en primer lugar, se puede observar un sistema de señales localizadas en 5.93 ppm, 6.11 ppm, 6.61 ppm, que corresponden a H-2, H-3, H-4; y de 6.96 a 7.21 ppm los hidrógenos H-8, H-9, H-10; de 7.23 a 7.43 ppm las señales de los sistemas aromáticos H-19 a 23 y H- 35 a 39 de la fenilalanina y el grupo Cbz, respectivamente; de igual manera, en 8.49 y 8.58 ppm se encuentran las señales para H-1 y H-11 y que por la integral, multiplicidad y desplazamiento, indican claramente la presencia del sistema dipirrólico, siendo las señales en 5.93, 6.11 y 6.61 ppm las señales características de este tipo de sistemas (integrando cada señal para un protón), el cual era el compuesto deseado, pero la integral no correspondía, ya que al ser solo para un protón y no para dos, como es característico en este tipo de sistemas, dio lugar a pensar que entonces las características de los residuos pirrol eran diferentes, es decir que se encontraban en diferente situación química y magnética, y que entonces las señales de uno de los pirroles eran las señales de 6.96 a 7.21 ppm (las cuales concordaban en cuanto a la integral), indicando un comportamiento particular y anómalo en este tipo de sistemas, lo cual pudiera ser indicativo de un sistema tipo porfirina, es decir, aromatzado, que era de esperarse ya que los hidrógenos de la posición *meso* de este tipo de complejos tienden a la aromatzación, es decir, son fácilmente oxidables, dando lugar a la conjugación del sistema  $\pi$  a lo largo del fragmento dipirrólico, oxidando el carbono *meso* de configuración  $sp^3$  a  $sp^2$ . Sin embargo, la idea del sistema aromatzado fue descartada ya que de haberlo sido el carbono *meso* no presentaría señal en el espectro de protón, lo cual sucede, ya que, traslapadas en 4.19 ppm con H-27, encontramos al protón H-6 el cual corresponde al metino base de dipirrol, es decir, al carbono *meso* mono hidrogenado indicativo de que el sistema no está aromatzado. Asimismo se observa a campo alto la señal del metileno base de dipirrol H-12 en 3.68 ppm. Por otro lado se tiene, en 8.49 y 8.58 ppm, dos señales que corresponden a los *N*-H's del dipirrol H-1 y H-11, demostrando una vez más la no equivalencia química del sistema.



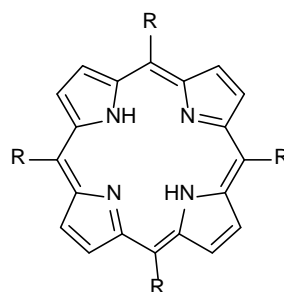
**Figura 22.** Expansión del espectro de  $^1\text{H}$  del compuesto **19**.

Esto indica entonces que el sistema se encontraba en diferente ambiente químico para cada pirrol, pero no aromatzado, siendo entonces la presencia de un confórmero (Figura 23) de manera tal que la disposición espacial de los dos pirroles del sistema fuera diferente, atribuyéndole entonces ambientes químicos diferentes a cada protón.



**Figura 23.** Estructuras del dipirrol aromatizado y de dos confórmeros.

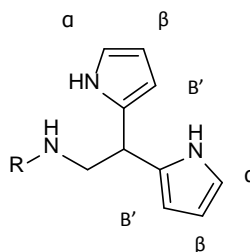
En el caso de que se hubiera obtenido la porfirina (Figura 24) o algún derivado policíclico porfirinógeno, el patrón de señales debería ser por un lado completamente diferente, dadas las interacciones y diferencias que existen dentro del sistema, esperado dos dobletes para cada pirriol, además de que por el tamaño y disposición espacial de la molécula sería difícil que a su vez formaran otro tipo de interacciones no covalentes.



**Figura 24.** Estructura general de una porfirina.

Por otro lado, también se descarta la posibilidad de que sea pirrol sin reaccionar, por el número de señales y nuevamente la integral y el desplazamiento, ya que las señales de pirrol son características y se ubican en 6.2 y 6.8 ppm. Un dato adicional que confirma la presencia del sistema dipirrólico desacoplado es que se observan seis señales, de las cuales dos señales

corresponden a los hidrógenos  $\alpha$ , dos señales que integran para los hidrógenos  $\beta$  y dos más para los hidrógenos  $\beta'$  de cada residuo pirrol (Figura 25), las cuales fueron asignadas, pero como se puede observar la ampliación de espectro en la Figura 22, no son equivalentes en el sistema dipirrólico, de serlo solo se observarían tres señales que integrarían cada una para dos hidrógenos de acuerdo a las características de la molécula.



**Figura 25.** Sistema de hidrógenos del dipirrol.

Por otra parte, al analizar el espectro de RMN de correlación homonuclear COSY (Figura 26), se puede observar las correlaciones entre hidrógenos vecinales del compuesto **19**, corroborando la existencia de correlación entre los hidrógenos H-6 y H-12, respectivamente, el H-6 corresponde al metino de la posición *meso* del sistema dipirrólico, el cual, de contar con el sistema aromatizado, no debería observarse. Se observan también las correlaciones entre los hidrógenos del dipirrol H-2, H-3 y H-4, que presentan correlación entre ellas y que las señales de los hidrógenos H-8, H-9 y H-10 no coinciden con las señales clásicas (que serían las correspondientes a H-1 a H-4).

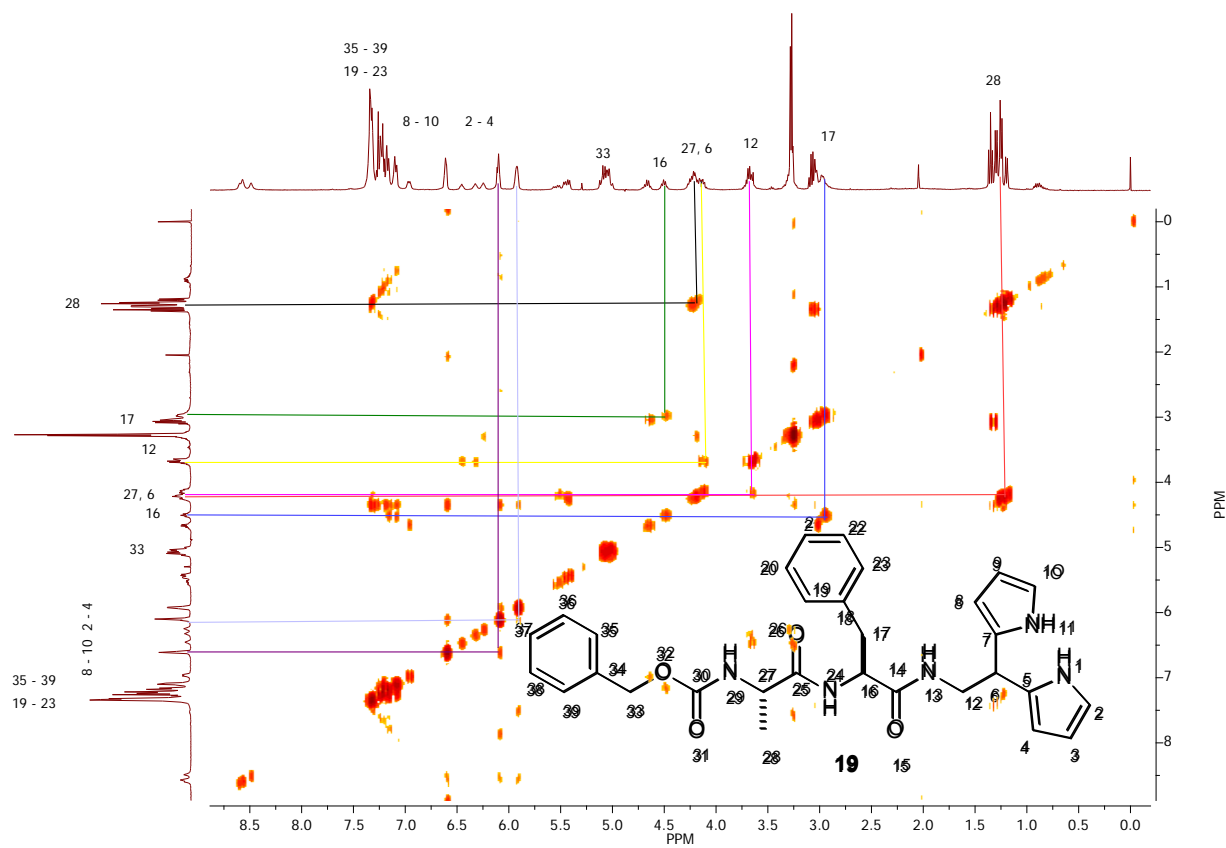


Figura 26. Espectro COSY del compuesto **19**.

Para corroborar que las señales asignadas a H-6 y H-12 correspondieran al metino y metileno del sistema dipirrólico se analizaron los espectros HETCOR y DEPT (Figuras 27 y 28).

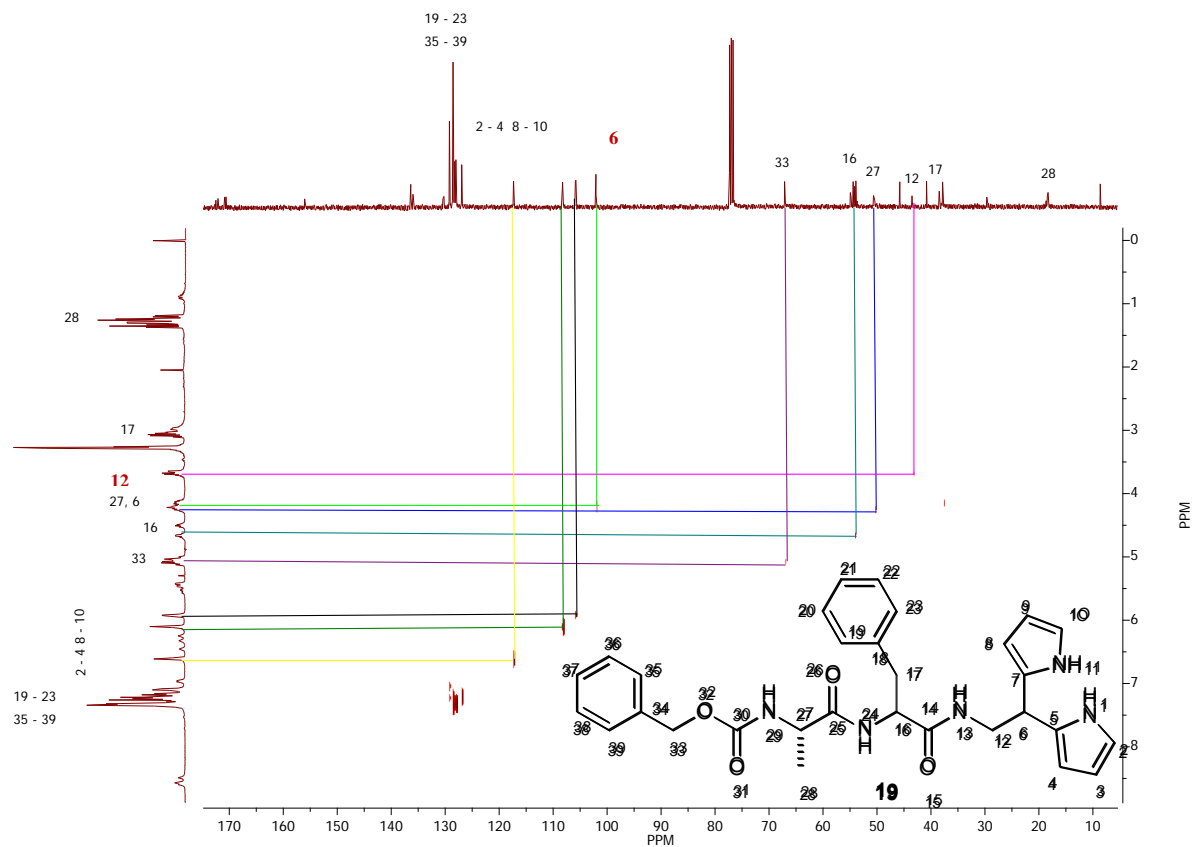
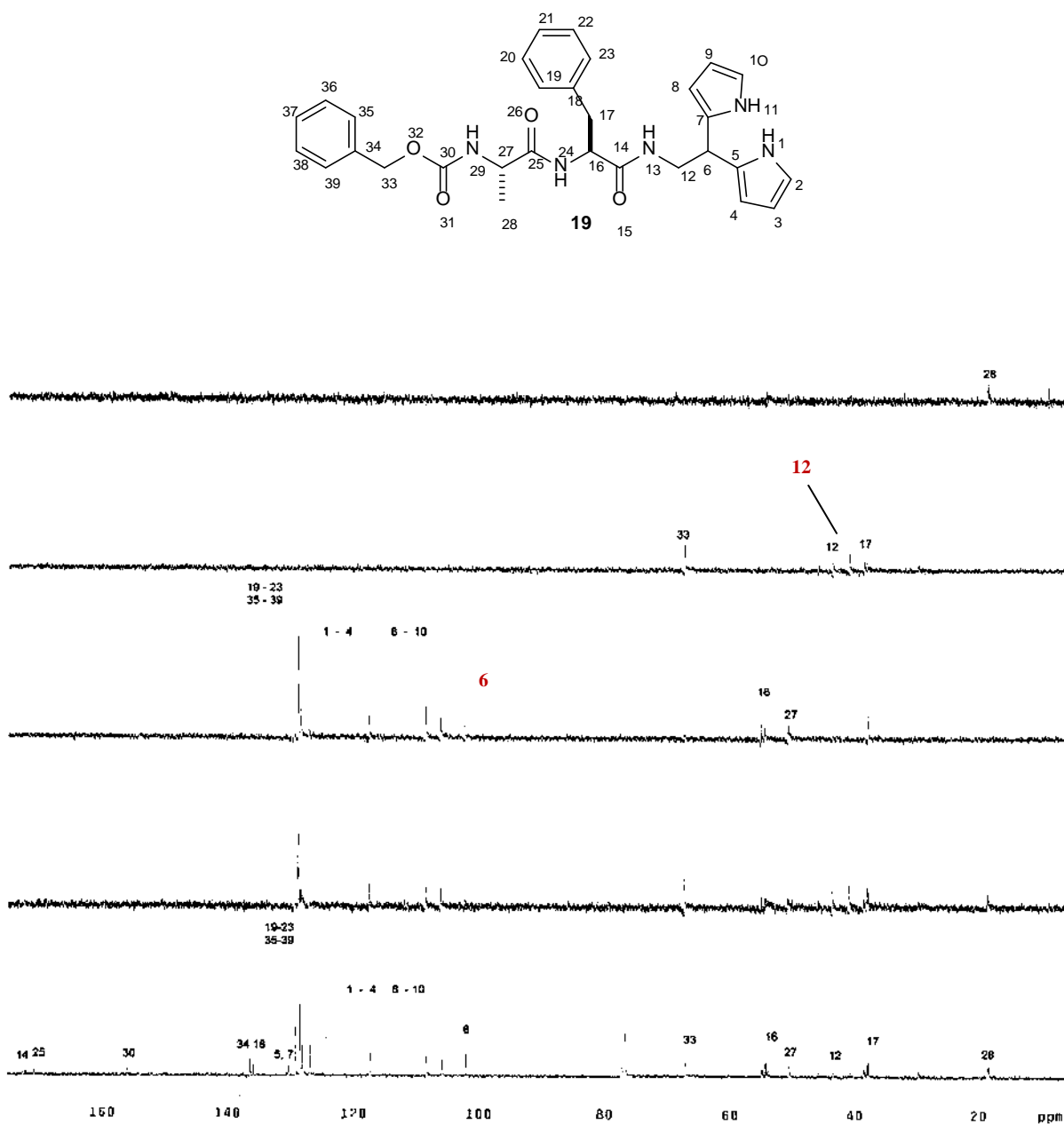


Figura 27. Espectro HETCOR del compuesto 19.



**Figura 28.** Espectro DEPT del compuesto **19**.

En el espectro HETCOR (Figura 27) se observa una correlación entre la señal asignada como H-6 y el y la señal en el espectro de carbono en 102.08 ppm asignada entonces como C-6, el cual es asignado en el espectro DEPT como un metino (Figura 28) y la correlación entre H-12 y la señal en el espectro de  $^{13}\text{C}$  en 43.53 ppm designada entonces como C-12 y que

corresponde a un carbono metilénico. El resto de las señales corresponden al fragmento peptídico.

En la Figura 29 se observan las señales de carbono del compuesto **19**, en 18.31 ppm la señal que corresponde al metilo C-28 de la alanina; en 37.84 ppm la señal del metileno C-17 de la fenilalanina; en 43.53 ppm la señal del metileno C-12 del fragmento dipirrol; en 50.64 ppm al C-27 metino base de alanina; y en 53.91 ppm el metino base de fenilalanina C-16; en 67.12 ppm se encuentra el metileno de Cbz C-33. En 102.08 ppm encontramos al carbono que corresponde al metino de la posición *meso* C-6; de 105.79 a 117.35 ppm el sistema de señales del dipirrol C-2 a C-4 y C-8 a C-10; de 128.03 a 129.24 ppm encontramos los sistemas aromáticos del grupo Cbz C-35 a C-39, y de la fenilalanina C-19 a C-23. En 130.25 y 130.43 ppm encontramos a los carbonos *ípro* del dipirrol C-5 y C-7; en 135.94 ppm el carbono *ípro* de la fenilalanina C-18; en 136.40 el carbono *ípro* del Cbz C-34; finalmente en 156.04, 170.87 y 177.052 ppm los carbonos carbonílicos C-30, C-25 y C-14, respectivamente.

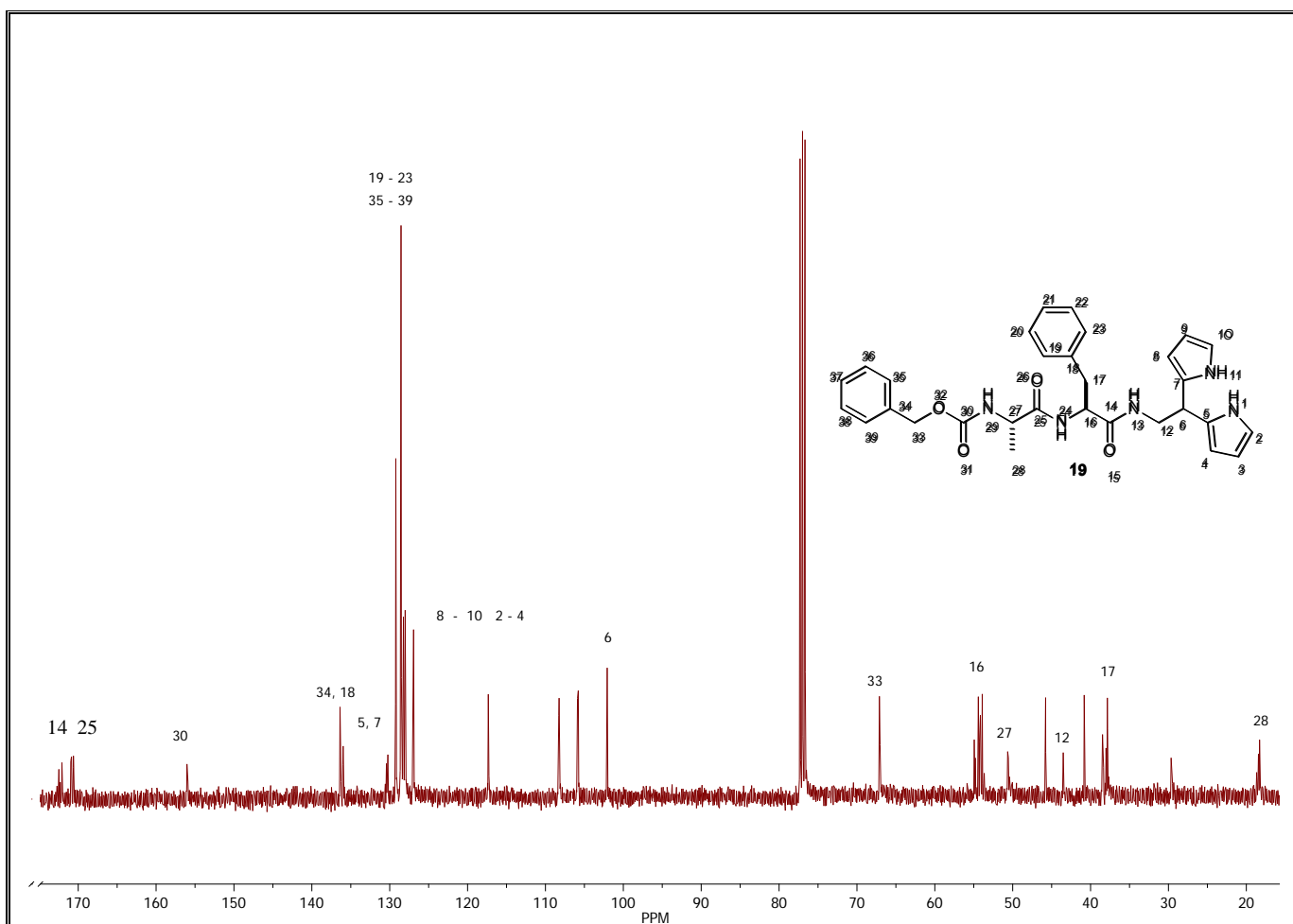
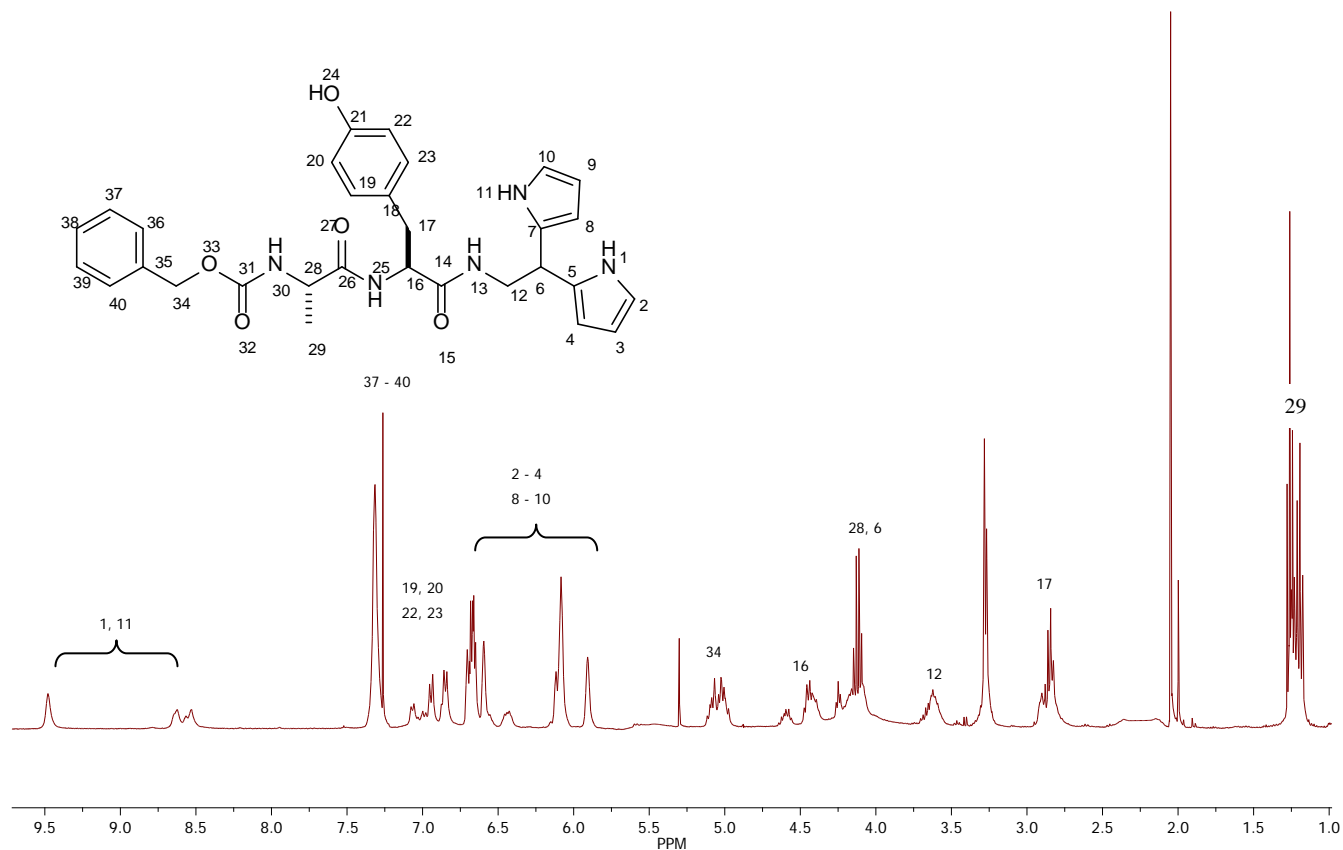


Figura 29. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **19**.

Una vez asignadas las señales del espectro del compuesto **19**, tomando en cuenta las consideraciones propias de la molécula y el comportamiento atípico que se estaba presentando, dando lugar al desdoblamiento de las señales anteriormente explicadas, la elucidación del compuesto **20** resultó sencilla y de igual forma se lograron identificar, asignar y correlacionar todas las señales correspondientes, observándose también el patrón de señales no típicas para el sistema dipirrólico dando no equivalencias entre sus átomos y la presencia de confórmeros.

A continuación, en la Figura 30 se presentan el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **20**.

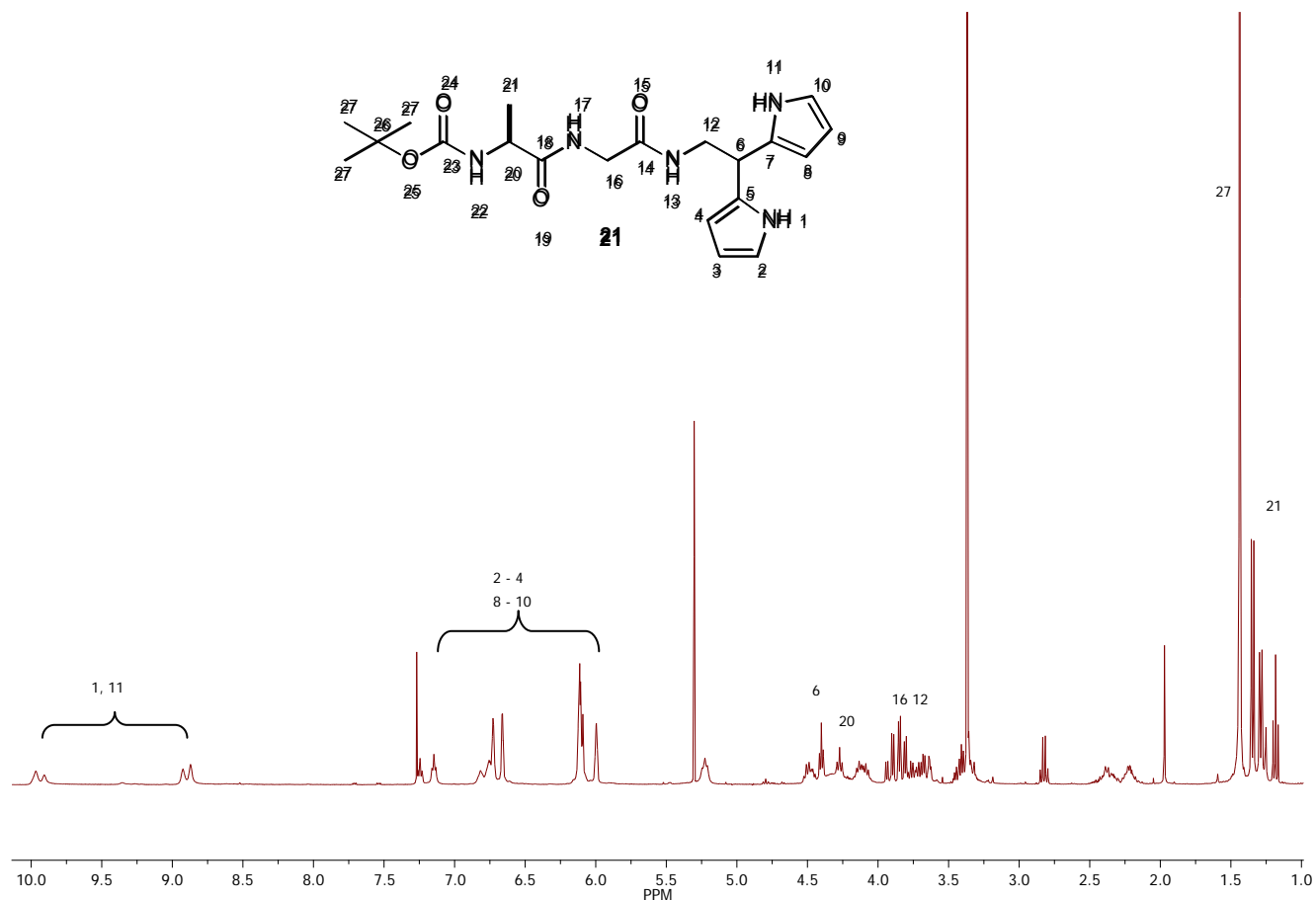


**Figura 30.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **20**.

Para el caso del compuesto **20**, en el espectro se observan las señales, en 1.20 ppm una señal doble que corresponde al metilo de la alanina H-29 que de igual manera se observa la presencia de confórmeros; en 2.88 ppm una señal doble que corresponde al metileno de la tirosina H-17; en 3.66 ppm la señal del metileno del fragmento dipirrol H-12; en 4.17 ppm encuentran traslapadas las señales H-28 del metino base de alanina y H-6 del metino de la posición *meso*. En 4.44 ppm se observa la señal H-16 del metino base de tirosina; y en 5.05 ppm la señal del metileno de Cbz H-34. Ubicadas de 5.91 a 6.68 ppm, se encuentra el patrón de señales del sistema dipirrólico H-2 a H-4 y H-8 a H-10; en 6.85 y 6.94 se encuentran los sistemas de señales dobles características de la sustitución *-para* de la tirosina, H-19, H-20, H-22 y H-23; y en 7.31 la señal que corresponde a los hidrógenos aromáticos del Cbz H-37 a H-40. En este espectro se puede observar más claramente la diferencia que existe entre los

hidrógenos *N*-H's del sistema dipirrólico, encontrando una de las señales en el desplazamiento esperado en 8.57 ppm, sin embargo podemos observar que la otra señal se encuentra más desplazada a campo bajo en 9.48 ppm lo cual resultó interesante, exponiendo que estos se encontraban formando, no solo confórmeros, si no también algún tipo de interacciones intramoleculares e intermoleculares, ya que la diferencia electromagnética era aún más evidente por el tipo de interacciones que se estaban presentando.

En el caso del compuesto **21**, es necesario detallar las características de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones particulares, ya que en este compuesto el grupo *N*-protector es diferente al de los compuestos anteriores, lo cual varía las características generales de las señales observadas en estos espectros. En la Figura 31 se representa el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **21**.

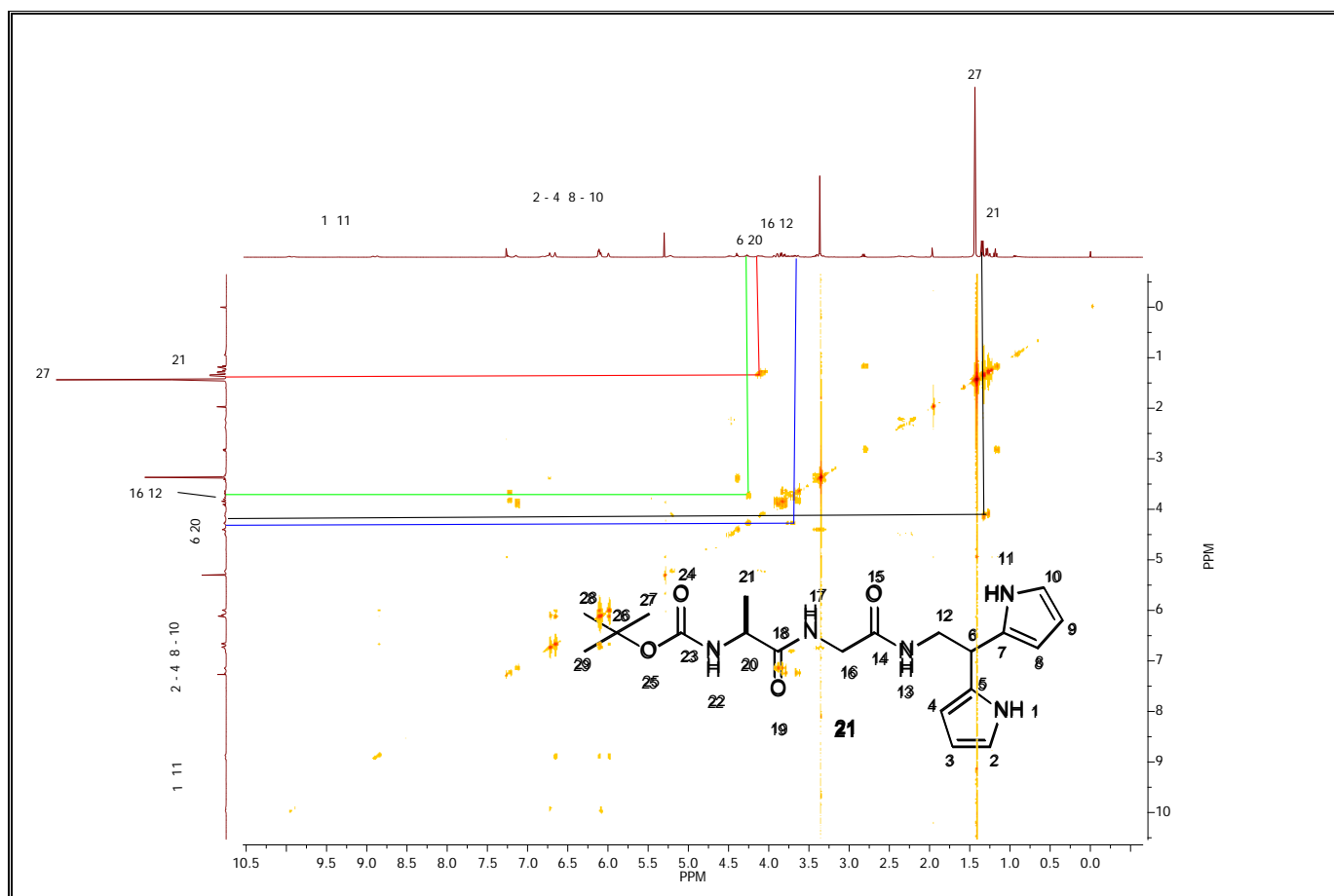


**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **21**.

En el espectro arriba esquematizado, se observa, en 1.35 ppm una señal doble que corresponde al metilo de la alanina H-21; en 1.44 una señal simple intensa que corresponde a los metilos H-27 del terbutilo del grupo protector Boc; en 3.67 ppm la señal correspondiente al metileno H-12 del fragmento dipirrolíco; en 3.83 y 3.92 ppm dos señales doble de dobles del metileno de la Glicina H-16; en 4.11 ppm la señal correspondiente al metino base de alanina H-20; y en 4.39 ppm la señal del metino de la posición *meso* H-6, descartando la posibilidad del sistema aromatizado. De nueva cuenta a campo bajo (de 6.00 a 6.72 ppm) se encuentran las señales del sistema dipirrólico, que nuevamente comprobamos se encuentran en diferente ambiente químico y electromagnético, y que ante la ausencia de protones de naturaleza aromática provenientes de las cadenas laterales o del grupo protector como en los compuestos anteriores, puede ser observada más claramente las señales del sistema

dipirrólico. En campo bajo, encontramos, en 8.90 y 9.94 ppm, nuevamente un desplazamiento anómalo para los hidrógenos H-1 y H-11, correspondientes a los *N*-H's del dipirrol, demostrando una vez más la no equivalencia del sistema por la presencia de conformeros e interacciones inter e intramoleculares. La asignación de las señales se logró gracias a la ayuda de la espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en dos dimensiones COSY (Figura 32) y HETCOR (Figura 33).

En el espectro COSY de la Figura 32 se observan las correlaciones entre protones vecinales del compuesto **21**. Se muestra que el H-21 metilo de la alanina correlaciona con el H-20, metino base de alanina, y el H-12, metileno del sistema dipirrol correlaciona con el H-6 metino de la posición *meso*, los H-27 y H-16 correspondientes a los metilos del terbutilo del Boc y al metileno de la glicina respectivamente, no presentan correlación con alguna otra señal en el espectro.



**Figura 32.** Experimento COSY del compuesto **21**.

El espectro de correlación heteronuclear HETCOR, mostrado en la Figura 33, se observan claramente las correlaciones entre las señales H-6 y la señal de  $^{13}\text{C}$  en 102.21 ppm asignada como C-6, y la correlación de H-12 con la señal en 43.55 ppm C-12, correspondientes al sistema dipirrólico, y en el espectro DEPT (Figura 34) se observa que C-6 (102.21 ppm) es el metino en la posición *meso* y el C-12 (43.55 ppm) es un metileno, indicándonos que en este compuesto tampoco se encuentra aromatzado este fragmento.

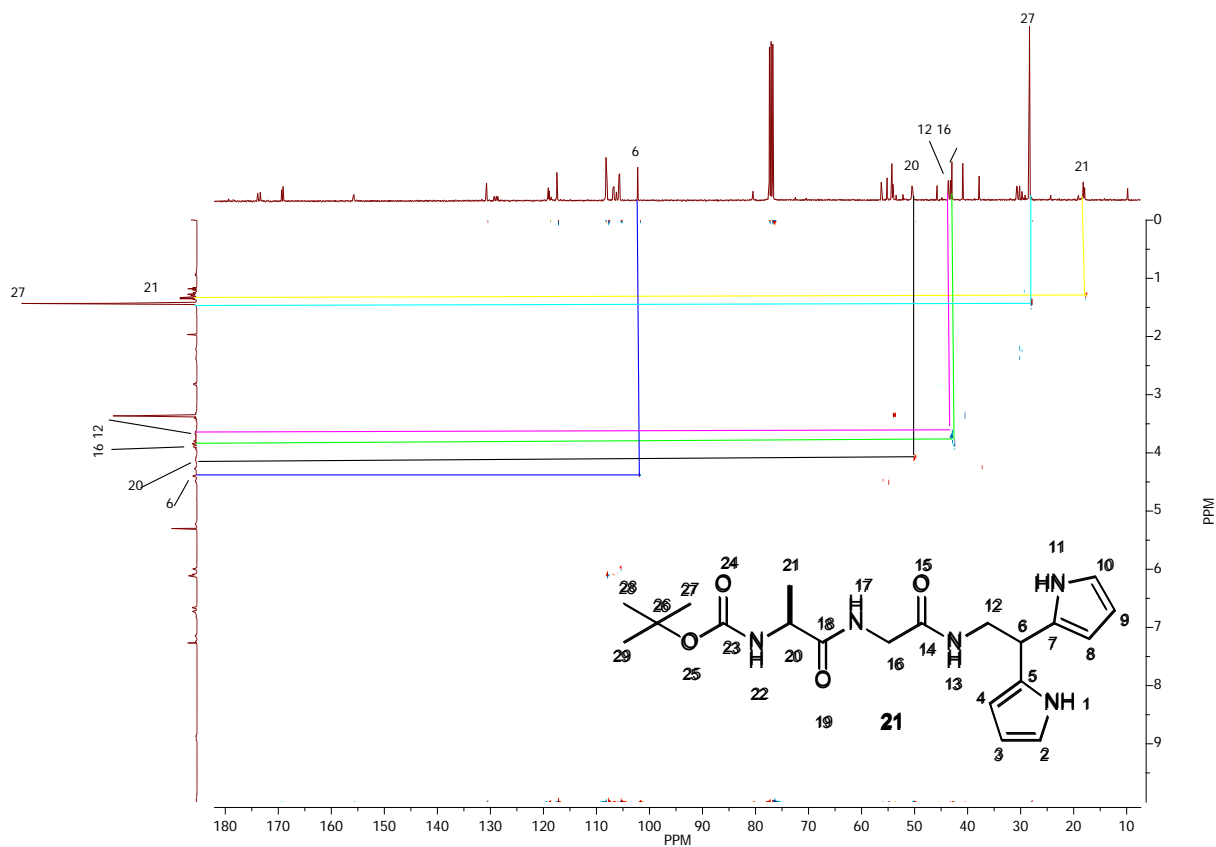
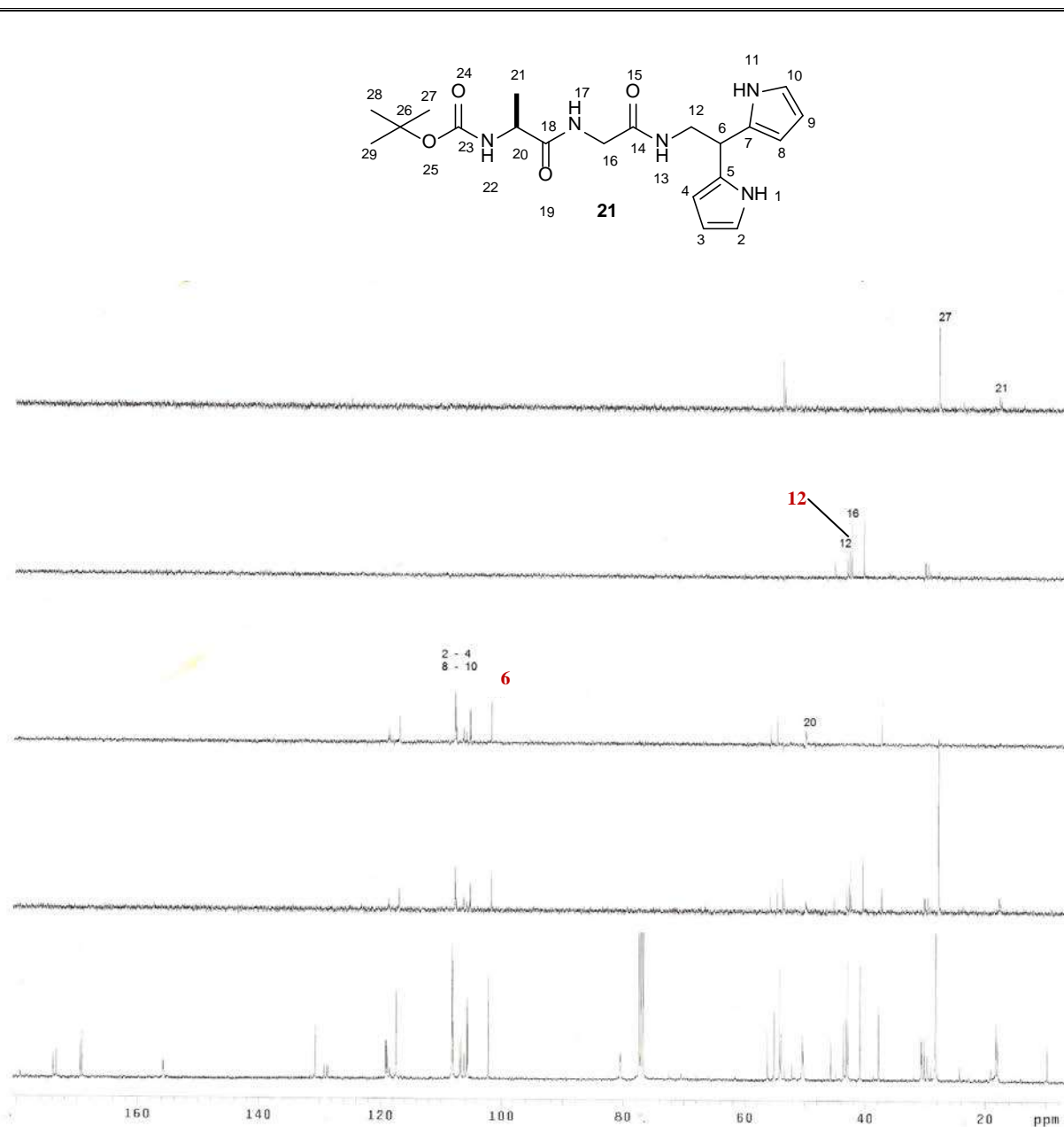


Figura 33. Experimento HETCOR del compuesto 21.



**Figura 34.** Experimento DEPT para el compuesto **21**.

Una vez obtenida la información de estos experimentos, fue posible entonces asignar inequívocamente el espectro de RMN de Carbono 13 (Figura 35).

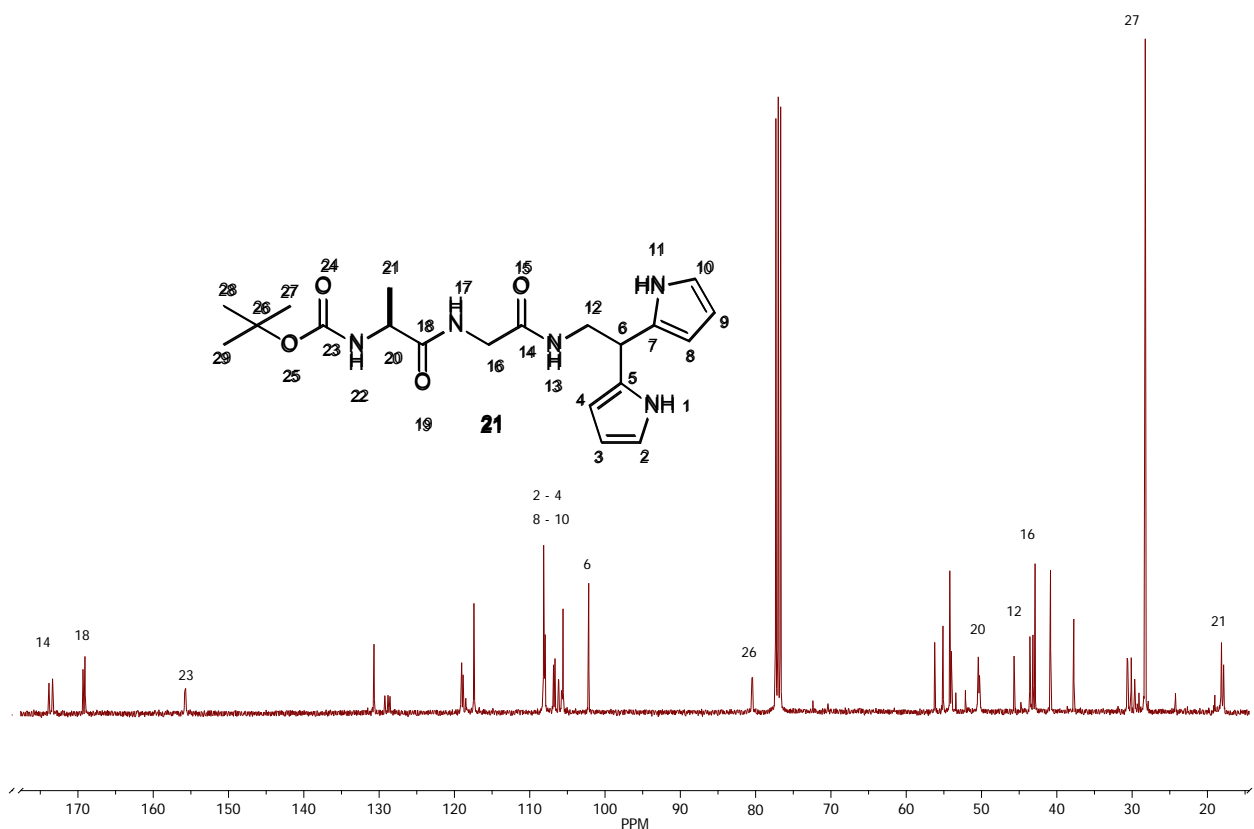
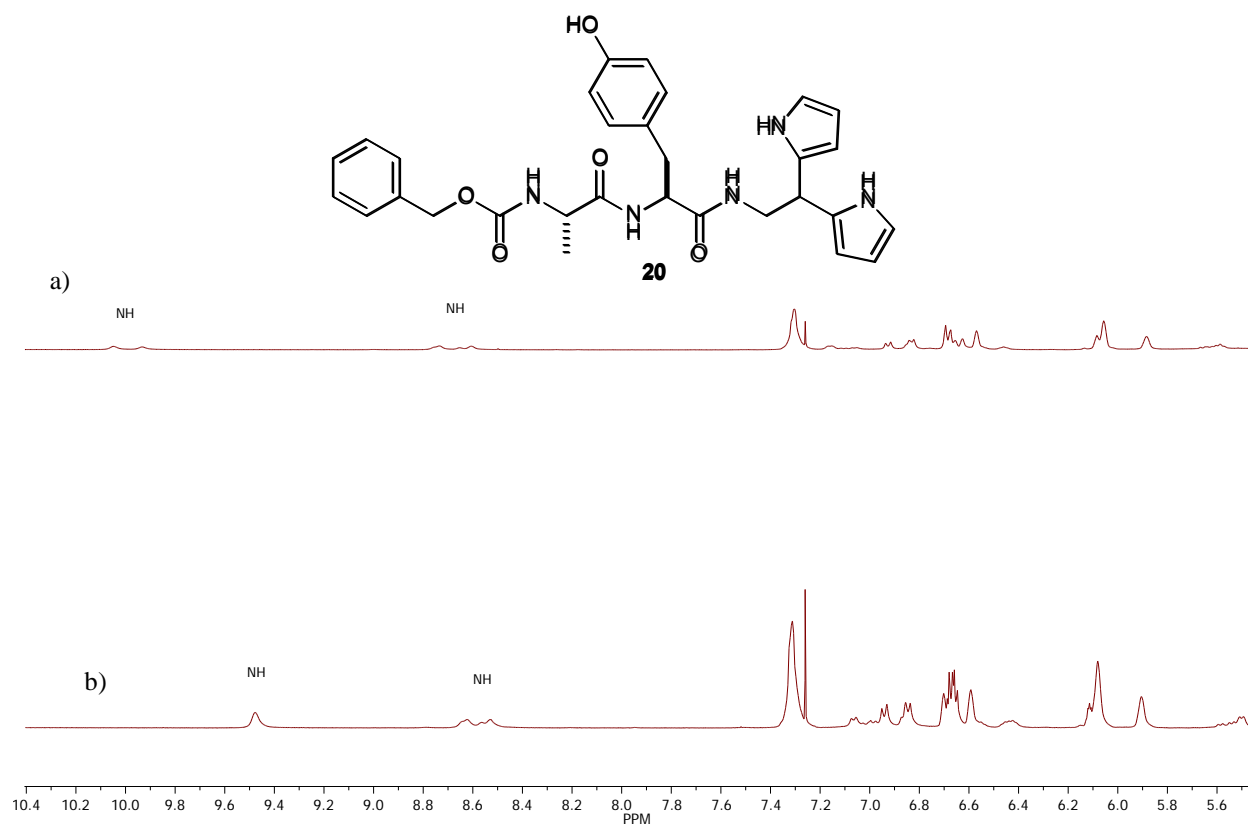


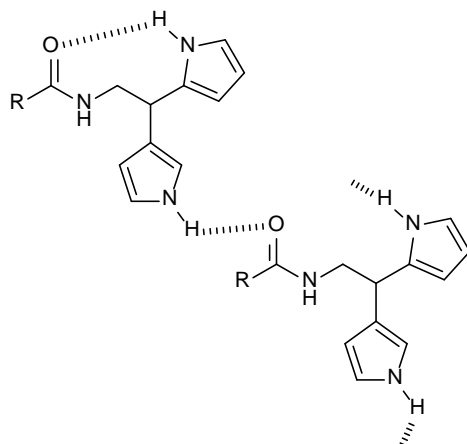
Figura 35. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **21**.

En el espectro de la Figura 35 se asignan las señales de carbono de uno de los conformeros del compuesto **21**. Así, se encuentra, en 18.12 ppm la señal correspondiente al metilo de la alanina C-21; en 28.29 ppm la señal C-27 propia de los metilos del terbutilo del Boc. En 42.92 ppm se observa la señal del metileno de la glicina C-16; en 43.55 ppm la señal del metileno C-12; y en 50.46 ppm la señal del metino base de alanina C-20. En 80.57 ppm se observa la señal del carbono cuaternario del terbutilo del Boc C-26; en 102.21 ppm la señal correspondiente al metino de la posición *meso* C-6; de 105.02 ppm a 108.22 ppm, se encuentran seis señales que corresponden a los seis metinos del sistema dipirrolíco C-2, C-3, C-4, C-8, C-9 y C-10; en 117.85 ppm la señal de los carbonos *ipso* del dipirrol C-5 y C-7, y finalmente en 159.00, 169.03 y 173.32 ppm, encontramos a los carbonilos C-23, C-18 y C-14, respectivamente.

Dada la presencia de confórmeros detectables en RMN, se realizaron experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  a diferentes concentraciones (10 mg/mL, 15 mg/mL) como se ilustra en la Figura 36. Se puede observar que las señales correspondientes a los *N*-H's del sistema dipirrólico se desplazan, indicando no sólo la presencia de confórmeros si no también la de interacciones tipo puentes de hidrógeno intermoleculares, cambiando el desplazamiento químico de 9.48 a 9.91 ppm y de 8.57 a 8.72 ppm (Figura 37).

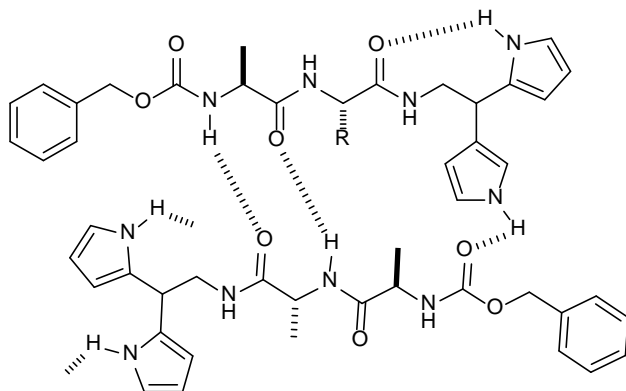


**Figura 36.** Comparación de los espectros de  $^1\text{H}$  del dipirrol **20** a) 15 mg/mL b) 10 mg/mL.



**Figura 37.** Posibles interacciones intramoleculares e intermoleculares del dipirrol.

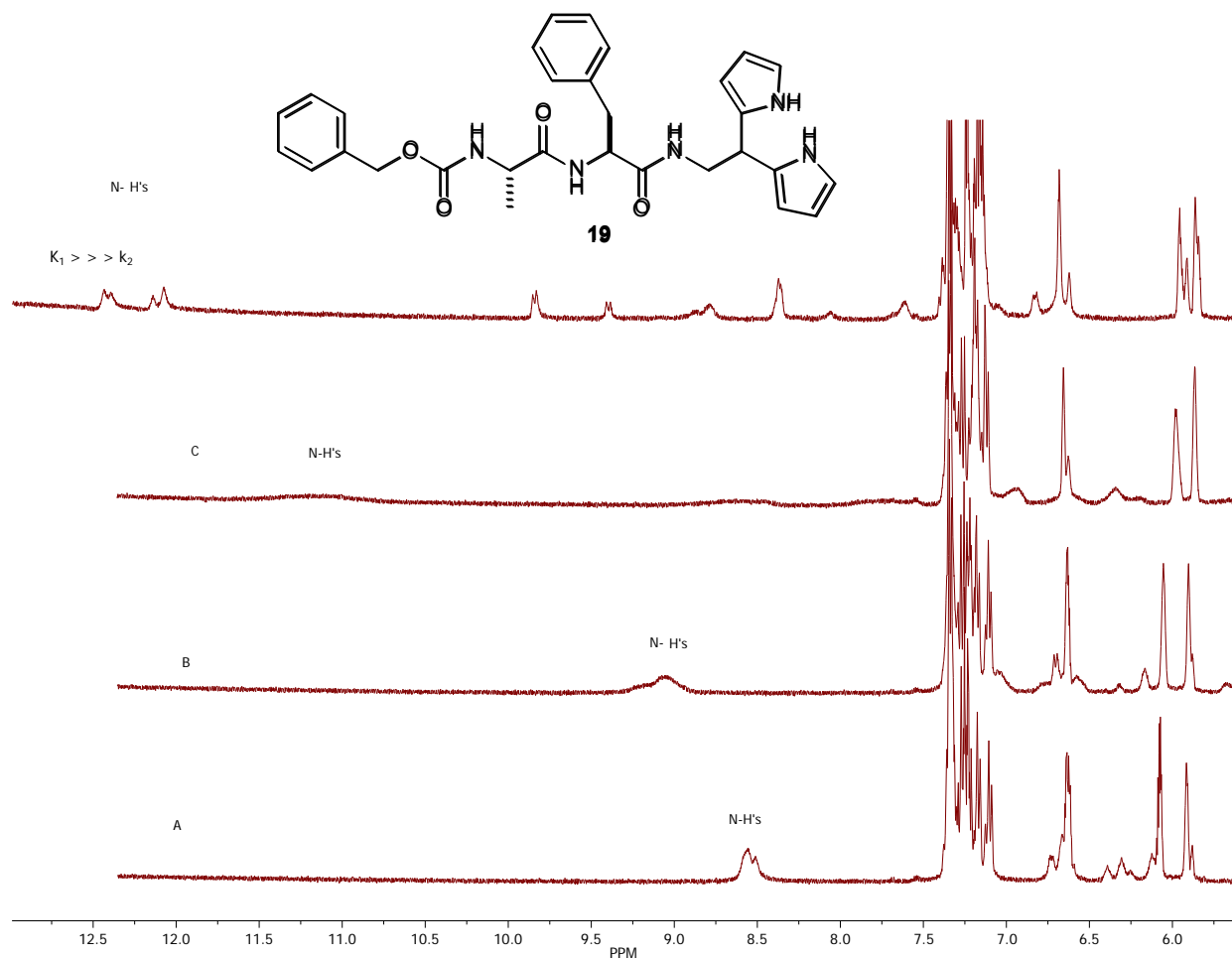
El fenómeno de interacción intermolecular, puede ser denominado como interacción supramolecular en paralelo (Figura 38). Explicándose también así los dos tipos de interacciones, intra e intermolecular.



**Figura 38.** Posibles interacciones de tipo supramolecular en el dipirrol.

Dados los antecedentes de sistemas polipirrólicos como reconocedores de iones,<sup>27</sup> así como para comprobar el tipo de interacciones que describimos anteriormente, se llevaron a cabo titulaciones de los derivados peptídicos con fluoruro de tetrabutil amonio (TBA-F), a diferentes concentraciones, empezando con 0.1 equivalente hasta llegar a una relación 1:1 con la solución de los compuestos 0.01M en  $CD_2Cl_2$  (Figuras 39, 40 y 41) observando que, en

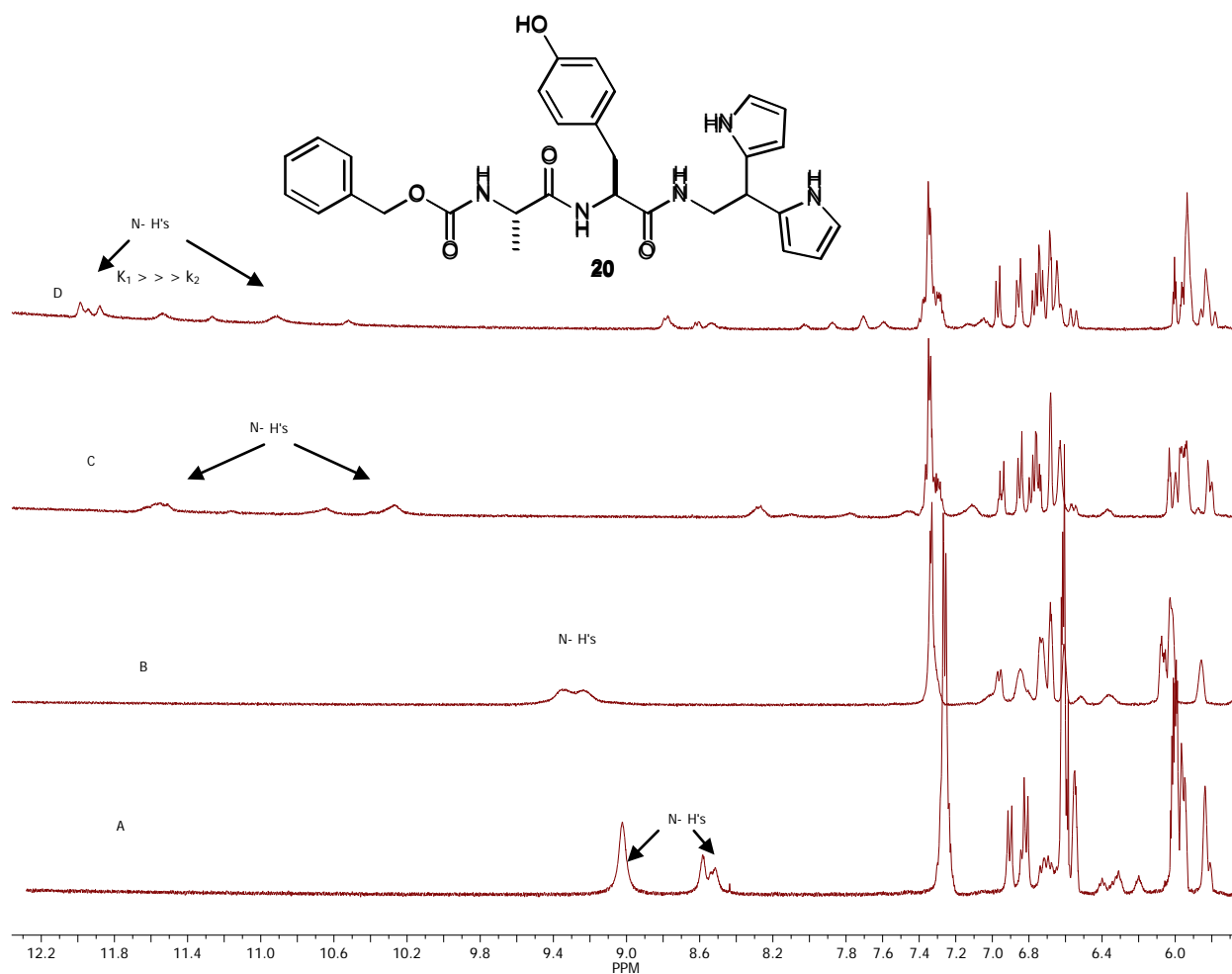
los tres compuestos probados (**19**, **20** y **21**) se presentó el reconocimiento de ión fluoruro con ambos hidrógenos de los NH's dipirrólicos.



**Figura 39.** Titulación del compuesto **19** con TBA-F.

Donde:

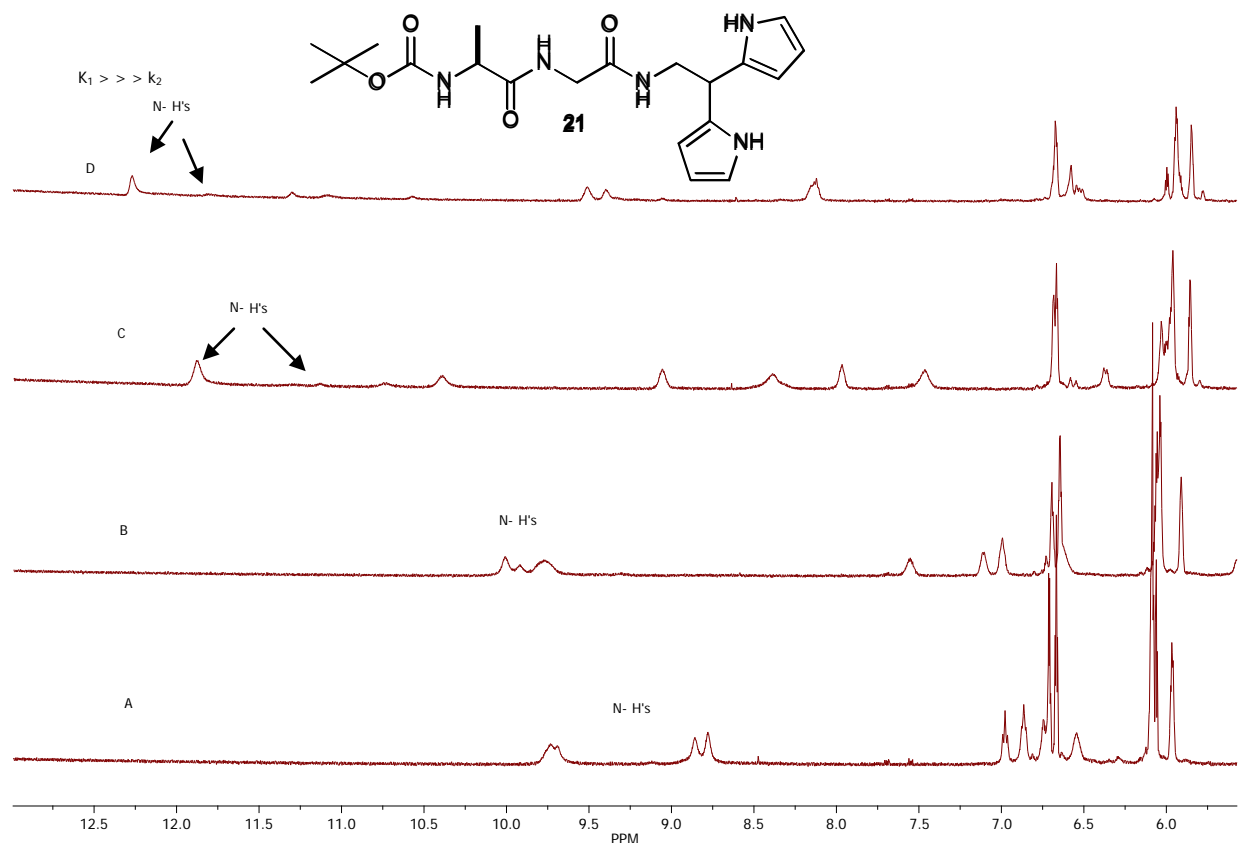
- A. Solución 0.01M del compuesto **19**.
- B. Solución A + 0.4 equivalentes (total de 0.4 equivalentes) de TAB-F.
- C. Mezcla B + 0.4 equivalentes (total de 0.8 equivalentes) de TAB-F.
- D. Mezcla C + 0.2 equivalentes (total de 1 equivalente) de TAB-F.



**Figura 40.** Titulación del compuesto **20** con TBA-F.

Donde:

- Solución 0.01M del compuesto **20**.
- Solución A + 0.2 equivalentes de TAB-F.
- Mezcla B + 0.4 equivalentes (total de 0.6 equivalentes) de TAB-F.
- Mezcla C + 0.2 equivalentes (total de 0.8 equivalentes) de TAB-F.



**Figura 41.** Titulación del compuesto **21** con TAB-F.

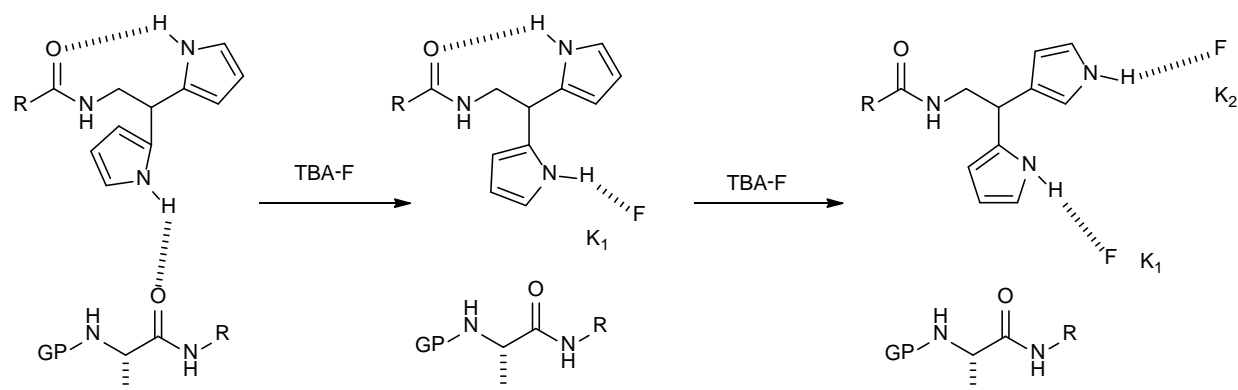
Donde:

- A. Solución 0.01M del compuesto **21**.
- B. Solución A + 0.3 equivalentes de TAB-F.
- C. Mezcla B + 0.4 equivalentes (total de 0.7 equivalentes) de TAB-F.
- D. Mezcla C + 0.3 equivalentes (total de 1 equivalente) de TAB-F.

Las diferencias en los desplazamientos de los *N*-H's del dipirrol pone de manifiesto las interacciones que se presentan en el sistema, resultando evidente que, aquel átomo de H que se encuentre participando en la interacción intermolecular será el denominado  $K_1$  ya que las fuerzas de unión con la otra molécula son más débiles, confiriéndole mayor libertad, por así decirlo, para interaccionar con el fluoruro al reconocerlo, presentando así una mayor contaste

de afinidad y un equilibrio rápido. Contrariamente, el átomo de hidrógeno que participa en las uniones intramoleculares será el denominado  $K_2$  ya que este tipo de uniones, aunque no covalentes, presentan mayor fuerza de atracción, retardando así su interacción con el ión, es por eso que el patrón de desplazamiento que éste hidrógeno presenta conforme aumenta la concentración del TBA-F varía poco en comparación a  $K_1$ , es decir, la constante de afinidad por el ión será menor y presentando un equilibrio lento, aumentando la afinidad  $K$  conforme el hidrógeno más dispuesto empieza a saturarse a razón de la concentración del TBA-F.

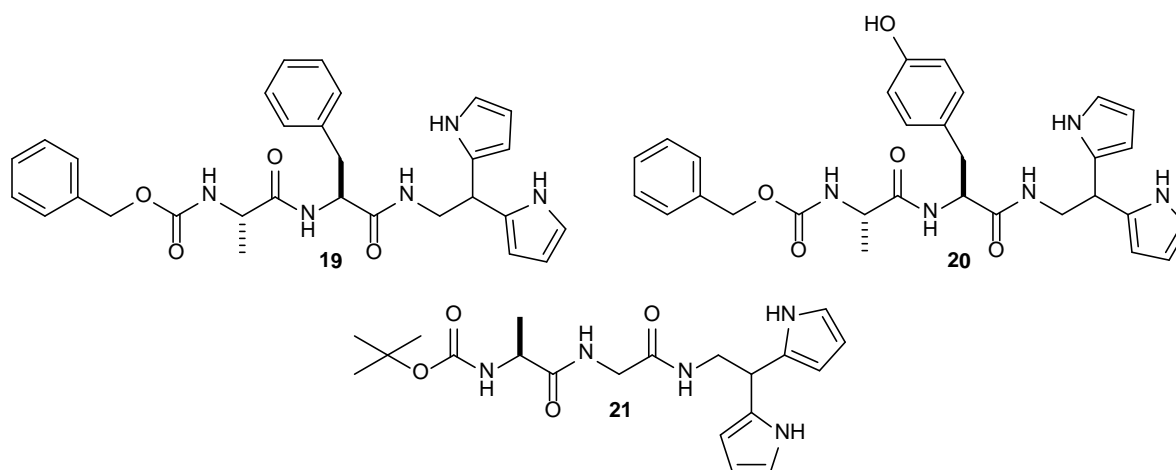
Otro dato interesante que se puede resaltar de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtenidos de las titulaciones, y que además apoya la teoría de las interacciones y cambios conformacionales a la hora del reconocimiento aniónico, es lo que se observa en la sección de las señales propias de los CH del dipirrol ya que como se puede observar en los espectros, estas señales también varían, siendo más significativa esta apreciación a concentraciones más altas del TBA-F. Esto es debido a que una vez que el pirrol orientado hacia afuera del sistema (como se propone en la Figura 42), que es el que se encontraría formando interacciones intermoleculares y por ende el más disponible al reconocer al ión, confiriéndole mayor afinidad ( $K_1$ ) y que al empezar a saturarse, el pirrol orientado hacia adentro del sistema, formando interacciones intramoleculares, menos disponible y con menos afinidad ( $K_2$ ), cambia su conformación para iniciar entonces el reconocimiento aniónico, lo cual se ve reflejado en los cambios de desplazamiento de las señales correspondientes en el espectro.



**Figura 42.** Cambios conformacionales del dipirrol al reconocer al F<sup>-</sup>.

## 2. Pruebas de correlación con ADN.

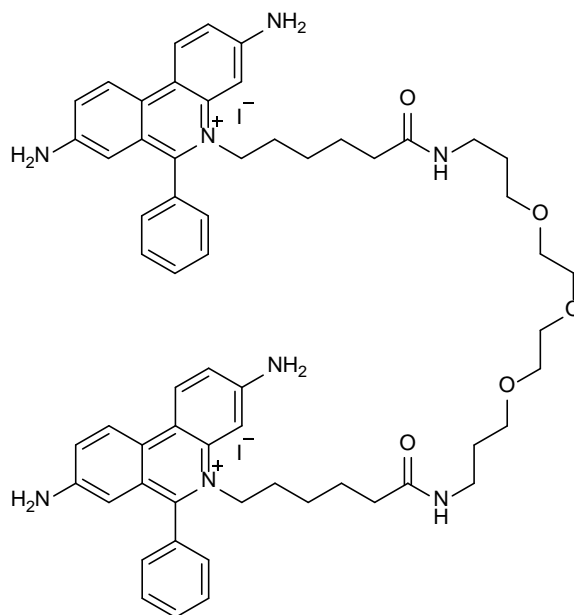
Una vez lograda la síntesis, el objetivo final de este trabajo de investigación fue evaluar la interacción de los compuestos obtenidos **19**, **20** y **21** con el ADN. Cabe mencionar que dicha interacción no garantiza la actividad biológica que está a su vez en función de muchos otros factores como solubilidad, absorción, metabolismo, etc. Sin embargo, la información arrojada puede dar pie a estudios posteriores que permitan incrementar las posibilidades de éxito de compuestos análogos.



Así, se llevaron a cabo ensayos de interacción entre los compuestos obtenidos y ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

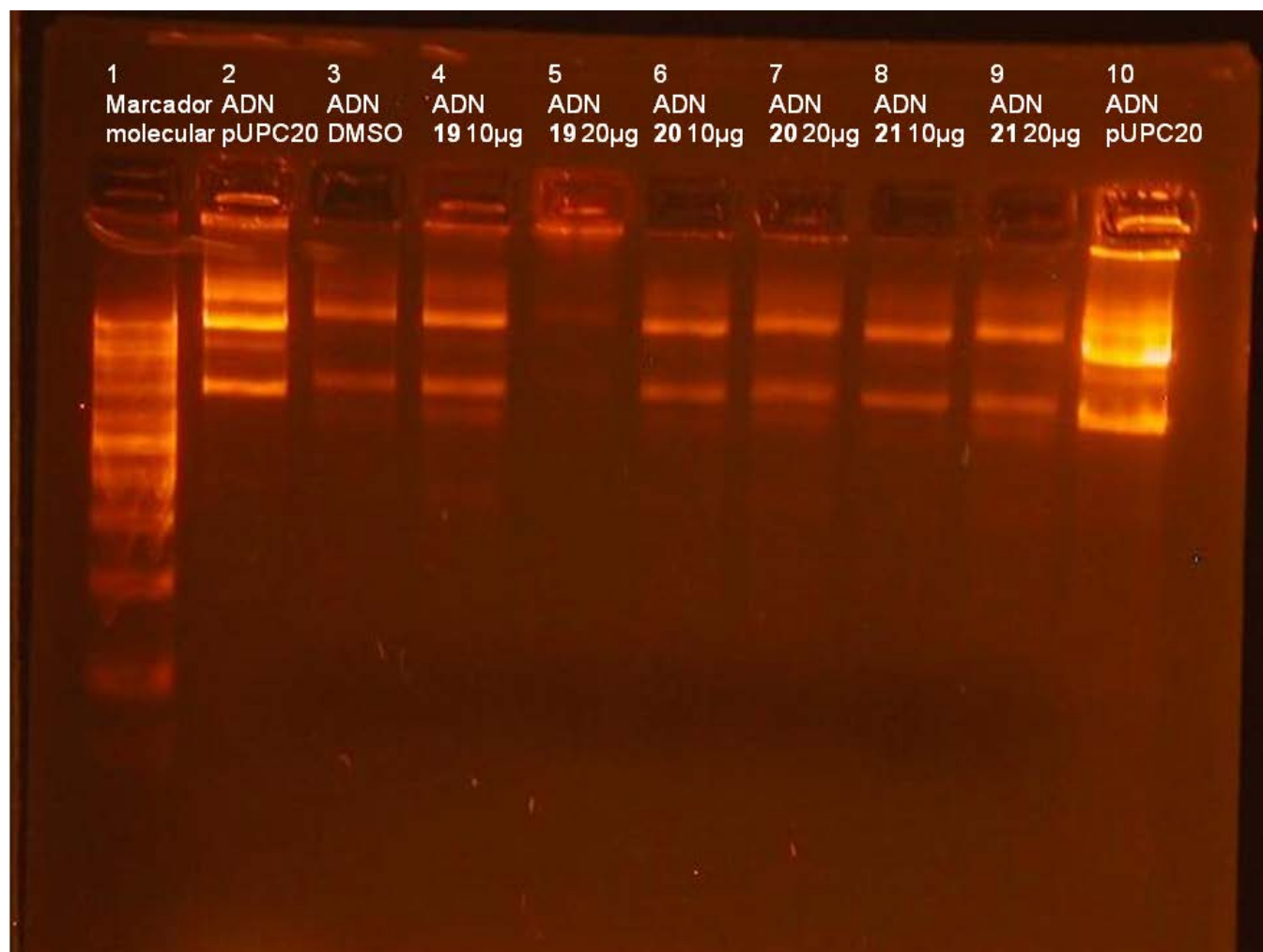
El ensayo se realizó utilizando el plásmido pUCP20 en una concentración de 100 ng/ $\mu$ L y los compuestos **19**, **20** y **21**, en concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L disueltos en DMSO, utilizando a su vez fracciones de 10 y 20  $\mu$ g de cada compuesto.

Cabe mencionar que se utilizó "Gel red" (Figura 43) como buffer de carga para dar densidad al complejo compuesto – ADN y que al mismo tiempo sirvió como revelador. Esta bis-fenantrolina cabe dentro de los bis-intercaladores y al reconocer el ADN se puede obtener información interesante sobre todo si el compuesto a probar llega a desplazar al intercalador.



**Figura 43.** Estructura del "Gel Red"

El resultado del ensayo con los compuestos **19**, **20** y **21** con el plásmido pUCP20 se ilustra en la Figura 44.



**Figura 44.** Electroforesis en gel de agarosa de los compuestos **19**, **20** y **21** con plásmido pUCP20.

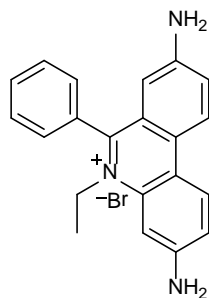
Las condiciones de los carriles de la electroforesis en gel de agarosa de los compuestos **19**, **20** y **21** con plásmido pUCP20 ilustrado en la Figura 44, se describen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Electroforesis en gel de agarosa de los compuestos **19**, **20** y **21** con plásmido pUCP20

Carril	Compuesto	Vol/[comp.]	Vol/[ADN]	Vol Gel Red
1	Marcador Molecular 1Kb	3 $\mu$ L	---	3 $\mu$ L
2			1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L
3	DMSO	10 $\mu$ L	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L
4	<b>19</b>	10 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L
5	<b>19</b>	20 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L
6	<b>20</b>	10 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L
7	<b>20</b>	20 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L
8	<b>21</b>	10 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L
9	<b>21</b>	20 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L
10			1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L

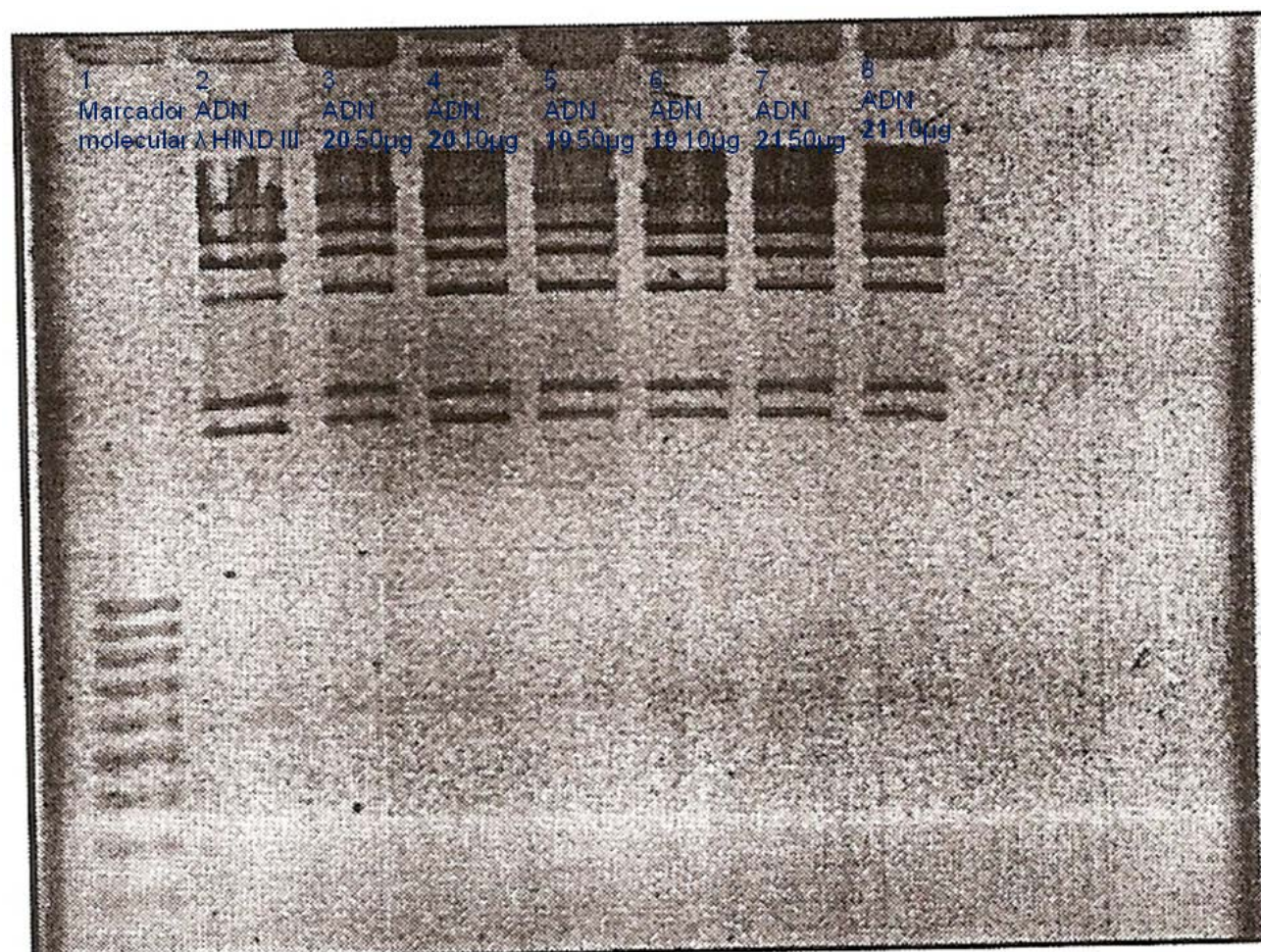
Como se aprecia en la Figura 44, el compuesto **19** a 20  $\mu$ g, presentó aparente interacción con el plásmido, ya que se observa un cambio en el corrimiento del ADN con respecto al control. Por su parte, los compuestos **20** y **21** a 10 y 20  $\mu$ g y el **19** a 10 $\mu$ g, presentan bandas menos intensas respecto al control y se aprecia un ligero retraso en las distancias de corrida de las bandas. La desaparición de bandas puede sugerir interacción con el ADN pues puede ser indicativo de desplazamiento del revelador Gel Red.

Para corroborar que es un efecto de desplazamiento se llevó a cabo el mismo experimento pero sin incubar los compuestos con el intercalador y revelando el gel con bromuro de etidio (Figura 45).



**Figura 45.** Estructura del bromuro de etidio.

Los resultados se aprecian en la Figura 46 en donde aparecen todas las bandas en igual intensidad.



**Figura 46.** Electroforesis en gel de agarosa de los compuestos **19**, **20** y **21** con plásmido ADN  $\lambda$  HIND III.

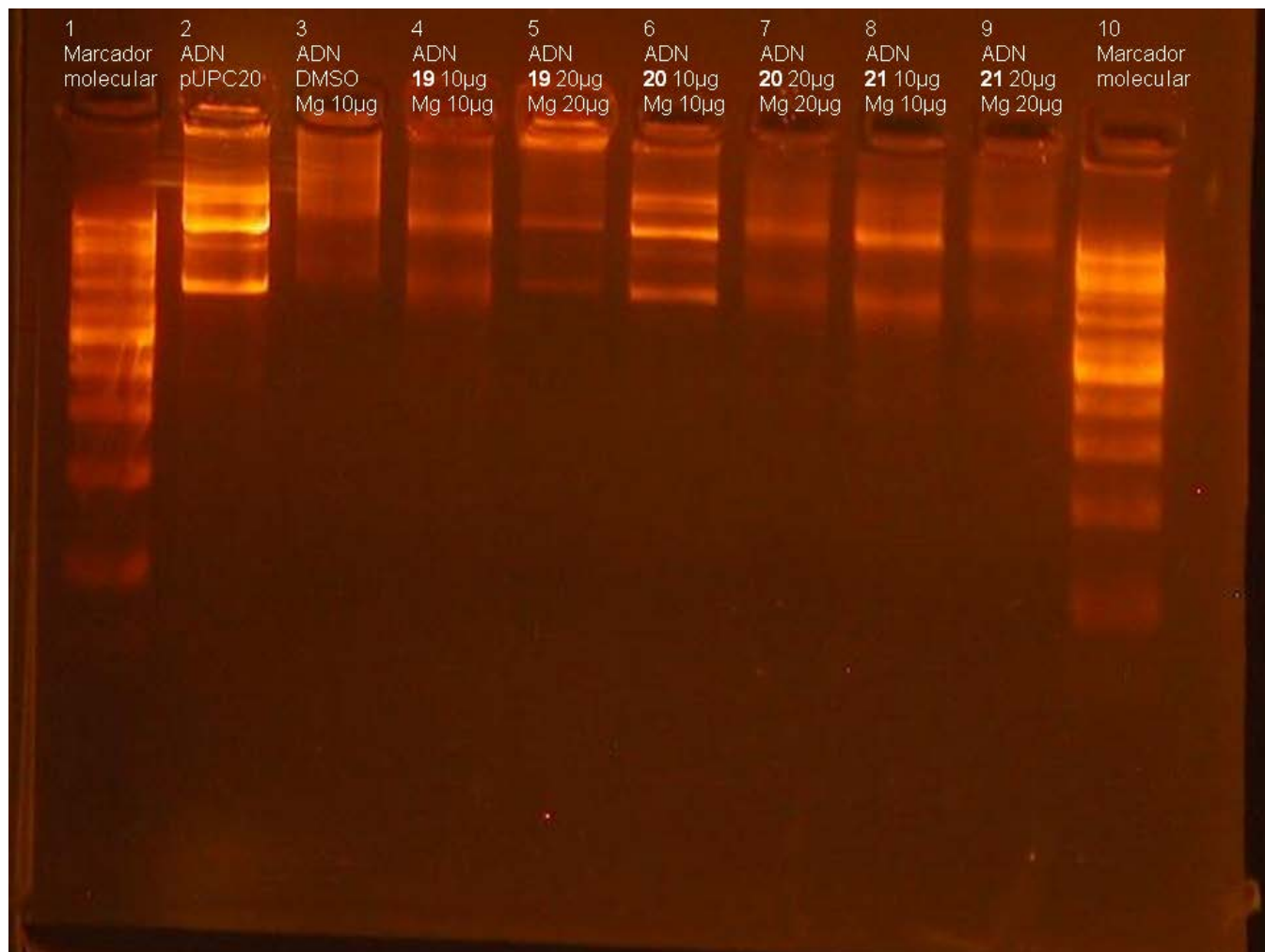
Los carriles se describen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Electroforesis en gel de agarosa de los compuestos **19**, **20** y **21** con plásmido ADN  $\lambda$  HIND III.

Carril	Compuesto	Vol/[comp.]	Vol/[AND]	Vol. H <sub>2</sub> O	Vol. DMSO	Vol. Buffer carga
1	-	-	-	3 $\mu$ L	5 $\mu$ L	3 $\mu$ L
2	-	-	5 $\mu$ L/[15 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	3 $\mu$ L
3	<b>20</b>	5 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L/[15 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L	-	3 $\mu$ L
4	<b>20</b>	1 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L/[15 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L	4 $\mu$ L	3 $\mu$ L
5	<b>19</b>	5 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L/[15 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L	-	3 $\mu$ L
6	<b>19</b>	1 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L/[15 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L	4 $\mu$ L	3 $\mu$ L
7	<b>21</b>	5 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L/[15 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L	-	3 $\mu$ L
8	<b>21</b>	1 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L/[15 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L	4 $\mu$ L	3 $\mu$ L

Cabe hacer notar que, aunque la prueba usando como revelador bromuro de etidio se llevó a cabo con otro plásmido y a diferentes concentraciones del compuesto y plásmido, el propósito se cumple, ya que el efecto a discutir es el mismo y estas condiciones no afectan sustancialmente esta propiedad de reconocimiento.

Cuando se adiciona magnesio a la mezcla de los compuestos con ADN se observa un efecto más marcado pues, contrario a cuando hay ausencia del metal, todos los compuestos dan lugar a bandas definidas cuya intensidad disminuye cuando la concentración de cada compuesto aumenta de 10 a 20  $\mu$ g. (Figura 47). Esto puede ser explicado por una posible interacción entre los dipirroles y el magnesio que a 10  $\mu$ g interactúan con el metal y más que con el ADN y por lo tanto no desplazan a la bis-fenantrolina. Así mismo, cuando la concentración del compuesto aumenta entonces el compuesto libre interactúa con el ADN desplazando a la feantrolina.



**Figura 47.** Electroforesis en gel de agarosa de los compuestos **19**, **20** y **21** con plásmido pUCP20 utilizando como cofactor Magnesio.

Los carriles del ensayo ilustrado en la Figura 46 se describen en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Electroforesis en gel de agarosa de los compuestos **19**, **20** y **21** con plásmido pUCP20 utilizando como cofactor Magnesio.

Carril	Compuesto	Vol/[comp.]	Vol/[ADN]	Vol/[Mg <sup>2+</sup> ]	Vol Gel Red
1	Marcador Molecular 1Kb	3 $\mu$ L	---	---	3 $\mu$ L
2	---	---	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	---	3 $\mu$ L
3	DMSO	10 $\mu$ L	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L
4	<b>19</b>	10 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L
5	<b>19</b>	20 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	2 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L
6	<b>20</b>	10 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L
7	<b>20</b>	20 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	2 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L
8	<b>21</b>	10 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	3 $\mu$ L
9	<b>21</b>	20 $\mu$ L/[1 $\mu$ g/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L/[100ng/ $\mu$ L]	2 $\mu$ L/[10 $\mu$ g/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L
10	Marcador Molecular 1Kb	3 $\mu$ L	---	---	3 $\mu$ L

## VI. Parte Experimental

### 1. Aspectos Generales.

Previo a la realización de cada una de las reacciones, el material se lavó perfectamente y se enjuagó con alcohol isopropílico. Posteriormente el material se secó en estufa a una temperatura aproximada de 80°C.

El monitoreo de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (TLC) a partir de cromatofolios de la marca Merk, usando como reveladores vapores de yodo, luz UV, y 2,4-Dinitrofenilhidrazina de la marca Aldrich.

Todos los reactivos y aminoácidos utilizados son de la marca Sigma-Aldrich. Todos los disolventes fueron destilados antes de su uso. Las purificaciones realizadas por cromatografía en columna utilizaron como fase estacionaria sílice de 70-230 mesh y florisil de 30-60 mesh de la marca Aldrich.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron con un equipo Varian Mercury Plus de 400 MHz y 200 MHz utilizándose  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{CD}_3\text{OD}$  como disolventes y TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos  $\delta$ , están dados en partes por millón y la constante de acoplamiento  $J$  en Hertz. La multiplicidad de las señales está indicada como *s*, *d*, *dd*, *t*, *c* y *m*.

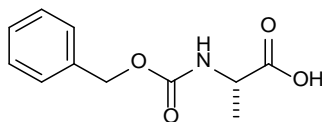
Los puntos de fusión se determinaron por el método de Fisher en un equipo marca Fisher-Johns modelo 4121 y no están corregidos.

## 2. Método general para la *N*-protección de aminoácidos con CbzCl.

En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y baño de hielo, se colocó un equivalente del aminoácido a proteger y se adicionaron 40 ml de NaOH 1N por cada gramo de a.a. Una vez fría la solución, se adicionaron 1.12 equivalentes de CbzCl y se dejó reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente y un pH de 10.

Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se enfrió a 0 °C y se pasó a un embudo de separación. Se hizo un lavado con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1x50 mL), posteriormente la fase acuosa se acidificó con HCl 1N hasta un pH de 3 y el producto se extrajo con cloruro de metileno (3x50 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor. El producto se purificó por el método de cromatografía en columna.

### *N*-Cbz-*L*-alanina 1.



Siguiendo el método general de *N*-protección, se adicionó 1.00 g (11.24 mmol) de *L*-Alanina en 40 mL de NaOH 1N. Posteriormente se adicionaron 1.8 mL (12.58 mmol) de CbzCl. Se obtuvieron 2.34 g (10.5 mmol, 93.23% de rendimiento) de un sólido blanco con un punto de fusión de 77°C – 79°C.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.46 (*d*, *J*=7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.41 (*c*, *J*=7.14 Hz, 1H, CH), 5.09 (*d*, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.19 (*d*, *J*=6.59 Hz, 1H, **NH-CO**), 7.10-7.30 (*m*, 5H, sistema aromático) 8.27 (*sa*, 1H, **COOH**).

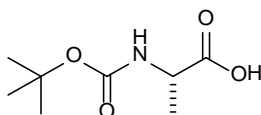
**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.35 (CH<sub>3</sub>), 49.48 (CH), 67.12 (CH<sub>2</sub>), 128.11, 128.25, 128.53 (CH's aromáticos), 136.02 (C-*ipso*), 155.80 (**CO-NH**, Cbz) 177.67 (CO, COOH).

### 3. Método general para la *N*-protección de aminoácidos con Boc<sub>2</sub>O.

En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética a temperatura ambiente, se colocó un equivalente del aminoácido a proteger y se disolvió en la mitad del volumen correspondiente de MeOH (50 mL por gramo de a.a.). Posteriormente se adicionaron 1.65 equivalentes de trietil amina (TEA) dejando reaccionar la mezcla durante 30 minutos. Por otro lado, en un segundo matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética se disolvieron 1.3 equivalentes de Boc<sub>2</sub>O en el volumen restante de MeOH, una vez disuelto, la solución se adicionó lentamente al primer matraz y se dejó reaccionar durante 12 horas a temperatura.

Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se llevó a sequedad y el producto se resuspendió en agua destilada y se hizo un lavado con diclorometano (1x50 mL). La fase acuosa se llevó a pH de 3 empleando una solución de HCl al 10% y el producto se extrajo con diclorometano (3x100 mL). La fase orgánica se colectó y secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró en rotavapor, el producto se purificó por el método de cromatografía e columna.

#### *N*-Boc-*L*-alanina **8**.



Siguiendo el método general de *N*-protección, a la solución formada por 1 g (11.24 mmol) de *L*-ala disuelta en 25 mL de MeOH tratada con 2.59 mL (18.64 mmol) de TEA, se adicionó gota a gota una solución formada por 3.19 g (14.61 mmol) de Boc<sub>2</sub>O y 25 mL de MeOH. Se obtuvieron 2.08 g (11.00 mmol, 97.95% de rendimiento) de un aceite amarillo paja.

<sup>1</sup>H RMN. (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.39 (*d*, *J*=7.1 Hz, 3H, **CH**<sub>3</sub>-CH), 1.44 (*d*, *J*= 8.7 Hz, 9H, CH<sub>3</sub> Boc), 4.24 (*m*, 1H, **CH**-CH<sub>3</sub>).

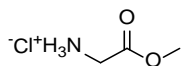
$^{13}\text{C}$  RMN. ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.28 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 28.24 ( $\text{CH}_3$ , Boc), 49.87 ( $\text{CH}_2$ ), 80.01 (C, Boc), 155.50 (CO Boc), 170.16 (CO, COOH).

#### 4. Método general para la *O*-protección de aminoácidos.

En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y baño de hielo se colocó un equivalente del a.a. a proteger y se adicionaron 25 mL de MeOH por gramo de a.a. Posteriormente se adicionaron lentamente 1.2 equivalentes de  $\text{SOCl}_2$ . Una vez terminada la adición, se dejó reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de reacción, se le adicionó a la mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  hasta 3/4 partes del volumen del matraz y se concentró en rotavapor.

#### Glicina-OMe 2a.

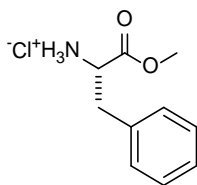


De acuerdo con la metodología general para la *O*-protección de a.a., a una solución formada por 2.00 g (26.66 mmol) de glicina y 50 mL de MeOH, se adicionaron 2.34 mL (32 mmol) de  $\text{SOCl}_2$ . Se obtuvieron 2.88 g (23.04 mmol, 86.4% de rendimiento) del producto en forma de escamas blancas.

$^1\text{H}$  RMN. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.81 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 3.82 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 50 MHz)  $\delta$  (ppm) 40.91 ( $\text{CH}_2$ ), 53.43 ( $\text{CH}_3$ ) 168.96 (CO, COOH).

### *L*-fenilalanina-OMe 2b.



De acuerdo con la metodología general para la *O*-protección de a.a., a una solución formada por 2.00 g (12.12 mmol) de *L*-fenilalanina y 50 mL de MeOH, se adicionaron 1.062 mL (14.55 mmol) de SOCl<sub>2</sub>. Se obtuvieron 2.54 g (11.81 mmol, 97.5% de rendimiento) de escamas blancas con un p.f. de 129°C – 131°C.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 3.15 (*dd*, *J*=7.51, 14.48 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.18 (*dd*, *J*=6.0, 14.29 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.25 (*dd*, *J*=5.86, 14.29 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.80 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.32 (*dd*, *J*=6.32, 7.33 Hz, 1H, CH), 7.20-7.40 (*m*, 5H, CH's aromáticos).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 37.42 (CH<sub>2</sub>), 53.60 (CH<sub>3</sub>), 55.18 (CH), 129.00, 130.20, 130.42 (CH's, aromáticos), 135.29 (C-*ipso*), 170.47 (CO, COOH).

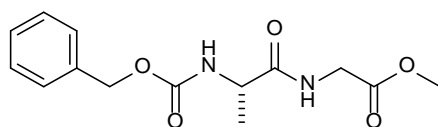
### 5. Procedimiento general para las reacciones de acoplamiento.

A.- En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y atmósfera de N<sub>2</sub> se colocó una solución 0.2 M del clorhidrato del aminoéster correspondiente (1.15 equivalentes) en THF, se le adicionaron 2.5 equivalentes de TEA y se dejó reaccionar 1 hora.

B.- En otro matraz balón provisto de embudo de adición, agitación magnética, atmósfera de N<sub>2</sub> y baño de hielo se colocó un equivalente del a.a. *N*-protegido en una concentración 0.2 M con THF anhidro. Se adicionaron 1.2 equivalentes de TEA y la solución se dejó reaccionar durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron lentamente 1.15 equivalentes de *i*-BCF al 0.2 M en THF dejando reaccionar por 20 minutos más. A continuación se le adicionó gota a gota la mezcla A (10 gotas/minuto), dejando reaccionar 30 minutos más en baño de hielo y toda la noche a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se filtró para eliminar las sales y el filtrado se concentró en rotavapor a presión reducida. El crudo de reacción se extrajo con acetato de etilo (2x50 mL) y se hicieron 2 lavados con agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor a presión reducida. El producto fue purificado por cromatografía en columna.

### *N*-Cbz-*L*-alanil-glicina-OMe **3**.

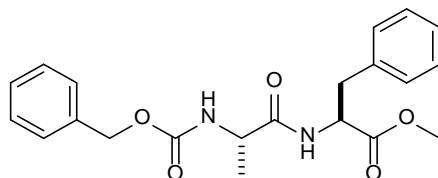


Siguiendo el procedimiento general de acoplamiento, a la solución de 1 g (4.48 mmol) del compuesto **1** disuelto en 22.5 mL de THF anhidro tratada con 0.75 mL (5.38 mmol) de TEA, se adicionó una solución de 0.68 mL (5.16 mmol) de *i*-BCF en 26 mL de THF anhidro. Posteriormente a la mezcla formada se le adicionó una solución de 0.6447 g (5.16 mmol) del compuesto **2a** disueltos en 26 mL de THF anhidro y tratada con 1.8 mL (12.9 mmol) de TEA. Después de ser purificado por el método de cromatografía en columna con un sistema eluyente Hex-AcOEt (7:3), se obtuvieron 1.072 g (3.645 mmol, 83.1% de rendimiento) del compuesto **3** en forma de sólido blanco.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.41 (*d*,  $J = 7.1$  Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**) 3.76 (*s*, 3H, **CH<sub>3</sub>-O**), 4.04 (*d*,  $J = 5.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> glicina), 4.30 (*m*, 1H, **CH-CH<sub>3</sub>**), 5.12 (*dd*, 2H, CH<sub>2</sub>, Cbz), 5.27 (*s*, 1H, NH alanina), 6.55 (*s*, 1H, **NH-CO** péptido), 7.54 – 7.26 (*m*, 5H, CH's aromáticos).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 50 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.39 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 41.17 (CH<sub>2</sub> glicina), 50.44 (**CH-CH<sub>3</sub>**), 52.44 (CH<sub>3</sub>-O), 67.16 (CH<sub>2</sub>, Cbz), 128.12, 128.25, 128.56 (5 CH's aromáticos), 136.03 (C-*ipso*), 156.01 (**CO-NH**, Cbz), 170.05 (**CO-NH** péptido) 172.36 (CO, COOR).

***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-fenilalanina-OMe 4.**

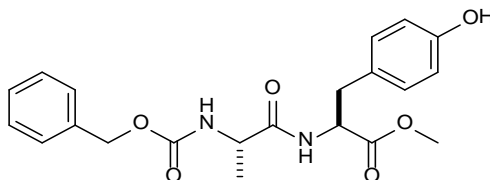


De acuerdo al método general de acoplamiento, a la solución formada por 1 g (4.48 mmol) del compuesto **1** disuelto en 22.5 mL de THF anhidro y 0.75 mL (5.38 mmol) de TEA, se le adicionó una solución de 0.68 mL (5.16 mmol) de *i*-BCF en 26 mL de THF anhidro. Posteriormente a la mezcla formada se le adicionó una solución de 1.109 g (5.16 mmol) del compuesto **2b** disueltos en 26 mL de THF anhidro tratada con 1.8 mL (11.21 mmol) de TEA. Después de ser purificado por cromatografía en columna con un sistema eluyente Hex-AcOEt (7:3), se obtuvieron 1.447 g (3.767 mmol, 84% de rendimiento) del compuesto **4** en forma de sólido blanco con un punto de fusión de 66°C – 68°C.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.33 (*d*, *J* = 7.0 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**) 3.07 (*dd*, *J* = 13.9, 6.0 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-CH**), 3.15 (*dd*, *J* = 13.9, 5.7 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-CH**), 3.72 (*s*, 3H, **CH<sub>3</sub>-O**), 4.25 (*m*, 1H, **CH-CH<sub>3</sub>**), 4.86 (*c*, 1H, **CH-CH<sub>2</sub>**), 5.09 (*c*, *J* = 12.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Cbz), 5.25 (*s*, 1H, NH Ala), 6.48 (*d*, *J* = 6.2 Hz, 1H, **NH-CO** péptido), 7.08 (*d*, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH's aromáticos), 7.45 – 7.18 (*m*, 8H, CH's aromáticos).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.37 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 37.75 (**CH<sub>2</sub>-CH**), 50.36 (**CH-CH<sub>3</sub>**), 52.38 (**CH<sub>3</sub>-O**), 53.12 (**CH-CH<sub>2</sub>**), 67.02 (CH<sub>2</sub> Cbz), 127.14, 128.05, 128.20, 128.53, 128.55, 129.22, (CH's aromáticos), 135.57 (C-*ipso* Cbz), 136.09 (C-*ipso* fenilalanina), 156.01 (**CO-NH** Cbz), 171.63 (**CO-NH** péptido), 171.72 (CO, COOR).

***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-tirosina-OMe 5.**

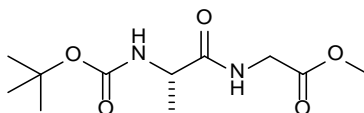


Siguiendo el procedimiento general de acoplamiento, a la solución de 1 g (4.48 mmol) del compuesto **1** disuelto en 22.5 mL de THF anhidro tratada con 0.75 mL (5.38 mmol) de TEA, se le adicionó una solución de 0.68 mL (5.16 mmol) de *i*-BCF en 26 mL de THF anhidro. Posteriormente a la mezcla formada se le adicionó una solución de 1.2 g (5.16 mmol) del compuesto **2c** disuelto en 26 mL de THF anhidro y tratada con 1.8 mL (12.9 mmol) de TEA. Después de ser purificado por cromatografía en columna con un sistema eluyente Hex-AcOEt (1:1), se obtuvieron 1.438 g (3.6 mmol, 80.15% de rendimiento) del compuesto **5** en forma de sólido blanco con un punto de fusión de 75°C – 77°C.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.32 (*d*, *J* = 6.9 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**), 2.98 (*dd*, *J* = 14, 5.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-CH**), 3.07 (*dd*, *J* = 14.0, 5.4 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-CH**), 3.73 (*s*, 3H, **CH<sub>3</sub>-O**), 4.24 (*m*, 1H, **CH-CH<sub>3</sub>**), 4.84 (*c*, *J* = 14.9 Hz, 1H, **CH-CH<sub>2</sub>**), 5.07 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub> Cbz), 5.40 (*d*, *J* = 7.1 Hz, 1H, NH ala), 6.63 (*d*, *J* = 7.8 Hz, 1H, **NH-CO** péptido), 6.68 (*d*, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH's aromáticos tirosina), 6.91 (*d*, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH's aromáticos tirosina), 7.34 (*dd*, *J* = 11.7, 5.9 Hz, 5H, CH's aromáticos Cbz).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.36 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 36.97 (**CH<sub>2</sub>-CH**), 50.43 (**CH-CH<sub>3</sub>**), 52.43 (**CH<sub>3</sub>-O**), 53.27 (**CH-CH<sub>2</sub>**), 67.16 (CH<sub>2</sub> Cbz), 115.51 (2 CH, aromáticos tirosina), 127.15 (C-*ipso* tirosina), 128.10, 128.26, 128.56 (5 CH aromáticos Cbz), 130.37 (2 CH's aromáticos tirosina), 136 (C-*ipso* Cbz), 155.11 (CO Cbz), 171.79 (**CO-NH**, péptido), 171.89 (CO, COOR).

### *N*-Boc-*L*-alanil-glicina-OMe **9**.



En base al procedimiento general de acoplamiento, a la solución de 1 g (5.29 mmol) del compuesto **8** disuelto en 26.5 mL de THF anhidro tratada con 0.88 mL (6.34 mmol) de TEA, se le adicionó una solución de 0.8 mL (6.085 mmol) de *i*-BCF en 30.42 mL de THF anhidro. Posteriormente a la mezcla formada se le adicionó una solución de 0.76 g (6.84 mmol) del compuesto **2a** disuelto en 30.42 mL de THF anhidro tratada con 1.84 mL (13.23 mmol) de TEA. Después de ser purificado por cromatografía en columna con un sistema eluyente Hex-AcOEt (6:4), se obtuvieron 1.10 g (4.22 mmol, 79.82% de rendimiento) del compuesto **9** en forma de aceite amarillo paja.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.39 (*d*,  $J = 7.1$  Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**) 1.45 (*s*, 9H, 3 CH<sub>3</sub> Boc), 3.75 (*s*, 3H, **CH<sub>3</sub>-O**), 4.05 (*dd*,  $J = 5.2, 2.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Glicina), 4.26 (*m*, 1H, **CH-CH<sub>3</sub>**), 5.21 (*d*,  $J = 7.1$  Hz, 1H, NH ala), 6.93 (*s*, 1H, **NH-CO** péptido).

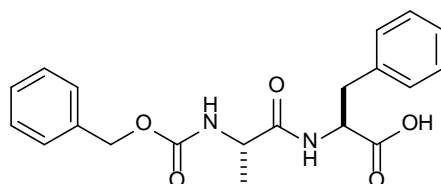
**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.28 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 28.24 (3 CH<sub>3</sub> Boc), 41.074 (CH<sub>2</sub> glicina), 49.87 (**CH-CH<sub>3</sub>**), 52.30 (**CH<sub>3</sub>-O**), 80.13 (C-Boc), 155.50 (**CO-NH** Boc), 170.16 (**CO-NH** péptido), 173.04 (CO, CCOR).

### 6. Método general de hidrólisis básica.

En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y baño de hielo se colocó un equivalente del dipéptido *O*-protegido y se disolvió en 10 mL de una mezcla de solventes de THF/H<sub>2</sub>O/MeOH. Posteriormente se adicionaron 3 equivalentes de LiOH. Una vez terminada la adición, la solución se dejó reaccionar durante 3 horas en baño de hielo.

Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se concentró en rotavapor y el crudo de reacción se resuspendió con agua, posteriormente se acidificó con HCl 1N. El producto se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x100 mL) y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor.

***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-fenilalanina-OH 6.**

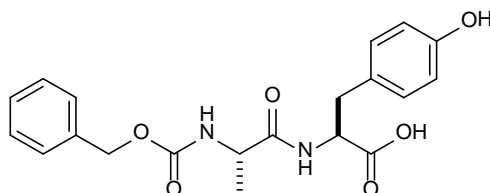


De acuerdo al procedimiento 6, 1 g (2.60 mmol) del compuesto **4** se disolvió en 10 mL de la solución de THF/H<sub>2</sub>O/MeOH. A la solución formada se adicionaron 0.328 g (7.82 mmol) de LiOH. Se obtuvieron 0.8219 g (2.22 mmol, 85.3% de rendimiento) del compuesto **6** como sólido blanco.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.26 (*d*, *J* = 6.8 Hz, 3H, **CH**<sub>3</sub>-CH) 3.00 (*dd*, *J* = 14.0, 6.6 Hz, 1H, **CH**<sub>2</sub>-CH), 3.17 (*dd*, *J* = 14, 5.5 Hz, 1H, **CH**<sub>2</sub>-CH), 4.26 (*m*, 1H, **CH**-CH<sub>3</sub>), 4.80 (*dd*, *J* = 13.1, 6.5 Hz, 1H, **CH**-CH<sub>2</sub>), 5.07 (*c*, *J* = 11.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Cbz), 5.64 (*d*, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH ala), 6.93 (*d*, *J* = 7.7 Hz, 1H, **NH**-CO péptido), 7.42 – 7.03 (*m*, 10H, 10 CH's aromáticos).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.31 (**CH**<sub>3</sub>-CH), 37.35 (**CH**<sub>2</sub>-CH), 50.27 (**CH**-CH<sub>3</sub>), 53.29 (**CH**-CH<sub>2</sub>), 67.10 (CH<sub>2</sub> Cbz), 126.99, 128.00, 128.22, 128.44, 128.52, 129.36 (10 CH's aromáticos), 135.78 (C-*ipso* fen), 135.98 (C-*ipso* Cbz), 156.06 (**CO**-NH Cbz), 172.524 (**CO**-NH péptido), 174.048 (CO, COOH).

***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-tirosina-OH 7.**

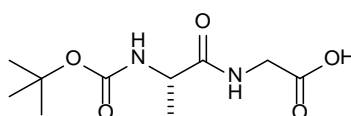


En base al procedimiento 6, 1 g (2.5 mmol) del compuesto **5** se disolvió en 10 mL de la solución de THF/H<sub>2</sub>O/MeOH. A la solución formada se adicionaron 0.3147 g (7.5 mmol) de LiOH. Se obtuvieron 0.7936 g (2.056 mmol, 82.24% de rendimiento) del compuesto **7** como polvo cristalino.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CD<sub>3</sub>OD 200 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.32 (*d*, *J* = 6.9 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**), 2.98 (*dd*, *J* = 14, 5.9 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-CH**), 3.07 (*dd*, *J* = 14.0, 5.4 Hz, 1H, **CH<sub>2</sub>-CH**), 4.19 (*c*, *J* = 14.9 Hz 1H, **CH-CH<sub>3</sub>**), 4.58 (*m*, 1H, **CH-CH<sub>2</sub>**), 5.07 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub> Cbz), 6.68 (*d*, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH's aromáticos tirosina), 6.91 (*d*, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH's aromáticos tirosina), 7.34 (*m*, 5H, CH's aromáticos Cbz).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CD<sub>3</sub>OD 50 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.17 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 37.48 (**CH<sub>2</sub>-CH**), 51.84 (**CH-CH<sub>3</sub>**), 55.09 (**CH-CH<sub>2</sub>**), 67.67 (CH<sub>2</sub> Cbz), 116.15 (2 CH's aromáticos tirosina), 128.66 (*C-*ipso** tirosina), 128.85, 128.99, 129.45 (5 CH's aromáticos Cbz), 131.42 (2 CH's aromáticos tirosina), 138.07 (*C-*ipso** Cbz), 157.30 (**CO-NH Cbz**), 174.46 (**CO-NH péptido**), 175.26 (CO, COOH).

***N*-Boc-*L*-alanil-glicina-OH 10.**



Siguiendo el método de desprotección 6, 1 g (3.846 mmol) del compuesto **9** se disolvió en 10 mL de la solución de THF/H<sub>2</sub>O/MeOH. A la solución formada se adicionaron 0.4842 g

(11.54 mmol) de LiOH. Se obtuvieron 0.7885 g (3.205 mmol, 83.34% de rendimiento) del compuesto **10** como aceite ocre.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CD<sub>3</sub>OD 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.32 (*d*,  $J = 7.2$  Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**) 1.44 (*s*, 9H, 3 CH<sub>3</sub> Boc), 3.91 (*dd*,  $J = 5.2, 2.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> glicina), 4.11 (*m*, 1H, **CH-CH<sub>3</sub>**).

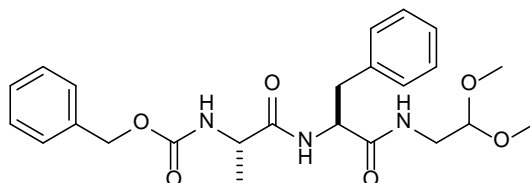
**<sup>13</sup>C RMN.** (CD<sub>3</sub>OD 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.39 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 28.68 (3 CH<sub>3</sub> Boc), 41.82 (CH<sub>2</sub> glicina), 51.51 (**CH-CH<sub>3</sub>**), 80.64 (C-Boc), 157.64 (**CO-NH** Cbz), 172.87 (**CO-NH** péptido), 176.22 (CO, COOH).

## 7. Procedimiento general para el acoplamiento de condensación con el acetal **12**.

En un matraz balón provisto de agitación magnética, atmósfera de N<sub>2</sub> y baño de hielo, se colocó una solución del Gp-*N*-péptido-OH en THF y se adicionaron 1.2 equivalentes de TEA. Enseguida se adicionaron lentamente 1.15 equivalentes de *i*-BCF y 2.5 equivalentes del aminoacetaldehído dimetil acetal **12** diluido en THF.

Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se filtró y el filtrado se concentró en rotavapor a presión reducida. El crudo de reacción se extrajo con acetato de etilo (2x50 mL) y se hicieron 2 lavados con agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor a presión reducida. El producto fue purificado por cromatografía en columna.

***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-fenilalanil-*O*-(*N*-acetaldehído dimetil acetal) 13.**

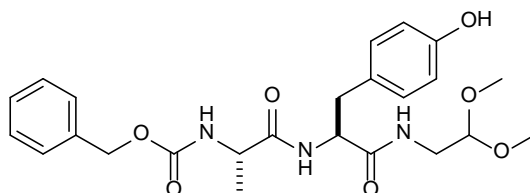


De acuerdo al procedimiento general 7, a la solución de 0.678 g (1.83 mmol) del compuesto **6** disuelto en 9.2 mL de THF anhidro tratada con 0.307 mL (2.20 mmol) de TEA, se le adicionaron 0.28 mL (2.11 mmol) de *i*-BCF. Posteriormente a la mezcla formada se le adicionaron 0.5 mL (4.6 mmol) del compuesto **12**. Después de ser purificado el producto por cromatografía en columna con un sistema eluyente (6:4) Hex-AcOEt, se obtuvieron 0.622 g (1.36 mmol, 74.23% de rendimiento) del compuesto **13** en forma de sólido blanco con p.f. de 130°C – 132°C.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.31 (*d*,  $J = 7.1$  Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**) 3.05 (*sa*, 2H, CH<sub>2</sub>, fen), 3.29 (*dd*,  $J = 3.9, 2.9$  Hz, 8H, 2 **CH<sub>3</sub>-O**, CH<sub>2</sub> acetal), 4.21 (*m*, 2H, CH acetal, CH ala), 4.61 (*dd*,  $J = 14.4, 7.0$  Hz, 1H, CH, fen), 5.09 (*c*,  $J = 12.4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> Cbz), 5.22 (*s*, 1H, NH ala), 6.01 (*s*, 1H, **NH-CO**, acetal), 6.66 (*d*,  $J = 7.3$  Hz, 1H, **NH-CO** péptido), 7.43 – 7.11 (*m*, 10H, 10 CH's aromáticos).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.25 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 38.29 (CH<sub>2</sub> fen), 40.89 (CH<sub>2</sub>, metileno de acetal), 50.81 (**CH-CH<sub>3</sub>**), 54.01 (CH fen), 54.44 (2 **CH<sub>3</sub>-O**), 67.21 (CH<sub>2</sub> Cbz), 102.14 (CH acetal), 127.05, 128.14, 128.31, 128.59, 128.67, 129.22 (10 CH's aromáticos), 135.98 (*C-*ipso** fen), 136.432 (*C-*ipso** Cbz), 156.01 (**CO-NH** Cbz), 170.42 (**CO-NH** peptido), 171.88 (**CO-NH** acetal).

***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-tirosil-*O*-(*N*-acetaldehído dimetil acetal) 14.**

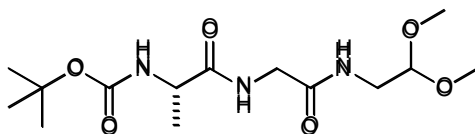


En base a la metodología 7, a la solución de 0.6049 g (1.57 mmol) del compuesto **7** disuelto en 7.8 mL de THF anhidro tratada con 0.26 mL (1.88 mmol) de TEA, se le adicionaron 0.24 mL (1.8 mmol) de *i*-BCF. Posteriormente a la mezcla formada se adicionaron 0.42 mL (3.91 mmol) del compuesto **12**. Después de ser purificado por cromatografía en columna con un sistema eluyente (4:6) Hex-AcOEt, se obtuvieron 0.4154 g (0.8782 mmol, 56.04% de rendimiento) del compuesto **14** en forma de polvo amarillo cristalino con un p.f. de 86°C – 88°C.

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.27 (*d*,  $J = 7.1$  Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**), 2.92 (*sa*, 2H, CH<sub>2</sub> tirosina), 3.26 (*s*, 8H, 2 **CH<sub>3</sub>-O**, CH<sub>2</sub> acetal), 4.27 (*m*, 2H, CH alanina, CH acetal), 4.69 (*c*,  $J = 7.1$  Hz, 1H, CH tirosina), 5.01 (*d*,  $J = 12.2$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Cbz), 5.11 (*d*,  $J = 11.9$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Cbz), 5.89 (*d*,  $J = 7.2$  Hz, 1H, **NH-CO** péptido), 6.69 (*d*,  $J = 8.3$  Hz, 2H, CH's aromáticos tirosina), 6.80 (*s a*, 1H, NH ala), 6.95 (*d*,  $J = 8.3$  Hz, 2H, CH's aromáticos tirosina), 7.38 – 7.20 (*m*, 5H, CH's aromáticos Cbz).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.38 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 37.70 (CH<sub>2</sub> tirosina), 40.77 (CH<sub>2</sub> acetal), 50.53 (**CH-CH<sub>3</sub>** alanina), 54.04 (CH tirosina), 54.19 (2 **CH<sub>3</sub>-O**), 66.93 (CH<sub>2</sub> Cbz), 101.95 (CH acetal), 121.05 (2 CH's aromáticos tirosina), 128.15, 128.44, 128.47 (5 CH's aromáticos Cbz), 130.31 (2 CH's aromáticos tirosina), 134.25 (*C-*ipso** tir), 136.09 (*C-*ipso** Cbz), 156.04 (**CO-NH** Cbz), 170.61 (**CO-NH** péptido), 170.720 (**CO-NH** acetal).

***N*-Boc-*L*-alanil-glicil-*O*-(*N*-acetaldehído dimetil acetal) 15.**



Siguiendo la metodología 7, a la solución de 0.7026 g (2.856 mmol) del compuesto **10** disuelto en 7.8 mL de THF anhidro tratada con 0.26 mL (1.88 mmol) de TEA, se le adicionaron 0.24 mL (1.8 mmol) de *i*-BCF. Posteriormente a la mezcla formada se le adicionaron 0.42 mL (3.91 mmol) del aminoacetal **12**. Después de ser purificado el producto por cromatografía en columna con un sistema eluyente Hex-AcOEt 1:1, se obtuvieron 0.6033 g (1.88 mmol, 65.8% de rendimiento) del compuesto **15** en forma de polvo amarillo claro con un p.f. de 100°C – 102°C.

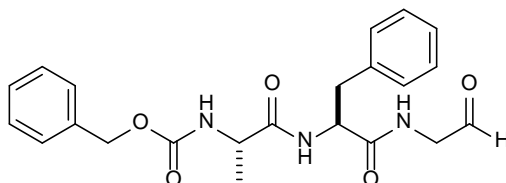
**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.38 (*d*, *J* = 7.1 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**), 1.44 (*s*, 9H, 3 CH<sub>3</sub> Boc), 3.38 (*s*, 8H, 2 **CH<sub>3</sub>-O**, CH<sub>2</sub> acetal), 3.92 (*dd*, *J* = 16.7, 5.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> glicina), 4.01 (*dd*, *J* = 16.7, 5.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> glicina), 4.18 (*m*, 1H, CH alanina), 4.42 (*t*, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH acetal), 5.39 (*d*, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH ala), 6.89 (*s*, 1H, **NH-CO** péptido), 7.25 (*t*, *J* = 5.5 Hz, 1H, **NH-CO** acetal).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.21 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 40.82 (CH<sub>2</sub> glicina), 42.96 (**CH<sub>2</sub>-CH**), 50.37 (**CH-CH<sub>3</sub>**), 54.237 (2 **CH<sub>3</sub>-O**), 80.18 (C-Boc), 102.16 (**CH-CH<sub>2</sub>**), 155.63 (**CO-NH** Boc), 169.05 (**CO-NH** péptido), 173.43 (**CO-NH** acetal).

### 8. Metodología general de oxidación.

En un matraz balón provisto de agitación magnética se colocó un equivalente del derivado acetal y se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Posteriormente se adicionaron 0.25 equivalentes de Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y se dejó reaccionar a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por TLC y utilizando 2,4-dinitrofenil-hidrazina como revelador.

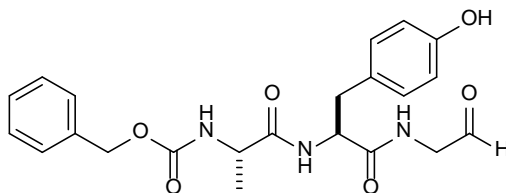
***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-fenilalanil-*O*-(*N*-metilenformilo) 16.**



De acuerdo a la metodología general 8, 0.05 g (0.1094 mmol) del acetal **13** se disolvieron en DCM y se adicionaron 0.0133 g (0.0274 mmol) de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ . Se obtuvieron 0.0347 g (0.084 mmol, 77.11% de rendimiento) del compuesto **16** como sólido amarillo amorfo.

**$^1\text{H}$  RMN.** ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.26 (*d*,  $J = 7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ) 3.09 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ , fen), 3.95 (*m*, 1H,  $\text{CH}_2\text{-COH}$ ), 4.04 (*dd*,  $J = 19.9, 5.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{-COH}$ ), 4.20 (*m*, 1H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 4.80 (*dd*,  $J = 15.1, 7.3$  Hz, 1H,  $\text{CH-CH}_2$ ), 5.06 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2$  Cbz), 7.50 – 6.97 (*m*, 10H,  $\text{CH}$ 's aromáticos), 9.43 (*s*, 1H,  $\text{COH}$ ).

***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-tiroxil-*O*-(*N*-metilenformilo) 17.**

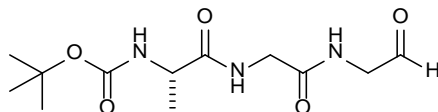


Conforme a la metodología general 8, 0.05 g (0.1057 mmol) del acetal **14** se disolvieron en DCM y se adicionaron 0.012 g (0.026 mmol) de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ . Se obtuvieron 0.032 g (0.074 mmol, 70.42% de rendimiento) del compuesto **17** como sólido amarillo amorfo.

**$^1\text{H}$  RMN.** ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.28 (*d*,  $J = 3.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ) 3.09 (*d*,  $J = 24.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ ), 4.01 (*dt*,  $J = 6.2, 3.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COH}$ ), 4.12 (*m*, 1H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 4.77 (*m*, 1H,

**CH-CH<sub>2</sub>**), 5.07 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>, Cbz), 7.07 (*d*, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH's aromáticos tir), 7.18 (*d*, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH's aromáticos tir), 7.38 – 7.27 (*m*, 5H, CH's aromáticos Cbz), 9.50 (*d*, *J* = 9.7 Hz, 1H, COH).

### ***N*-Boc-*L*-alanil-glicil-*O*-(*N*-metilenformilo) 18.**



Siguiendo el método 8 para la obtención de aldehídos, se disolvieron 0.05 g (0.150 mmol) del acetal **15** en DCM y se adicionaron 0.018 g (0.037 mmol) de Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Se obtuvieron 0.032 g (0.112 mmol, 75.09% de rendimiento) del compuesto **18** como aceite amarillo.

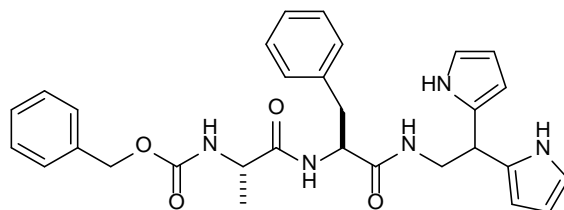
**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.38 (*d*, *J* = 7 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**) 1.42 (*s*, 9H, CH<sub>3</sub>, Boc), 3.40 (*m*, 2H, **CH<sub>2</sub>-COH**) 3.95 (*dd*, *J* = 16.9, 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>, gli), 4.04 (*dd*, *J* = 13.3, 5.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>, gli), 4.13 (*m*, 1H, **CH-CH<sub>3</sub>**), 9.60 (*s*, 1H, COH).

## **9. Procedimiento general para la formación del sistema dipirrólico.**

En un matraz balón provisto de agitación magnética a temperatura ambiente, se disolvió 1 equivalente molar del aldehído correspondiente en DCM. Posteriormente se adicionó a la solución formada 25 equivalentes de Pirrol destilado dejando reaccionar por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se adicionaron a la mezcla de reacción 0.25 equivalentes de TFA. La mezcla se dejó reaccionar durante 5 horas.

El producto de reacción se extrajo con DCM y se lavó con una solución saturada de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró en rotavapor. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en placa preparativa.

***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-fenilalanil-*O*-(*N*-*meso*-dipirrolilmetileno) 19.**

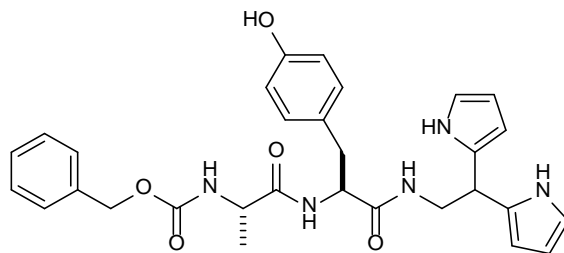


Siguiendo la metodología general 9, a la solución formada por 0.3 g (0.723 mmol) del aldehído **16** en DCM se adicionaron 1.26 mL (18.25 mmol) de pirrol destilado. Posteriormente se adicionaron 0.014 mL (0.182 mmol) de TFA. Una vez purificado el producto por cromatografía en placa preparativa con un sistema eluyente (1:1) de Hex-AcOEt, se obtuvieron 0.197 g (0.374 mmol, 51.29% de rendimiento) del compuesto **19** como espuma.  $[\alpha]_D = -1.00$  ( $c=1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**$^1\text{H}$  RMN.** ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.30 (*d*,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ ) 3.02 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}$  fen), 3.68 (*td*,  $J = 13.5, 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH } \alpha\text{-meso}$ ), 4.19 (*m*, 2H,  $\text{CH-CH}_3$  alanina, CH *meso*), 4.59 (*m*, 1H,  $\text{CH-CH}_2$  fen), 5.06 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2$  Cbz), 5.42 (*d*,  $J = 7.1$  Hz, 1H, NH ala), 5.46 (*d*,  $J = 7.4$  Hz, 1H,  $\text{NH-CO}$  péptido), 5.93 (*s*, 1H, CH, dipirrol), 6.11 (*dt*,  $J = 5.3, 2.6$  Hz, 1H, CH, dipirrol), 6.61 (*d*,  $J = 2.5$  Hz, 1H, CH, dipirrol), 6.96 (*d*,  $J = 7.0$  Hz, 1H, CH, dipirrol), 7.09 (*d*,  $J = 7.5$  Hz, 1H,  $\text{NH-CO}$  dipirrol), 7.17 (*d*,  $J = 7.2$  Hz, 1H, CH, dipirrol), 7.21 (*d*,  $J = 6.3$  Hz, 1H, CH, dipirrol), 7.43 – 7.23 (*m*, 10H, 10 CH's aromáticos Cbz y fen) 8.49 (*sa*, 1H, NH dipirrol), 8.58 (*sa*, 1H, NH dipirrol).

**$^{13}\text{C}$  RMN.** ( $\text{CDCl}_3$  100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.31 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ), 37.84 ( $\text{CH}_2\text{-CH}$  fen), 43.53 ( $\text{CH}_2$   $\alpha\text{-meso}$ ), 50.64 ( $\text{CH-CH}_3$ ), 53.91 ( $\text{CH-CH}_2$  fen), 67.12 ( $\text{CH}_2$  Cbz), 102.08 (CH *meso*), 105.79 (CH, dipirrol), 105.88 (CH, dipirrol), 108.25 (CH, dipirrol), 108.29 (CH, dipirrol), 117.30 (CH dipirrol), 117.35 (CH, dipirrol), 128.03, 128.25, 128.27, 128.55, 128.61, 129.24 (10 CH's aromáticos Cbz y fen), 130.25 (*C-*ipso** dipirrol), 130.43 (*C-*ipso** dipirrol), 135.94 (*C-*ipso** fen), 136.40 (*C-*ipso** Cbz), 156.04 ( $\text{CO-NH}$  Cbz), 170.87 ( $\text{CO-NH}$  péptido), 172.50, ( $\text{CO-NH}$  dipirrol).

***N*-Cbz-*L*-alanil-*L*-tirosil-*O*-(*N*-*meso*-dipirrolilmetileno) 20.**

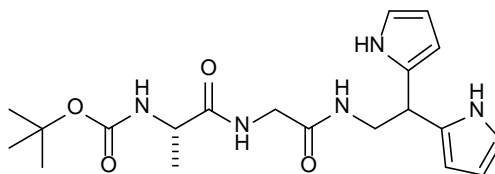


De acuerdo al procedimiento general 9, a la solución formada por 0.3 g (0.702 mmol) del aldehído **17** disueltos en DCM se adicionaron 1.22 mL (17.56 mmol) de pirrol destilado. Posteriormente se adicionan 0.014 mL (0.175 mmol) de TFA. Una vez purificado el producto or cromatografía en placa preparativa con un sistema eluyente (2:3), se obtuvieron 0.174 g (0.321 mmol, 45.67% de rendimiento) del compuesto **20** como espuma.  $[\alpha]_D = -2.00$  (c=1, CHCl<sub>3</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.20 (*d*, *J* = 7.3 Hz, 3H, **CH**<sub>3</sub>-CH) 2.88 (*d*, *J* = 14.5, 13.8 Hz, 2H, **CH**<sub>2</sub>-CH fen), 3.66 (*dd*, *J* = 16.3, 9.3 Hz, 2H, **CH**<sub>2</sub>-CH  $\alpha$ -*meso*), 4.17 (*ddd*, *J* = 21.4, 12.5, 6.2 Hz, 2H, **CH**-CH<sub>3</sub>, CH *meso*), 4.44 (*m*, 1H, **CH**-CH<sub>2</sub> fen), 5.05 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub> Cbz), 5.52 (*m*, 2H, NH Cbz, **NH**-CO péptido), 5.91 (*s*, 1H, CH dipirrol), 6.11 (*dd*, *J* = 9.0, 6.6 Hz, 2H, CH dipirrol), 6.59 (*s*, 1H, CH, dipirrol), 6.68 (*td*, *J* = 8.4, 5.3 Hz, 2H, CH dipirrol), 6.85 (*d*, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH's aromáticos tirosina), 6.94 (*d*, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH's aromáticos tirosina), 7.07 (*d*, *J* = 7.5 Hz, 1H, **NH**-CO dipirrol), 7.31 (*s*, 5H, CH's aromáticos Cbz), 8.57 (*m*, 1H, NH dipirrol), 9.48 (*s*, 1H, NH dipirrol).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.30 (**CH**<sub>3</sub>-CH), 37.16 (**CH**<sub>2</sub>-CH fen), 43.59 (**CH**<sub>2</sub>-CH  $\alpha$ -*meso*), 55.26 (**CH**-CH<sub>2</sub> tirosina), 67.26 (CH<sub>2</sub> Cbz), 102.08 (**CH**-CH<sub>2</sub> *meso*), 105.77, 108.13, 108.25, 115.62, 117.43, 118.89 (6 CH's dipirrol), 128.13, 128.33, 128.58 (5 CH's aromáticos Cbz), 130.37 (4 CH's aromáticos tirosina), 130.51 (C-*ipso* tirosina), 135.90 (C-*ipso* Cbz), 155.21 (C-*ipso* dipirrol), 155.28 (C-*ipso* dipirrol), 156.19 (**CO**-NH Cbz), 171.076 (**CO**-NH péptido), 172.61 (**CO**-NH dipirrol).

***N*-Boc-*L*-alanil-glicil-*O*-(*N*-*meso*-dipirrolilmetileno) 21.**



En base al procedimiento general 9, a la solución formada por 0.3 g (1.045 mmol) del aldehído **18** disueltos en DCM se adicionaron 1.8 mL (26.13 mmol) de pirrol destilado. Posteriormente se adicionaron 0.02 mL (0.261 mmol) de TFA. Una vez purificado el producto por cromatografía en placa preparativa con un sistema eluyente Hex-AcOEt (3:7), se obtuvieron 0.208 g (0.516 mmol, 49.37% de rendimiento) del compuesto **21** como un aceite viscoso.  $[\alpha]_D = -5.00$  (c=1, CHCl<sub>3</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz)  $\delta$  (ppm) 1.35 (*d*, *J* = 7.1 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>-CH**) 1.44 (*s*, 9H, CH<sub>3</sub> Boc), 3.67 (*m*, 2H, **CH<sub>2</sub>-CH  $\alpha$ -meso**), 3.83 (*dd*, *J* = 16.6, 5.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> gli), 3.92 (*dd*, *J* = 16.7, 5.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> gli), 4.11 (*m*, 1H, **CH-CH<sub>3</sub>**), 4.39 (*dd*, *J* = 13.5, 8.2 Hz, 1H, **CH-CH<sub>2</sub> meso**), 5.22 (*m*, 1H, NH ala), 6.00 (*d*, *J* = 0.8 Hz, 1H, CH, dipirrol), 6.12 (*m*, 2H, CH dipirrol), 6.66 (*dt*, *J* = 3.6, 1.8 Hz, 1H, CH dipirrol), 6.72 (*m*, 2H, CH dipirrol), 7.15 (*t*, *J* = 5.4 Hz, 1H, **NH-CO péptido**), 7.24 (*t*, *J* = 5.7 Hz, 1H, **NH-CO dipirrol**), 8.90 (*d*, *J* = 22.0 Hz, 1H, NH dipirrol), 9.94 (*d*, *J* = 23.7 Hz, 1H, NH dipirrol).

**<sup>13</sup>C RMN.** (CDCl<sub>3</sub> 100 MHz)  $\delta$  (ppm) 18.12 (**CH<sub>3</sub>-CH**), 28.29 (3 CH<sub>3</sub> Boc), 42.92 (CH<sub>2</sub> gli), 43.55 (**CH<sub>2</sub>-CH  $\alpha$ -meso**), 50.46 (**CH-CH<sub>3</sub>**), 80.57 (C Boc), 102.21 (**CH-CH<sub>2</sub> meso**), 105.02, 105.26, 105.65, 105.76, 108.17, 108.22 (6 CH's dipirrol), 117.460 (C-*ipso* dipirrol), 117.85 (C-*ipso* dipirrol), 159 (**CO-NH Boc**), 169.036 (**CO-NH péptido**) 173.320 (**CO-NH dipirrol**).

## 10. Titulación de dipirroles con aniones.

Para llevar a cabo la titulación de los dipirroles con aniones, era necesario preparar soluciones al 0.01M de los compuestos en CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

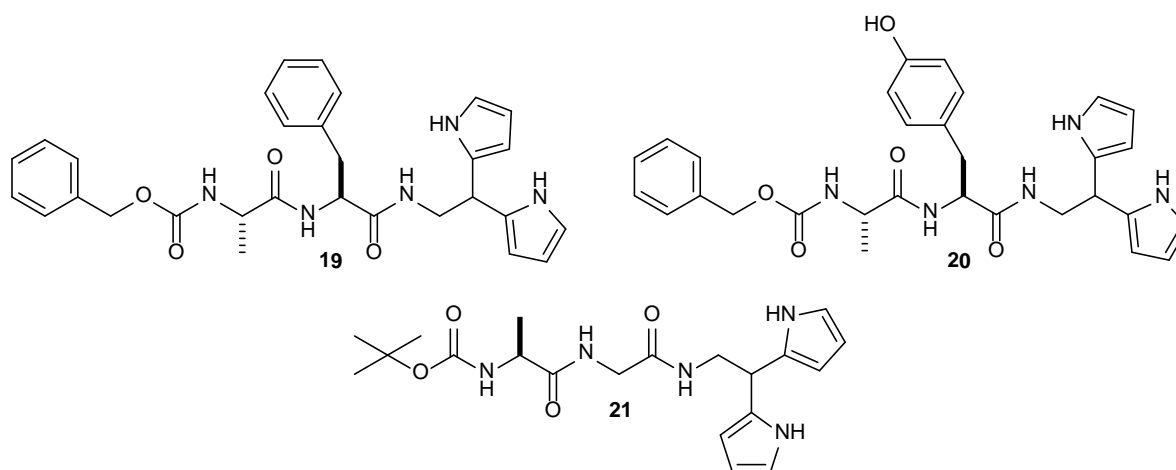
Se hicieron entonces las tres soluciones correspondientes a los 3 compuestos a probar, siendo:

- Compuesto **19**: 0.0034 g ( $6.4762 \times 10^{-3}$  mmol) disueltos en 0.65 mL de CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
- Compuesto **20**: 0.0035 g ( $6.4695 \times 10^{-3}$  mmol) disueltos en 0.65 mL de CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
- Compuesto **21**: 0.0026 g ( $6.4838 \times 10^{-3}$  mmol) disueltos en 0.65 mL de CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

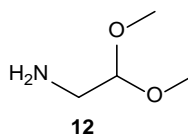
Posteriormente, a cada solución se fue agregando fracciones de 0.1 equivalentes de la sal de TBA-F hasta llegar a un total de 1 equivalente. Cada nueva adición de la sal conllevó la obtención de un espectro de <sup>1</sup>H RMN.

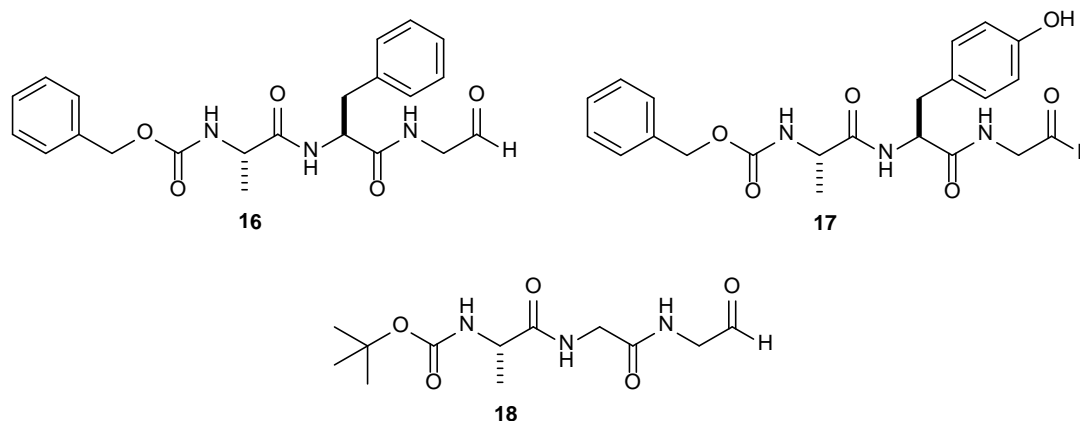
## VII. Conclusiones

En el presente trabajo, se llevó a cabo el diseño, la síntesis y elucidación estructural por Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones de una serie de compuestos de tipo *N*-Carbamoil-*O*-(*N*-*meso*-dipirrolilmetilen)- $\alpha$ -péptidos **19**, **20**, **21**. Los compuestos obtenidos son completamente novedosos, no existe reporte en la literatura de este tipo de sistemas (péptidos acoplados a sistemas dipirrólicos), por lo que la síntesis es interesante además desde el punto de vista sintético.



Se llevó a cabo la obtención de los derivados peptídicos *O*-oxofuncionalizados, **16**, **17** y **18**, mediante el acoplamiento de los péptidos con el aminoacetaldehído dimetil acetal **12**, y posterior oxidación bajo condiciones suaves con  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  para la obtención de los aldehídos correspondientes.





Se llevó a cabo la correlación con ADN de los compuestos peptídicos mediante electroforesis en gel obteniendo como resultados que los compuestos sintetizados presentaron actividad como reconocedores de surco utilizando al plásmido pUCP20 como blanco, tanto en presencia como ausencia de magnesio, siendo el compuesto **19** el cual presentó mayor actividad contra el plásmido a 20  $\mu\text{g}$  en ausencia de magnesio.

Aunque los compuestos obtenidos interactúan con el ADN, no implica que sean antibióticos, ya que la actividad antibacteriana depende de muchos factores como son absorción del compuesto por la bacteria, etc. Por tal motivo es importante realizar ensayos como agentes antibacterianos. Así mismo es conveniente realizar pruebas de citotoxicidad pues dado el mecanismo de acción molecular pueden presentar efectos colaterales.

La titulación de los compuestos **19**, **20** y **21** con el anión fluoruro, presentó un comportamiento peculiar de estos derivados péptido-dipirrólicos, los cuales presentaron en su estructura diferentes sitios de reconocimiento por el anión, que están en función de aspectos tanto conformacionales como de interacciones intramoleculares e intermoleculares (de tipo supramolecular en paralelo), lo cual abre la puerta también al estudio de estos compuestos en el terreno de la química supramolecular, pudiendo dar a los compuestos aquí descritos nuevas

propiedades y aplicaciones tanto en el campo supramolecular como en el reconocimiento selectivo de iones.

## VIII. Referencias

1. Vecom, *Antibióticos*. <http://fotografia.tripod.com/textos/antibioticos1.htm>
2. Sánchez de Rivas, C. ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana? *Química Viva*. ISSN, **2006**, *2*, 1666-7948.
3. Wermuth, Camile G. Ed. The practice of Medicinal Chemistry, *Academic Press* **1996**.
4. Maxwell, A. *Trends Microbiol*, **1997**, *5*, 102-109.
5. Chacón-García, L., Martínez, R. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 1345-1359.
6. Chacón-García, L.; Martínez, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 731-736.
7. Chacón-García, L.; Rodríguez-Palacios, M.E.; Martínez, R.; Apan, M.T. *Rev. Soc. Quím. Mex.* **2003**, *47*, 186-189.
8. Carey, F. A. *Química Orgánica*, 6ta. Edición, **2006**, 1122 – 1177.
9. Bailey, P. D. *An Introduction to Peptide Chemistry*; Jonh Wiley & Sons: New York, **1997**.
10. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons: New York, **1999**.
11. Hancock R. E. W., Chapple Daniel S., *Antimicrob. Agents Chemoter.* **1999**, *43*, 6, 1317-1323.

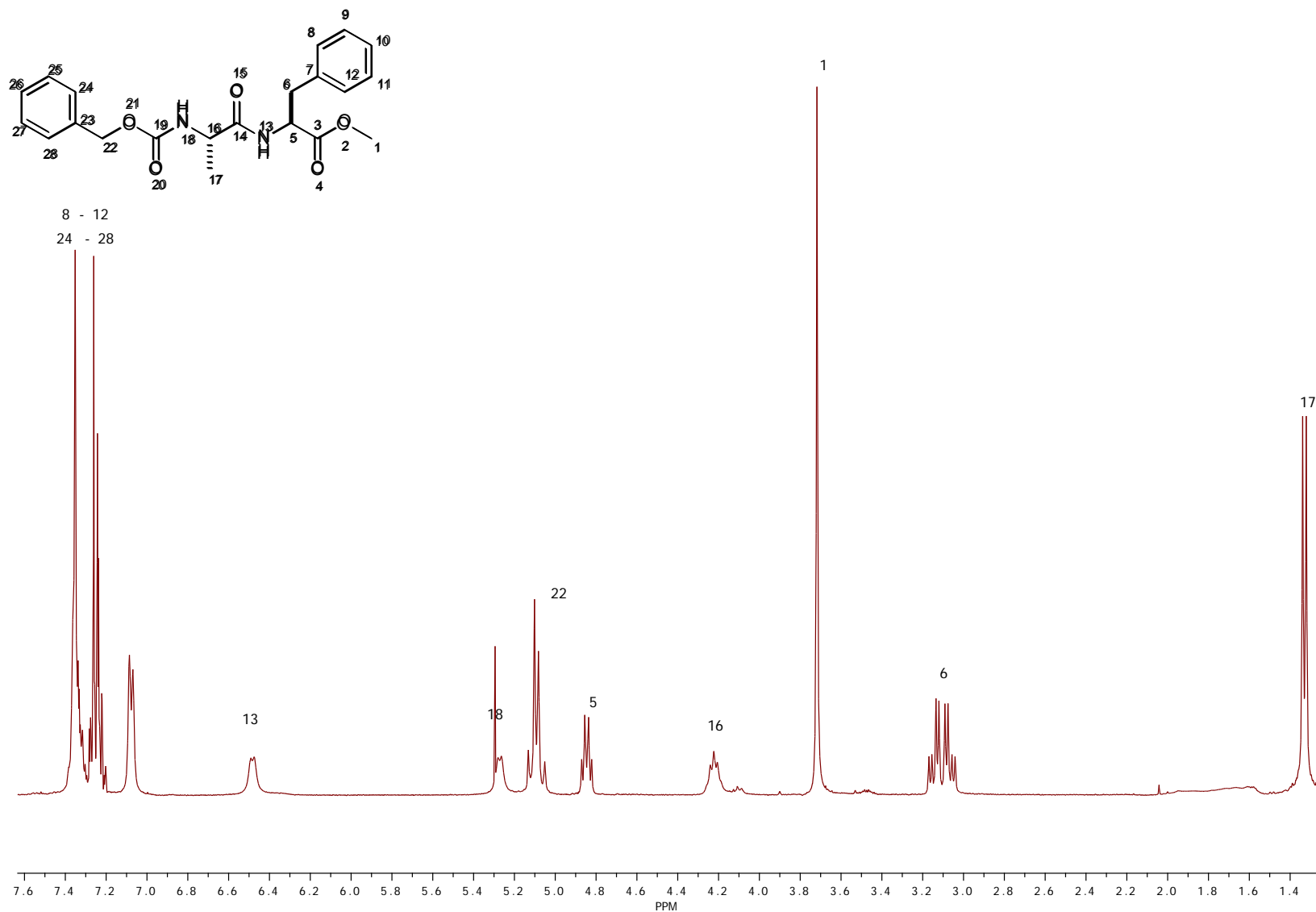
12. Dubin A., Mak P., Dubin G., Rzychon M., Stec-Niemczyk J., Władyka B., Maziarka K. y Chmiel D., *Acta Biochimica Polonica*, **2005**, 50, 3, 633 – 638.
13. Villarreal-Franco R., Huizar-López R., Corrales M., Sánchez T., Islas-Rodríguez, *Investigación en Salud*. **2004**, 003, 170-179.
14. K. Davtyan T., S. Hakobyan I., E. Murandyan R., G. Hovhannisyan H., S. Gabrielyan E. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2007**, 59, 1114-1122.
15. M.B. Strom, B.E. Haug, M.L. Skar, W. Stensen, T. Stiberg, and J.S. Svendsen, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 1567 – 1570.
16. Wieprecht T., Dathe M., Epand R. M., Beyermann M., Krause E., Maloy W. L., MacDonald D., Bienert M., *Biochemistry*, **1997**, 36, 12869 – 12880.
17. Liu Z., Brady A., Young A., Rasimick B., Chen K., Zhou C., Kallenback N. R., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, 51, 2, 597 – 603.
18. Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Borowski E., *Int. J. Pep. Protein. Res.*, **1986**, 27, 449.
19. Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Borowski E., *Journal of Medicinal Chemistry*, **1987**, 30, 10, 1715 – 1719.
20. Lesczak B., Katariski P., Sztajer H., Mastalerz P., *Journal of Medicinal Chemistry*, **1986**, 29, 11, 2212 – 2217.
21. Rajendra N. M., Anshupriya S., Pritha P., Prasanta K. D., *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 94 – 102.

22. Ziv O., Hong J., Shai Y., *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 272, 14643-14649.
23. Valencia Barajas, Y., *Síntesis y actividad antimicrobiana de nuevos derivados de fluoroquinolona sustituidos en la posición 7*. Tesis de Maestría. **2010**. 15- 16.
24. Machuca de la Paz, E., *Síntesis y evaluación como agentes antibacterianos de nuevas aminoacil fluoroquinolonas*. Tesis de licenciatura. **2010**. 5 – 8.
25. Torres Ochoa R. O., *Diseño y síntesis de péptidos como reconocedores de surco mediante inteligencia artificial*. Tesis de Licenciatura, **2002**.
26. Mejía Farfán I. N., *Síntesis de Calix[4]pirroles mediante el uso de ácidos de Lewis*. Tesis de licenciatura, **2002**.
27. Král V., Vašek P., Dolenský B., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, 69, 1126-1136.
28. Boyle R. W., Xie L. M., Dolphin D., *Tetrahedron lett.* **1994**, 35, 5377; Ema T., Tomita T.J., *Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4240.
29. Setsune J. I., Hashimoto M., Shiosawak, *Tetrahedron lett.* **1998**, 54, 1407.
30. Biaggi C., Benaglia M., Raimondi L., *Tetrahedron*, **2006**, 62, 12375.
31. Naik R., Joshi P., Kaiwar S. P., Deshpande R. K., *Tetrahedron*, **2003**, 59, 2207.
32. Sobral A. J. F. N., Rebanada N. G. C. L., da Silva M., Lamperia S. H., Silvia M. R., Beja A. M., Paixao J. A., Gonsalves A. M., d' A. R., *Tetrahedron lett.*, **2003**, 44, 3971.
33. Vigmond S. J., Chang M. C., Kallury K. M. R., Thompson M., *Tetrahedron*, **1994**, 35, 2455.

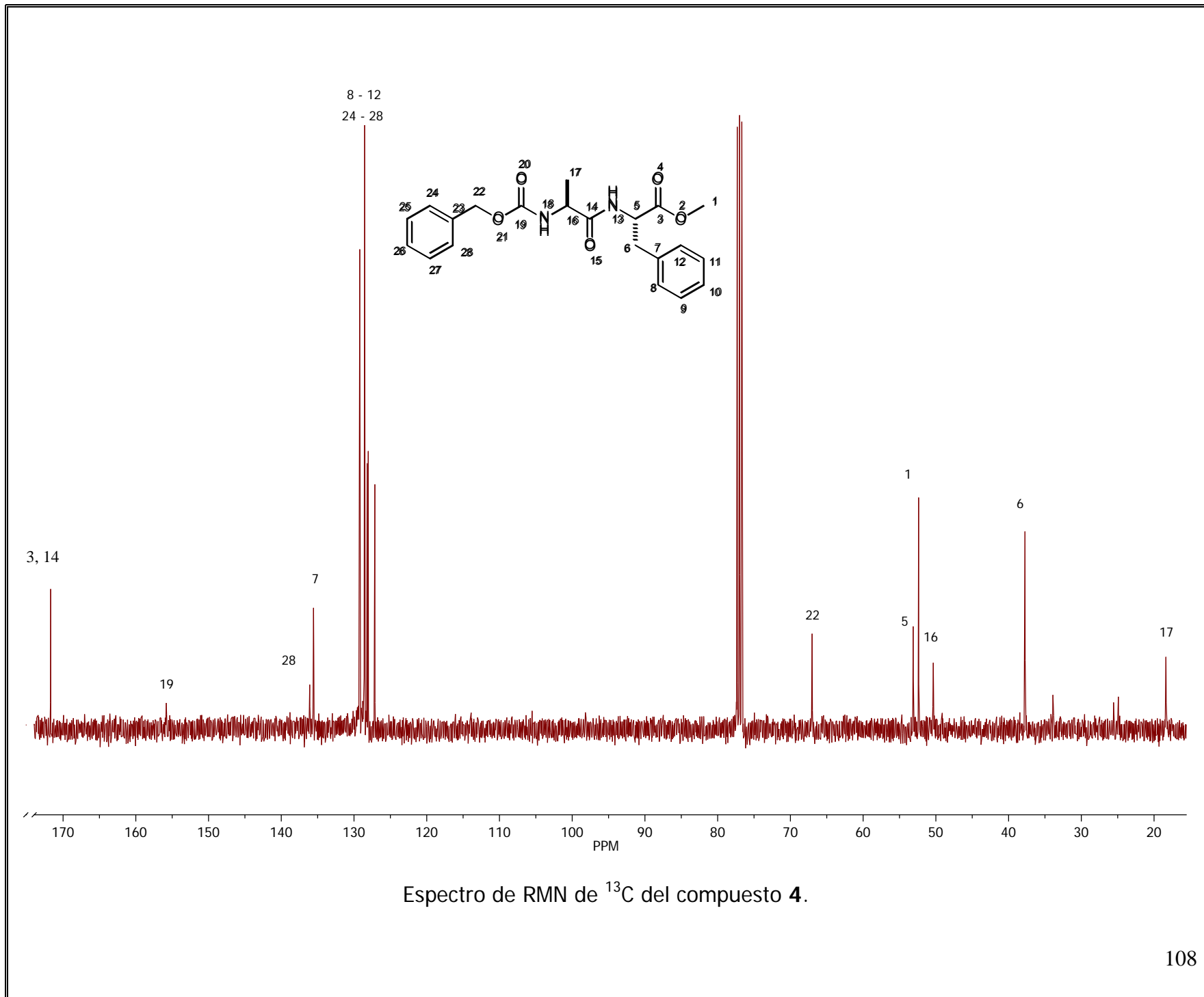
34. Lee C. H., Lindsey J. S., *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 11427.
35. Temelli B., Unaleroglu C., *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 10130.
36. Littler B. J., Miller M. A., Hong C., Wagner R. W., O'shea D. F., Boyle P. D., Lindsey J. S. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 1391.
37. Mejía-Farán I., Contreras-Celedón C., Aviña-Verduzco J., Chacón-García L., *Letters in Organic Chemistry*, **2008**, *5*, 237 – 239.
38. Zhang Y., Liang J., Shang Z., *Chim. J. Chem.*, **2010**, *28*, 259 – 262.
39. Kbeer A., Shaik H., Vishal A., Patil, B. P. Bandgar, *Orbital Elect. J. Chem.*, **2012**, *4(2)*, 111.
40. Kabeer A., Vishal A., Azeem A., *E-Journal of Chemistry*, **2012**, *9(4)*, 1796.
41. Syed Shahed Ali, *Arch. Appl. Sci. Res.*, **2010**, *2(6)*, 121.
42. Rohand T., Dolusic E., Ngo T. H., Maes W., Dehaen W., *ARKIVOK*, **2007**, (x), 307.
43. Hong S-J., Lee M-H., Lee C-H., *Bull Korean Chem. Soc.* **2004**, *25(10)*, 1545.
44. Laha J. K., Dhanalekshmi S., Taniguchi M., Ambroise A., Lindsey J. S., *Organic Process Research & Development*, **2003**, *7*, 799.
45. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. *DRI Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride*. Washington, DC: National Academy Press; **1997**. Rakel D, ed. *Integrative Medicine*. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; **2007**.
46. Gallardo Alfonso S., *Síntesis de 1-adamantil-(N-meso-dipirrolilmetilen)-carboxamida*. Tesis de Licenciatura, **2013**.

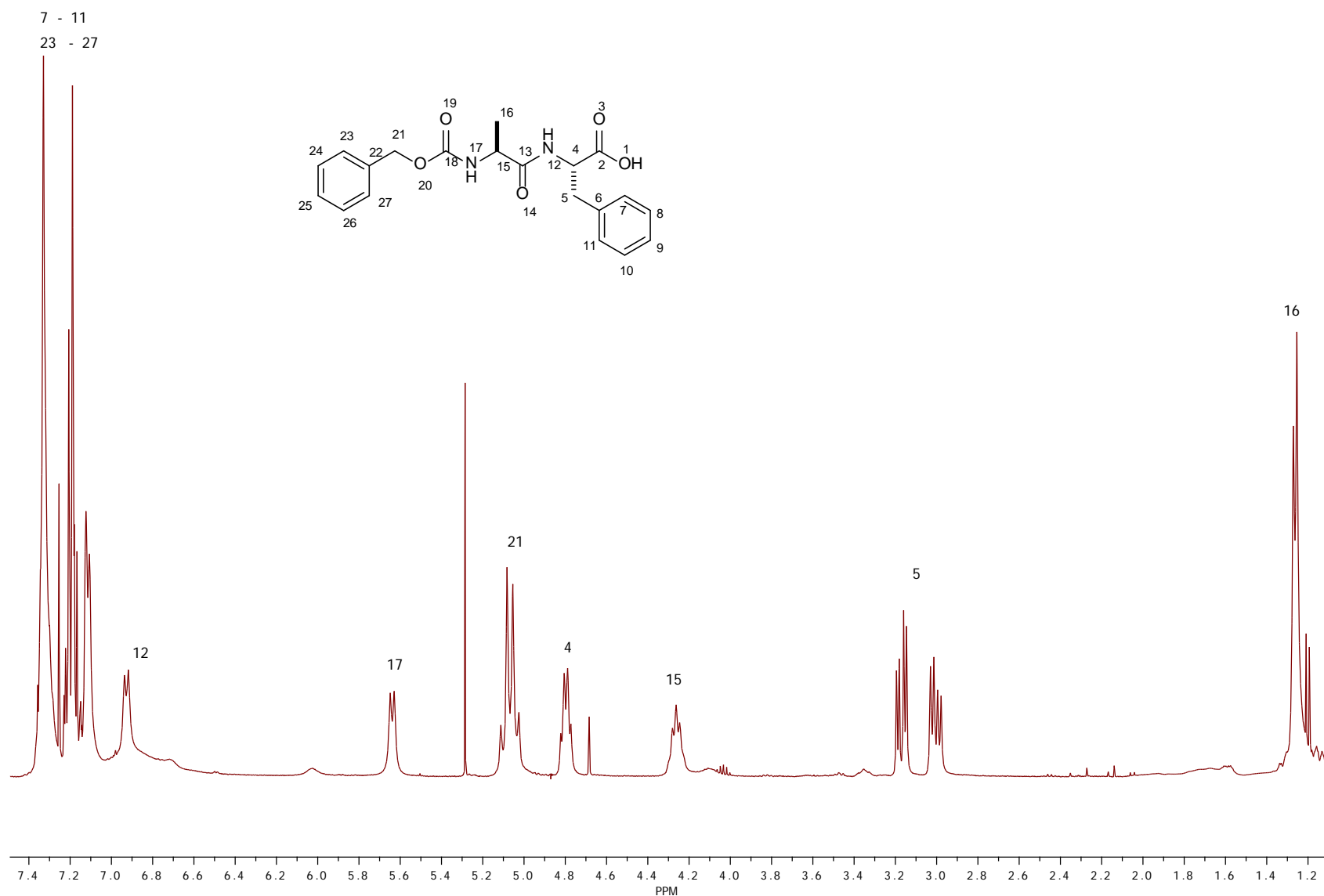
47. Bothwell Jason M. Krabbe Scott W. Mohan Ram S., *Chem Soc Rev.*, **2011**, 40, 4749-4770.
48. Sobral Abílio J. F. N., Rebanada Nuno G. C. L., da Silva Melo, et. Al. *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 3971-3973.

### IX. Anexos

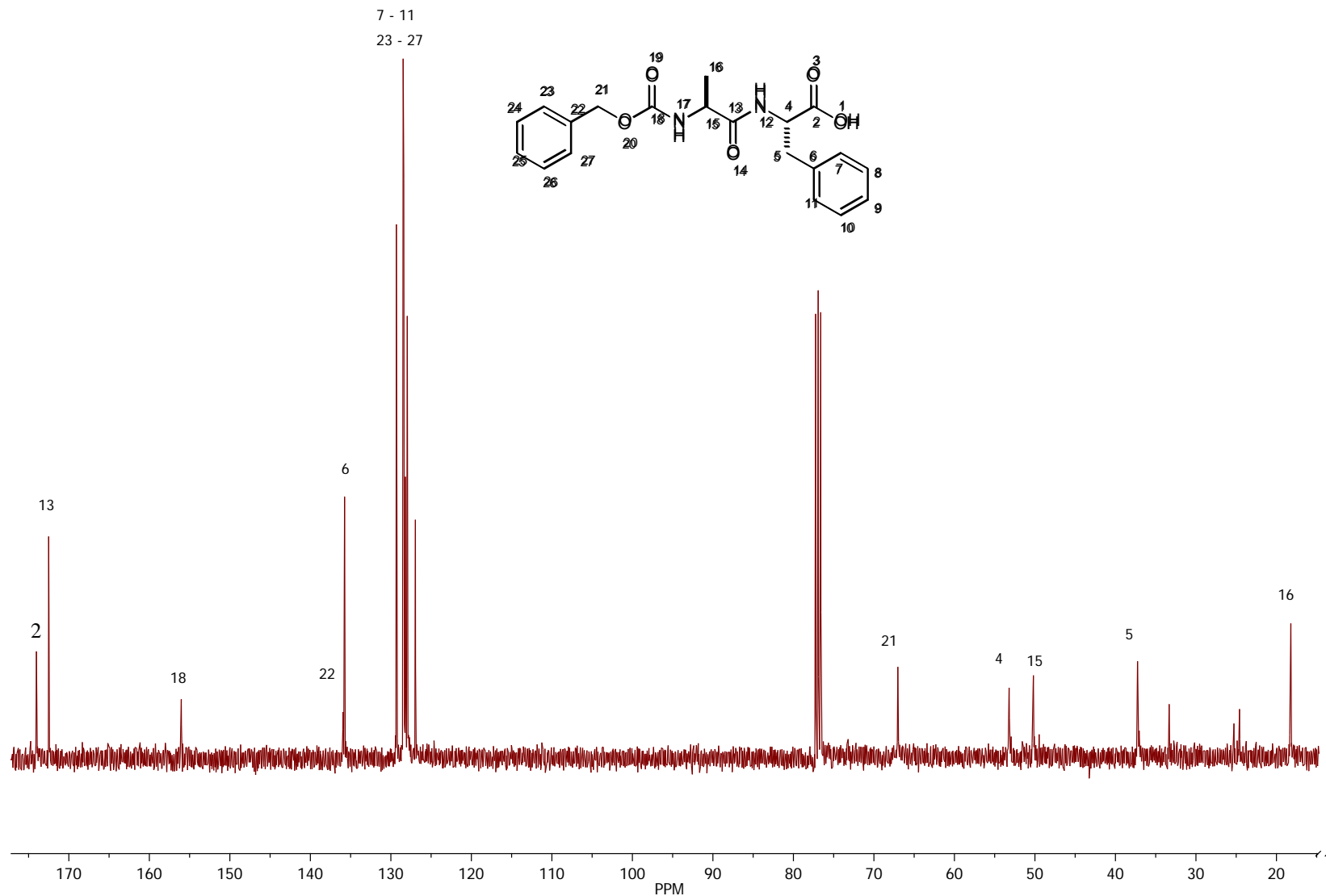


Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 4.

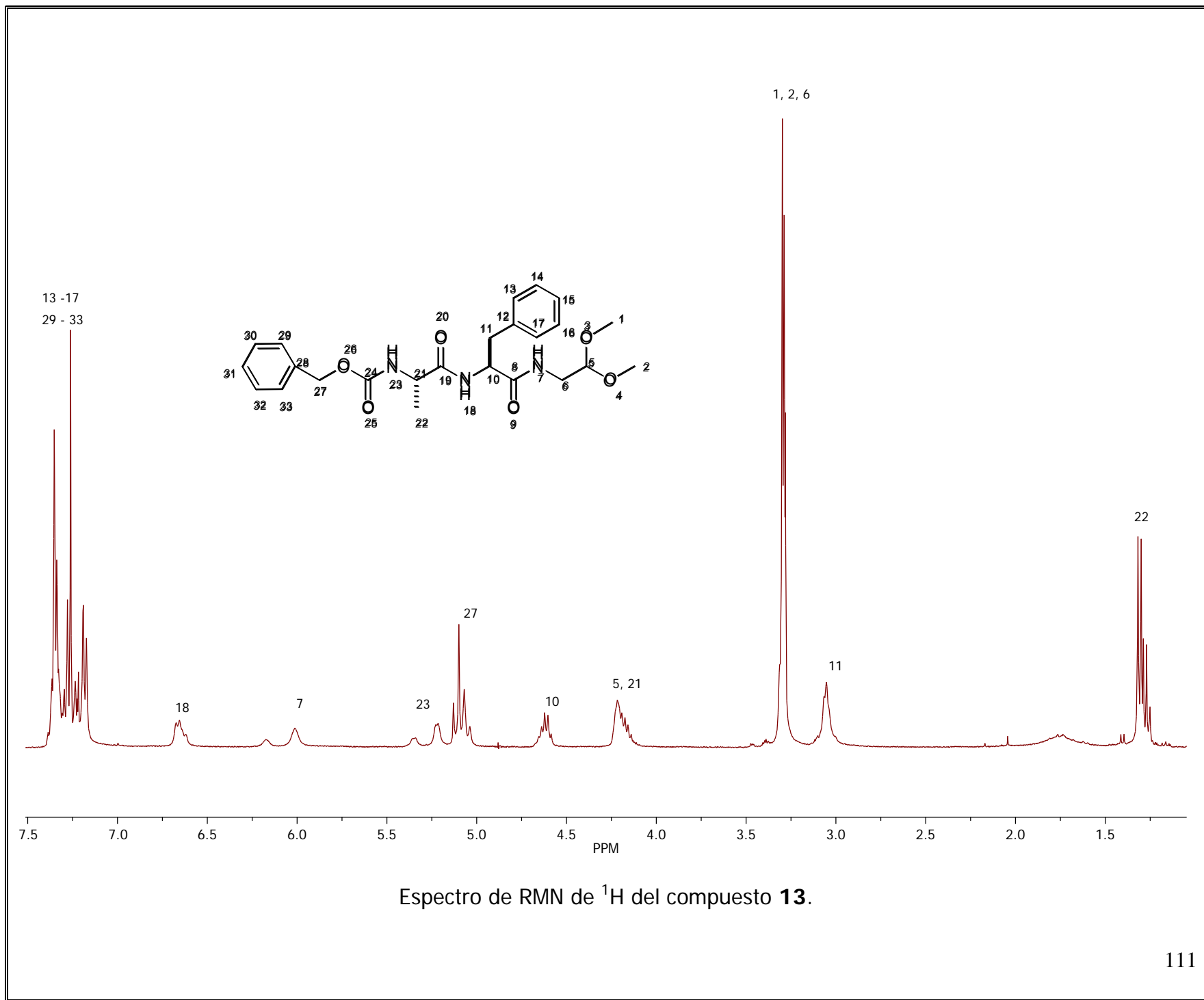


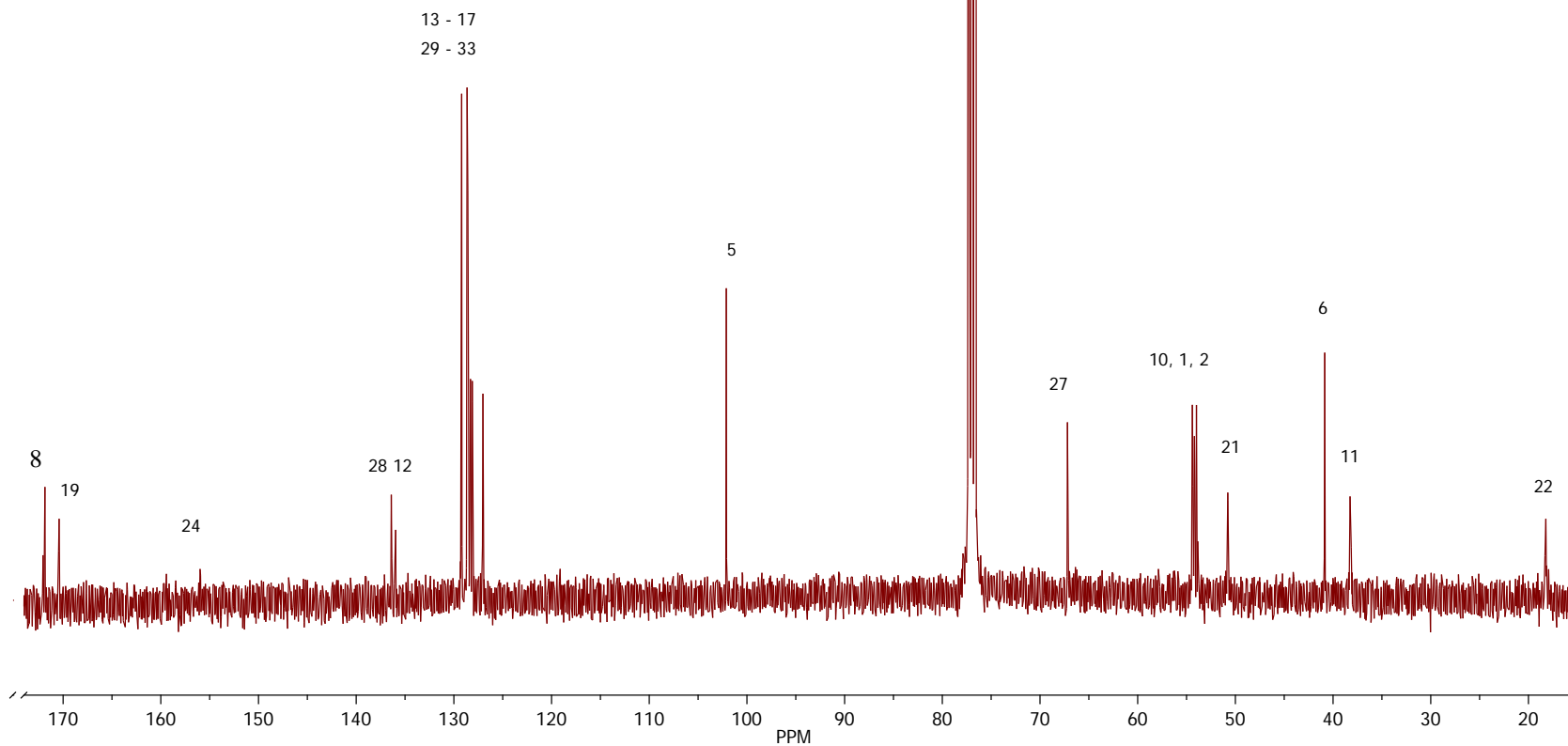
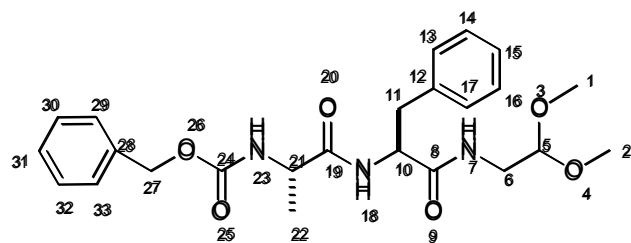


Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 6.

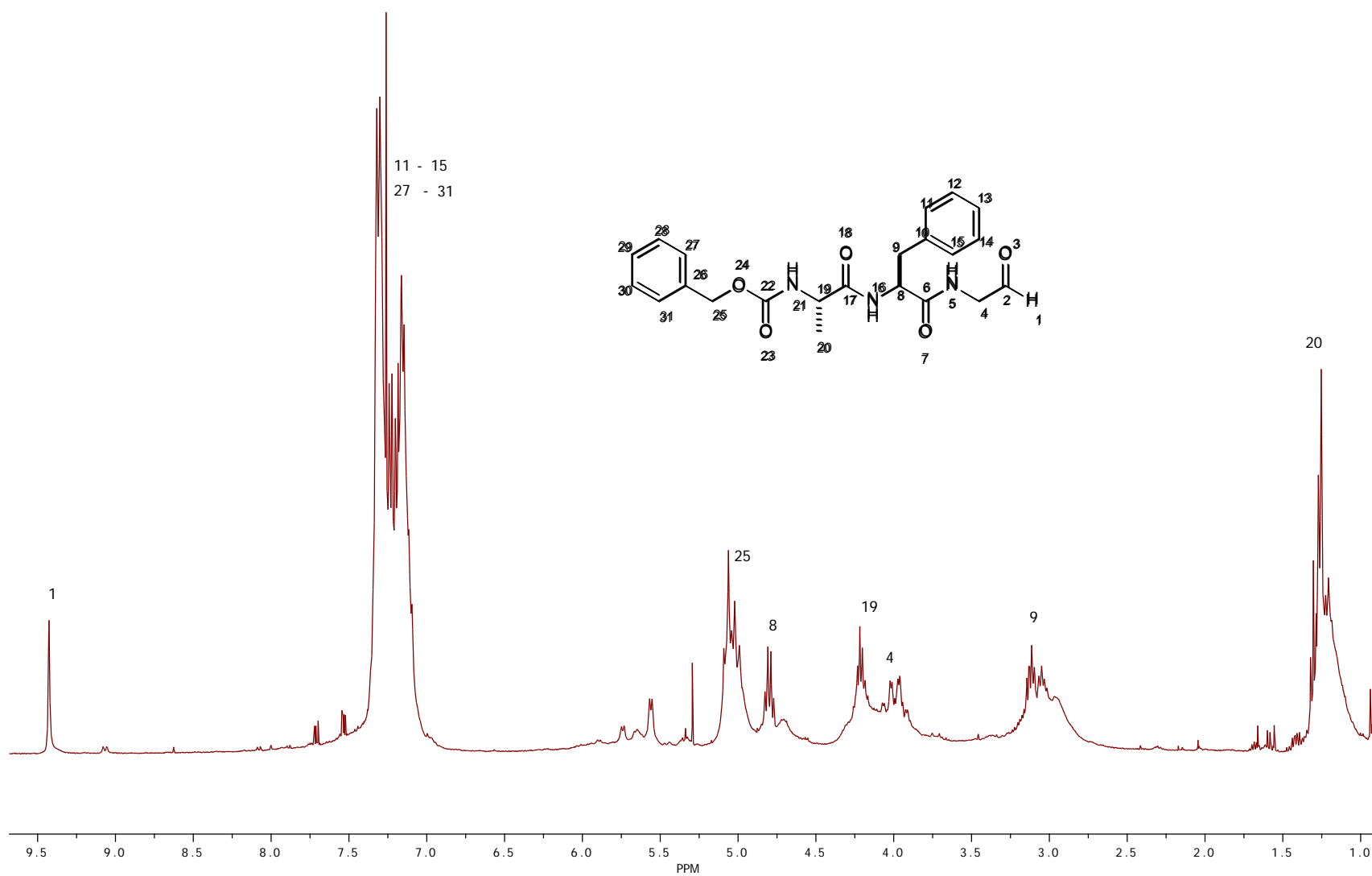


Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del compuesto 6.

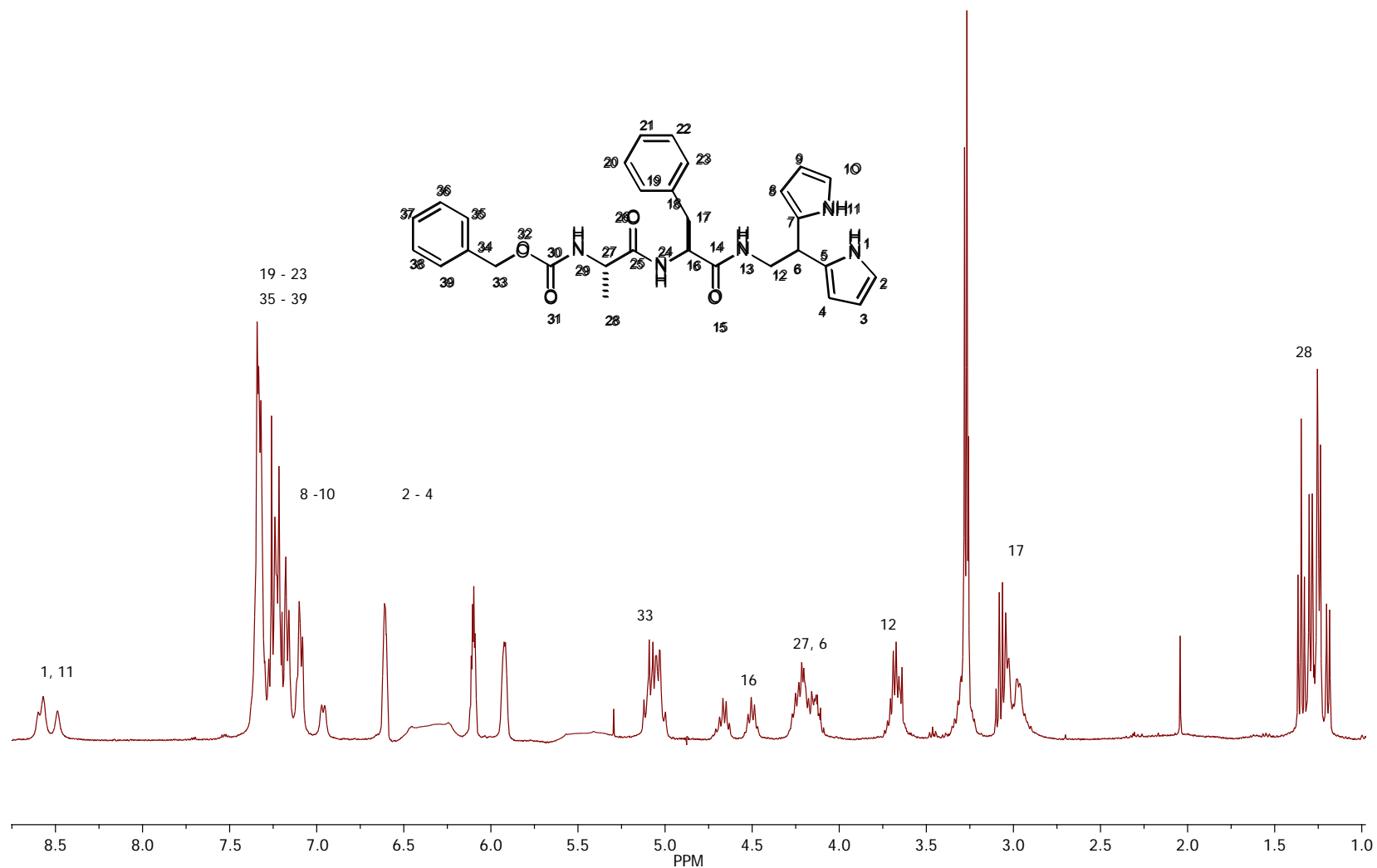




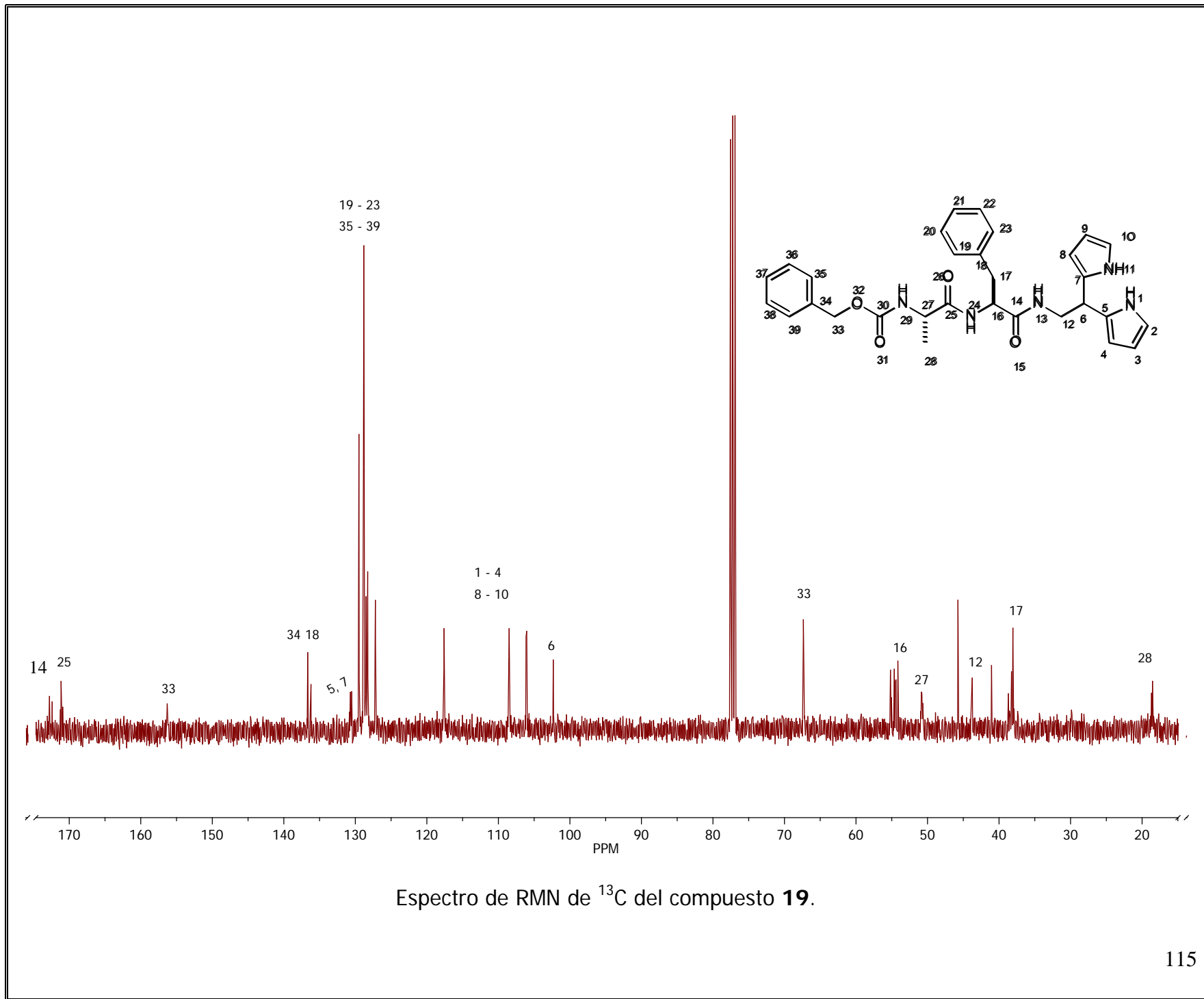
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **13**.

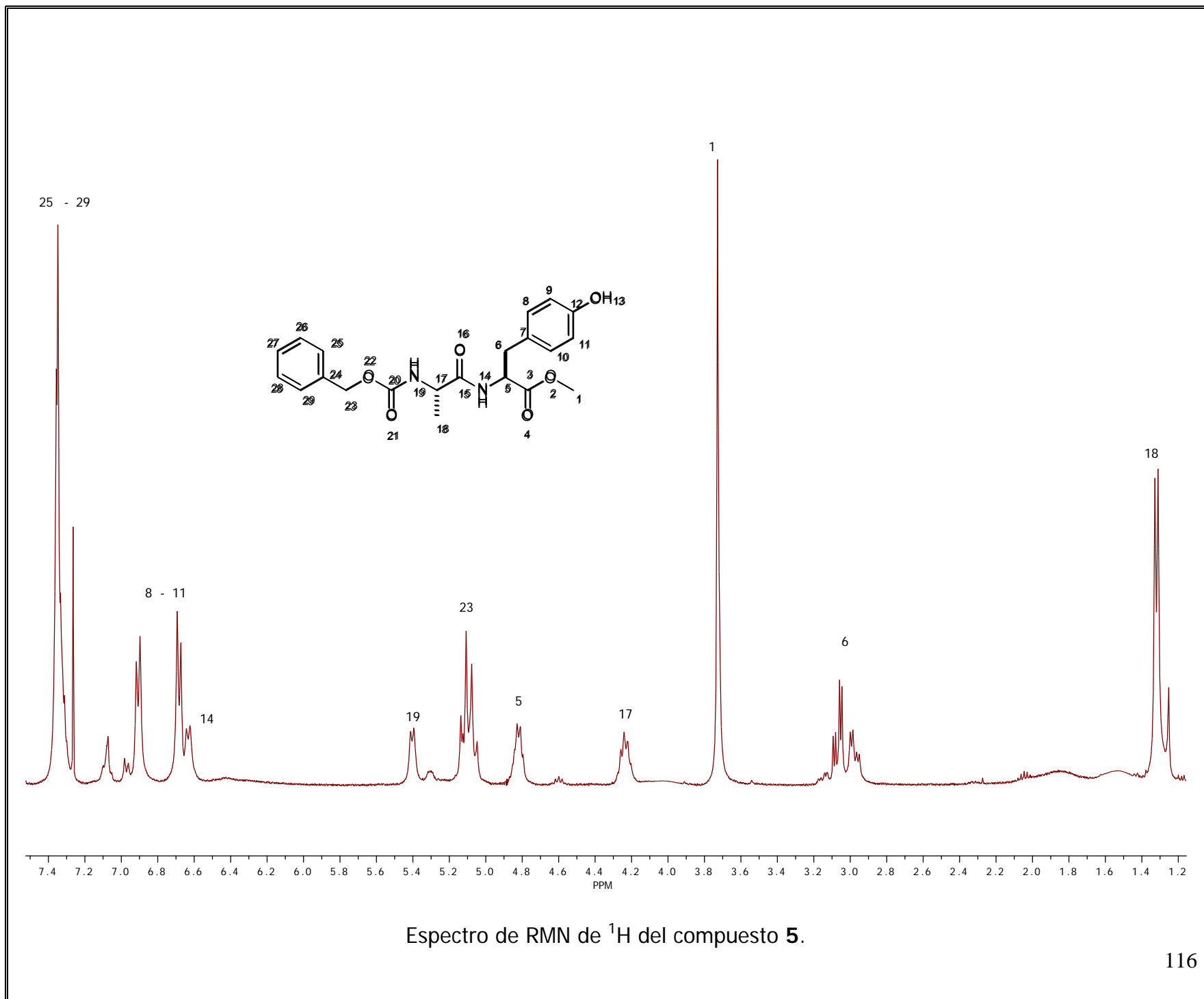


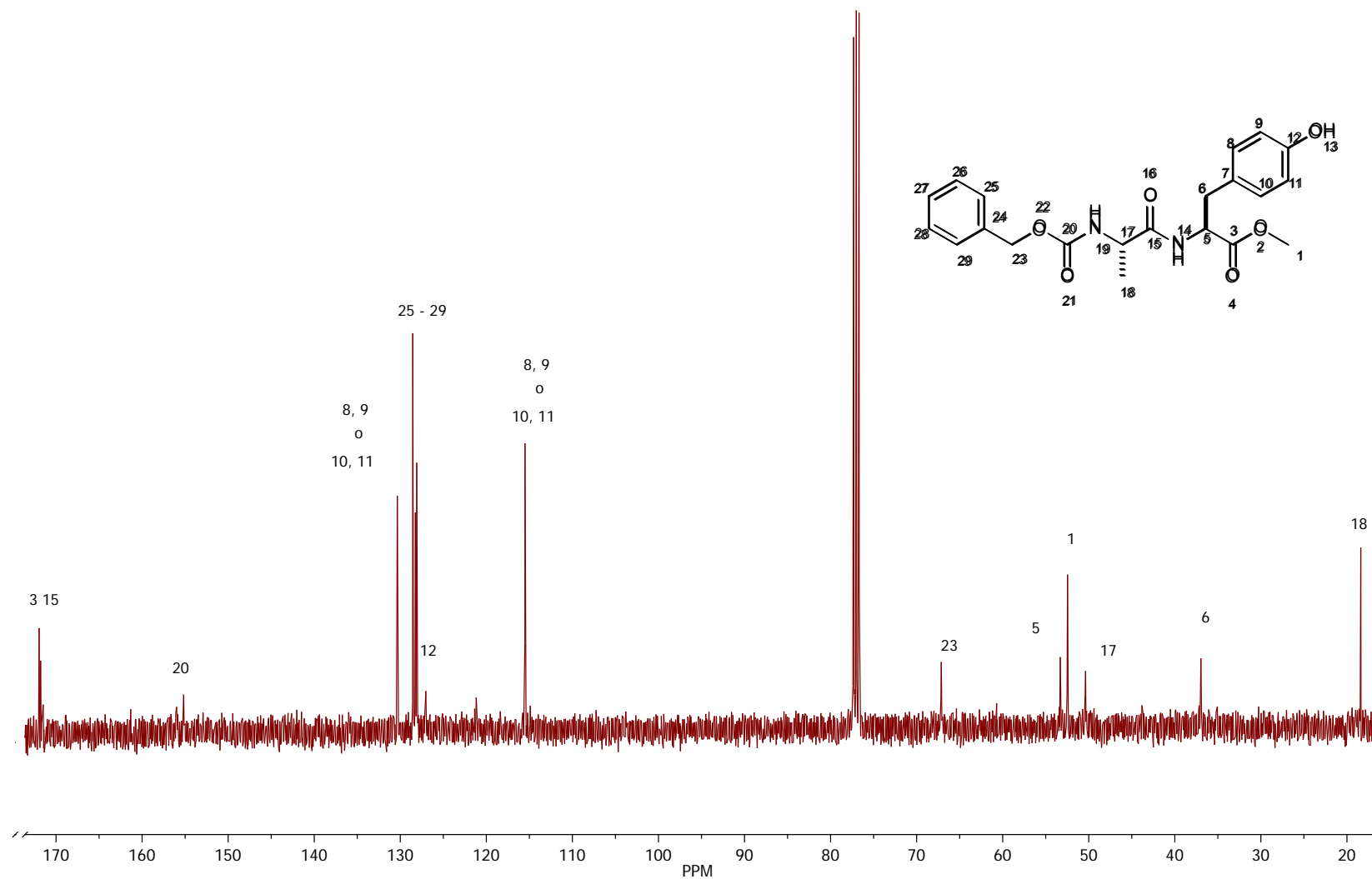
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 16.



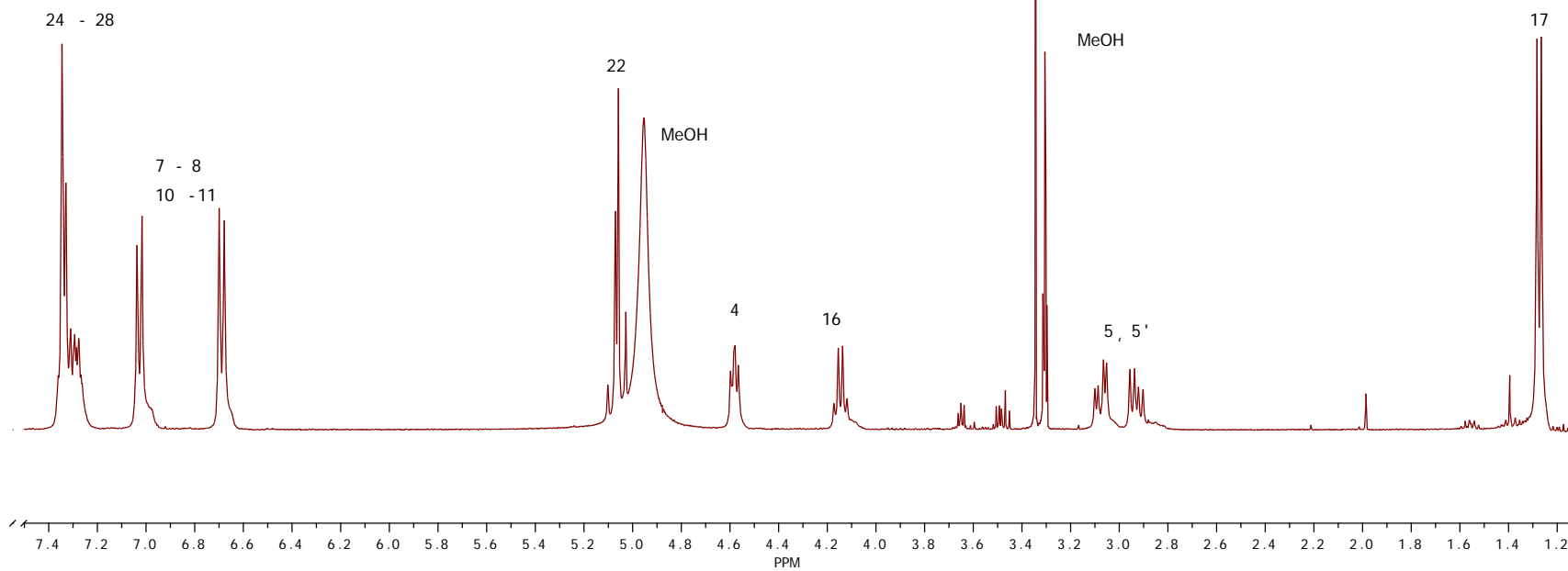
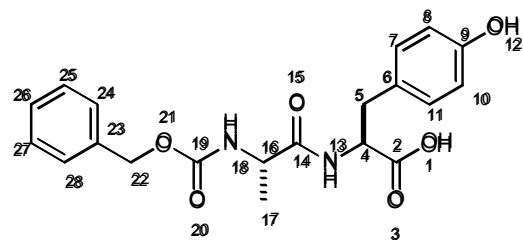
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 19.



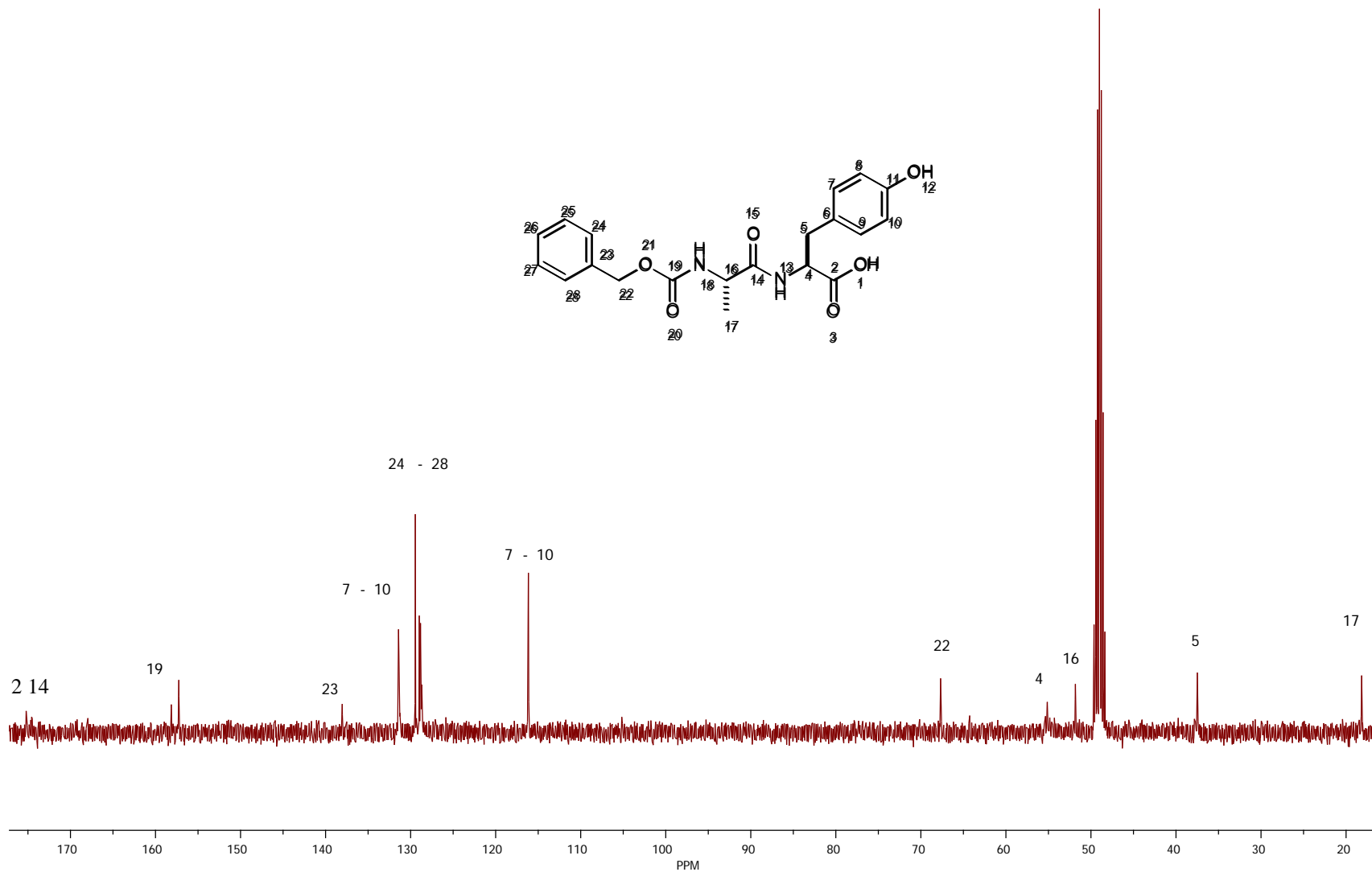
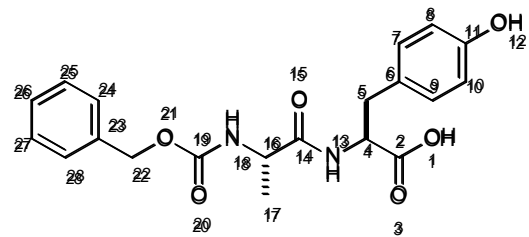




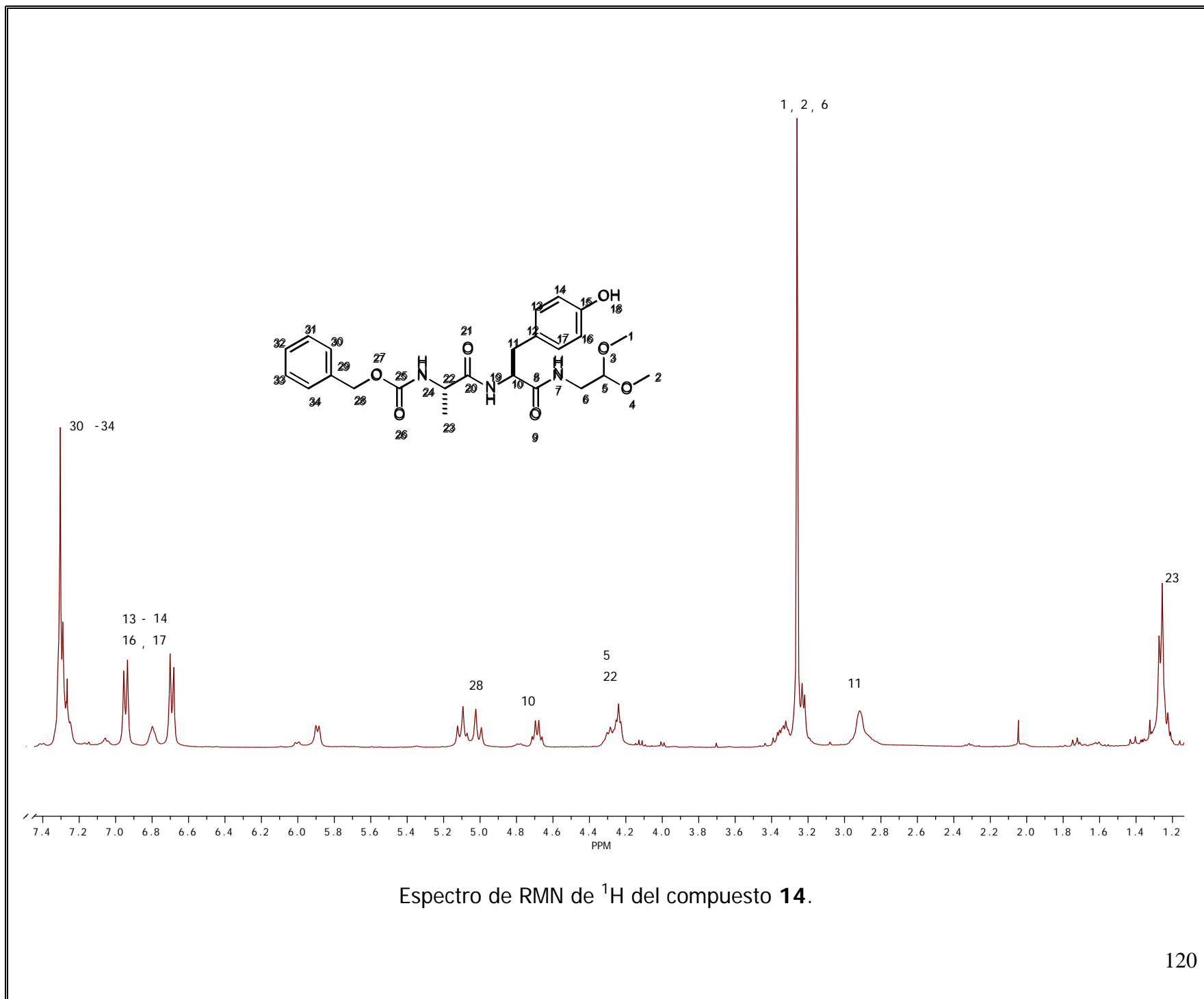
Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del compuesto 5.

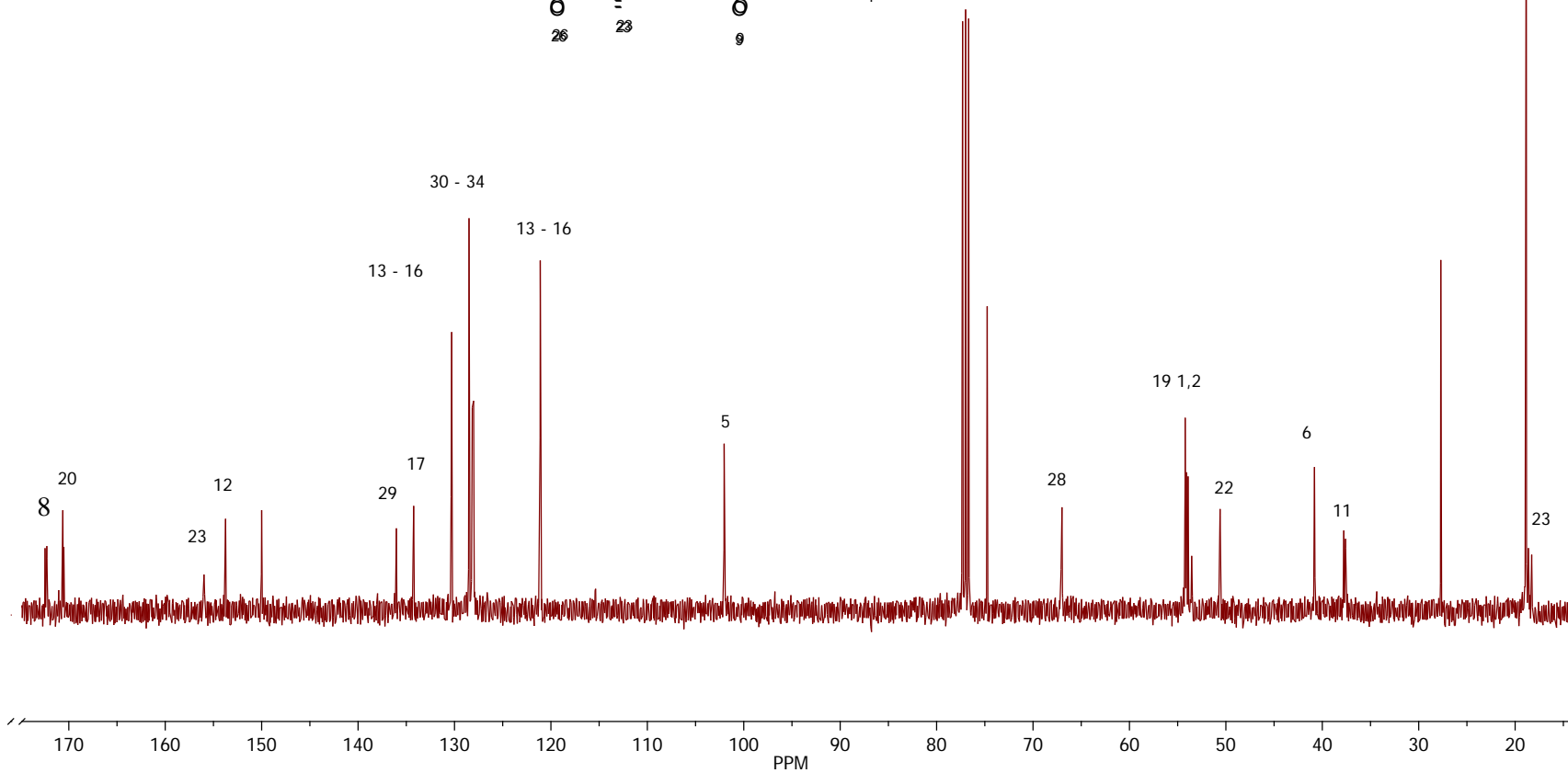
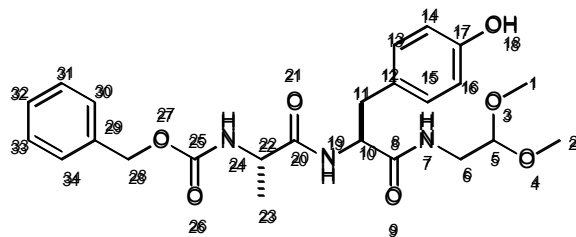


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 7.



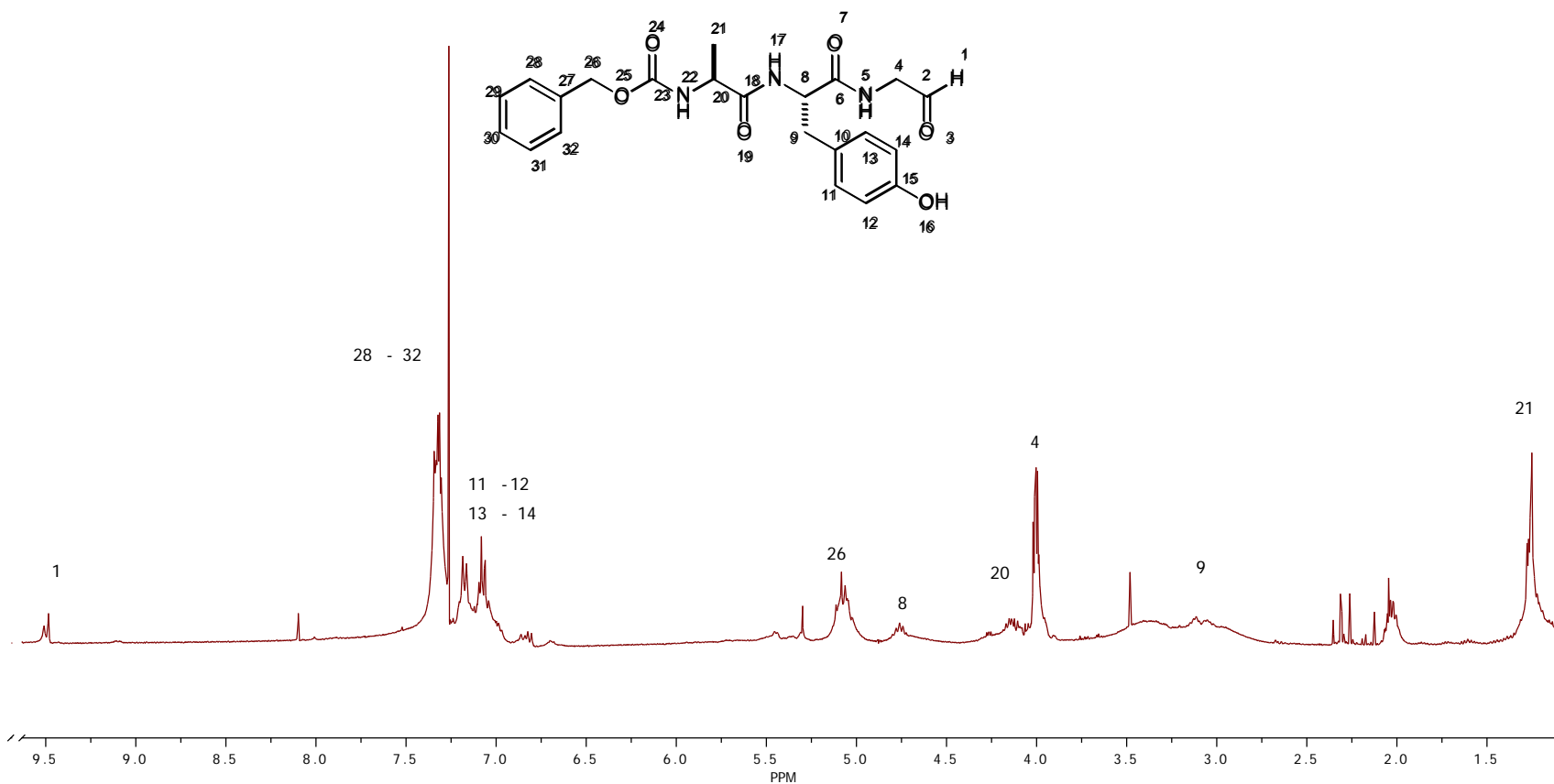
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 7.



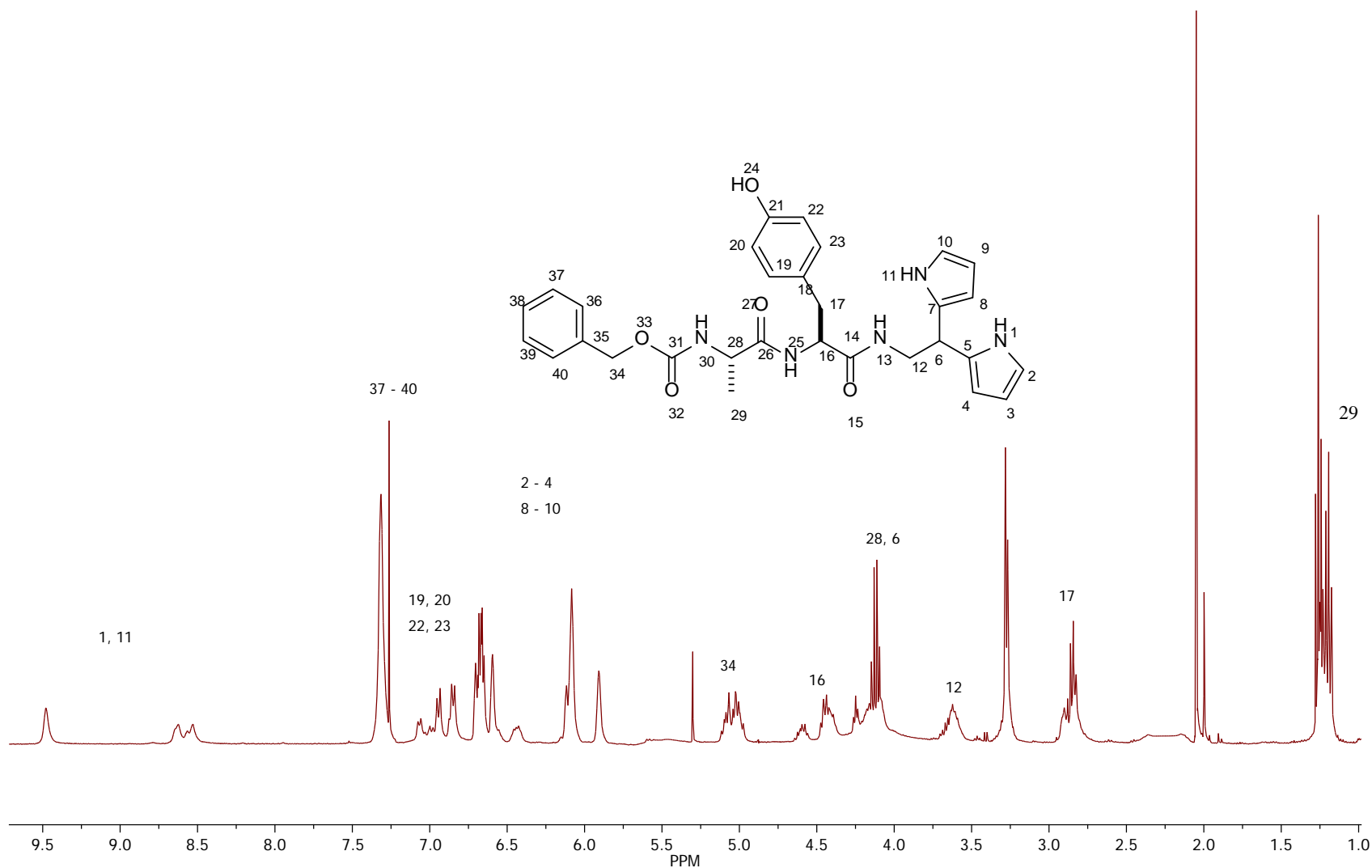


Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **14**.

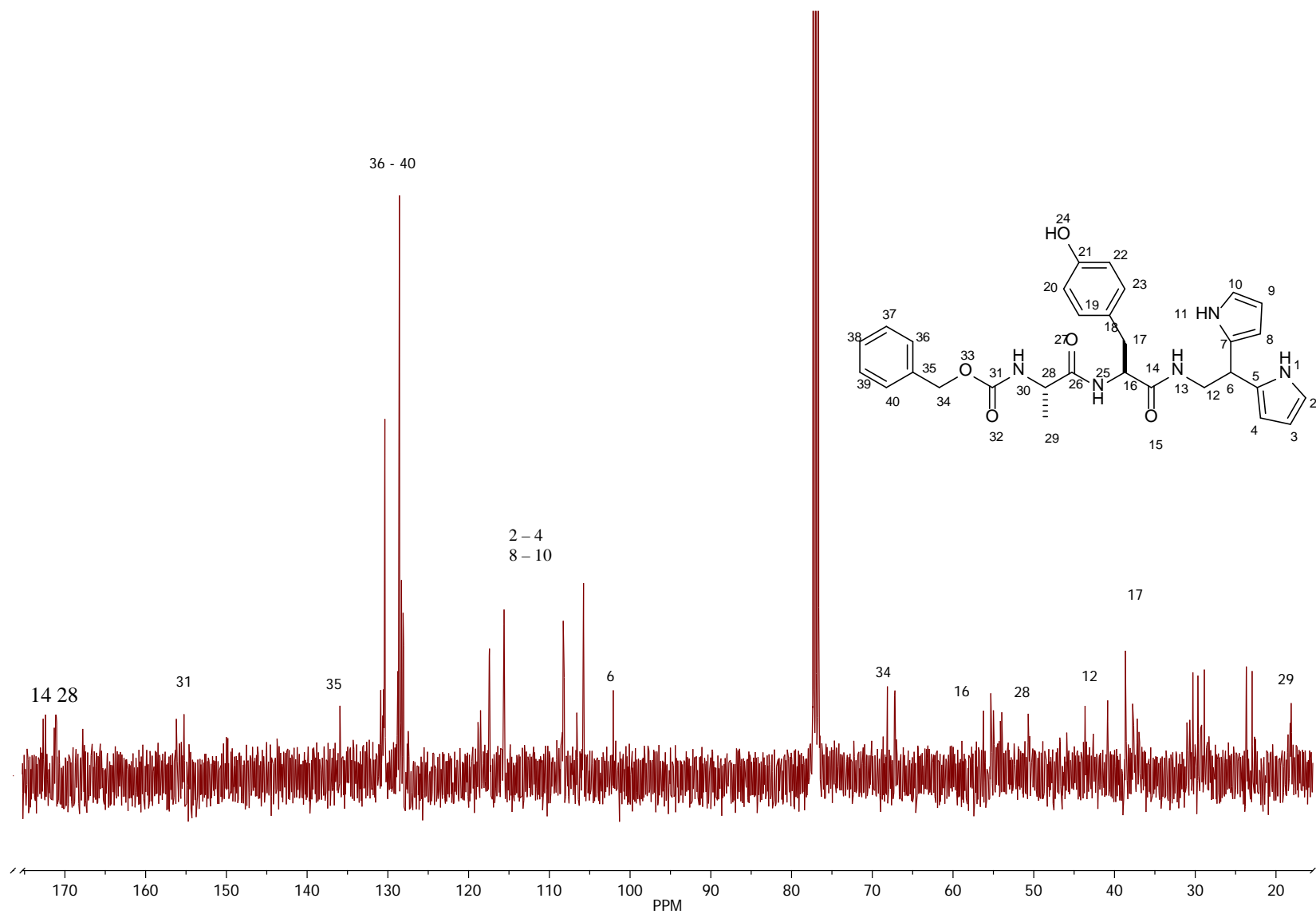
1



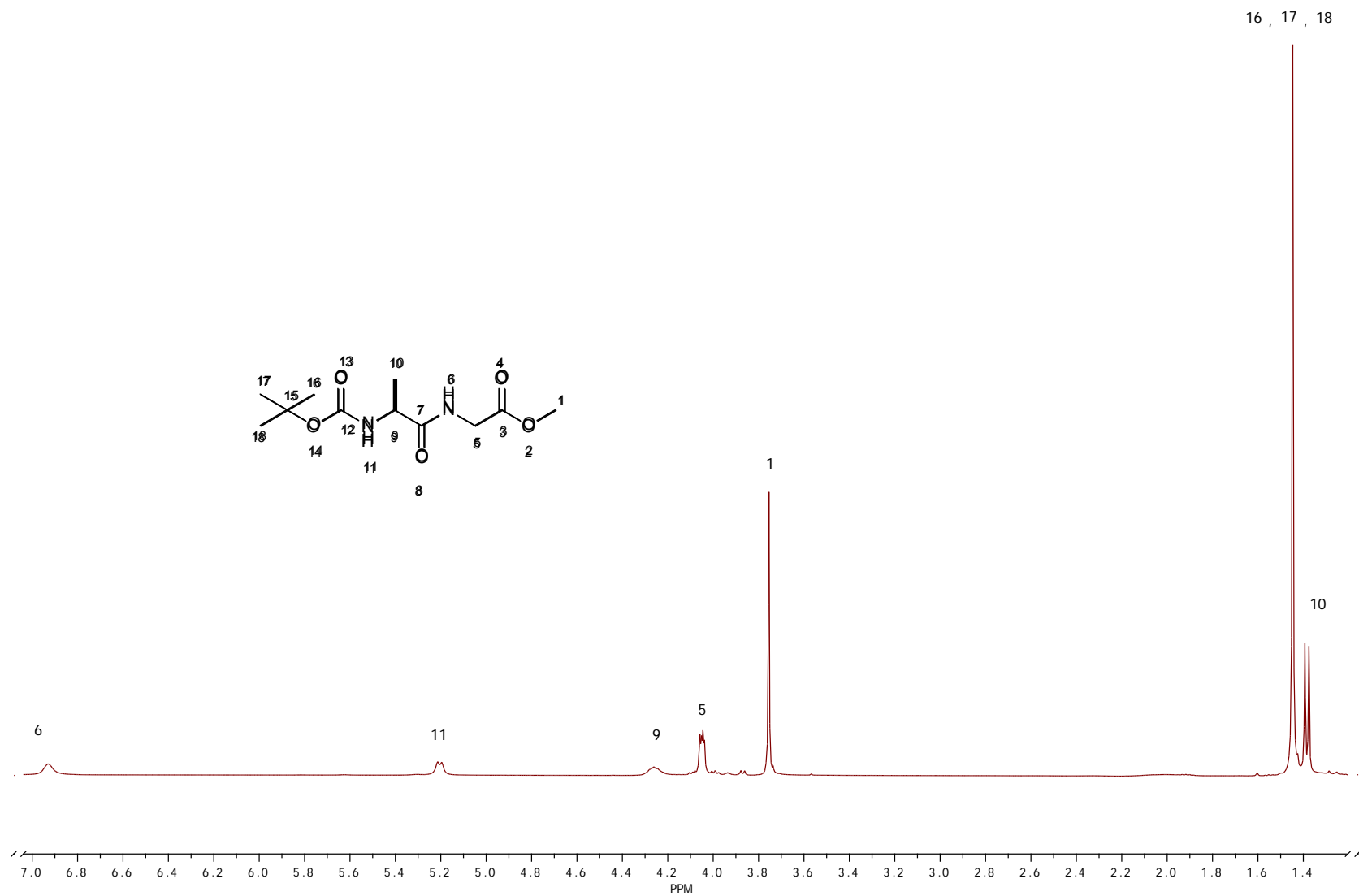
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 17.



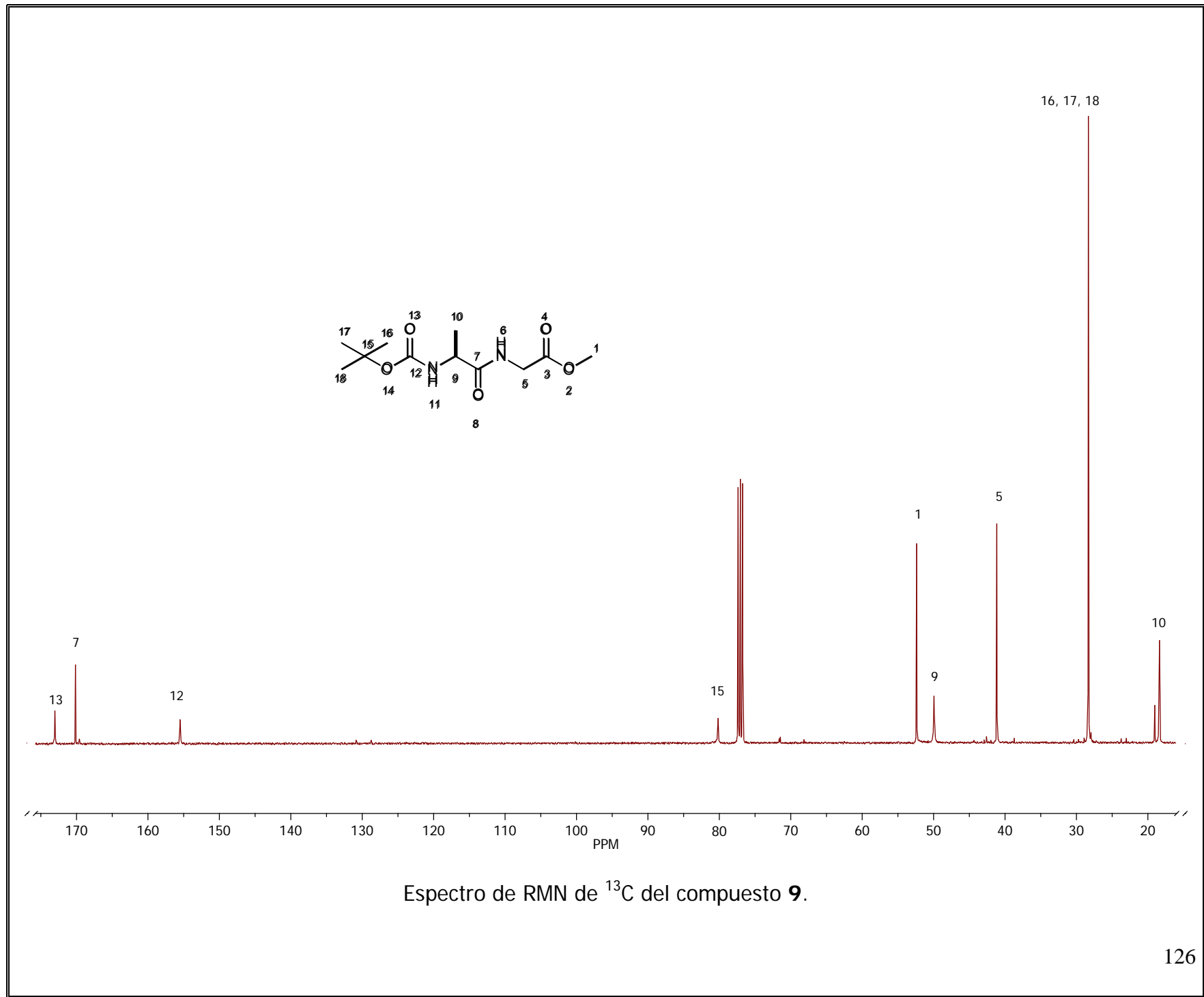
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 20.

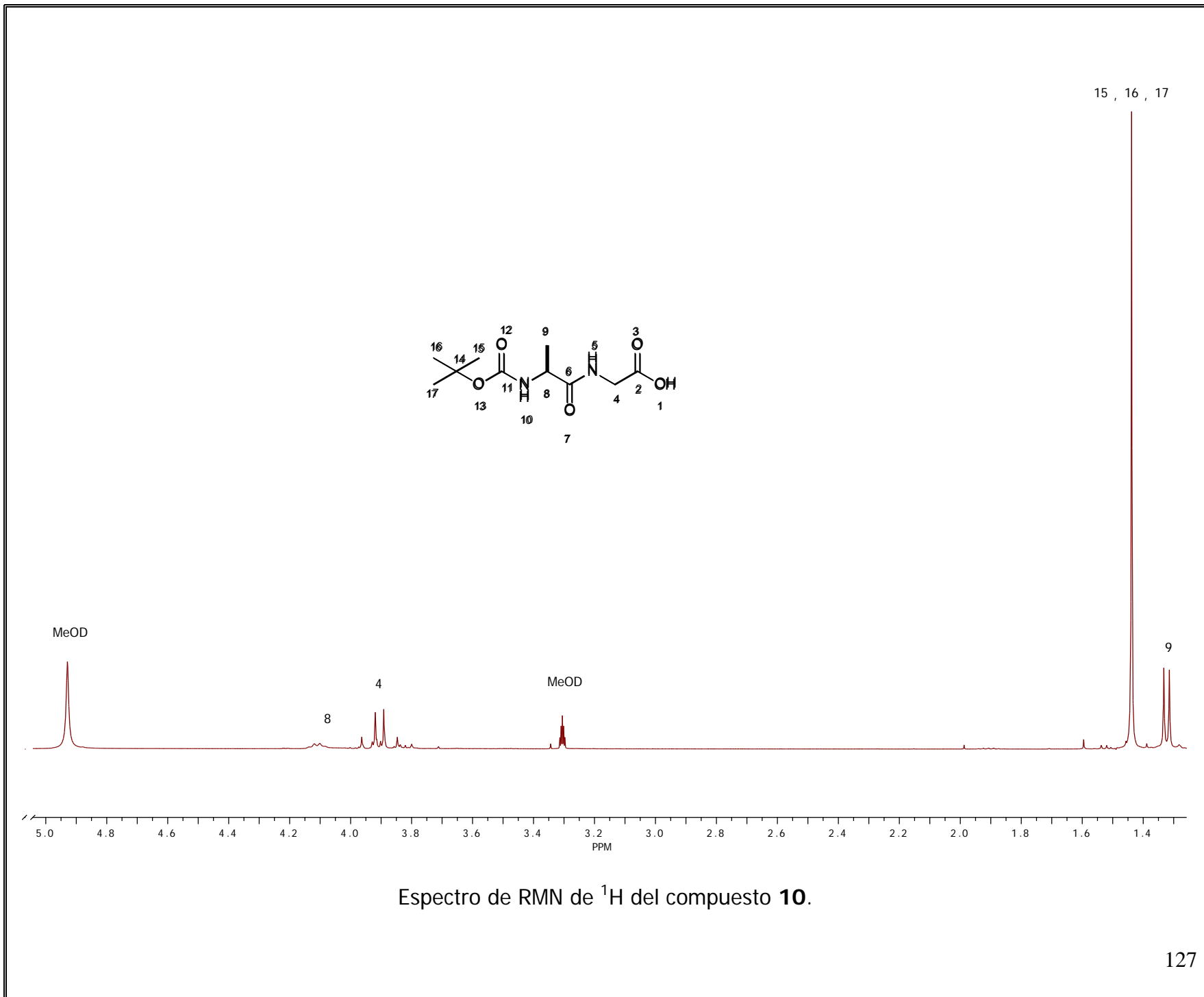


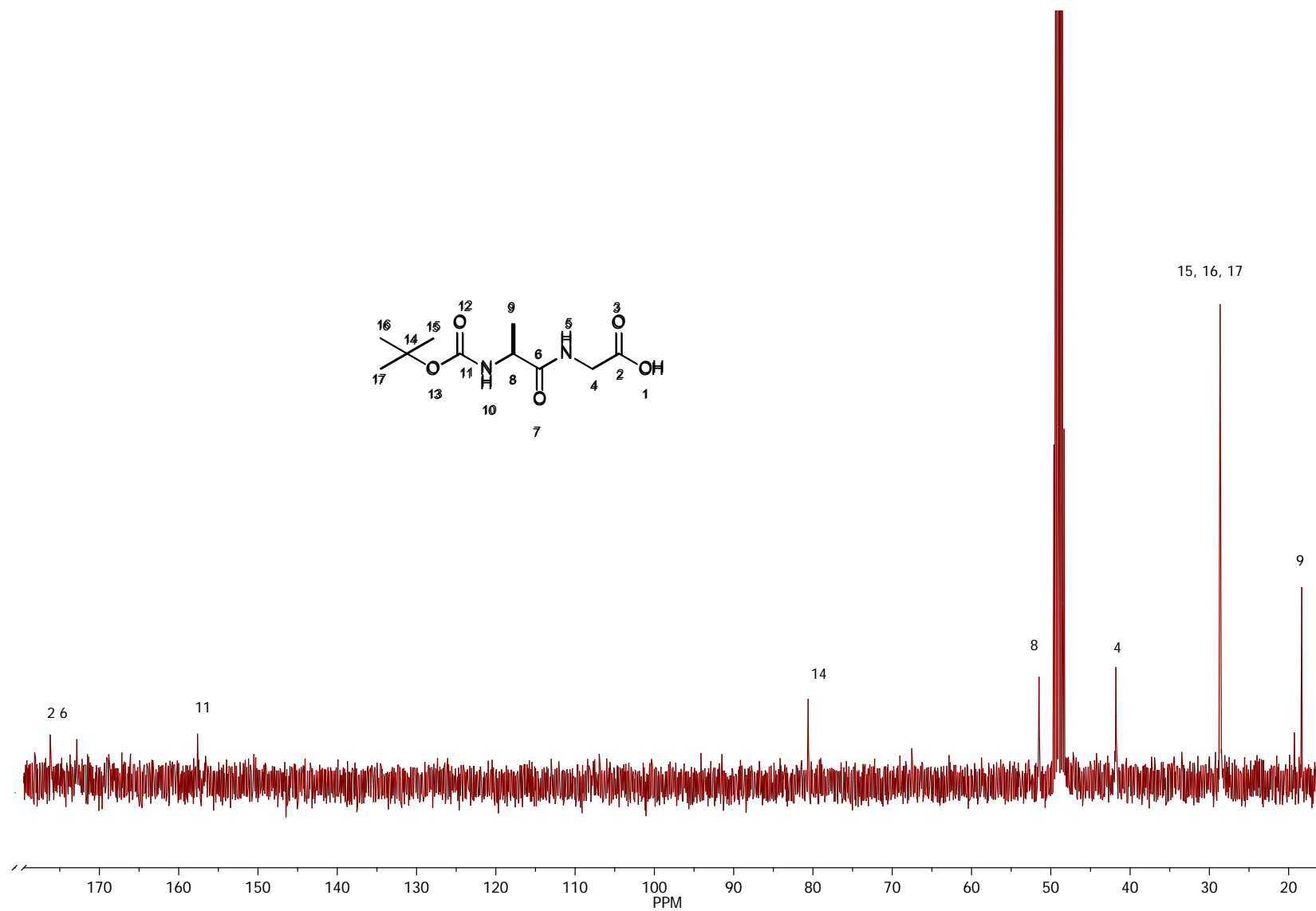
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **20**.



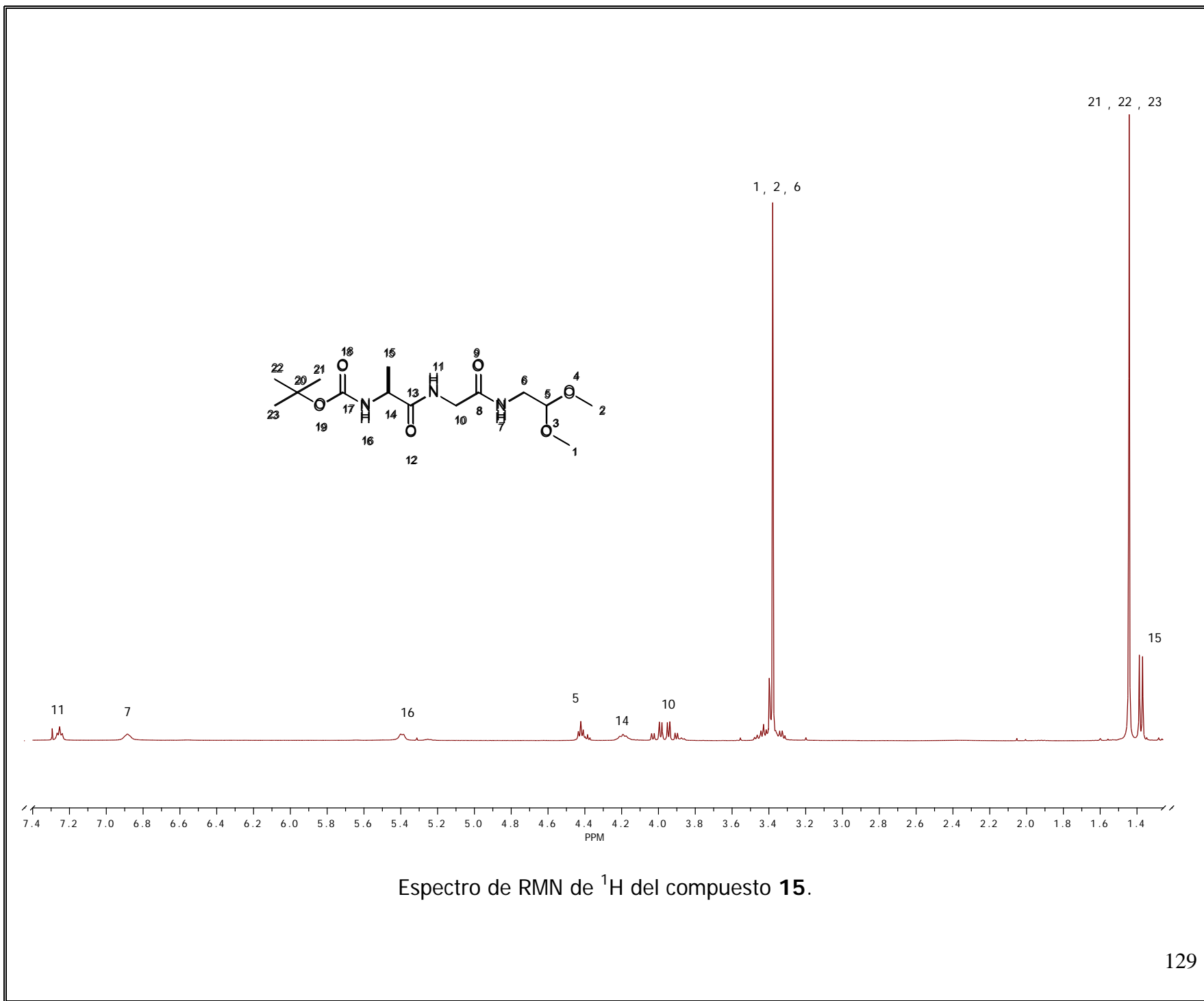
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 9.

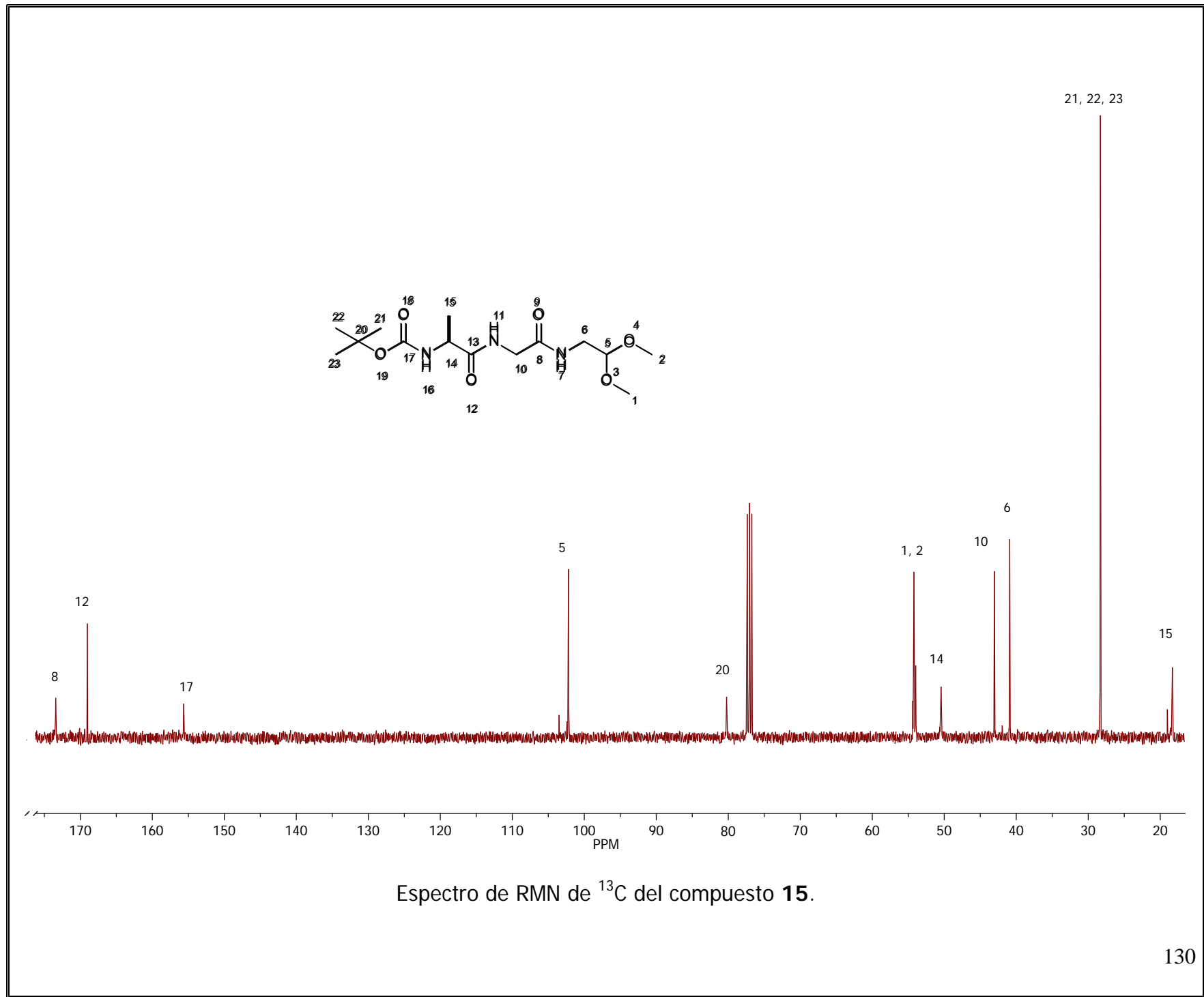


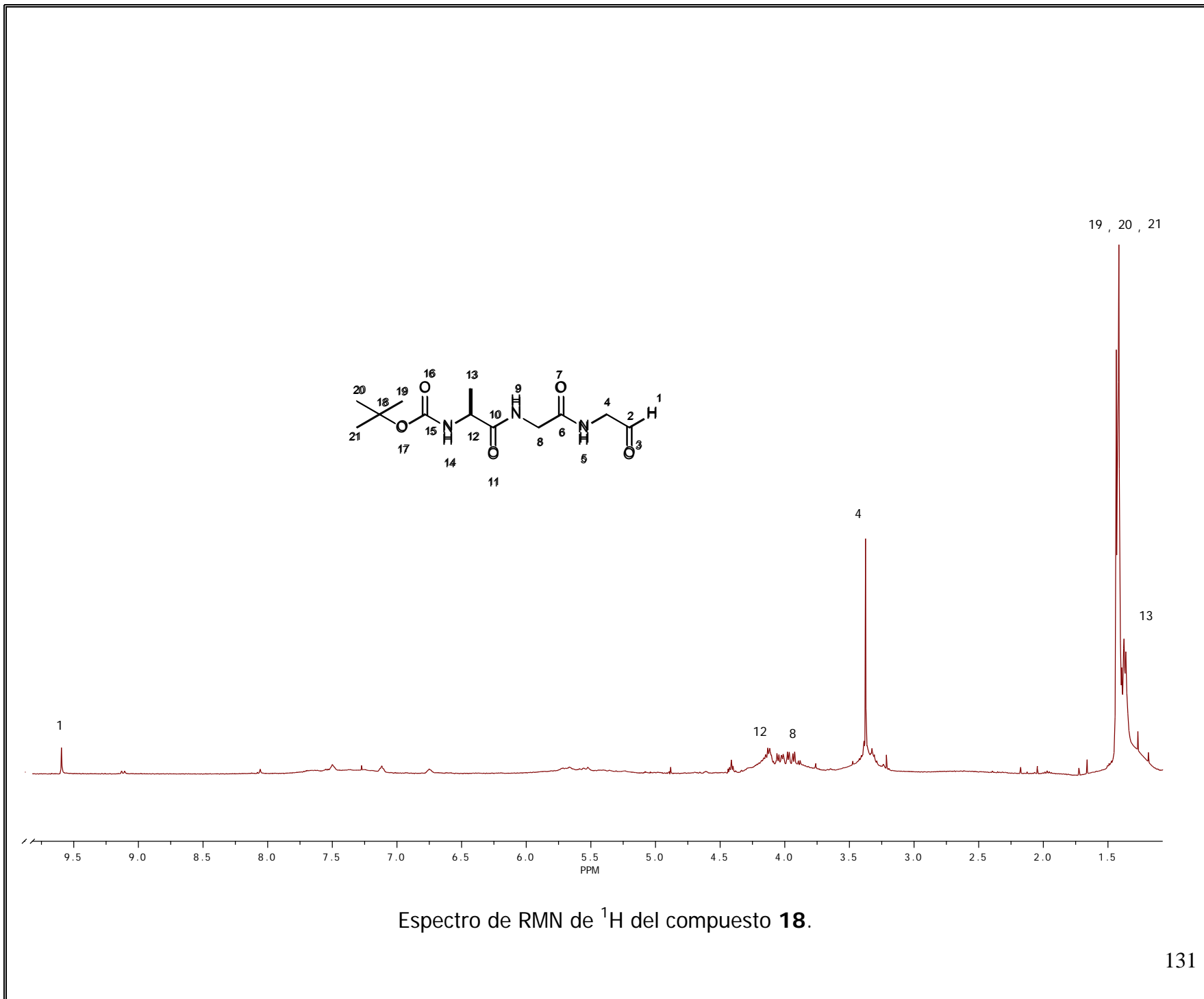


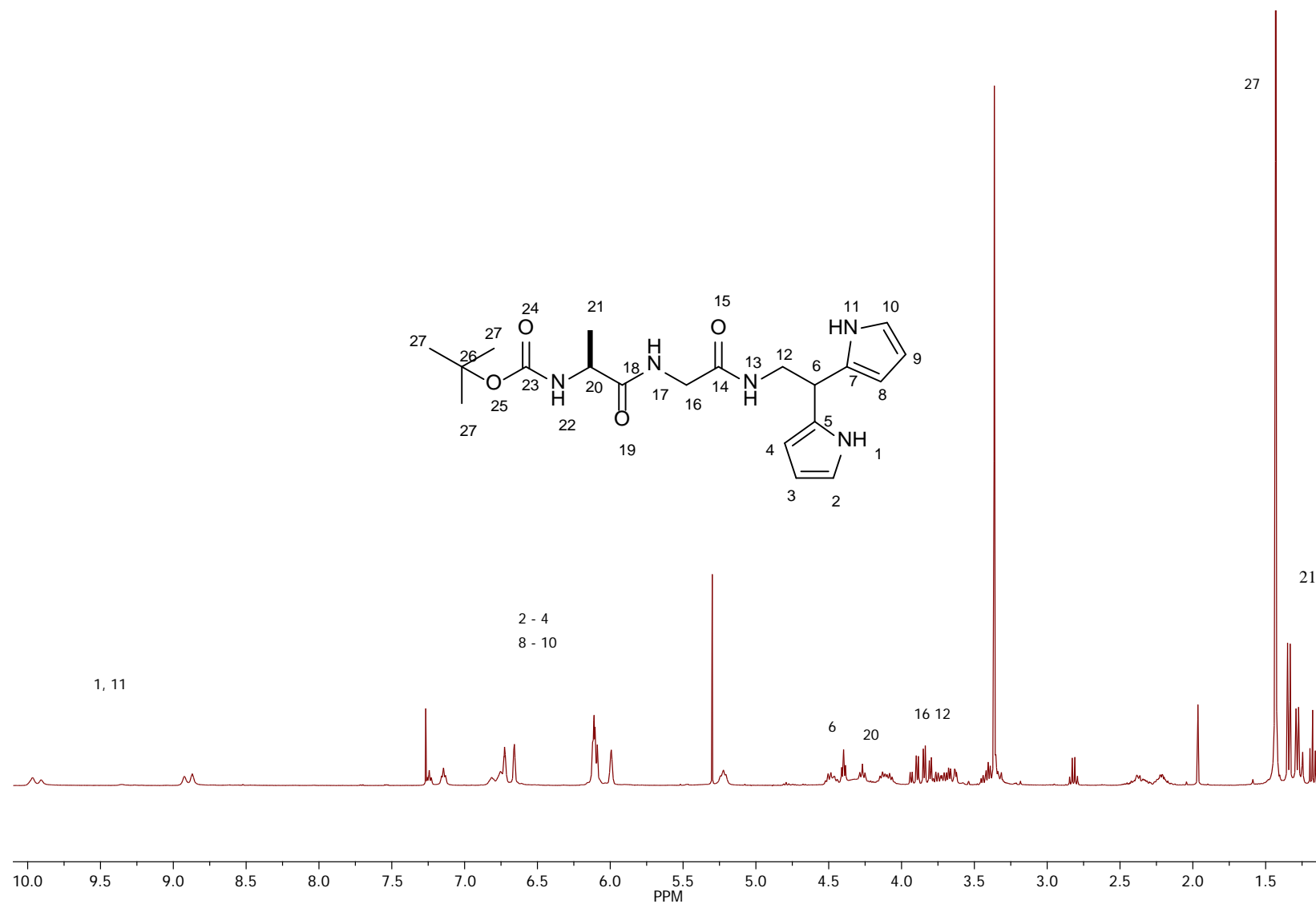


Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del compuesto 10.

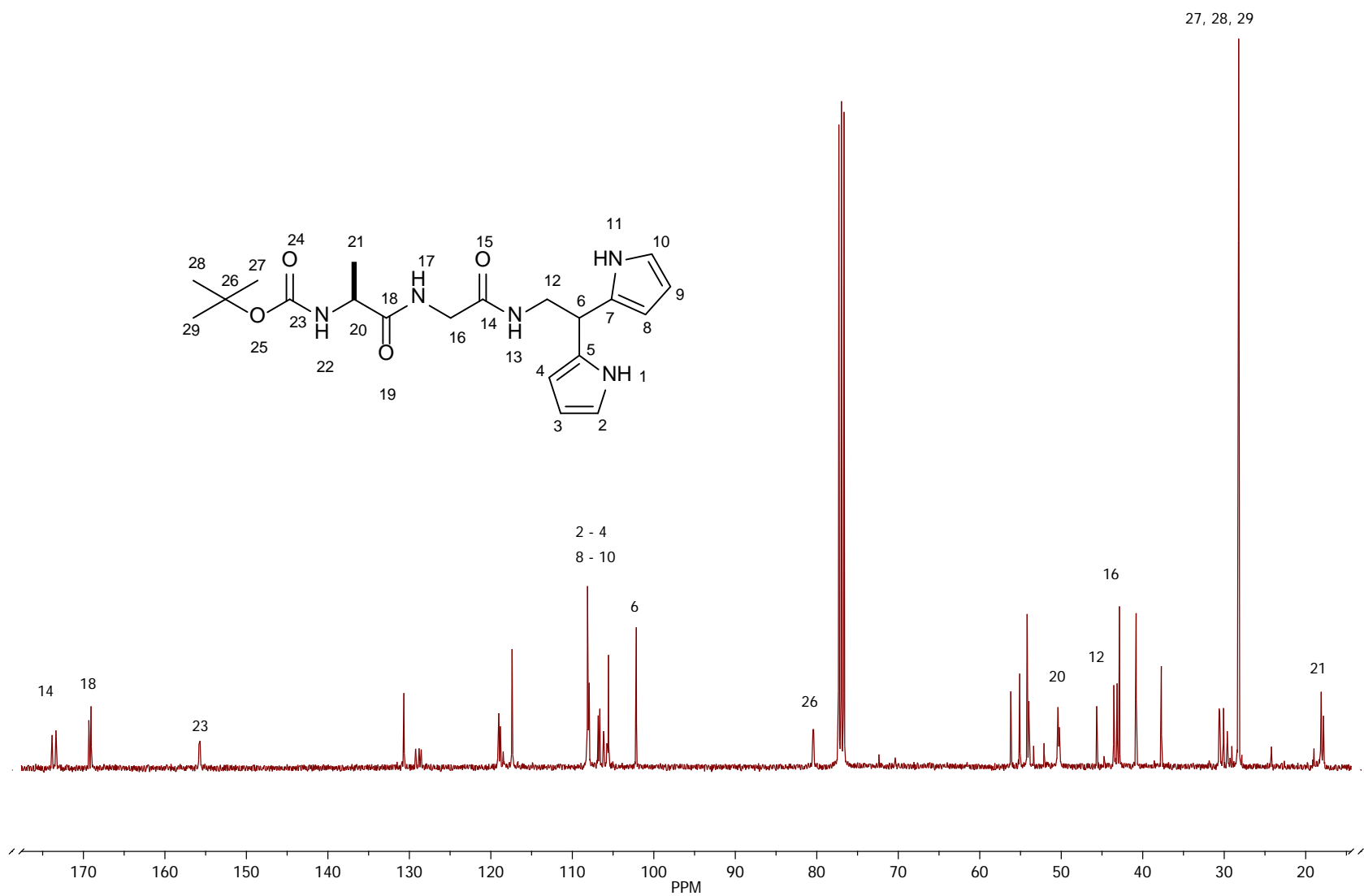




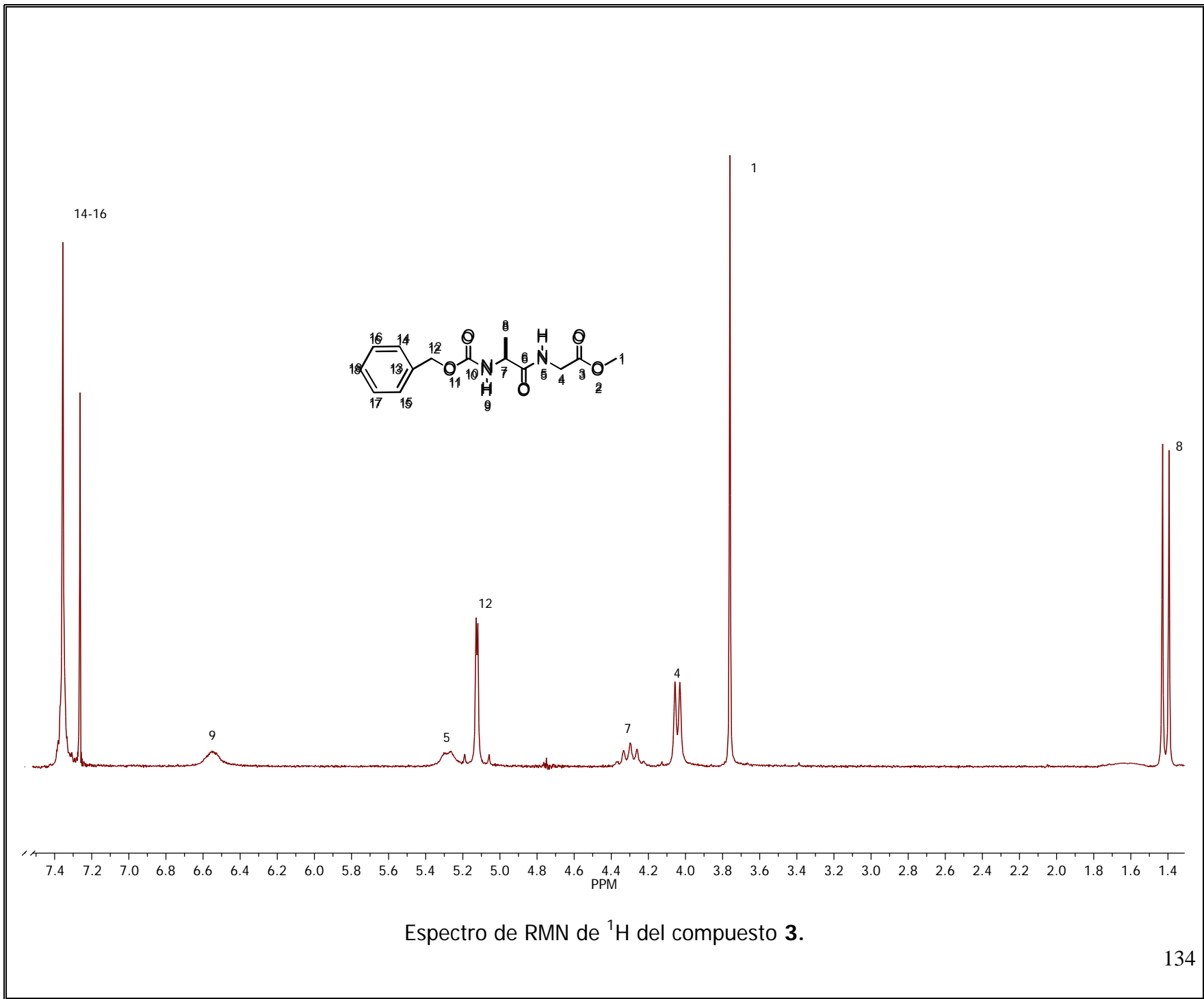


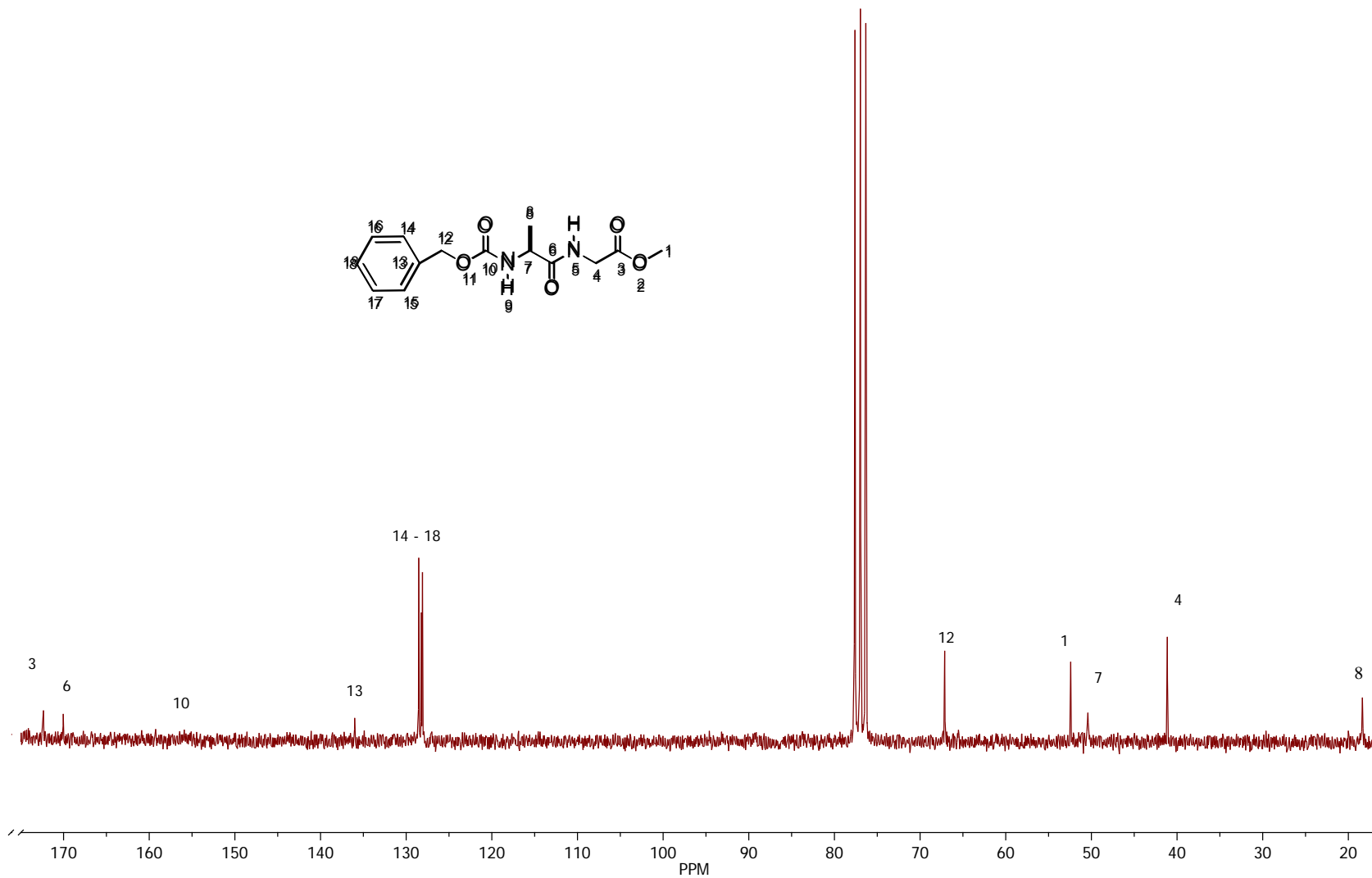
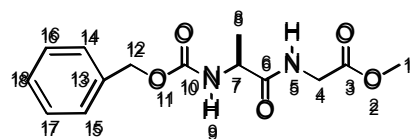


Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 21.



Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del compuesto 21.





Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del compuesto 3.