



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

"SINTESIS DE ACIDOS BOC-AMINOACIL-4-  
(OXIMETIL) FENILACETICOS PARA USO  
EN SINTESIS DE PEPTIDOS"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
GONZALO TRUJILLO CHAVEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1989



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

### CONTENIDO

### PAGINA

I.	Introducción.....	1
II.	Fundamentación del tema.....	4
	1. Síntesis de péptidos en solución.....	4
	2. Síntesis de péptidos en fase sólida.....	7
	3. Grupos protectores.....	9
	4. Protección del grupo amino.....	10
	5. El grupo ter-butiloxicarbonil (Boc).....	11
	6. Protección del grupo carboxilo.....	13
	7. Formación de nitrilos.....	18
	8. Hidrólisis de nitrilos.....	18
	9. Halogenación.....	19
	10. Esterificación.....	20
III.	Planteamiento del problema.....	22
IV.	Objetivos.....	27
V.	Hipótesis.....	28
VI.	Material y métodos.....	29
	A. Material y equipo.....	29
	B. Reactivos y disolventes.....	30
	C. Relación de compuestos sintetizados.....	31
	D. Parte experimental.....	32
VII.	Discusión y resultados.....	47
VIII.	Conclusiones.....	52
IX.	Apendice.....	53
X.	Referencias bibliográficas.....	72

## I. INTRODUCCION

Desde el siglo XIX ya se sabía que las proteínas y los péptidos están formados de aminoácidos. Hacia 1904 Fischer descubrió que las proteínas son cadenas largas formadas de aminoácidos estableciendo de paso probablemente el primer puente importante entre la biología y la química modernas, fue también él mismo, quien llevando a cabo sus estudios sobre las proteínas a principios de este siglo llegó a sintetizar un compuesto tipo peptídico; sin embargo, fue hasta el año de 1953 cuando du Vigneaud logró realizar el aislamiento, la determinación de la estructura<sup>1</sup> y por último, pero no por ello menos importante, la síntesis total en solución (síntesis clásica) de la oxitocina<sup>2</sup> que tiene estructura de un nonapéptido cíclico, dando un empuje sin precedentes al desarrollo de la síntesis de péptidos.

El conocimiento de la secuencia de los aminoácidos en una cadena peptídica que posea algún tipo de actividad biológica, permite la construcción de moléculas estructuralmente análogas, lo que por un lado permite el estudio de la relación estructura-actividad y por otro la optimización de los principios básicos y procedimientos involucrados en la síntesis de péptidos ó compuestos similares en el laboratorio.

La improvisación de metodologías químicas durante la década de los cincuenta amplió la síntesis de péptidos, pero el éxito era aun limitado por la baja solubilidad de los intermediarios durante las reacciones de acoplamiento, por las dificultades en la purificación de los productos, el número grande de etapas que comprende el solo acoplamiento de un aminoácido incorporado a una cadena peptídica y principalmente

la limitación en cuanto al tamaño del péptido. En respuesta a esta problemática Merrifield sugiere unir el primer aminoácido a una especie de soporte que además sea insoluble, después a partir de éste unir el siguiente aminoácido y así sucesivamente hasta tener la cadena deseada completa <sup>3</sup>. El paso final consiste en desprender toda la cadena del soporte sólido; la ventaja fundamental es que la cadena creciente de aminoácidos no se disuelve nunca durante toda la preparación pudiendo filtrarse, lavarse y hacerse reaccionar con más aminoácidos sin que sea necesario aislar y purificar el producto después de cada reacción química.

La síntesis de péptidos en fase sólida además de representar la unión de esfuerzos de un grupo de investigadores dedicados a la preparación de péptidos, ofrece ciertas ventajas sobre los métodos en solución; las principales son que los aminoácidos enlazados al soporte sólido pueden ser separados de los reactivos solubles, por filtración repetida, lavado del soporte conservando el material durante el aislamiento y purificación de los intermediarios sintéticos, los reactivos solubles se pueden usar en exceso para forzar las reacciones a ser completas y así elevar los rendimientos, las etapas son simplificadas y aceleradas, todas las reacciones son realizadas en un sólo vaso de reacción lo que ayuda a las transferencias repetidas de los intermediarios y eliminar el material perdido, finalmente las extensiones de la cadena pueden realizarse en forma automática <sup>4</sup>. Pero éste como los otros métodos tiene limitaciones y desventajas entre las cuales se cuentan: la persistencia de impurezas insolubles unidas al soporte que no pueden ser separadas en los estados intermediarios y así la pureza del producto final depende de la eficiencia -

de la desprotección y acoplamiento en las reacciones y de la ausencia de reacciones colaterales <sup>5</sup>.

El principal problema en la síntesis de péptidos en fase sólida lo constituye la ruptura acidolítica del enlace tipo -éster implicado en la unión del primer aminoácido a la resina de Merrifield (clorometil resina <sup>6</sup>), una de las más empleadas en la preparación de péptidos, con la consecuente disminución en el rendimiento. La búsqueda de resinas con mayor resistencia a la ruptura acidolítica durante las etapas de desprotección del grupo alfa-amino, condujo a Merrifield y colaboradores al uso de la resina fenilacetamido metilamino (PAM-resina) <sup>7</sup>, como una mejor alternativa especialmente en el caso de la síntesis de péptidos con un número grande de aminoácidos. Ya que los derivados de los ácidos Boc-aminoacil-4-(oximetil) fenilacéticos ó también denominados Boc-aminoacil-4-(oxitolil) acéticos (Boc-aminoacil-OTA), no son comerciales, la preparación de la resina esta sujeta a la obtención de estos derivados aminoacéticos.

El presente trabajo contempla establecer la ruta sintética más adecuada para la preparación de algunos ácidos Boc-aminoacil-4-(oxitolil) acéticos de aminoácidos naturales así como optimizar las condiciones de reacción para obtener éstos ácidos con pureza y rendimientos aceptables encontrando las modificaciones propicias a la metodología.

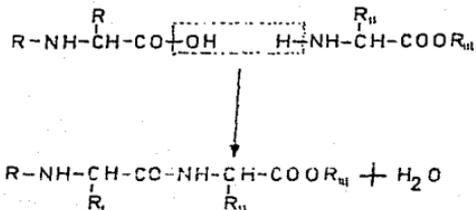
Aunque la idea global considera la optimización de la ruta sintética cabe mencionar que la presente tesis pretende -- hacer también un estudio preliminar de una via nueva para la -- obtención de los ácidos Boc-aminoacil-OTA, preparando el amino para que en trabajos futuros sea tomada en cuenta al intentar sintetizar éstos derivados a un menor costo.

## II. PUNDAMENTACION DEL TEMA

Es indudable la importancia que en la actualidad tiene-- la síntesis de péptidos como una herramienta que permite realizar estudios de la relación estructura-actividad, además de otras características de las proteínas y de otros compuestos-- con actividad biológica <sup>8, 9</sup>.

### 1. SINTESIS DE PEPTIDOS EN SOLUCION.

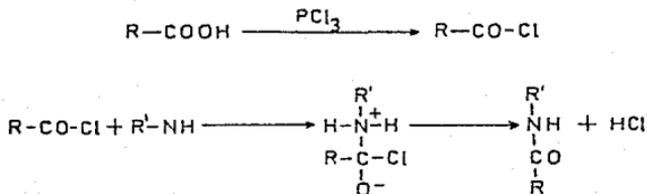
La síntesis clásica (i.e. en solución) de una cadena peptídica puede realizarse de una manera secuencial, es decir aminoácido por aminoácido o por la unión de fragmentos peptídicos (di-, tri-, tetrapéptidos, etc.) previamente sintetizados <sup>10</sup>. En general la reacción más importante en la preparación de péptidos corresponde a la N-acilación de un aminoácido por otro, para generar el enlace peptídico (Esquema: 1).



Esquema 1: Formación del enlace peptídico.

Debido a que cada aminoácido contiene un grupo amino y un grupo carboxilo al menos, en algunos casos otros grupos -- reactivos localizados en la cadena lateral, que pueden tomar parte en las reacciones de acilación en distintas direcciones

como componentes acilantes o acilados, por lo que es necesario que sólo uno de los grupos reactivos amino y carboxilo de cada aminoácido tomen parte en la reacción de formación del enlace peptídico mientras que los otros grupos estarán debidamente protegidos evitando combinaciones indeseables durante las reacciones químicas. De hecho la formación del enlace tipo amida no ocurre en forma espontánea, excepto a elevadas temperaturas; por lo tanto, es necesario que uno de los dos grupos sea convertido a una forma más reactiva para promover la formación de dichos enlaces. Un ejemplo de activación, es la transformación de un ácido carboxílico <sup>11, 12</sup> en su correspondiente cloruro de ácido, aumentando así la reactividad en la electrofilicidad del átomo de carbono del carboxilo acilante, el resultado de esto es un centro electrofílico fácil de ser atacado por el grupo amino nucleofílico.



Esquema 2: Activación de un ácido carboxílico y formación del enlace peptídico.

Las consideraciones químicas sobre el rendimiento dependen de la ruta elegida. Los procedimientos analíticos y métodos de purificación son las herramientas con que cuenta el químico de péptidos. Las dificultades en la síntesis de un péptido y el tiempo requerido para la preparación de grandes-

cadena promovió el desarrollo de técnicas que facilitarían la unión peptídica por operaciones fáciles y repetitivas en las que la síntesis de un dipéptido, en general, involucra cuatro etapas:

- a) Protección del grupo amino del aminoácido que estará en el residuo N-terminal del dipéptido.
- b) Protección del grupo carboxilo del aminoácido en el cual está el residuo C-terminal del dipéptido.
- c) Conversión del grupo carboxilo del aminoácido N-protegido al derivado adecuado que pueda sufrir ataque nucleofílico por el grupo amino del aminoácido C-protegido para dar el dipéptido protegido (activación y condensación).
- d) Finalmente la eliminación de los grupos protectores para obtener el dipéptido deseado.

La simplicidad aparente de la síntesis en solución a pesar de todo presenta numerosas desventajas; los derivados activados no son fácilmente accesibles en forma pura, esterequímicamente el uso de ellos para formar el enlace peptídico está acompañado por considerables riesgos de racemización y amidación pudiendo darse un aumento de las reacciones colaterales dependiendo del derivado empleado. Por todo esto el método en solución presenta ciertas limitaciones entre las que se cuentan las siguientes:

1. Requiere de un número grande de etapas para la síntesis de tan sólo un enlace peptídico.
2. La purificación representa un gran problema debido a que se tiene que realizar para cada reacción, incluyen la preparación de los derivados activados.
3. El tamaño de los péptidos sintetizados se ve limitado-

por el número de etapas de purificación involucradas, así como por su reducida solubilidad que hace disminuir los rendimientos.

4. La síntesis de péptidos de mayor tamaño esta limitada por grandes problemas de solubilidad.

La improvisación de metodologías químicas hasta principios de los años sesentas amplió la síntesis en general, pero la obtención de péptidos conteniendo cuando menos veinte aminoácidos, era todavía un deseo que requería mucho tiempo y -- trabajo tanto teórico como práctico por invertir. El éxito -- era aún limitado por las desventajas enumeradas anteriormente amén de que las grandes cadenas tienden a ser más problemáticas conforme se aumentan en tamaño 9, 13, 14.

## 2. SINTESIS DE PEPTIDOS EN FASE SOLIDA.

En 1963 Merrifield <sup>15</sup> propone un método de síntesis de péptidos en fase sólida que representa el resultado de la unión de esfuerzos de un grupo de investigadores dedicados a la síntesis de éstos compuestos, en el cual la idea central es unir el aminoácido correspondiente al carboxilo final de una cadena a un soporte sólido y extender a partir de ahí la cadena. La técnica de fase sólida ofrece ventajas sobre los métodos en solución: a) La cadena peptídica unida al soporte puede ser separada de los reactivos solubles así como de los subproductos, por filtración y lavado del soporte conservando el material durante el aislamiento y purificación de los intermediarios sintéticos. b) Los reactivos solubles pueden ser usados en exceso para forzar las reacciones hasta un alto porcentaje de conversión, elevando así los rendimientos. c) Las-

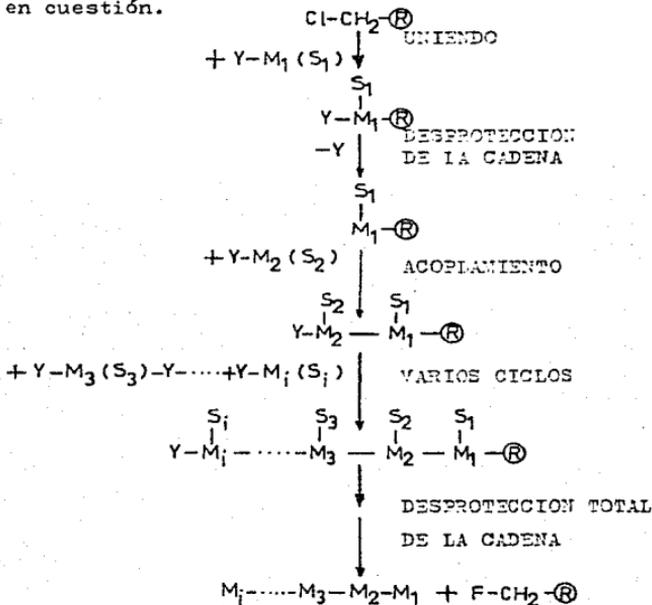
etapas de síntesis son simplificadas y aceleradas, además todas las reacciones pueden ser realizadas en un sólo vaso de reacción, lo que posibilita las transferencias repetidas de los intermediarios eliminando la mayoría del material perdido. d) Las operaciones de extensión de la cadena pueden realizarse automáticamente; y e) Se hace posible la síntesis de péptidos de hasta 30-60 aminoácidos. Las limitaciones y desventajas son que algunas impurezas insolubles unidas al soporte no pueden ser separadas del producto deseado en los estadíos-intermedios, así pues, de esta manera la pureza del producto final depende de la eficiencia en las diferentes etapas de desprotección y acoplamiento, además de la ausencia de reacciones colaterales <sup>8, 16</sup>.

La efectividad de éste método fue demostrada primero por la síntesis de un tetrapéptido <sup>17</sup>, después fue extendido para la síntesis de la angiotensina, la insulina y otros péptidos, para posteriormente ser aplicado a la preparación de varias proteínas incluyendo la enzima ribonucleasa A <sup>18</sup>.

La operación inicial de la síntesis en fase sólida es una unión covalente del primer aminoácido de la cadena al soporte sólido, etapa durante la cual uno de los grupos funcionales está protegido y el otro grupo funcional del aminoácido está desprotegido, permitiendo así la formación del enlace. Un ciclo completo de la síntesis consiste en la desprotección del grupo amino de la cadena principal y el acoplamiento con el siguiente aminoácido protegido. Las unidades siguientes son adicionadas a la cadena por repetición del ciclo hasta haber ensamblado el péptido deseado, para finalmente obtener el producto por separación del soporte <sup>14</sup>.

El número mínimo de pasos comprendido en la obtención de

péptidos por el método de fase sólida se muestra en el esquema 3; donde R= soporte; M= aminoácido; Y= grupo protector de la cadena; S= grupo protector de la cadena lateral del aminoácido en cuestión.



Esquema 3: Síntesis general de péptidos en fase sólida.

### 3. GRUPOS PROTECTORES

Durante el acoplamiento de un aminoácido a una cadena peptídica la mayoría de los grupos funcionales, excepto el grupo alfa-carboxilo del aminoácido y el grupo amino terminal.

del péptido son protegidos para evitar las reacciones colaterales que disminuyen la pureza y rendimiento del péptido deseado. Muchos de los grupos protectores utilizados en la obtención de péptidos son usados para condiciones de reacción empleadas tanto en solución como en fase sólida.

Los grupos protectores presentan utilidad para la protección de grupos alfa-amino, alfa-carboxilo así como grupos funcionales de la cadena lateral de los aminoácidos que los tienen, además presentan resistencia a los reactivos comúnmente empleados en la formación del enlace peptídico <sup>19</sup>.

#### 4. PROTECCION DEL GRUPO AMINO.

La basicidad y nucleofilicidad de los grupos amino de los aminoácidos a ser acoplados a los péptidos hace que sea necesario su protección por grupos como los que se muestran en la figura 1, de los cuales el más empleado es el ter-butil oxycarbonilo (Boc) junto con los derivados del benciloxycarbonilo (Z), por ser las estructuras que presentan las características más apropiadas de estabilidad a las condiciones usadas durante la síntesis del enlace peptídico tanto en fase sólida como en solución.

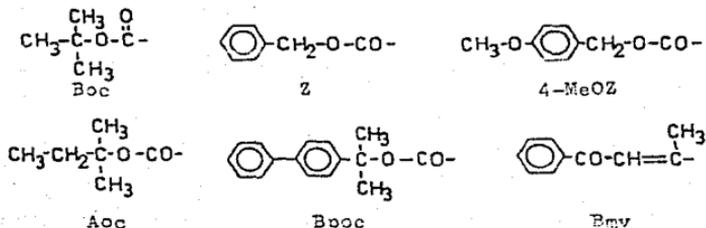


Figura 1: Principales grupos protectores del grupo alfa-amino.

### 5. EL GRUPO TER-BUTOXICARBONIL (Boc).

El grupo ter-butoxicarbonil (Boc) fue introducido por - Carpino como un protector del grupo alfa-amino en aminoácidos proponiéndolo para ser usado en la síntesis de péptidos <sup>20</sup>.

Este grupo es uno de los más importantes protectores del extremo alfa-amino en la síntesis de péptidos.

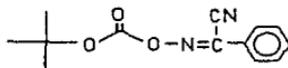
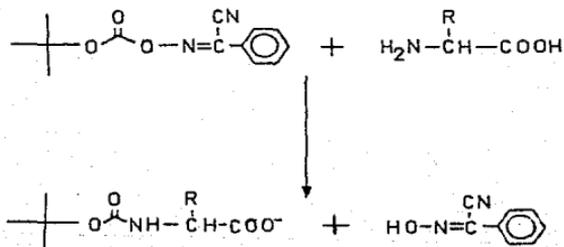


Figura 2: Boc-ON protector del grupo alfa-amino.

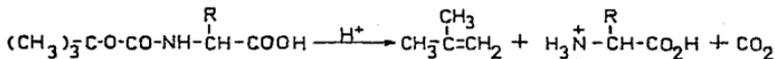
La protección de los grupos alfa-amino se lleva a cabo - usando un exceso (10 %) del compuesto Boc-ON y un 50 % de tri- etilamina en un 50 % de dioxano ó acetona. La reacción se com- pleta en un tiempo de 2-5 horas (dependiendo del tipo de ami- noácido) a temperatura ambiente, posteriormente se extrae fá- cilmente de la mezcla de reacción con éter o acetato de etila.



Esquema 4: Procedimiento general para la introducción del grupo Boc en aminoácidos.

El grupo Boc presenta algunas ventajas sobre los demas -- entre las que se cuentan: estabilidad a la hidrogenación cata-- lítica, a la hidrazina y álcalis; además, se elimina rápida-- mente del grupo amino por tratamiento con ácidos de fuerza -- moderada, facilitando así la síntesis de péptidos tanto en so-- lución como en fase sólida de Merrifield, donde los grupos -- alfa-amino en su mayoría son protegidos por éste grupo <sup>21</sup>.

La eliminación de éste grupo procede a través del uso de ácidos de fuerza media para lo cual han sido propuestas nume-- rosas condiciones acídicas entre las que el uso de ácido tri-- fluoroacético solo ó en mezclas con disolventes es el más am-- pliamente utilizado. La eliminación ocurre por medio de la -- formación de cationes terbutilo, a través de los cuales el -- Boc es convertido a isobuteno por eliminación de un protón, -- siendo los productos adicionales una sal del aminoácido ó el-- péptido libre y dióxido de carbono.



Esquema 5: Desprotección por tratamiento ácido moderado.

Sin embargo, la presencia de cationes terbutilo puede -- originar reacciones con el tioéter de la metionina y la sus-- titución del anillo indólico del triptófano además de forma-- ción de sales de sulfonio con aminoácidos que contienen azu-- fre. Para evitar éstas reacciones indeseables se ha recomen-- dado la adición a la mezcla de reacción de sustancias atra-- padoras, tales como anisol ó metionina <sup>8, 22</sup>.

## 6. PROTECCION DEL GRUPO CARBOXILO.

Durante las etapas de formación de un péptido es comparable el riesgo de reacción del grupo carboxilo al del grupo amino, por lo tanto, cuando son empleados los reactivos normalmente usados para el acoplamiento, el grupo carboxilo debe también ser protegido.

La protección del grupo carboxilo en las primeras síntesis de péptidos fue realizada por la formación de ésteres metálicos y etílicos lograda por la introducción del ácido clorhídrico gaseoso dentro de una suspensión del aminoácido en el alcohol absoluto. Sin embargo, un método más conveniente -- propuesto por Brenner y Huber<sup>23</sup> que consiste en agregar gota a gota cloruro de tionilo al alcohol frío seguido por la adición del aminoácido el cual se disuelve rápidamente, efectúan la reacción a reflujo. Aquí probablemente, el sulfito de metilo y el ácido clorhídrico, son los productos de la reacción entre el cloruro de tionilo y el alcohol, aunque ambos son capaces de facilitar la esterificación del aminoácido. La eliminación de éstos grupos protectores del péptido después de las etapas de acoplamiento se realiza comúnmente por hidrólisis alcalina suave en acetona ó metanol a temperatura ambiente; el mayor riesgo de éste tratamiento alcalino es la posible hidrólisis de enlaces amida sensibles.

La atractiva posibilidad de eliminar grupos protectores del carboxilo por hidrogenólisis en vez de hidrólisis, condujo a la preparación de ésteres bencílicos como protectores del carboxilo en aminoácidos, haciéndose aún más populares con la introducción de simplificaciones a la esterificación catalítica, usando ácido p-toluensulfónico en vez del ácido --

clorhídrico como catalizador, mejorando los rendimientos obtenidos por el uso de los ésteres metílicos y etílicos.

El grupo bencilo puede ser eliminado del carbono terminal de un péptido, con ácido bromhídrico en ácido acético a temperatura ambiente. Una posibilidad más la constituye el empleo de los ésteres fenacílicos; éste grupo se introdujo para la síntesis de péptidos en fase sólida, debido a la gran facilidad de eliminación con bases ó bajo condiciones de reducción con metales como cinc en medio ácido. Los ésteres fenacílicos son estables en presencia de ácidos anhidros, incluyendo el reflujo con ácido trifluoroacético y ácido fluorhídrico líquido, pero son sensibles a nucleófilos una ó dos veces más que los ésteres bencilicos sencillos. Pueden ser eliminados de la resina por métodos reductivos como; hidrogenólisis catalítica usando cinc en ácido acético glacial ó acético acuoso y fotólisis en disolventes dipróticos.

Muchos métodos para la esterificación se han reportado en la literatura, sin embargo, persiste la necesidad de un procedimiento para obtener ésteres en condiciones suaves que sean aplicables a compuestos que son sensibles a ácidos, bases ó condiciones térmicas sin que su obtención sea costosa ó dependiente de reactivos de difícil acceso. Wang y Gisin<sup>24</sup> describieron un método en el que el aminoácido a ser esterificado, primero es convertido a la sal de cesio con carbonato ó bicarbonato de cesio. Después de evaporar a sequedad, la sal es tratada con un halogenuro de alquilo en dimetilformamida ó acetonitrilo para formar el correspondiente éster. La reacción se realiza en un período de tiempo corto, por agitación y calentamiento a temperatura no mayor a los 55 °C y en condiciones neutras.

En la figura 3 se muestran los principales grupos protectores del grupo carboxilo empleados en fase sólida. Durante el acoplamiento estos grupos están unidos a un polímero insoluble protegiendo de esta forma al carboxilo del residuo terminal mientras se realiza el ensamble de los aminoácidos siguientes: El enlace 4-alquibencílico I <sup>15</sup> es moderadamente resistente a reactivos ácidos para eliminar al grupo N<sup>α</sup>-Boc, tales como HCl 1 M en ácido acético, HCl 4 M en dioxano ó TFA al 50 % en diclorometano, pero sufre ruptura por HBr en TFA y por HF líquido. El enlace éster alquifenacílico II <sup>25</sup> es estable en condiciones moderadamente ácidas y sufre ruptura por nucleófilos como hidróxidos, tiorfenóxido, amonio é hidrazina. Los enlaces éster n-alquílicos III y IV <sup>26</sup> y V <sup>27</sup> son estables en ácidos acético y bromhídrico al 30 % en ácido acético y sufren ruptura por saponificación ó amonólisis. El enlace difenilmetílico VI <sup>28</sup> se rompe por TFA al 5 % en diclorometano. El enlace éster ter-alquílico VII <sup>29</sup> y el enlace 4-alcoxi bencílico VIII <sup>30</sup>, son estables en condiciones medianamente ácidas usadas para remover al grupo N<sup>α</sup>-Boc, pero hay ruptura en condiciones moderadamente ácidas empleadas para remover al grupo N<sup>α</sup>-Boc.

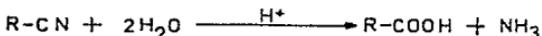
Otras resinas han sido utilizadas específicamente para la síntesis de amidas peptídicas. Los enlaces éster fenacílicos IX <sup>31</sup> y X <sup>32</sup>, son completamente estables bajo las condiciones de síntesis en fase sólida incluyendo la eliminación de los grupos N<sup>α</sup>-Boc, pero son relativamente sensibles a amonólisis. El enlace difenilmetilamida XI <sup>33</sup> es estable bajo condiciones ácidas moderadas, pero sufre ruptura por HF para producir el péptido amídico. El enlace ter-alquilloxicarbonil

hidrazina XII: <sup>34</sup>, es moderadamente resistente a reactivos medianamente ácidos, tales como TFA al 0.5 % en diclorometano usado para eliminar al grupo N<sup>α</sup>-Bpoc, pero hay ruptura como hidrazina peptídica con TFA al 50 % en diclorometano, un reactivo común para eliminar al grupo N<sup>α</sup>-Boc.

Algunos grupos C<sup>α</sup>-protectores son estables hasta convertirse a una forma lábil al final de la síntesis. Por ejemplo el enlace 2-(alquiltio)-etil XIII <sup>35</sup> es moderadamente resistente a ácidos y bases hasta oxidarse al enlace éster 2-(alquilsulfonil)-etilo XIV, el cual es sensible a ruptura por  $\beta$  eliminación con metóxido de sodio. Similarmente, los enlaces éster 4-alquiltiofenilo XV <sup>36</sup> y XVI <sup>37</sup> son relativamente no reactivos bajo condiciones de oxidación y los enlaces éster 4-alquilsulfonilfenilo XVII y XVIII respectivamente, pueden sufrir ruptura por una variedad de nucleófilos significativa.



diente.

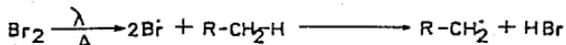


Esquema 7: Hidrólisis de nitrilos.

En solución neutra la reacción es muy lenta, pero el proceso se cataliza enormemente utilizando ya sea un ácido ó una base. Es así pues, que si los nitrilos se preparan de un modo adecuado a partir de los halogenuros de alquilo primarios mediante un tratamiento con el ión cianuro, por ende, los ácidos carboxílicos pueden prepararse de haluros de alquilo por medio de la conversión a nitrilos que se hidrolizan a continuación obteniéndose el ácido carboxílico correspondiente, en donde el producto de reacción presenta un átomo de carbono -- más respecto al halogenuro.

## 9. HALOGENACION

La halogenación de un hidrocarburo es un proceso de sustitución en el que un átomo de halogeno reemplaza a un átomo de hidrógeno; sin embargo en el caso de la halogenación benecílica el proceso es muy diferente a las reacciones de sustitución nucleofílica, dado que la reacción procede por un proceso homolítico a través de intermediarios radicales como se describe en el esquema 8.

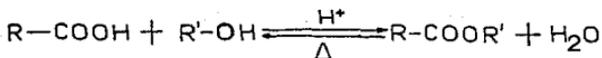


Esquema 8: Halogenación via radicales libres.

## 10. ESTERIFICACION

En la formación de ésteres a partir de ácidos carboxílicos se pueden dar dos diferentes enfoques fundamentalmente. - Primero, el protón del ácido puede reemplazarse por un grupo alquilo ó segundo, el grupo alcóxido proveniente de un alcohol puede reemplazar al grupo hidroxilo del ácido.

El método más importante para preparar un éster es la -- reacción catalizada por un ácido mineral entre un ácido carboxílico y un alcohol, la cual recibe el nombre de esterificación de Fischer <sup>12, 38</sup>.



Esquema 9: Reacción de esterificación de Fischer.

Esta reacción es particularmente versátil debido a que -- la mayoría de los alcoholes son muy accesibles, además, ya -- que la reacción es reversible pueden prepararse tanto los ésteres como los ácidos, aumentando ó disminuyendo la concentración de los reactivos ó productos apropiados (tales como -- agua), al utilizar el principio de acción de masas de Le Châtelier.

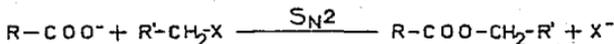
La mayor prueba de la reversibilidad natural de la reacción de esterificación proviene de variar la concentración de los reactivos. Por otra parte para su hidrólisis es necesario usar bases tales como el hidróxido de sodio.

El segundo método en importancia para la preparación de ésteres es el que se lleva a cabo mediante la reacción entre un cloruro de ácido y un alcohol produciéndose el éster correspondiente, en este procedimiento se agrega una base para eliminar el HX a medida que se forma, a tal procedimiento se le conoce como el método de esterificación de Schotten-Baumann.



Esquema 10: Esterificación de Schotten-Baumann.

Otro método útil es la reacción que se da entre el anión carboxilato proveniente de una sal del ácido carboxílico correspondiente y un haluro de alquilo generalmente por un mecanismo  $S_N2$ .



Esquema 11: Esterificación por haluros de alquilo.

Esta reacción  $S_N2$  se limita a los haluros de alquilo primarios y secundarios ya que el anión carboxilato presenta algunas propiedades básicas y promueve la eliminación en haluros terciarios. Es importante hacer notar que estas reacciones de esterificación se efectúan bajo condiciones más suaves que las conversiones catalizadas por ácidos de alcoholes primarios y secundarios en ésteres.

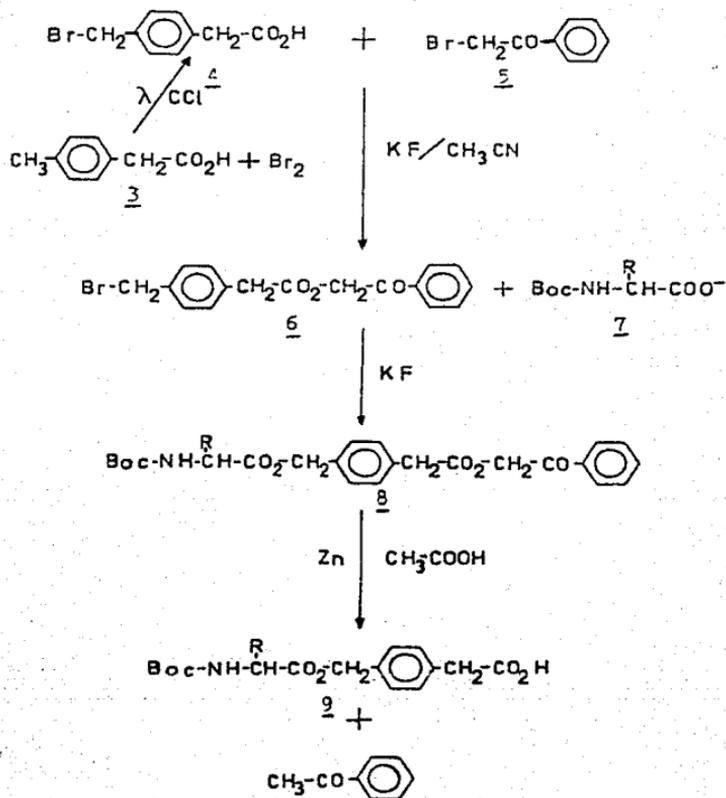
### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los problemas más importantes que se han presentado en la síntesis de péptidos por el método de fase sólida empleando la resina de Merrifield, (una de las más utilizadas) consiste en la ruptura acidolítica prematura <sup>9, 39, 40</sup> durante las etapas de desprotección del enlace tipo éster bencílico con el que se une el primer aminoácido a la resina.

Una forma de resolver éste problema ha sido el desarrollo de resinas más resistentes a la acidólisis prematura que se puede presentar, tal es el caso de la denominada PAM-resina (fenilacetamido metilamino resina). La preparación de este tipo de resinas esta supeditada a la síntesis de los ácidos -Boc-aminoacil-4-(oximetil)-fenilacéticos también designados como ácidos ~~N~~-Boc-aminoacil-4-(oxitolil)-acéticos (~~N~~-Boc-aminoacil-OTA) mediante los cuales se une el primer aminoácido a la resina. Sin embargo, los rendimientos informados en la literatura hasta ahora para algunos de estos derivados de aminoácidos (v.g. Glu, Asp, Asn, Ser y Arg) siguen siendo muy bajos (15-20 %, en cuatro etapas) <sup>23, 41</sup>, lo que evita la posibilidad de ampliar su uso y por otra parte ha conducido al desarrollo de otras resinas con la misma finalidad <sup>9, 13, 14</sup>.

Debido a que los métodos existentes resultan poco eficientes, muy costosos y poco accesibles para el investigador que se dedica a la síntesis de péptidos en fase sólida, el presente trabajo contempla la realización de un estudio de la síntesis originalmente descrita, la cual consta de cuatro etapas, las que se muestran el esquema 12.

La finalidad del presente trabajo es establecer las condiciones de reacción óptimas para la preparación de algunos -

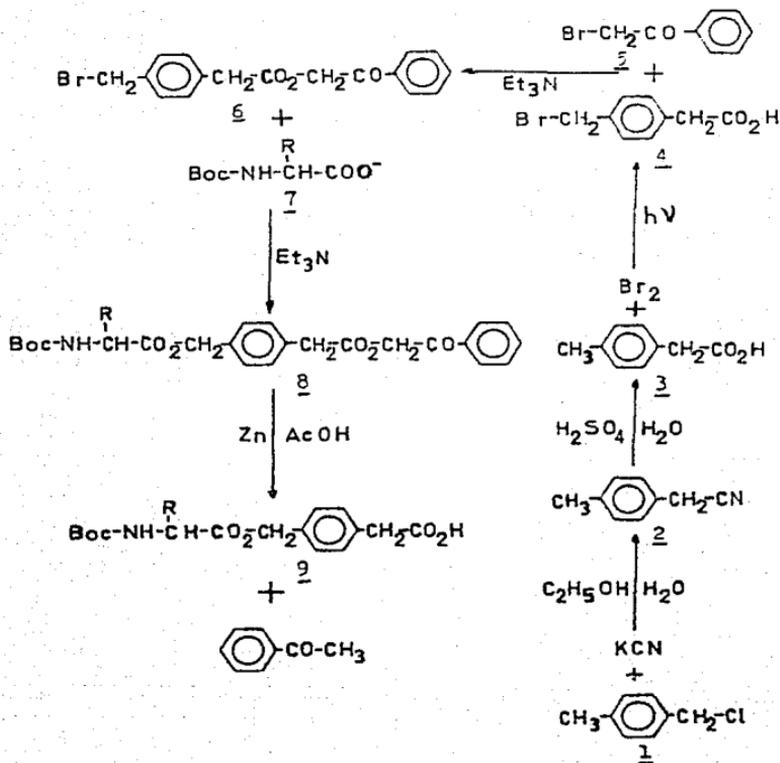


Esquema 12: Ruta sintética empleada originalmente por Merrifield y colaboradores.

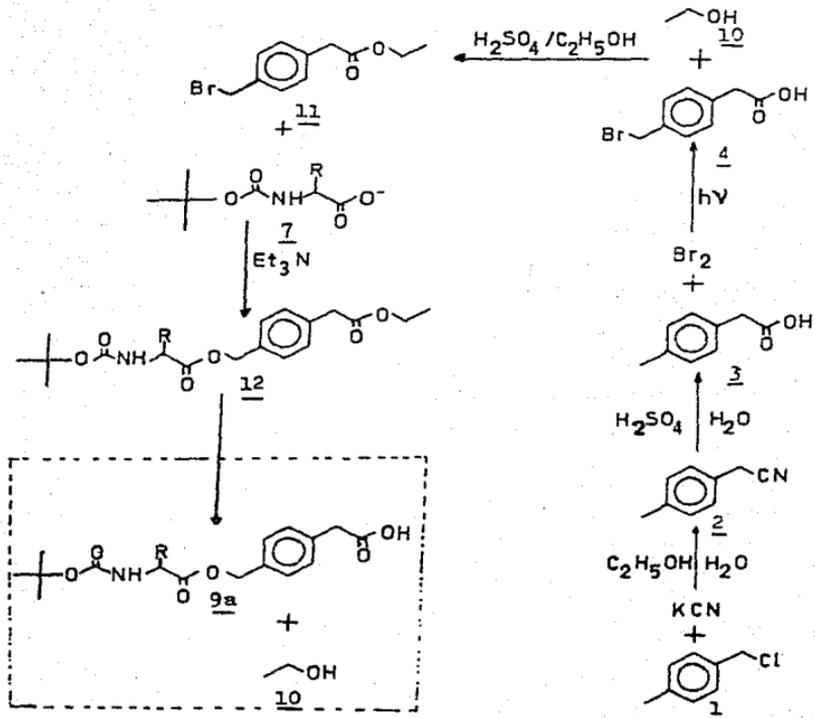
ácidos Boc-aminoacil-4-(oxitolil) acéticos de aminoácidos naturales.

Aunque la idea general considera la optimización de una ruta sintética ya descrita en la literatura y que permite la obtención de los derivados mencionados, los precios elevados de algunas materias primas nos orillan a realizar un estudio para sintetizar algunos de los precursores necesarios en la ruta, considerando que es más fácil y económico obtenerlos en el laboratorio que adquirirlos en el mercado, esto sin contar que uno de ellos no es comercial, por lo cual se propone la realización de una ruta sintética que permita la obtención de los mismos, partiendo de materias primas más baratas y accesibles, esquema 13.

Finalmente con el propósito de abatir aún más el costo elevado de la obtención de los ácidos Boc-aminoacil-4-(oxitolil) acéticos (Boc-aminoacil-OTA), principal objetivo del presente trabajo de tesis y aprovechando la experiencia lograda en lo concerniente a la parte experimental, en el esquema 14 se muestra una ruta sintética totalmente nueva, la cual forma parte de un estudio preliminar en el que se logró obtener todos los intermediarios que en ella se señalan cuando se empleó la sal de cesio del ácido Boc-aspártico, faltando únicamente la obtención del producto final para el cual se debe realizar una hidrólisis selectiva del éster etílico del ácido  $N^{\alpha}$ -(ter-butiloxicarbonil)-O $\beta$ -bencilaspartil-4-(oximetil) fenilacético para obtener el ácido  $N^{\alpha}$ -(ter-butiloxicarbonil)-O $\beta$ -bencilaspartil-4-(oximetil) fenilacético.



Esquema 13: Ruta sintética propuesta para la obtención de los Boc-aminoacil-OTA.



Esquema 14: Ruta sintética para la obtención de los ácidos Boc-aminoacyl-OTA resultado de un estudio preliminar.

#### IV. OBJETIVOS

- i) Realizar un estudio de la metodología para la síntesis de los ácidos Boc-aminoacil-4-(oximetil) fenilacéticos - propuesta por Merrifield y colaboradores.
- ii) Encontrar las modificaciones más adecuadas que permitan mejorar los rendimientos globales obtenidos hasta ahora.
- iii) Aislamiento y purificación de los intermediarios importantes que son requeridos durante la realización de la ruta sintética, los cuales se enlistan a continuación:
  - p-metil fenilacetónitrilo.
  - ácido 4-metil fenilacético.
  - ácido-4-(bromometil) fenilacético.
  - éster fenacílico del ácido-4-(bromometil) fenilacético.
  - ésteres fenacílicos de los ácidos N $\alpha$ -(ter-butilóxicarboxil)-O $\beta$ -bencilaminoacil-4-(oximetil) fenilacéticos.
- iv) Caracterización de los substratos y productos obtenidos utilizando técnicas como; cromatografía, espectroscopias de IR y  $^1\text{H}$ -RMN.
- v) En base a los puntos anteriores y los rendimientos reportados actualmente, realizar una comparación de la eficiencia de las metodologías; original y modificada.
- vi) Realización de un estudio preliminar de una nueva ruta de síntesis para la obtención de los ácidos Boc-aminoacil-4-(oximetil) fenilacéticos.

## V. H I P O T E S I S

La síntesis de los ácidos Boc-aminoacil-4-(oximetil) fenilacéticos, necesarios en la obtención de péptidos en fase sólida fué propuesta por Merrifield y colaboradores, para ser usados como soportes más resistentes a la ruptura acidolítica de péptidos durante la síntesis de los mismos. Esta síntesis fué propuesta hace ya más de diez años, sin embargo, los rendimientos hasta hoy en día siguen siendo en general bajos, lo cual impide su uso de una manera más amplia.

La síntesis de estos ácidos descrita originalmente consta de cuatro etapas en las cuales los rendimientos se favorecerán si se manejan condiciones más apropiadas para la preparación de los intermediarios involucrados en la ruta general propuesta. Así pues, si las modificaciones hechas a cada uno de los procedimientos experimentales son las apropiadas y además son de fácil control durante los procesos para cada una de las reacciones, los rendimientos globales para estos derivados de aminoácidos aumentarán.

La caracterización é identificación de substratos y productos obtenidos, por otra parte se facilitará en la medida que la pureza sea mayor, ya que su purificación será fácil de realizar en la proporción que se incrementen los rendimientos tanto parciales como globales.

## VI. MATERIAL Y METODOS

### A. MATERIAL Y EQUIPO.

Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en un aparato para determinar punto de fusión Fischer-Jones y se informan sin corregir.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrómetro Perkin Elmer modelo 559-B en película cuando las sustancias fueron aceites ó en pastillas de KBr si estos eran sólidos. En la parte experimental los espectros se describen primero dando la señal en  $\text{cm}^{-1}$ , luego la intensidad (i banda intensa, m banda media y d banda débil); finalmente la asignación.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ( $^1\text{H}$ -RMN) fueron obtenidos en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Varian modelo EM-390 empleando  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $-\text{CDCl}_3$  ó  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  como disolventes y TMS como referencia interna; los desplazamientos químicos estan dados en partes por millon (ppm) indicandose con  $\delta$ . En la parte experimental estan descritos como sigue: singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q) y multiplete (m). Un doble de doble (dd) significa una señal doble a su vez dividida en dobletes cada señal, triplete de doblete (td) significa una señal en la que cada señal esta dividida en tripletes, en tanto que doblete de triplete (dt) corresponde a una señal triple en la que cada señal esta dividida en dobletes.

La cromatografía en capa fina (C.C.F.), para monitoreo de las reacciones ó para verificar la pureza de las sustancias se hace en silica gel GF<sub>254</sub> y ninhidrina al 2 % en butanol ó luz ultravioleta (U.V.) como sistema de revelado.

La cromatografía en columna a su vez se hace con sílica-gel tipo 60 de 70-230 mallas ó en florisil de 100-200 mallas. La purificación de los compuestos se realizó como se indica en cada una de las técnicas y se verificó por c.c.f.

Todo el material de vidrio de laboratorio utilizado en la parte experimental fué de las siguientes marcas: Cristalab, Pyrex y Kymax.

Otro equipo no considerado anteriormente es el siguiente: Cromatografo de líquidos de alta resolución (HPLC) modelo 5020 de Varian, balanzas analítica y granataria, parrillas de agitación y calentamiento, rotavapor Bucchi, barras magnéticas de varias medidas, soportes universales y una lámpara de tungsteno de 75 Watts.

#### B. REACTIVOS Y DISOLVENTES.

Los Boc-aminoácidos utilizados fueron obtenidos de Peninsula Laboratories Inc. y de Sigma Chemical Co.

Los reactivos usados durante la síntesis se obtuvieron de Aldrich Chemical Co., J. T. Baker y Productos Químicos Monterrey todos en grado reactivo.

Todos los disolventes empleados se trataron para su purificación según los procedimientos descritos en la literatura 42, 43.

Para la preparación de las soluciones porcentuales se emplearon reactivos grado analítico, conseguidos de las fuentes antes mencionadas.

C. RELACION DE COMPUESTOS SINTETIZADOS.

1. p-metil fenilacetnitrilo.
2. Acido 4-metil fenilacético.
3. Acido 4-(bromometil)-fenilacético.
4. Ester fenacílico del ácido 4-(bromometil)-fenilacético.
5. Ester fenacílico del ácido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-OB-bencilaspartil-4-(oximetil)-fenilacético.
6. Acido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-OB-bencilaspartil-4-(oximetil)-fenilacético.
7. Ester fenacílico del ácido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-OB-bencilglutanil-4-(oximetil)-fenilacético.
8. Acido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-OB-bencilglutanil-4-(oximetil)-fenilacético.
9. Ester fenacílico del ácido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-OB-bencilseril-4-(oximetil)-fenilacético.
10. Acido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-OB-bencilseril-4-(oximetil)-fenilacético.
11. Ester fenacílico del ácido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-OB-benciltreonil-4-(oximetil)-fenilacético.
12. Acido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-OB-bencilteronil-4-(oximetil)-fenilacético.
13. Ester fenacílico del ácido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-asparagil-(oximetil)-fenilacético.
14. Acido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-asparagil-4-(oximetil)-fenilacético.
15. Ester fenacílico del ácido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-valil-4-(oximetil)-fenilacético.
16. Acido N<sup>α</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-valil-4-(oximetil)-fenilacético.

17. Ester etílico del ácido 4-(bromometil)-fenilacético.
18. Ester etílico del ácido N $\alpha$ -(ter-butiloxicarbonil)- $\beta$ -benzilaspartil-4-(oximetil)-fenilacético.

#### D. PARTE EXPERIMENTAL.

#### SINTESIS DE p-metil fenilacetnitrilo (1)

A una solución de 11.20 gr (0.172 mmol) de cianuro de -- potasio (KCN) en 15 ml de agua adicionar gota a gota mediante un embudo de adición 22.21 gr (0.158 mmol) de p-cloroxileno - en 20 ml de etanol; la mezcla de reacción se calienta a reflujó durante 4 horas. Enfriar y filtrar la sal inorgánica formada lavandola con 10 ml de alcohol. El filtrado se evapora obteniéndose un aceite de color café el cual se destila a presión reducida (110-120 °C a 5 mm Hg). El líquido destilado es transparente é incoloro y se obtienen 19.067 gr 92 % de rendimiento del producto.

IR (película) 3040d y 3020m ( $\nu$ , C-H aromático); 2970m y 2970m ( $\nu$ , C-H alifático); 2285m ( $\nu$ , C-N); 840i y 790m ( $\delta$ , -- C-H fenilo p-disustituido).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 2.37 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 3.68 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 7.23 (s, 4H, hidrógenos aromáticos).

SINTESIS DEL ácido 4-metil fenilacético (2)

Una solución de 2 ml de agua, 2 ml de ácido sulfúrico -- concentrado y 6.0 gr de p-metil fenilacetnitrilo, se calienta a reflujo durante 3 horas. Al terminar este tiempo la mezcla - de reacción se vacía en hielo picado con mucho cuidado, des-- pues el precipitado formado se filtra y se recristaliza en --- agua obteniéndose 6.1134 gr (39 % de rendimiento) de un sólido blanco con punto de fusión de 30-31 °C después de ser secado - bajo vacío por espacio de dos horas.

IR (KBr) 2920cm (v, -OH, del -COOH); 1690cm (v, C=O); 160cm y 760cm (d, C-H, fenilo p-disustituido).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) 2.37 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 3.63 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 7.22 (s, 4H, hidrógenos aromáticos).

SINTESIS DEL ácido 4-(bromometil)-fenilacético (3)

Una solución del ácido 4-metil fenilacético 75.0 gr (0.5-mol) en tetracloruro de carbono (350 ml) se calienta a reflujo en un matraz de 2 litros de tres bocas equipado con: agitación magnética, sistema de calentamiento, embudo de adición, con-- densador de reflujo y trampa de gas. Una solución de bromo -- (30 ml, 88 gr, 0.55 mol) en tetracloruro de carbono (30 ml) -- son adicionados en aproximadamente 20 porciones durante cuatro a seis horas con espacios de 10-30 minutos entre las porciones. Durante la adición la mezcla de reacción es irradiada con una-- lámpara de tungsteno de 75 Watts. Cuando todo el bromo se adi--

cionó la irradiación y el calentamiento se continúan por toda la noche. Al siguiente día el precipitado formado se recolecta, se recristaliza en tolueno y se seca por cuatro horas bajo vacío para dar un producto blanco 80.0 gr, rendimiento de 70 % y punto de fusión de 178-180 °C.

Las aguas madres se concentran a la mitad del volumen inicial, decoloradas con carbón activado dos veces y enfriadas para dar otra porción del producto ligeramente impuro 6.0 gr, rendimiento de 5.0 % y punto de fusión de 166-168 °C.

IR (KBr) 3000m ( $\nu$ , -OH); 1700i ( $\nu$ , C=O); 1275i ( $\delta$ , C-O); 820m y 720m ( $\delta$ , C-H aromático p-disustituido); 645i ( $\nu$ , C-Br).

$^1\text{H-RMN}$  (DMSO $_d$  / CDCl $_3$  1:1) 3.60 (s, 2H, -CH $_2$ -CO $_2$ H); 4.65 (s, 2H, Br-CH $_2$ -); 7.4 (m, 4H, hidrógenos aromáticos).

SINTESIS DEL éster fenacílico del ácido 4-(bromometil)-fenilacético (4)

60.0 gr (0.30 mol) de  $\alpha$ -bromoacetofenona se disuelven en el menor volumen de acetonitrilo anhidro (aproximadamente 50-ml). Esta solución se pone en un matraz redondo de dos bocas de 250 ml acondicionado con embudo de adición y un condensador para reflujo. Una solución de ácido 4-(bromometil)-fenilacético (34.5 gr, 0.15 mol) en el mínimo volumen de dioxano - (alrededor de 100 ml) son adicionados, la solución resultante se agita y se calienta a 50 °C. Una solución de trietilamina (23.4 ml, 16.8 gr, 0.16 mol) en un volumen igual de dioxano - ó de acetonitrilo son adicionados por goteo durante 35 minu-

tos. El calentamiento se continua por 20-45 minutos hasta que la mayoría del bromoácido se ha consumido, lo cual se determina por cromatografía en capa fina de sílica gel (acetato de etilo-hexano 1:5.6, V/V):  $\alpha$ -bromoacetofenona Rf=0.42; éster fenacílico del ácido 4-(bromometil)-fenilacético Rf=0.23; ácido 4-(bromometil)-fenilacético y sus sales formadas Rf=0.04. La mezcla de reacción se enfría a 0 °C en un baño de hielo y el precipitado obtenido se filtra. El sólido se disuelve en el mínimo volumen de cloroformo, se reprecipita con acetato de etilo y se filtra. Los filtrados combinados son evaporados hasta obtener un aceite. El aceite se disuelve en acetato de etilo y se lava dos veces con ácido cítrico al 10 % - NaCl solución saturada (1:1, V/V), NaCl solución saturada, dos veces con carbonato de amonio solución saturada - NaCl solución saturada (1:1, V/V) y NaCl solución saturada a un pH constante. La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio ó con sulfato de sodio anhidro y se evapora. El producto resultante se recrystaliza en acetato de etilo-hexano para dar el éster deseado con rendimiento de 36.0 gr, 69 % y punto de fusión de 84-85 °C.

IR (KBr) 3060d (v, C-H insaturado); 2990d, 2950d y 2870d (v, C-H alifático); 1715i (v, C=O del éster); 1680i (v, C=O de la cetona); 1240i (d, C-O-C); 800m y 735m (d, C-H fenilo - p-disustituido).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) 3.83 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CO-); 4.5 (s, 2H, ---Br-CH<sub>2</sub>-); 5.39 (s, 2H, -CO-CH<sub>2</sub>-O-); 7.20-7.70 (m, 7H, hidrógenos aromáticos); 7.8-8.05 (m, 2H, hidrógenos meta al carbonilo).

TECNICA GENERAL PARA LA OBTENCION DE LOS ésteres fenacílicos-  
de los ácidos N $\alpha$ -(ter-butiloxicarbonil)-OB-bencilaminoacil-4-  
(oximetil)-fenilacéticos (compuestos 5, 7, 9, II, 13 y 15)

Una solución del éster del ácido  $\beta$ -bencil-Boc-aminoacilí-  
co (12.4 mmol) y del éster fenacílico del ácido 4-(bromometil)-  
fenilacético (4.0 gr, 12.4 mmol) en 10 ml de acetonitrilo a--  
anhidro se pone en un matraz de 100 ml de dos bocas equipado -  
con: agitación magnética, condensador y termómetro. La solu--  
ción se calienta hasta 50 °C y se le adiciona una porción de--  
trietilamina de (1.7 ml, 12.4 mmol). Después la solución se -  
calienta por 30 minutos adicionando porciones del bromoéster--  
(4.0 gr, 12.4 mmol) y trietilamina (1.7 ml, 12.4 mmol) y la -  
temperatura se mantiene por 60-90 minutos más. El progreso de  
la reacción es monitoreado por cromatografía en capa fina de  
silica gel (2:3 y 8:2, V/V de acetato de etilo-hexano de a--  
cuerdo al producto de que se trate); La sal trietilamónica --  
Rf=0.00, bromoéster Rf=0.55 en el primer sistema de elución,-  
el éster deseado Rf de acuerdo con el aminoácido de que se --  
trate (ver tabla 1). La reacción se termina cuando el ácido -  
Boc-aminoacílico no se detecta más por la prueba de ninhidri--  
na. Si parte de la trietilamina se pierde por evaporación, --  
una cantidad adicional (0.2 ml) pueden ser necesarios para --  
consumir completamente el ácido Boc-aminoacílico.

La solución se evapora a sequedad, se redissuelve en el -  
mínimo volumen de cloroformo y se reprecipita con acetato de  
etilo. El filtrado se concentra hasta obtener un aceite, el-  
cual se disuelve en acetato de etilo y se lava dos veces con-  
NaHCO<sub>3</sub> solución acuosa saturada-NaCl solución acuosa saturada

(1:1, V/V), ácido cítrico solución acuosa al 10 %-NaCl solución saturada (1:1, V/V) y NaCl solución acuosa saturada. La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio ó sulfato de sodio anhidros y se evapora para dar un sólido ó un aceite según sea el caso, con un rendimiento variable de alrededor de 92 % de acuerdo con el éster de que se trate, los cuales presentan una pureza de aproximadamente 96-97 % determinada por HPLC. Los productos así obtenidos se pueden purificar mediante una recristalización con éter-hexano para aumentar su pureza.

Comp.	P.F. (°C)	Sist. de elución	Rf	Rdt (%)	
				Experimental	Literatura
5	86-87	1	0.38	90	80
7	62-64	1	0.46	93	75
9	aceite	1	0.55	95	76
11	aceite	1	0.60	92	74
13	122-124	2	0.49	95	60
15	aceite	1	0.56	90	82

Tabla 1: Resultados obtenidos en la síntesis de los ésteres fenacólicos de los ácidos Boc-aminoacil-OTA.  
Sistemas de elución: 1; acetato de etilo-hexano 2:3, V/V.  
2; acetato de etilo-hexano 8:2, V/V.

Compuesto 5:

IR (KBr) 3360m (v, NH); 3060d, 3040d y 3020d (v, C-H insaturado); 2970d y 2930d (v, C-H alifáticos); 1730i y 1720h (v, C=O de los ésteres); 1695i y 1685h (v, C=O de la cetona y uretano); 1180i (d, C-O-C).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.43 (s, 9H, t-Bu-); 2.96 [dd,  $J=4.5$  y - 5.0 Hz, 2H,  $-\text{CH}-(\text{NH})-\text{CH}_2-$ ]; 3.83 (s, 2H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ); 4.62 (m, 1H,  $-\text{CH}-(\text{NH})-$ ); 5.1 y 5.15 (2s, 2H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ); 5.37 (s, 2H,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ); 7.25-8.05 (m, 14H, hidrógenos aromáticos).

Compuesto 7:

IR (KBr) 3330m ( $\nu$ , N-H); 3000h ( $\nu$ , C-H aromático); 2970 m y 2930m ( $\nu$ , C-H alifático); 1730h ( $\nu$ , C=O de los ésteres); 1705i y 1675i ( $\nu$ , C=O uretano y cetona aromática); 1200i ( $\delta$ , C-O-C); 795m y 730m ( $\delta$ , C-H aromático monosustituido).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.57 (s, 9H, t-Bu-); 1.9-2.67 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 3.87 (s, 2H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ); 4.33 (m, 1H,  $-\text{CH}_2-$ ); 5.12 y 5.17 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{Ar}$ ); 5.41 (s, 2H,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ); 7.33-8.15 (m, 14H, hidrógenos aromáticos).

Compuesto 9:

IR (película) 3400m y 3330m ( $\nu$ , N-H uretano); 3060d y - 3030 ( $\nu$ , C-H aromático); 2980m, 2930m y 2880m ( $\nu$ , C-H alifático); 1730i ( $\nu$ , C=O de los ésteres); 1700h y 1690i ( $\nu$ , C=O uretano); 1180i ( $\delta$ , C-O-C); 800m y 740m ( $\delta$ , aromático monosustituido C-H).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.47 (s, 9H, t-Bu-) 3.6-4.0 (m, 4H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CO}-$  y  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Bzl}$ ); 4.5 (s, 2H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ); 5.13-5.64 (m, 5H,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$  y  $-\text{CH}_2-$ ); 7.23-8.10 (m, 14H, hidrógenos aromáticos).

Compuesto 11:

IR (película) 3350<sub>m</sub> ( $\nu$ , NH uretano); 3050d y 3020d ( $\nu$ ,

C-H aromático); 2970m, 2930m y 2870m ( $\nu$ , C-H alifático); --- 1725i ( $\nu$ , C=O de los ésteres); 1700h y 1690i ( $\nu$ , C=O de la cetona y uretano); 1170i ( $\delta$ , C-O-C); 790m y 739i ( $\delta$ , C-H aromático).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.23 (m, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH-O-}$ ); 1.50 (s, 9H, t-Bu); 3.77 (s, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CO-}$ ); 3.9-4.65 (m, 4H,  $\text{-O-CH-CH-CO}$  y  $\text{-O-CH}_2\text{-Ar}$ ); 5.14 (s, 2H,  $\text{-O-CH}_2\text{-}\phi$ ); 5.31 (s, 2H,  $\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ ); 7.32 (s, 9H, hidrógenos aromáticos); 7.1-8.0 (m, 5H,  $\text{Ar-CO-}$ ).

Compuesto 13:

IR (KBr) 3300i y 3180m ( $\nu$ , N-H amida primaria y secundaria); 2970m y 2930m ( $\nu$ , C-H alifático); 1715i y 1700h ( $\nu$ , C=O de los ésteres); 1680i y 1640i ( $\nu$ , C=O de la amida, uretano y cetona); 1240i y 1170i ( $\delta$ , C-O-C).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.43 (s, 9H, t-Bu-); 2.78 [m, 2H,  $\text{-CH-(NH)-CH}_2\text{-}$ ]; 3.86 (s, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CO-}$ ); 4.60 [m, 1H,  $\text{-CH-(NH)-}$ ]; 5.20 (s, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-O-}$ ); 5.40 (s, 2H,  $\text{-O-CH}_2\text{-CO-}$ ); 7.25-8.05 (m, 14H, hidrógenos aromáticos).

Compuesto 15:

IR (película) 3340m ( $\nu$ , N-H uretano); 3030d ( $\nu$ , C-H aromático); 2960m, 2920h y 2880h ( $\nu$ , C-H alifático); 1715h ( $\nu$ , C=O de los ésteres); 1690i y 1670h ( $\nu$ , C=O uretano y cetona-aromática); 1170i ( $\delta$ , C-O-C); 800m y 730m ( $\delta$ , C-H aromático).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0.88 (dd,  $J=6.0$  y  $6.0$  Hz, 6H,  $\text{Me}_2\text{-CH-}$ ); 1.46 (s, 9H, t-Bu-); 2.05 (m, 1H,  $\text{Me}_2\text{-CH-}$ ); 3.78 (s, 2H, Ar-

$\text{CH}_2\text{-CO-}$ ); 4.35 (m, 1H,  $-\text{CH}_2-$ ); 5.21 (s, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-O-}$ ); 5.42-  
(s, 2H,  $-\text{CO-CH}_2\text{-O-}$ ); 7.38-8.10 (m, 9H, hidrógenos aromáticos).

TECNICA GENERAL PARA LA OBTENCION DE LOS ácidos Boc-aminoacil-4-(oximetil) fenilacéticos (compuestos 6, 8, 10, 12, 14 y 16).

(2.0 mmol) del éster fenacílico del ácido N<sup>w</sup>-(ter-butil-oxycarbonil)-O<sup>B</sup>-bencilaminoacil-4-(oximetil)-fenilacético, se disuelven en el menor volumen de ácido acético acuoso al 25 % y (2600 mg, 40 mmol) de cinc activado en polvo se adicionan también y la suspensión es fuertemente agitada a temperatura ambiente. La reacción se monitorea por cromatografía en capa fina de sílica gel (2:3, 8:2 y 2:8, V/V de acetato de etilo-hexano de acuerdo al ácido que se va a sintetizar); acetofenona con un Rf=0.41, en el tercer sistema de elución, la sal de cinc Rf=0.00 en cualquier sistema de elución, éster fenacílico y ácidos Boc-aminoacil-4-(oximetil) fenilacéticos con Rf de acuerdo al producto de que se trate. Después de que toda la materia prima se ha reducido (alrededor de 6-9 horas), el cinc es eliminado por filtración y lavado con dioxano ácido acético acuoso al 85 % 1:1, V/V, (aproximadamente 50 ml). El filtrado se evapora bajo vacío en un baño a temperatura no mayor de 30 °C.

El sólido ó aceite residual se disuelve en acetato de etilo-ácido cítrico acuoso al 10 %-NaCl solución saturada (2 : 1:1, V/V/V). La fase acuosa se extrae seguidamente con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavan con ácido cítrico acuoso al 10 %-NaCl solución saturada (1:1, V/V) y a p<sup>H</sup> constante con NaCl solución saturada, secada con sulfato de magnesio ó sulfato de sodio anhidros y se evapora a seque-

dad como antes. La mayoría de la acetofenona es removida por trituración en hexano, obteniendo así el ácido deseado.

Para obtener una mayor pureza del producto se realiza una recristalización en éter-hexano, teniendo distintos rendimientos según ácido de que se trate, el cual se redissuelve en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se evapora a sequedad bajo vacío.

Comp.	P.P. (°C)	Sist. de elución	Rf	Rdt (%)	
				Experimental	Literatura
6	97-98	3	0.12	95	55
8	106-108	3	0.10	91	60
10	aceite	1	0.27	94	74
12	aceite	1	0.41	89	70
14	152-154	2	0.20	92	18
16	aceite	1	0.30	88	74

Tabla 2: Resultados obtenidos de la síntesis de los ácidos Boc-aminoacil-4-(oximetil) fenilacéticos.

Sistemas de elución: 1; acetato de etilo-hexano 2:3, V/V.  
 2; acetato de etilo-hexano 2:2, V/V.  
 3; acetato de etilo-hexano 2:8, V/V.

Compuesto 6:

IR (KBr) 3350m ( $\nu$ , N-H); 3250m ( $\nu$ , O-H del carboxilo); -- 2980m y 2940m ( $\nu$ , C-H alifático); 1740i y 1720i ( $\nu$ , C=O de los ésteres); 1690h y 1680i ( $\nu$ , C=O del ácido y uretano); -- 1260i y 1185i ( $\delta$ , C-O-C); 770d y 760d ( $\delta$ , C-H aromático mono-sustituido).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.41 (s, 9H, t-Bu-); 2.97 (dd,  $J=4.5$  y -- 6.0 Hz,  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ , 2H); 3.65 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2-\text{CO}-$ ); 4.67 (m, 1H,  $-\text{CH}_2-$ ); 4.13 y 4.18 (2s, 4H,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$  y  $-\text{O}-\text{CH}_2-\beta$ ); 7.33- y 7.39 (2s, 9H, hidrógenos aromáticos).

Compuesto 8:

IR (KBr) 3340m (v, N-H); 3250m (v, -OH del carboxilo); -2970m y 2920m (v, C-H alifático); 1730h y 1710i (v, C=O de los ésteres); 1690h y 1575i (v, C=O del ácido y uretano); -1250i y 1190i (δ, C-O-C); 785d y 735d (δ, C-H aromático mono-sustituido).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.4 (s, 9H, t-Bu-); 1.3-2.55 (m, 4H, --- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 3.67 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CO-}$ ); 4.45 (m, 1H,  $\text{-CH}_2\text{-}$ ); -5.11 y 5.13 (2s, 4H,  $\text{-O-CH}_2\text{-Ar}$  y  $\text{-O-CH}_2\text{-}$ ); 7.32 y 7.35 (2s, 9H, hidrógenos aromáticos).

Compuesto 10:

IR (película) 2260<sub>a</sub> (v, O-H del carboxilo); 2980m, ---2920m y 2870m (v, C-H alifático); 1710h y 1690i<sub>a</sub> (v, C=O del éster, ácido y uretano); 1180i (δ, C-O-C); 775d y 735d (δ, -C-H aromático p-disustituido).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.5 (s, 9H, t-Bu-); 3.63 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CO-}$ ); 3.5-4.10 (m, 2H,  $\text{-O-CH}_2\text{-CH-}$ ); 4.53 (s, 2H,  $\text{-O-CH}_2\text{-Ar}$ ); 4.4-4.6 (m, 1H,  $\text{-CH}_2\text{-}$ ); 5.23 (s, 2H,  $\text{O-CH}_2\text{-O-}$ ); 7.32 (s, 9H, hidrógenos aromáticos).

Compuesto 12:

IR (película) 2260<sub>a</sub> (v, O-H del carboxilo); 2970m, --2920m y 2870h (v, C-H alifático); 1710h y 1690i<sub>a</sub> (v, C=O del éster, ácido y uretano); 1175i (δ, C-O-C); 775m y 735m (δ, -C-H aromático p-disustituido).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.2 (d,  $J=6.0$  Hz., 3H,  $\text{CH}_3$ -); 1.43 (s, 9H, t-Bu); 3.6 (s, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CO-}$ ); 4.0-4.6 (m, 4H,  $-\text{O-CH-CH-CO-}$  y  $-\text{O-CH}_2\text{-Ar}$ ); 5.11 (s, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-}\phi$ ); 7.23 (s, 9H, hidrógenos aromáticos).

Compuesto 14:

IR (KBr) 3360h y 3330m ( $\nu$ , N-H amida y uretano); 3280m, ( $\nu$ , O-H del carboxilo); 2990m y 2920m ( $\nu$ , C-H alifático); 1730m ( $\nu$ , C=O del éster); 1690h, 1670i y 1640i ( $\nu$ , C=O del ácido, amida y uretano); 1255i y 1180i ( $\delta$ , C-O-C).

$^1\text{H-RMN}$  (DMSO/Acetona/ $\text{CDCl}_3$  4:3:1) 1.52 (s, 9H, t-Bu); 2.71 (dd,  $J=2.0$  y  $7.0$ , 2H,  $-\text{CH-CH}_2\text{-CO-}$ ); 3.63 (s, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CO-}$ ); 4.52 (m, 1H,  $-\text{CH}_\alpha$ ); 5.18 (s, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-Ar}$ ); 7.38 (s, 4H, hidrógenos aromáticos).

Compuesto 16:

IR (película) 3250m ( $\nu$ , O-H del carboxilo); 2960m y 2920m ( $\nu$ , C-H alifático); 1710h y 1690i ( $\nu$ , C=O del éster, ácido y uretano) 1175i ( $\delta$ , C-O-C).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0.90 (dd,  $J=7.0$  y  $7.0$  Hz. 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-}$ ); 1.43 (s, 9H, t-Bu-); 2.17 (m, 1H,  $\text{Me}_2\text{-CH-CH-}$ ); 3.67 (s, 2H,  $\text{Ar-CH}_2\text{-CO-}$ ); 4.22 (m, 1H,  $-\text{CO-CH-}$ ); 5.20 (s, 2H,  $-\text{O-CH}_2\text{-Ar}$ ); 7.3 (s, 4H, hidrógenos aromáticos).

SINTESIS DEL éster etílico del ácido 4-(bromometil)-fenilacético (17).

Disolver 5.0 gr del ácido 4-(bromometil)-fenilacético en 70 ml de etanol absoluto y colocarlos en un matraz redondo de 200 ml de tres bocas acondicionado con: agitación magnética, condensador, trampa de humedad, termómetro y embudo de adición. A esta solución se le agregan mediante el embudo 2 ml de  $H_2SO_4$  concentrado, disueltos en 5 ml de etanol absoluto y se calienta a  $60^\circ C$  hasta que todo el bromoácido sea consumido, determinandolo por cromatografía en capa fina de sílica-gel (1:4, V/V de acetato de etilo-hexano), bromoácido  $R_f=0.53$ ; éster  $R_f=0.81$ ; La mezcla de reacción se concentra hasta la mitad de su volumen y se disuelve en acetato de etilo. La solución resultante se lava como sigue: Una vez con  $(NH_4)_2CO_3$  solución acuosa saturada-NaCl solución acuosa saturada (1:1, V/V), una vez con  $NaHCO_3$  solución acuosa saturada-NaCl solución acuosa saturada (1:1, V/V) y 3 veces con NaCl solución acuosa saturada. La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio ó sulfato de sodio anhidros y se evapora para dar un líquido transparente e incoloro.

IR (película) 3050d y 3020d (v, C-H aromático); 2980m, 2930d y 2870d (v, C-H alifático); 1710i (v, C=O); 1270i y 1175i (d, C-O-C).

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ ) 1.24 (t,  $J=7.0$  Hz, 3H,  $CH_3$ -); 3.63 (s, 2H, Ar- $CH_2$ -CO-); 4.2 (q,  $J=7.0$  Hz, 2H, -O- $CH_2$ -); 4.52 (s, 2H, -Br- $CH_2$ -) 7.37 (s, 4H, hidrógenos aromáticos).

SINTESIS DEL éster etílico del ácido Na-(ter-butiloxycarbonil)- $\beta$ -bencilaspartil-4-(oximetil)-fenilacético (18).

Una solución del éster del ácido  $\beta$ -bencil Boc-aspartico (4.4 gr) y del éster etílico del ácido 4-(bromometil)-fenilacético (2.5 gr) en 6.5 ml de acetonitrilo anhidro se pone en un matraz redondo de 100 ml equipado con agitación magnética y condensador para reflujo. La solución se calienta a 50 °C y se le adiciona una porción de trietilamina de 0.6 ml. Después la solución se calienta por 30 minutos más, adicionando porciones del bromoéster (2.5 gr) y trietilamina (0.6 ml), manteniendo la temperatura otros 50-90 minutos más y el progreso de la reacción se monitorea por cromatografía en capa fina de sílica gel (2:3, V/V de acetato de etilo-hexano), éster Boc-Asp-OBzl Rf=0.25; bromoéster Rf=0.34; éster deseado Rf=0.65.- La reacción se termina cuando el éster del ácido  $\beta$ -bencil Boc-aspartico se detecta más por la prueba de ninhidrina. Si parte de la trietilamina se pierde por evaporación, una cantidad adicional (0.2 ml) puede ser necesaria para consumir completamente el éster del ácido Boc-amínico.

La solución se evapora a sequedad, se redisuelve en el mínimo volumen de cloroformo y se precipita con acetato de etilo, y se filtra. El filtrado se concentra hasta obtener un aceite el cual se disuelve en acetato de etilo y se lava dos veces con solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ -NaCl solución acuosa saturada (1:1, V/V), finalmente con NaCl solución acuosa saturada. La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio anhidro y se evapora para dar un aceite amarillento el que se purifica por recristalización en éter-hexano.

IR (película) 3330m ( $\nu$ , N-H); 3020s ( $\nu$ , C-H aromático);- 2970m, 2930m y 2880m ( $\nu$ , C-H alifático); 1730i ( $\nu$ , C=O de los ésteres); 1700i y 1675i ( $\nu$ , C=O uretano); 1220i ( $\delta$ , C-O-C); - 795m y 730m ( $\delta$ , C-H aromático monosustituido).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.24 (t,  $J=7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -); 1.43 (s, 9H, t-Bu); 2.96 (dd,  $J=4.5$  y  $5.0$  Hz, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CH}_2$ -); 3.83 (s, 2H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CO}$ -); 4.2 (q,  $J=7.0$  Hz, 2H,  $-\text{O}-\text{CH}_2$ -); 4.67 (m, 1H,  $-\text{CH}_2$ -); 5.13 (s, 2H,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$ -); 7.33 y 7.39 (2s, 9H, hidrógenos aromáticos).

SINTESIS DEL ácido  $\text{N}^\alpha$ -(ter-butiloxicarbonil)- $\alpha$ -bencilaspartil-4-(oximetil)-fenilacético (6) a partir del éster etílico.

Para la obtención de este compuesto se empleó una nueva ruta sintética a partir del compuesto 17, se emplearon distintas condiciones de reducción sin llegar a obtener el producto deseado por esta vía de síntesis. Entre las condiciones empleadas están la técnica general para la obtención de los ácidos Boc-aminoácil-4-(oximetil)-fenilacéticos utilizadas con anterioridad, sin obtener resultados que fueran satisfactorios hasta ahora, quedando así pues, abierta la posibilidad para la síntesis de este compuesto y también la de sus análogos empleando otros aminoácidos quedando condicionada a la factibilidad de realizar y encontrar las condiciones para que esta reducción se pueda llevar a cabo.

## VII. DISCUSION Y RESULTADOS

La síntesis de los ácidos N<sup>o</sup>-Boc-aminoácil-4-(oximetil)-fenilacéticos originalmente propuesta por Merrifield y colaboradores 3, 15, 17, se sometió a estudio y se le hicieron modificaciones con la finalidad de mejorar los rendimientos hasta ahora reportados, ya que de la obtención de éstos derivados depende la preparación de resinas más resistentes a la ruptura acidolítica de péptidos durante la síntesis de los mismos por el método de fase sólida. En el esquema 10 se ilustra la ruta sintética original, la cual consta de cuatro etapas para la obtención de los derivados aminoacídicos deseados, el estudio hecho dió los siguientes resultados.

La bromación del ácido 4-metil fenilacético (3) durante la primera etapa, se lleva a cabo en tetracloruro de carbono por fotoadición a temperatura de reflujo. Aquí se encontró -- que un incremento de tre veces en la concentración del ácido, produce un aumento de un 51 % a un 70 % en el rendimiento del bromoácido (4).

La condensación del ácido 4-(bromometil) fenilacético -- (4) con  $\alpha$ -bromoacetofenona (5) en la segunda etapa da bajos rendimientos con ciclohexilamina como base y requiere una purificación difícil de realizar. Se ha sugerido el uso de KP- $\cdot 2H_2O$  en presencia de éteres corona, que aunque tedioso da mejores rendimientos 9, 14. Ya que la condensación del ácido-4-(bromometil)-fenilacético (4) y la  $\alpha$ -bromoacetofenona (5) puede conducir a diferentes productos de acuerdo con la base empleada, se decidió estudiar con más detalle esta reacción. Se escogió trietilamina como base, esperando tener un mayor impedimento estérico que con la ciclohexilamina y menor solu-

bilidad de la sal de amonio formada en los disolventes orgánicos. Debido a que el bromoácido (4) no es muy soluble en el acetato de etilo originalmente empleado, se decidió buscar otros disolventes que permitieran incrementar la concentración hasta niveles deseados. El dioxano resultó ser adecuado para disolver al bromoácido y el acetonitrilo a la  $\alpha$ -bromoacetofenona de tal manera que pudieron prepararse soluciones concentradas de la mezcla de reacción, disolviendo previamente cada uno de los reactivos por separado y mezclándolos posteriormente.

La mayoría de las reacciones de competencia (por ejemplo la formación de 13, 14 y 15) pueden ser clasificadas como reacciones  $S_N2$  (esquema 15).

Aunque la reacción ácido-base deseada en primer término debe ser rápida (con formación de 4a), en comparación con las otras, su reversibilidad bajo condiciones de exceso de amina presente, podría desplazar la reacción hacia compuestos no deseados. El producto deseado (6), debe producirse en un segundo paso, también mediante una reacción  $S_N2$  siempre que la concentración de base se mantenga suficientemente baja para minimizar las reacciones en competencia. Se esperaría por tanto que un incremento en la concentración de las especies reaccionantes conduzca a un aumento en la velocidad de reacción.

Experimentos cinéticos de la reacción de trietilamina y  $\alpha$ -bromoacetofenona (5), tanto en acetato de etilo como en acetonitrilo, mostraron un aumento de cuando menos 10 veces en la velocidad de sustitución en acetonitrilo respecto al acetato de etilo, ésto seguido mediante  $^1H$ -RMN y por desaparición del singulete a 4.4 ppm, correspondiente al metileno que soporta al bromo.

Estos resultados indican por un lado, la necesidad de adicionar muy lentamente la amina, con el fin de minimizar las reacciones laterales no deseadas y por otro, que la reacción- $S_N2$  deseada debe verse favorecida en acetonitrilo.

La evaluación de la reactividad relativa de la reacción-entre 4a y 5 sería de gran valor para calcular una proporción óptima de reactivos, sin embargo ésta se encuentra limitada - debido a la autocondensación del ácido (4).

En experimentos de competencia entre la sal de cesio de (4) en acetonitrilo:DMP (3:1, V/V) a 50 °C (4 y 5 en relación 1:2), se obtuvo más del 97 % del éster fenacílico (6), lo que indica que la  $\alpha$ -bromoacetofenona es cuando menos 50 veces más reactiva que el bromoácido (4) aunque los resultados no son - concluyentes debido a la descomposición de (5) bajo condiciones de reacción empleadas. En la práctica, una relación 2:1 - del ácido (4) y la bromoacetofenona (5) ha dado los mejores - resultados para la obtención de (6) con un fácil procedimiento de purificación.

La condensación de los  $N^{\alpha}$ -Boc-aminoácidos con el éster--fenacílico del ácido 4-(bromometil)-fenilacético (6) (ver esquema 10, etapa 3), empleando trietilamina como base dió en general malos rendimientos (55 %) cuando se aplica al caso de la  $N^{\alpha}$ -Boc-Asn<sup>8</sup>, por lo que se decidió emplear su sal de cesio en un exceso del éster (6) (1.5 : 1.0), en acetonitrilo - anhidro a 50-55 °C. Se obtuvieron rendimientos reproductibles- del 90-94 % de los ésteres fenacílicos de  $N^{\alpha}$ -Boc-aminoacil---OTA (9) de aminoácidos poco reactivos tales como Asn y Ser y aún una recuperación hasta del 70 % del bromoéster (6) en exce- so.

La reducción de los ésteres fenacéticos (etapa 4) se realizó básicamente por el procedimiento descrito en la literatura 7, 15. Así pues, tomando en cuenta las consideraciones anteriores los rendimientos globales obtenidos para los derivados de algunos aminoácidos poco reactivos han llegado a ser hasta 500 % mayores a los informados en la literatura 14 hasta hoy en día.

Por lo que respecta al estudio preliminar de la nueva ruta sintética, se obtuvieron resultados considerablemente buenos en cuanto a los rendimientos de los intermediarios logrados (ver parte experimental), esto hace que la ruta sea una muy buena perspectiva para el futuro debido a que los reactivos utilizados en ella hacen que la obtención de las resinas por éste método sean más accesibles. Por otra parte, tomando en cuenta que para esta nueva vía sintética únicamente falta encontrar las condiciones de reacción del éster etílico del ácido N<sup>o</sup>-(ter-butiloxicarbonil)-O<sup>o</sup> $\beta$ -benzilaspartil-4-(oximetil)-fenilacético la que deberá ser selectiva y una vez que se encuentren extrapolárlas para los demás aminoácidos.

Así pues, analizando los resultados de éste estudio realizado se puede aseverar que se cumplió con el objetivo perseguido de establecer buenos antecedentes para un trabajo posterior que conduzca a la obtención de estos derivados ácidos a un precio asequible y partiendo de reactivos más sencillos y de fácil acceso para el químico que se dedica a la síntesis de péptidos y especialmente por el método de fase sólida de Merrifield.

### VIII. CONCLUSIONES

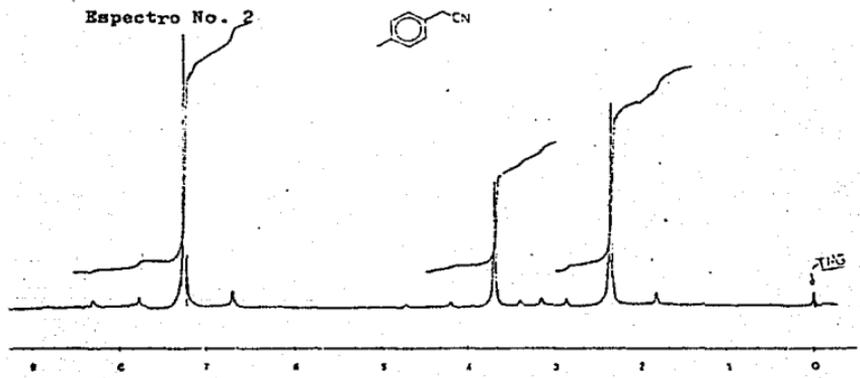
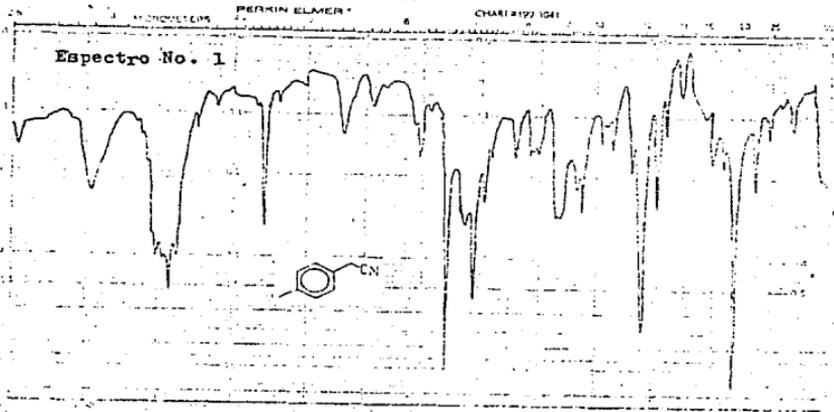
1. Se realizó el estudio de la metodología original propuesta por Merrifield y colaboradores para la obtención de los ácidos Boc-aminoacil-OTA, lo que permitió optimizar la ruta sintética
2. Se encontraron las modificaciones apropiadas a la metodología que permitieron mejorar los rendimientos hasta hoy reportados, tanto para los derivados de aminoácidos difíciles (e.g. Asn, Ser y Treo), como para los considerados no tan problemáticos (e.g. Val, Asp y Glu).
3. Se aislaron, purificaron y caracterizaron intermediarios y productos involucrados en la ruta sintética mediante técnicas como: Cromatografía, espectroscopías de IR y  $^1\text{H-NMR}$  y propiedades físicas como su punto de fusión.
4. En base a los rendimientos obtenidos y los reportados en la literatura se pudo hacer una comparación en cuanto a resultados (ver tablas 1 y 2).
5. Se realizó el estudio preliminar de una nueva ruta sintética para llegar a los mismos compuestos; ruta que presenta una perspectiva bastante prometedora tanto porque implica un costo más bajo, como por lo accesible de los reactivos requeridos para la misma.

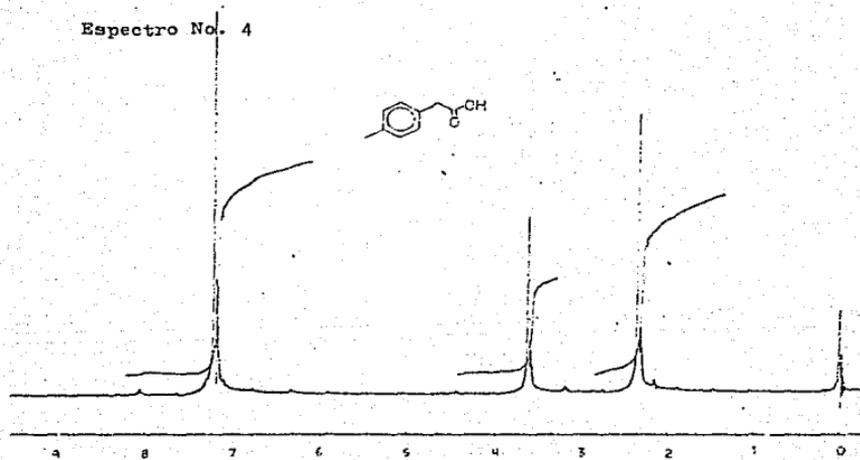
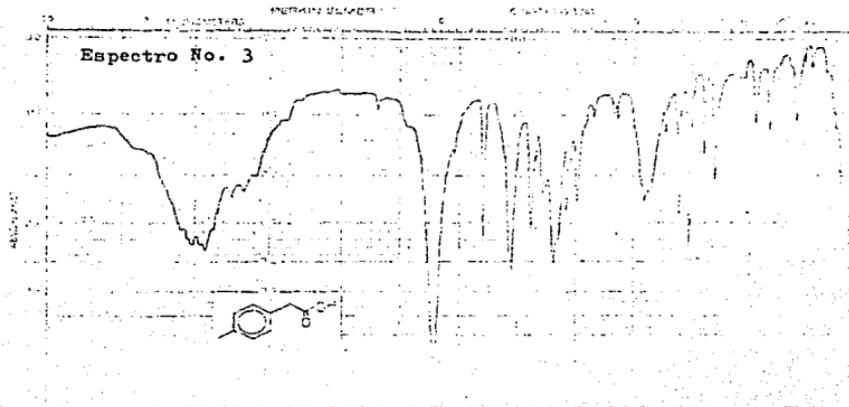
IX. A P E N D I C E

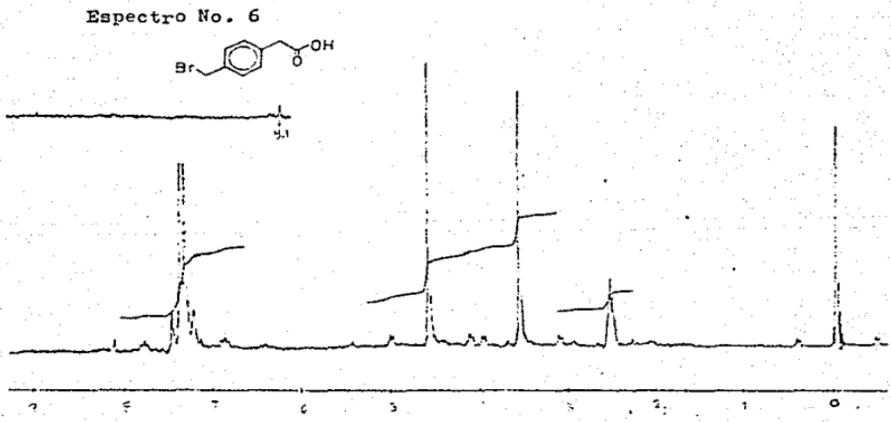
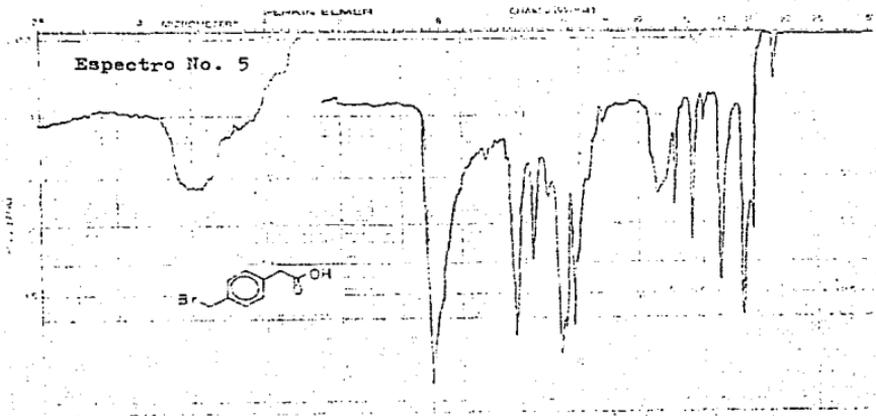
En la presente sección se muestran los espectros representativos de Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear-Protónica ( $^1\text{H-RMN}$ ), obtenidos para la identificación de los compuestos sintetizados en el presente trabajo.

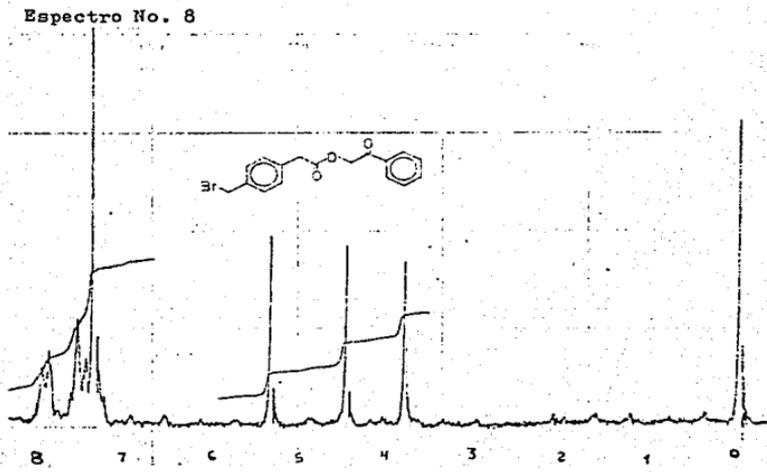
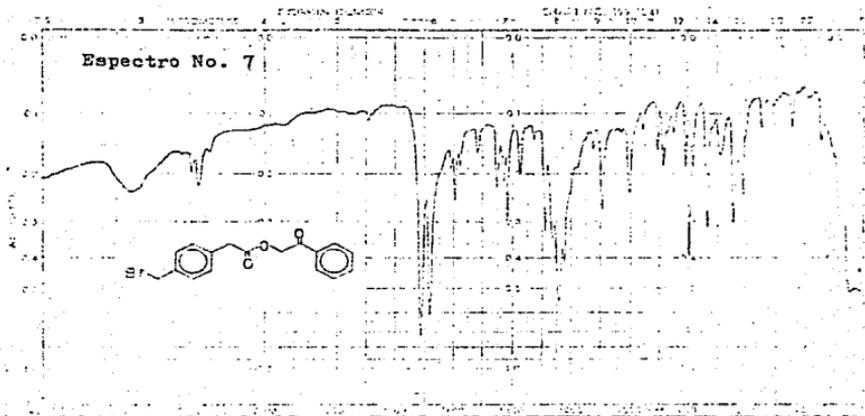
No.	Espectro	Compuesto
1	IR	1
2	$^1\text{H-RMN}$	1
3	IR	2
4	$^1\text{H-RMN}$	2
5	IR	3
6	$^1\text{H-RMN}$	3
7	IR	4
8	$^1\text{H-RMN}$	4
9	IR	5
10	$^1\text{H-RMN}$	5
11	IR	6
12	$^1\text{H-RMN}$	6
13	IR	7
14	$^1\text{H-RMN}$	7
15	IR	8
16	$^1\text{H-RMN}$	8
17	IR	9
18	$^1\text{H-RMN}$	9
19	IR	10
20	$^1\text{H-RMN}$	10
21	IR	11
22	$^1\text{H-RMN}$	11

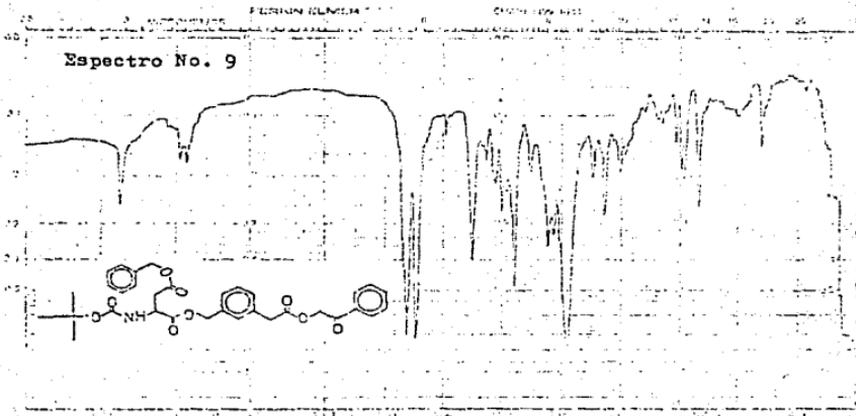
No.	Espectro	Compuesto
23	IR	12
24	$^1\text{H-NMR}$	12
25	IR	13
26	$^1\text{H-NMR}$	13
27	IR	14
28	$^1\text{H-NMR}$	14
29	IR	15
30	$^1\text{H-NMR}$	15
31	IR	16
32	$^1\text{H-NMR}$	16
33	IR	17
34	$^1\text{H-NMR}$	17



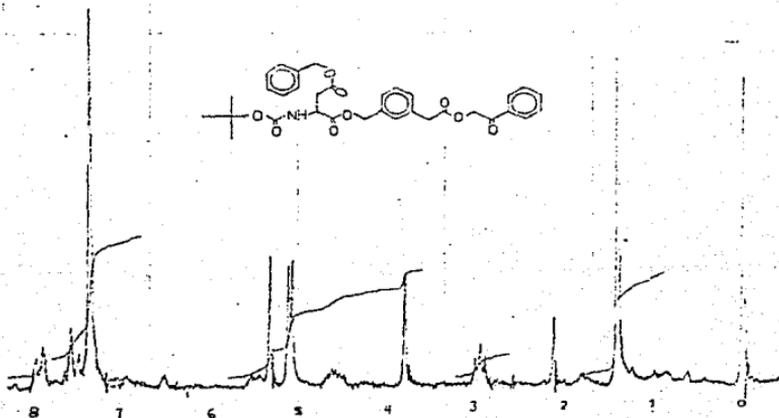


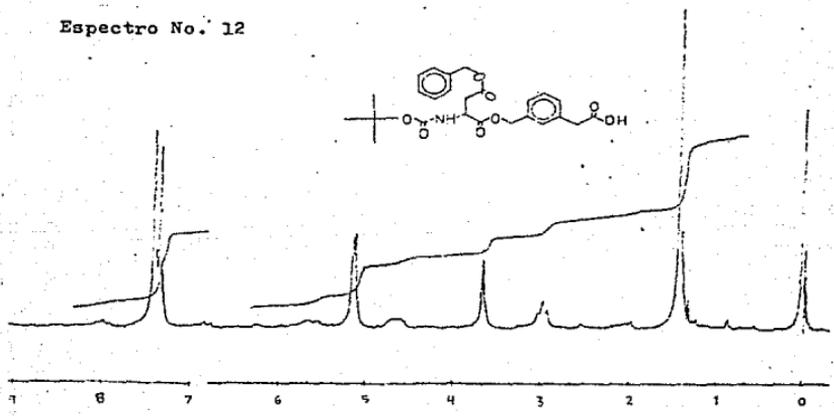
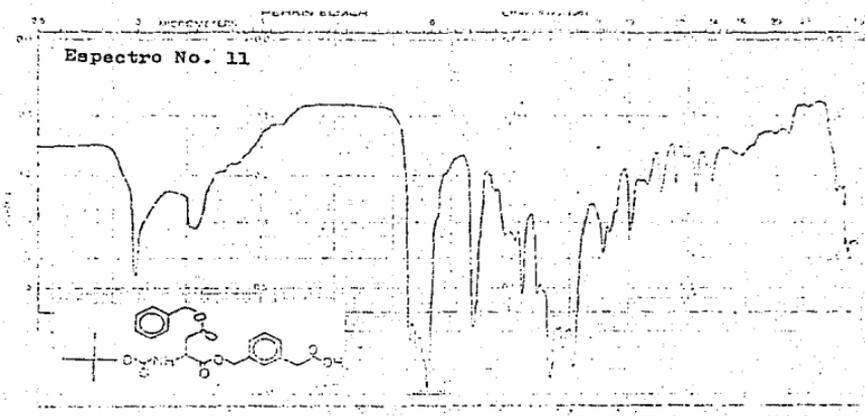


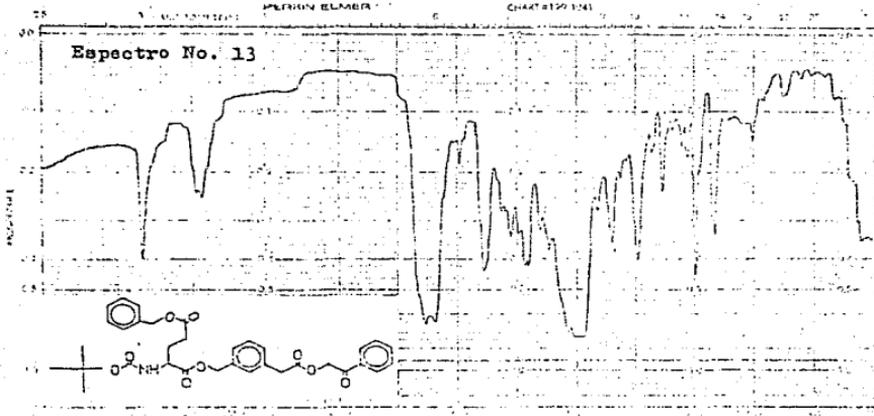




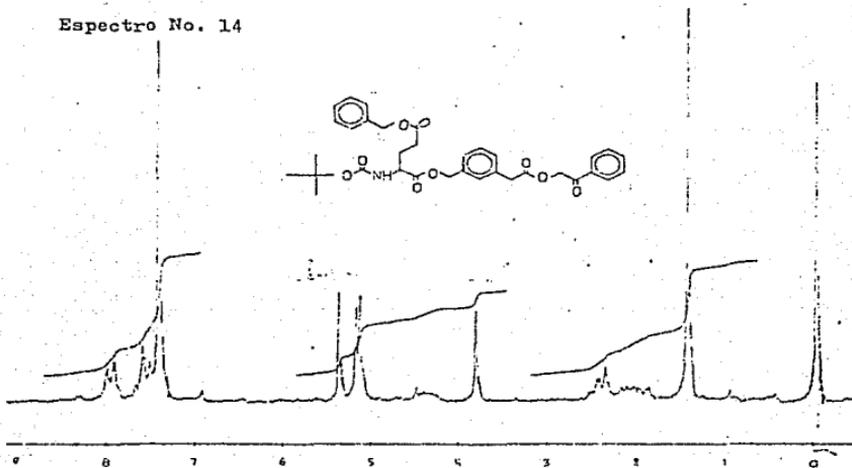
Espectro No. 10

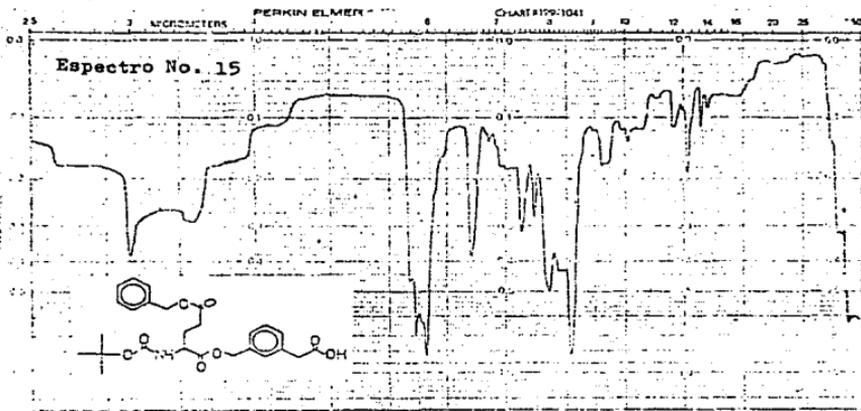




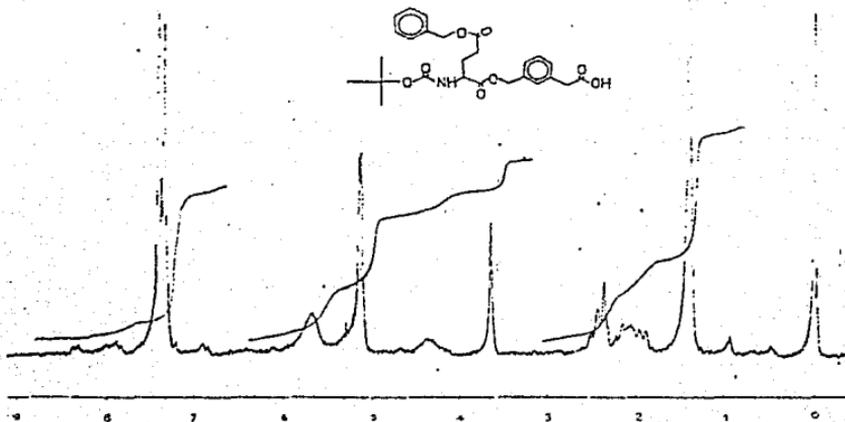


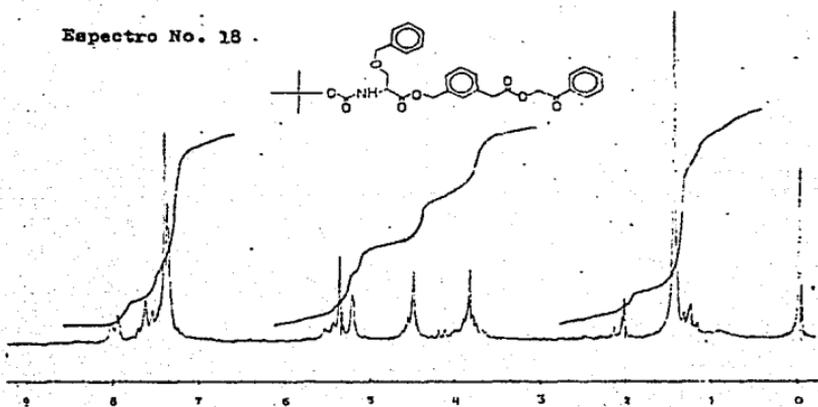
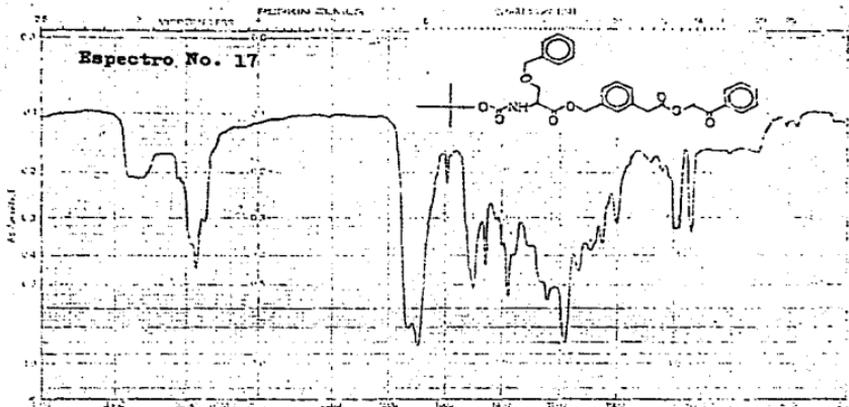
Espectro No. 14

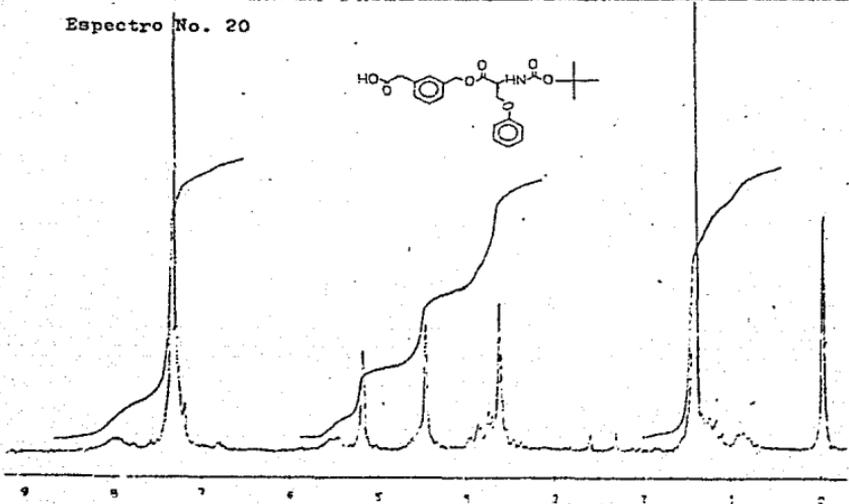
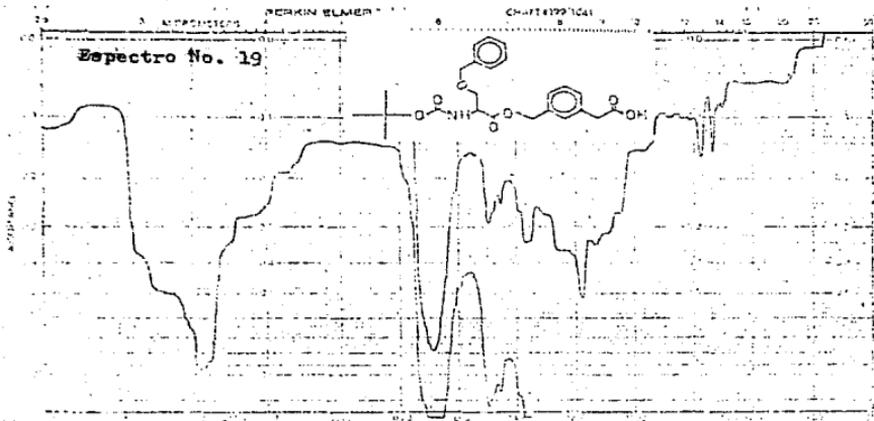


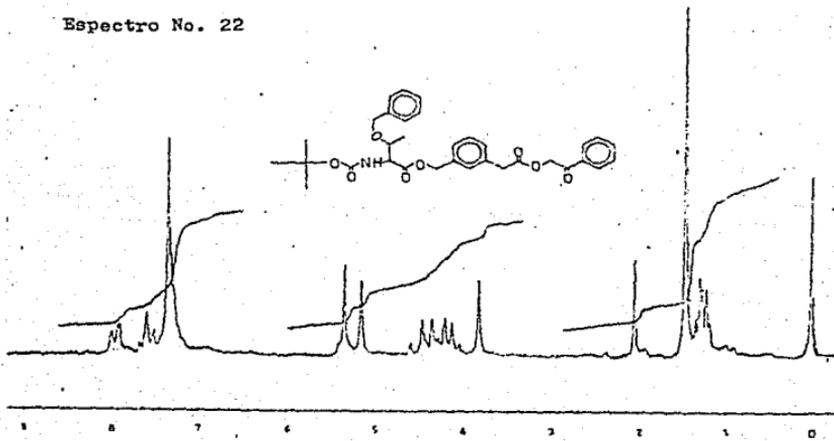
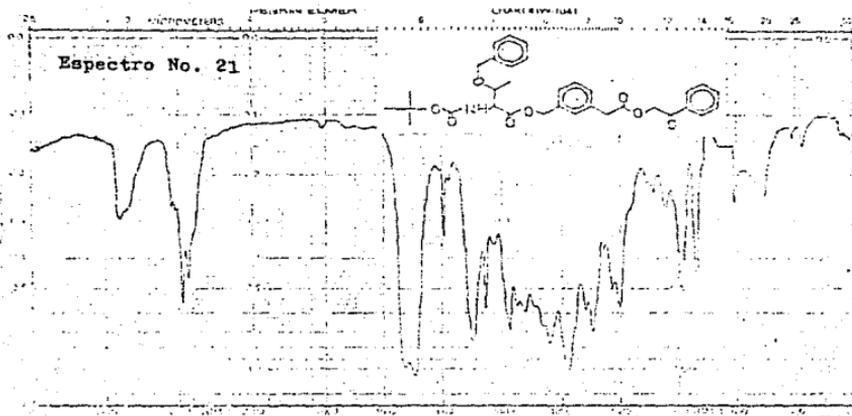


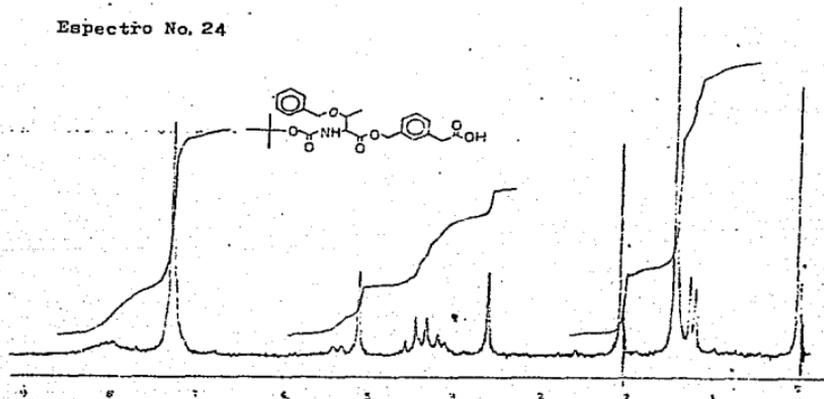
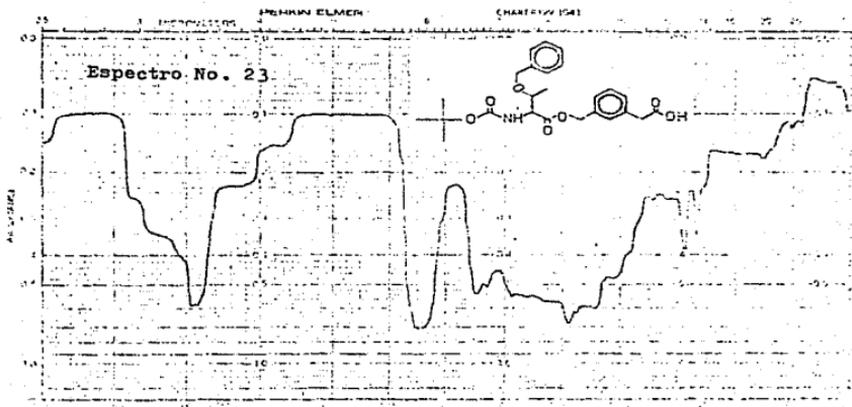
Espectro No. 16

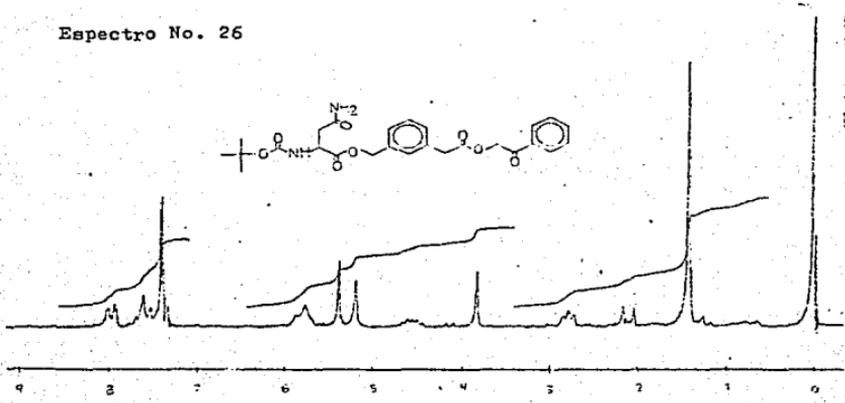
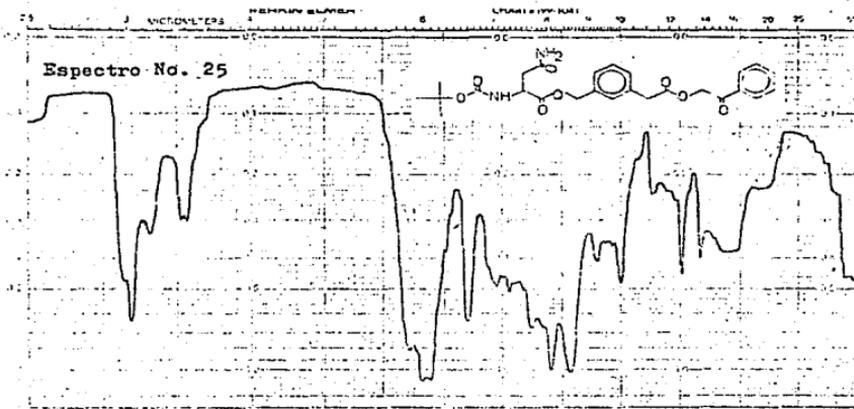


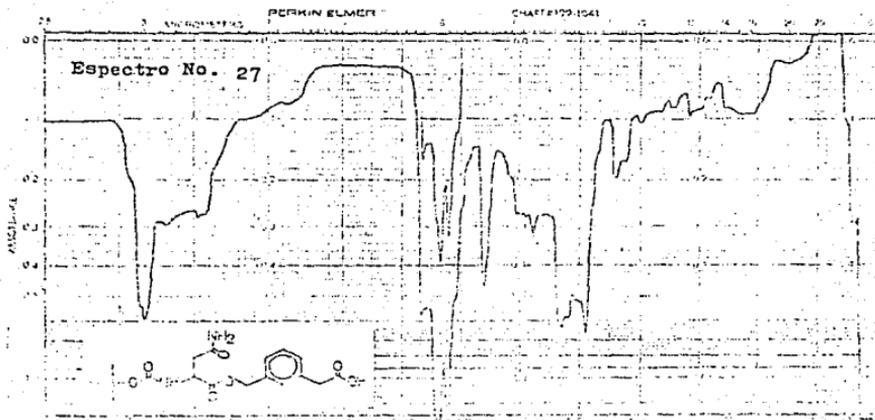




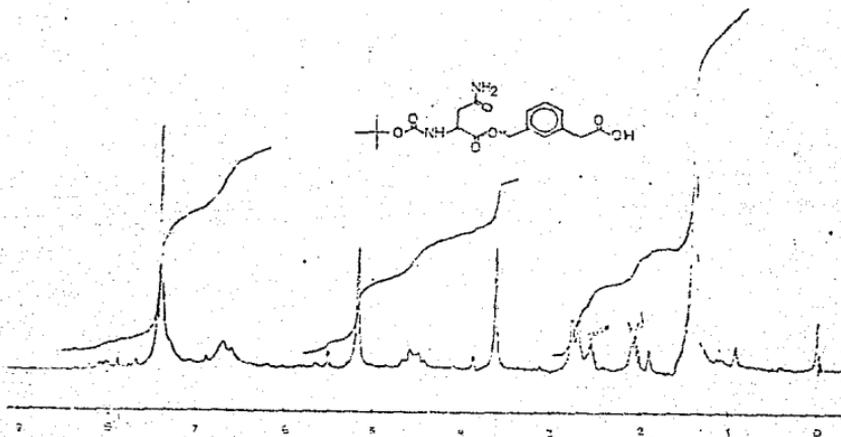






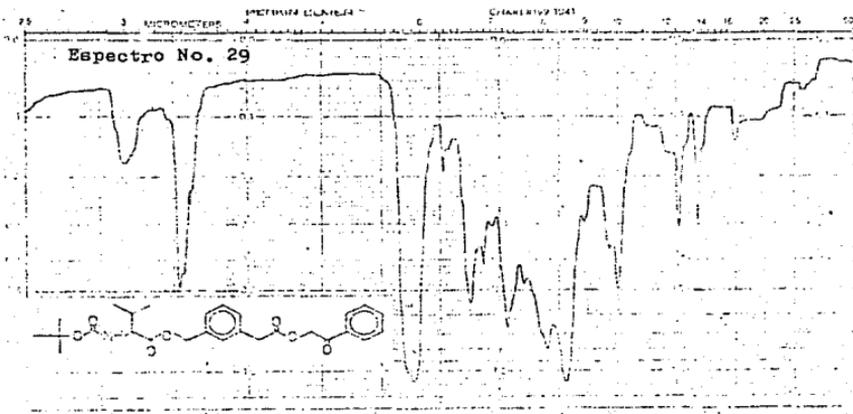


Espectro No. 28

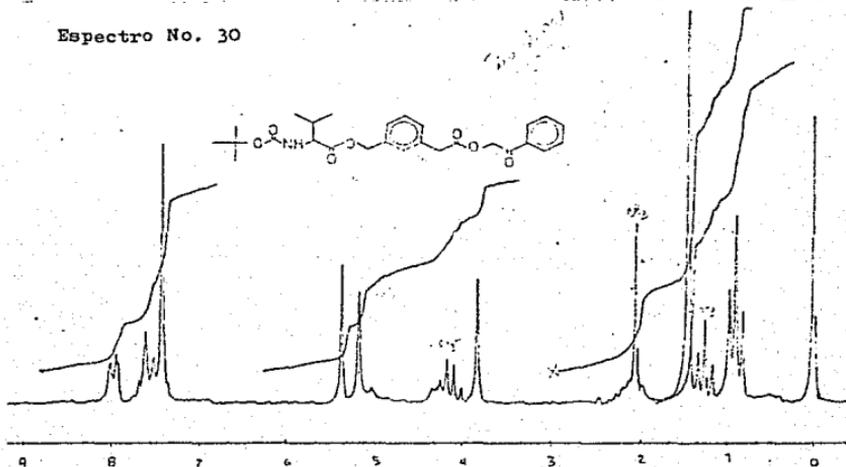


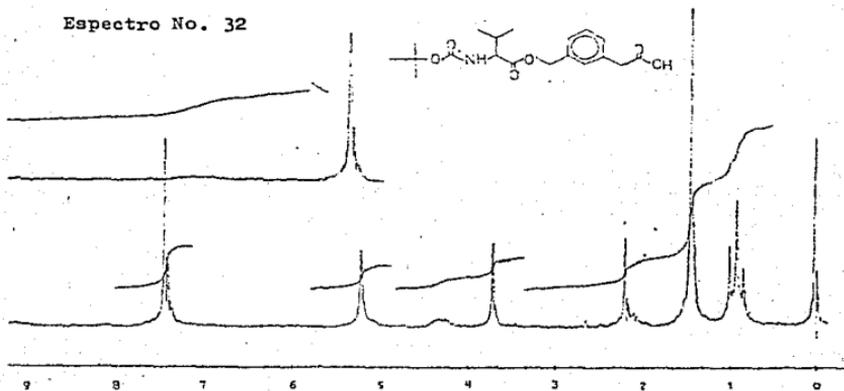
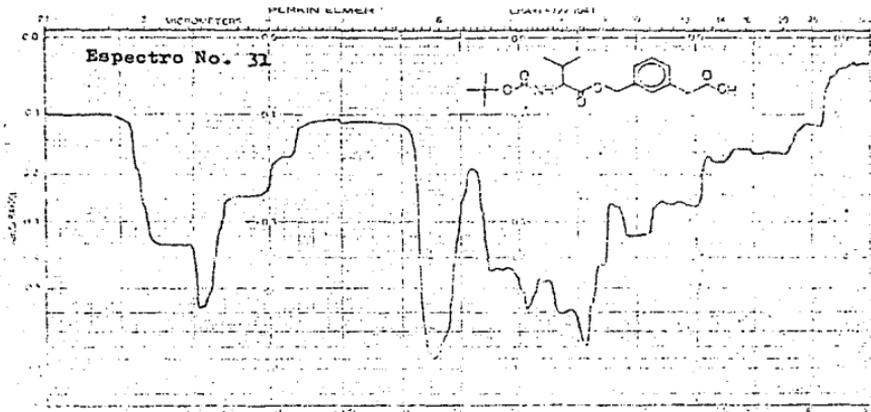
ESTA TESIS  
SALIR DE LA  
NO DEBE  
BIBLIOTECA

- 69 -



Espectro No. 30

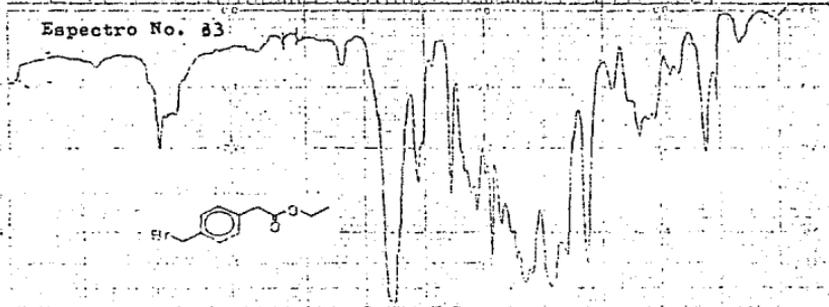




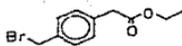
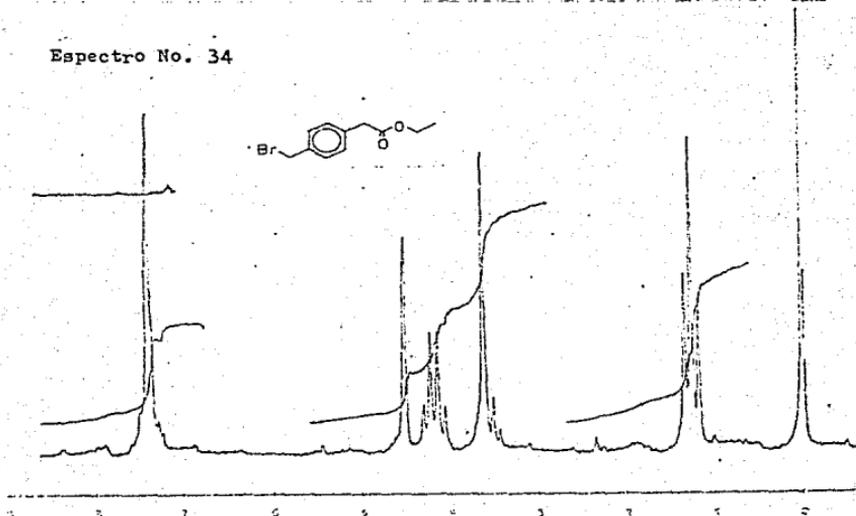
PERKIN ELMER

CHART 100 1001

Espectro No. 33



Espectro No. 34



X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. du Vigneaud V., Ressler C., Suean J. M., Roberts C. W., Kateeyannis G. and Gordon S., J. Amer. Soc. 75, 4879 -- (1953).
2. du Vigneaud V., Ressler C. and Trippet S., J. Biol. Chem. 205, 949 (1953).
3. Erickson B. W. and Merrifield R. B., J. Amer. Chem. Soc. 95, 3750 (1973).
4. Bodanszky M., "Principles of Peptide Synthesis", Springer Verlag, New York, USA 1984.
5. Tam J. P., Tjoeng P. S. and Merrifield R. B., J. Amer. Chem. Soc., 102, 6117 (1980).
6. Gisin B. P., Helv. Chim. Acta., 56, 1476 (1973).
7. Mitchel A. R., Stephen B. H. Kent., Engelhard M. and Merrifield R. B., J. Org. Chem., 43, 2845 (1978).
8. Gress E. and Meienhefer J., The Peptides. Vol. 2, 84 - (1980).
9. Bodanszky M., Klausner Y. S. and Ondetti M. A. "Peptide-Synthesis" 2<sup>nd</sup> Ed., John Wiley & Sons., USA (1976).
10. Hirs C. and Serge N., Solid-Phase Peptide Synthesis in: Methods in Enzymology., Vol. XLVIII, Academic Press New-York, USA., pp 572-616.
11. Adams R., Johnson J. R. and Wilcox C. F., "Laboratory - Experiments in Organic Chemistry" 6<sup>nd</sup> Ed., Collier Macmillan., New York, USA 1972.
12. Pine S. H., Hendrickson J. B., Cram D. J. y Hammond G. S. "Química Orgánica" 4<sup>a</sup> Edic. en inglés 2<sup>a</sup> en español. - Edit. McGraw-Hill México D. F. pp 241-422-423, 1982.

13. Elmore D. T. "Peptides and Proteins" Cambridge University Press. pp 73-102, New York, USA (1969).
14. Erickson B. W. and Merrifield R. B. "The Proteins" Vol. 2 Cap. 3, Meurath H. and Hill R. L., Academic Press , pp -- 257-527., USA (1976).
15. Merrifield R. B., J. Amer. Chem. Soc., 85, 2149 (1963).
16. Feinberg R. S. and Merrifield R. B., Tetrahedron., 30, - 3209 (1974).
17. Mitchel A. R. Erickson B. W., Ryabtsev M. N., Hodges R.- S., and Merrifield R. B., J. Amer. Chem. Soc., 92, 7357-- (1976).
18. Merrifield R. B., Automated Synthesis of Peptides. Science 150, 178-185 (1965).
19. Stewart J. M. and Young J. D., "Solid- Phase Peptide Synthesis", Freeman, San Francisco Cal. USA (1969).
20. Carpino L. A., J. Amer. Chem. Soc., 79, 98 (1957).
21. Merrifield R. B., J. Org. Chem., 29, 3100 (1964).
22. Hagiwara M. I. and Kamira T., Tet. Lett., 4393-4396 (1975).
23. Brenner M., Huber W., Helv. Chim. Acta., 36, 1109 (1953).
24. Wang S.S., Gisin B. P., Winter D. P., Mekefsko R., Kule-- sha I. D., Tsougraki C. and Meienhefer J., J. Org. Chem., 42, 1286 (1977).
25. Mizoguchi T., Shigezane K. and Takamura N., Chem. Pharm.-- Bull., 18, 1465 (1970).
26. Tilak M. A. and Holliden C. S., Tet. Lett. p.1297 (1968b).
27. Bayer E. Breitmaier E. Jung G. and Parr W. Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem. 352, 759 (1971a).
28. Southard G. L., Brooke G. S. and Pettee J. M., Tet. Lett. p 3505 (1969).

29. Wang S. S. and Merrifield R. B., J. Amer. Chem. Soc., 91, 6488 (1969b).
30. Wang S. S. In "Chemistry and Biology of Peptides" (J. -- Meienhofer, ed), pp 179-182, Ann Arbor Sci. Publ., Ann -- Arbor, Michigan USA (1972).
31. Inukei N. Nakano K. and Murakami M., Bull. Chem. Soc. Jap. 41, 182 (1968).
32. Blake J. and Li C. H., Int. J. Protein Res. 3, 135 (1971).
33. Pietta P. G. and Marshall G. R., J. Chem. Soc. D.P. 650, (1970).
34. Wang S. S. and Merrifield R. B., Int. J. Peptide Protein Res., 4, 309 (1972).
35. Tesser G. I. and Ellenbrock B. W. J. (1967) In "Peptides" Beyerman H. C., Van de Linde A. and Van den Brink M. eds pp 124.
36. Flanigan E. and Marshall G. R., In "Progress in Peptide - Research" (S. Lande, ed), pp 7-14, Gordon Breach, New - York, USA (1972).
37. Marshall D. L. and Liener I. E., J. Org. Chem., 35, 867 - (1970).
38. Wingrove A. S. y Caret R. L., "Química Orgánica" 1<sup>a</sup> Edic. Edit. Harla, pp 1089-1095, México D. P. 1984.
39. Mitchel A. R., Kent S. B., Erickson B. W. and Merrifield R. B., Tet. Lett. 3795 (1976).
40. Mitchel A. R., Kent S. B., Engelhard M. and Merrifield R. B., J. Org. Chem., 41, 2845 (1976).
41. Saren V., Kent S. B. and Merrifield R. B., J. Amer. Chem. Soc., 102, 5463 (1980).
42. Riddik J. A. and Bunger W. B., "Physical Properties and - Methods of Purification", USA 1978.

43. Ferrin D. D. and Armarego W. L. T., "Purification of Laboratory Chemicals" 2<sup>nd</sup> Ed. Pergamon Press Ltd. Oxford - England 1980.
44. Tam J. P., Kent S. B. H., Wong T. W. and Merrifield R. B. Syn thesis., 39, 955 (1979).
45. Nakanishi M. and Solomon P. H., "Infrared Absorption -- Spectroscopy" Holden Day, 2<sup>nd</sup> Edition. USA 1977.
46. Pasto D. J. and Johnson C. R. "Organic Structure Determination" 1<sup>st</sup> Edition, Prentice-Hall Inc. pp 109-215, USA , 1969.
47. Johnson E. L. and Stevenson R., "Basic Liquid Chromatography" 1<sup>st</sup> Edition, Edit, Varian USA 1978.
48. Smith I. y Feiberg J. G., "Cromatografia sobre papel y - capa fina. Electroforesis" 1<sup>a</sup> Edición, Edit. Alhambra., Madrid España, 1979.