



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**Síntesis, pH y Reactividad de Pseudopéptidos con Zinc, Acrilonitrilo y
Arsénico**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN QUÍMICA

P R E S E N T A

ELTONH ISLAS TREJO

ASESORES

DRA. ANGELA MARGARITA TLAHUEXTL ROMERO

DR. ANTONIO RAFAEL TAPIA BENAVIDES

MINERAL DE LA REFORMA, HGO.

JUNIO 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Área Académica de Química
Chemistry Department

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:

Por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de Licenciatura en Química **Eltonh Islas Trejo**, quien presenta el trabajo de titulación "**Síntesis, pH y Reactividad de Pseudopéptidos con Zinc, Acrilonitrilo y Arsénico**" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dra. Yolanda Marmolejo Santillán
PRIMER VOCAL: Dra. Ángela Margarita Tlahuextl Romero
SEGUNDO VOCAL: Dr. Antonio Rafael Tapia Benavides
TERCER VOCAL: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
SECRETARIO: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
PRIMER SUPLENTE: Dra. Noemí Andrade López
SEGUNDO SUPLENTE: Dr. Simplicio González Montiel

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 19 de junio de 2017.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Dra. Myriam Meléndez Rodríguez
Coordinadora Adjunta de la Lic. en Química.



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Química

Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
Colonia Carboneras
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts. 2200 y 2201, Fax 6502
aaq_icbi@uaeh.edu.mx



PROMOTORSE



www.uaeh.edu.mx

El trabajo de tesis aquí presentado se realizó en el Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección de la Dra. Ángela Margarita Tlahuextl Romero y del Dr. Antonio Rafael Tapia Benavides.

Esta Tesis fue soportada por:

- La Beca CONACyT [23776]
- El proyecto: "Síntesis y estudio de la actividad citotóxica de arsoranos" fondo SEP-CONACYT: CB-2011/169010
- El proyecto: "Red-PROMEP [2016-2017]"

Parte del trabajo fue presentado en el congreso:

- Síntesis de pseudopéptidos y el estudio de su isomerización por RMN. **Eltonh Islas-Trejo**, Concepción Ávila-Montiel, Margarita Tlahuextl, Antonio R. Tapia-Benavides*, Carlos Galán-Vidal, Hugo Tlahuext, Armando Ariza Castolo. 51º Congreso Mexicano de Química y 35º Congreso Nacional de Educación Química del 28 de septiembre al 01 de octubre de 2016 en la Ciudad de Pachuca, Hidalgo Pag 372-374. Presentación Cartel.

Parte de este trabajo se presentará en el congreso:

- pH influences on the reactivity of Zn amino amide complexes with acrylonitrile. **Eltonh Islas-Trejo**, Rafael Tapia-Benavides, Hugo Tlahuext, Margarita Tlahuextl*. 4th EuCheMS Inorganic Chemistry Conference del 2 de julio al 5 de julio de 2017 en Copenhague, Dinamarca. Presentación Cartel.

DEDICATORIAS

A mis padres
Oscar Islas y Carmen Trejo

A mi cachorro
Leonardo López Islas

A mi viejo
Hilarion Islas Cruz

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ángela Margarita Tlahuextl Romero y al Dr. Antonio Rafael Tapia Benavides por hacerme parte de su equipo de investigación, así como por los conocimientos, comentarios y consejos aportados a este trabajo de tesis.

Al comité evaluador por las observaciones y aportaciones a este trabajo.

A mis padres Oscar Islas y Carmen Trejo por el apoyo y confianza que han tenido hacia mí. Por el esfuerzo y sacrificio que han hecho, gracias.

A mis hermanos Tannia, Daniela y Alan, por el cariño y respaldo que encuentro en ustedes. Gracias.

A la familia Villareal Mejía por el apoyo que me han dado. Así como a mis abuelos José y Bernardina.

A mi abuelo Hilarion Islas Cruz, por el apoyo, lecciones y cariño. Por el buen ejemplo y por ayudarme a ser quien soy. Donde quiera que estés, te doy las gracias.

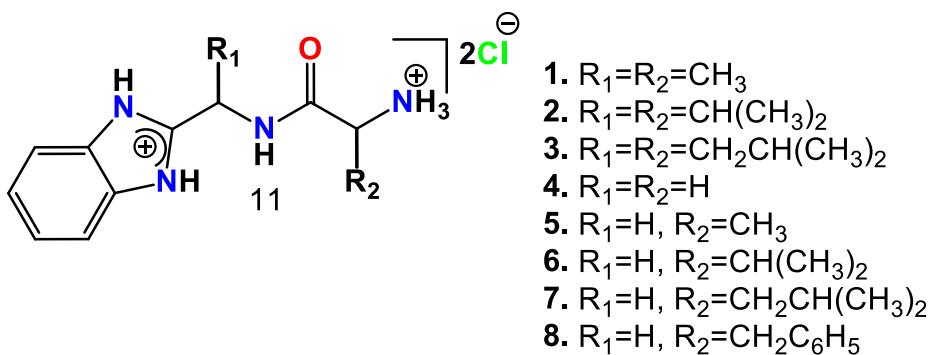
A mis compañeros de la licenciatura y personas que han formado parte de mi formación profesional, en especial a mis compañeros de laboratorio, Conchita, Ricardo y Patricio.

Resumen

Las biomoléculas que tienen a los bencimidazoles y aminoácidos como parte de su estructura han sido empleadas en el sector salud. Los derivados de aminoácidos e imidazol tienen relevancia en la maquinaria celular, porque pueden interaccionar con iones metálicos de Cu, Zn, As, Ni, Pd, etc.^{1,2} Por otra parte, el pH y la presencia de iones metálicos son variables que afectan el comportamiento químico de estos compuestos y que puede promover o restringir su reactividad molecular.³ Un ejemplo típico de biomoléculas son las proteínas. Estos polímeros contienen residuos de aminoácidos con grupos amina, imidazol y amida que son necesarios para que ocurran los procesos biológicos.⁴ Por ello, en esta tesis se presenta la síntesis de tres pseudopéptidos, el estudio de la reactividad del pseudopéptido derivado de alanina hacia el Zn(II), acrilonitrilo y compuestos de arsénico. Además, se estimaron las constantes de acidez del pseudopéptido derivado de alanina en ausencia y presencia del ión zinc.

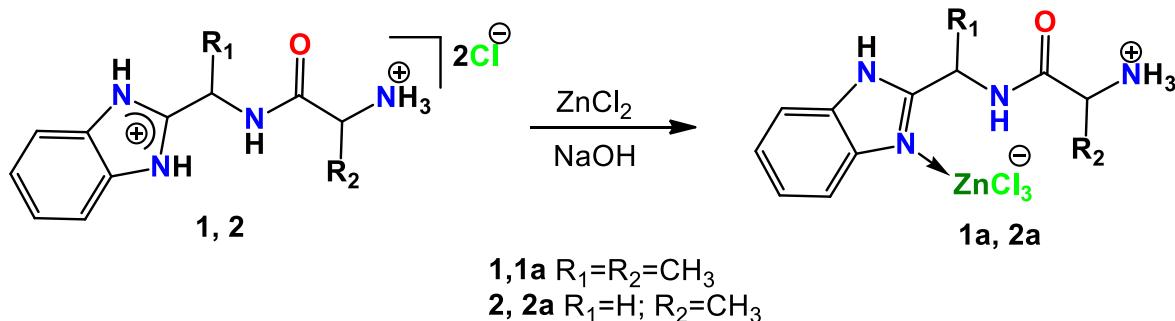
En este contexto, la presente tesis consta de tres capítulos y la numeración es independiente en cada capítulo:

En el capítulo I se describe la síntesis y caracterización por RMN de ¹H y ¹³C de los pseudopéptidos **1-3** derivados de bencimidazol y α -aminoácidos. También, se determinó la resonancia magnética nuclear de ¹⁵N de los compuestos **1-8** que fueron previamente obtenidos a diferentes valores de pH (7.0, 8.0 y 9.0). Los datos de ¹⁵N contribuyeron a determinar si estos compuestos sufren procesos de la isomerización de la amida o la epimerización de centros estereogénicos. El estudio de la estructura molecular se complementó con la determinación de la energía electrónica de los isómeros *Z* y *E* del compuesto 1. Asimismo, en este capítulo se describe el estudio cristalográfico de la especie monoprotonada del compuesto **1** y la estimación de su constante de acidez.



Estructura de los compuestos **1-8**.

En el capítulo II se describe la síntesis y estudio estructural de los complejos **1a** y **2a** por medio de la RMN a diferentes valores de pH. Se presenta el análisis por difracción de rayos-X de **1a** y el cálculo de las constantes de acidez de los compuestos **1** y **2** en presencia del ion Zn(II). Además, se estudia la reactividad del compuesto **1** hacia el acrilonitrilo a diferentes valores de pH y el efecto que ejerce el Zn(II) en las reacciones de aza-adición tipo Michael.



Síntesis de los compuestos **1a-2a**.

En el capítulo III se muestra el estudio de la reactividad del compuesto **1** hacia diferentes reactivos de arsénico (AsCl₃ y ácido fenilarsónico). También, se describe la importancia del pH en la determinación de las estructuras moleculares.

Referencias

- 1.- Kunal, K.; Divya, A.; Seung-Yub, L.; Jason, E. C.; Susan, E. K.; Richard, A. S.; Iwao, O.; Bioorg. Med. Chem. 2013, 21, 3318–3326.
- 2.- Chen, Z.; Zhang, J.; Zeng, P.; Zhang, S.; Jin, C. Z. Anorg. Allg. Chem. 2014, 640, 1506-1513.
- 3.- Falcón, L. M. P.; Tesis de doctorado; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; Pachuca de Soto, 2014.
- 4.- Lanigan, R. M.; Sheppard, T. D.; Eur. J. Org. Chem. 2013, 2013, 7453-7465.

Lista de Abreviaturas.

| | |
|--|---|
| 2-AMBZ | 2-(aminometil) bencimidazol |
| RMN de ^1H | Resonancia Magnética Nuclear de ^1H |
| RMN de ^{13}C | Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C |
| RMN de ^{15}N | Resonancia Magnética Nuclear de ^{15}N |
| COSY | Correlation Spectroscopy (del Inglés) |
| HETCOR | Heteronuclear Correlated Spectroscopy (del Inglés) |
| HSQC | Heteronuclear Simple Quantum Correlation (del Inglés) |
| δ | Desplazamiento químico |
| $\Delta\delta$ | Variación de desplazamiento químico |
| ppm | Partes por millón |
| M | Molaridad |
| pKa | -log Ka |
| pH | -log $[\text{H}_3\text{O}^+]$ |
| D₂O | Óxido de deuterio |
| DMSO-d6 | Dimetilsulfoxido deuterado |
| MeOD | Metanol deuterado |
| \AA | Angstrom (1×10^{-8} cm) |
| ° | Grados |
| Z | zusammen: del mismo lado (del alemán) |
| E | eingegen: lado opuesto (del alemán) |
| R_d^a(n) | Patrón del enlace de hidrógeno |
| a | Número de aceptores de hidrógeno |
| d | Número de donadores de hidrógeno |
| R | Ring: anillo (del inglés) |
| S | Patrón de enlace de hidrógeno intra-molecular |
| US | Ultrasonido |

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I: SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE PSEUDOPÉPTIDOS DERIVADOS DE α-AMINOÁCIDOS | 1 |
| 1.1 Introducción | 2 |
| 1.2 Antecedentes | 4 |
| 1.2.1 Síntesis de amidas | 4 |
| 1.2.2 Síntesis de bencimidazolamidas | 6 |
| 1.2.3 Estructura y comportamiento dinámico de amidas | 8 |
| 1.2.3.1 Estereoisomería <i>E/Z</i> en amidas | 8 |
| 1.2.3.2 Impedimento estérico | 9 |
| 1.2.3.3 Efectos electrónicos | 10 |
| 1.2.3.4 Efectos ácido-base | 11 |
| 1.2.3.5 Determinación de constantes de acidez de grupos amina, bencimidazol y amida | 13 |
| 1.2.3.6 Estudios estructurales de sales bencimidazolamidas | 17 |
| 1.3 Objetivos | 20 |
| 1.3.1 Objetivo General | 20 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos | 20 |
| 1.4 Resultados y Discusión | 20 |
| 1.4.1 Síntesis de pseudopéptidos derivadas α -aminoácidos | 20 |
| 1.4.2 Estudio estructural de los pseudopéptidos 1-3. | 22 |
| 1.4.2.1 RMN de ^1H de los pseudopéptidos 1-3 | 22 |
| 1.4.2.2 RMN de ^{13}C de pseudopéptidos 1-3 | 24 |
| 1.4.3 Estudio estructural de los pseudopéptidos 1-8 por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{15}N en DMSO-d6 | 25 |
| 1.4.3.1 RMN de ^1H y ^{13}C de pseudopéptidos 6, 7 | 25 |
| 1.4.3.2 RMN de ^1H y ^{13}C de los pseudopéptidos de 1-8 a pH diferente | 26 |
| 1.4.3.3 Estudio por RMN de ^1H y ^{13}C del efecto de la temperatura en los pseudopéptidos 1, 2 y 4 | 33 |
| 1.4.3.4 RMN de ^{15}N de los pseudopéptidos de 1-8 a diferente pH y | 35 |

| | |
|---|-----------|
| temperatura | |
| 1.4.4 Estimación de las constantes de acidez del pseudopéptido 1 | 37 |
| 1.4.5 Análisis cristalográfico la especie monoprotonada de 1 | 44 |
| 1.5 Conclusiones | 49 |
| 1.6 Desarrollo experimental | 50 |
| 1.7 Referencias | 52 |
| CAPÍTULO II: INFLUENCIA DEL ZINC Y DEL pH EN LA FORMACIÓN DEL ADUCTO DERIVADO DE PSEUDOPÉPTIDO Y ACRILONITRILo | 55 |
| 2.1 Introducción | 56 |
| 2.2 Antecedentes | 57 |
| 2.2.1 Complejos metálicos derivados de bencimidazoles | 57 |
| 2.2.2 Complejos de Cu(II) y Zn(II) derivadas de bencimidazolil aminoamidas | 58 |
| 2.2.3 Reacciones de adición aza-Michael | 61 |
| 2.2.3.1 Reactividad de aminas hacia acrilonitrilo | 61 |
| 2.2.3.2 Reactividad de bencimidazol hacia acrilonitrilo | 62 |
| 2.3 Objetivos | 67 |
| 2.3.1 Objetivo General | 67 |
| 2.3.2 Objetivos Específicos | 67 |
| 2.4 Discusión de Resultados | 67 |
| 2.4.1 Estudio de la Síntesis de los complejos de Zn derivados de alanina a pH = 4 y pH = 5.5 | 69 |
| 2.4.2 Estudio por RMN de ¹³ C de los complejos de Zn derivados de alanina a pH = 4 y pH = 5.5 | 70 |
| 2.4.3 Estudio del Efecto del Zn(II) en la constante de acidez de los pseudo-péptidos | 72 |
| 2.4.4 Análisis estructural del complejo de zinc 1a y del tetraclorozincato 1e por difracción de rayos-X | 77 |
| 2.4.4.1 Análisis estructural del compuesto 1a por difracción de rayos- X | 77 |
| 2.4.4.2 Análisis estructural del compuesto 1e por difracción de rayos- X | 79 |

| | |
|--|-----|
| 2.4.5 Influencia del pH y del zinc en la adición 1,4 del pseudopéptido en el acrilonitrilo | 81 |
| 2.4.5.1 Formación del aducto del pseudopéptido derivado de la alanina | 81 |
| 2.4.5.2 Análisis Estructural por RMN de ^1H del aducto 1P | 84 |
| 2.4.5.3 Análisis Estructural por RMN de ^{13}C del aducto 1P | 86 |
| 2.5 Conclusión | 88 |
| 2.6 Referencias | 89 |
| CAPÍTULO III: REACTIVIDAD DEL PSEUDOPÉPTIDO DERIVADO DE ALANINA FRENTE AL ARSÉNICO | 91 |
| 3.1 Introducción | 92 |
| 3.2 Antecedentes | 93 |
| 3.2.1 El Arsénico en la industria | 93 |
| 3.2.2 Arsénico en la medicina | 94 |
| 3.2.3 Arsénico y carbohidratos | 96 |
| 3.2.4 El átomo de nitrógeno en los compuestos de arsénico | 97 |
| 3.3 Objetivos | 100 |
| 3.3.1 Objetivo General | 100 |
| 3.3.2 Objetivos Específicos | 100 |
| 3.4 Discusión de Resultados | 100 |
| 3.4.1 Reactividad del compuesto 1 con AsCl_3 . | 100 |
| 3.4.2 Reactividad del compuesto 1 con el ácido fenilarsónico | 103 |
| 3.5 Conclusión | 106 |
| 3.6 Referencias | 107 |
| ANEXOS | 109 |

CAPÍTULO I: SÍNTESIS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE PSEUDOPÉPTIDOS DERIVADOS DE α -AMINOÁCIDOS

1. 1 Introducción

El anillo bencimidazólico se encuentra presente en diversos compuestos con propiedades antibacterianas¹, antidepresivas² y desparasitantes³. Un ejemplo es el compuesto **9** derivado de bencimidazol y α -aminoácidos, el cual presenta actividad antibacteriana o fungicida (Figura 1).⁴ Este tipo de compuestos se han utilizado en la síntesis orgánica como inductores asimétricos en la síntesis de alcoholes quirales.^{5,6} Asimismo, el compuesto **10** ha sido utilizado para catalizar reacciones de hidrogenación de transferencia asimétrica.⁵ Así, las aminoamidas con una estructura molecular semejante a los compuestos **9** y **10** son sustancias químicamente interesantes, porque contienen centros reactivos distintos (tres átomos de nitrógeno y un átomo oxígeno) los cuales le confieren versatilidad como ligantes polidentados o en los fenómenos ácido-base.^{4,5}

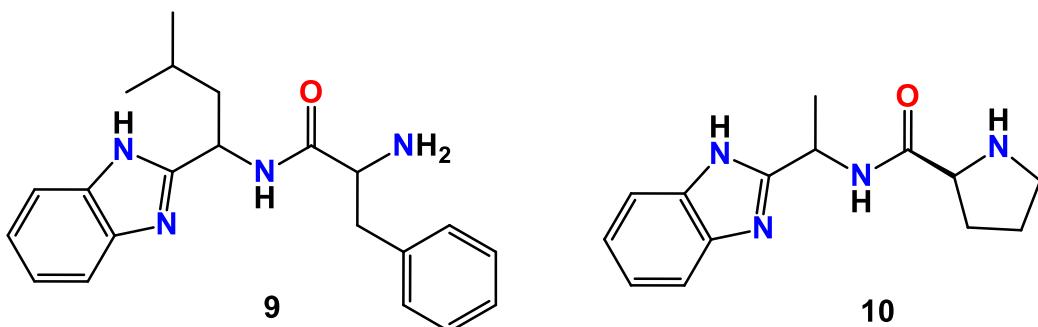


Figura 1

En el presente capítulo se describe la síntesis de las amidas **1-3** y el estudio por resonancia magnética nuclear en DMSO-d6 de los pseudopéptidos **1-8** a tres pH distintos (7, 8 y 9) [Figura 2]. Se estimó la constante de acidez del compuesto **1** en medio acuoso y con la ayuda de cálculos teóricos se establecieron los factores estructurales y energéticos por los cuales uno de los isómeros del grupo amida (*Z* o *E*) es más estable.

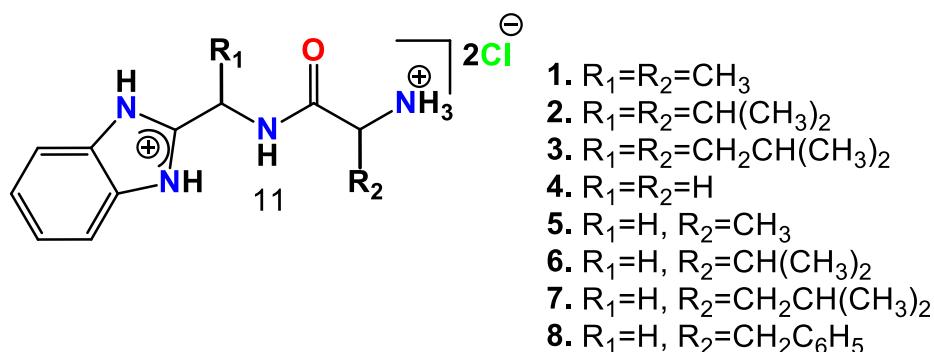


Figura 2

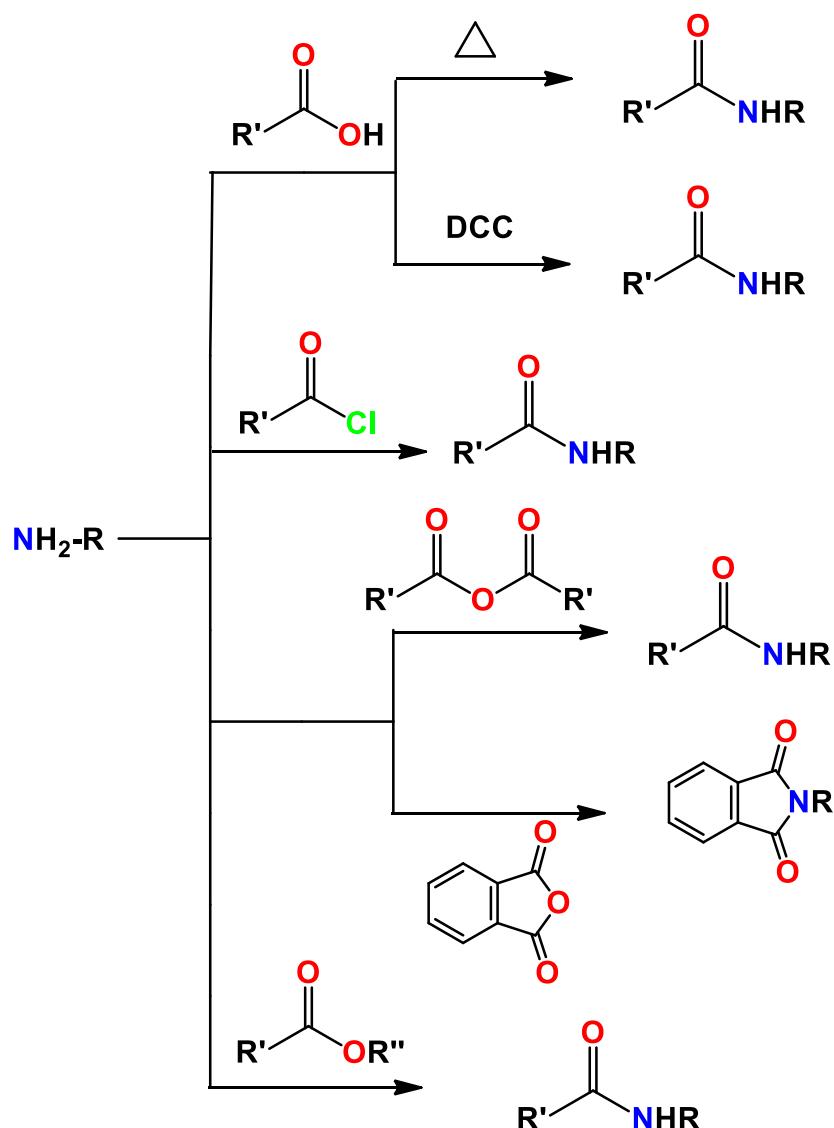
Una técnica de gran utilidad en el análisis estructural de compuestos nitrogenados es la resonancia magnética nuclear de ^{15}N , porque permite obtener información de

la geometría de los átomos de nitrógeno³⁴ y de los cambios en la densidad electrónica sobre este átomo.³⁵ De esta manera se pueden distinguir los diferentes átomos de nitrógeno presentes en distintos grupos funcionales (amida, amina, amonio, imina, etc.)³⁵⁻³⁶ Por lo tanto, esta técnica es un excelente complemento para estudiar a los pseudopéptidos que se sintetizaron en el presente trabajo.

1.2 Antecedentes

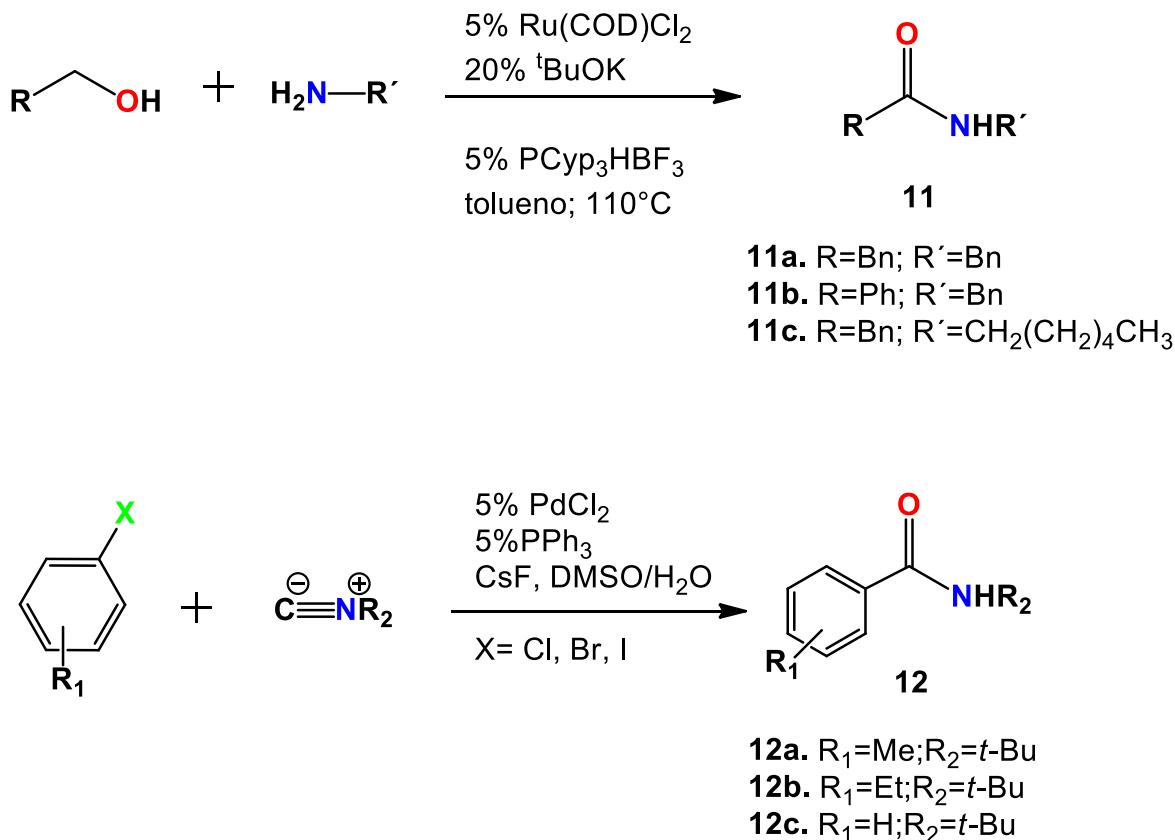
1.2.1 Síntesis de amidas

En la literatura se han reportado métodos diversos para la síntesis de amidas. En el esquema 1.1 se muestra la condensación de una amina con el ácido carboxílico o sus derivados (los haluros de acilo, anhídridos y ésteres).⁷⁻¹⁰ En algunas reacciones es necesario activar el ácido carboxílico mediante el uso de agentes de acoplamiento [como la diciclohexilcarbodiimida (DCC)] que favorecen la deshidratación y el ataque nucléofílico de la amina y por lo tanto la formación de la amida correspondiente.¹¹



Esquema 1.1. Reacciones para la obtención de amidas a partir de aminas.

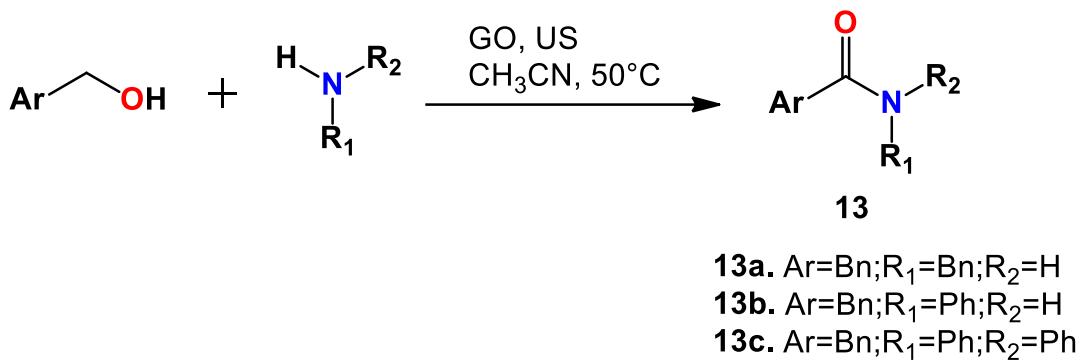
Otros métodos de síntesis de amidas (**11** y **12**), involucran la reacción de alcoholes con aminas primarias o haluros de arilo con isocianato en presencia de catalizadores de rutenio y paladio respectivamente (Esquema 1.2).¹²⁻¹³



Esquema 1.2. Síntesis de amidas a partir de alcoholes y haluros de arilo.

Por otra parte, las microondas o el ultrasonido son métodos alternativos para mejorar el rendimiento y selectividad en la obtención de amidas. Una ventaja adicional del uso de las microondas consiste en que estas reacciones se pueden efectuar en ausencia de disolvente y en menor tiempo. Otra de las ventajas de utilizar métodos alternativos de inducción energética se refiere a que tanto con microondas como con ultrasonido se pueden emplear catalizadores.¹⁴⁻¹⁵

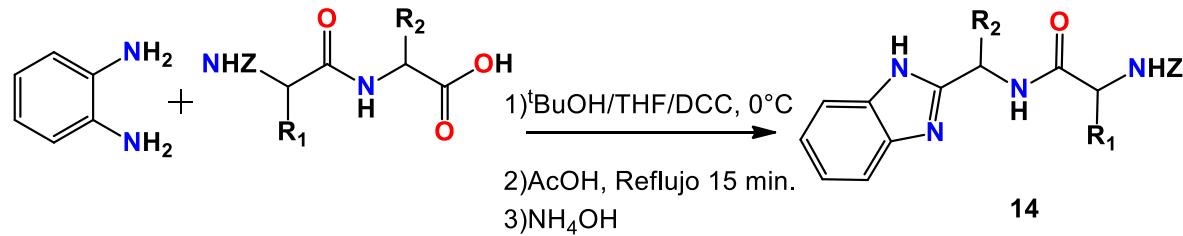
Las reacciones de condensación en las cuales se han utilizado a las microondas comprenden el empleo de imidazol, ácido polifosfórico, ácido *p*-toluensulfónico y silicagel como catalizadores.¹⁴ Mientras tanto, Maryam *et al* han reportado la síntesis de las amidas **13** a partir de alcoholes bencílicos y aminas secundarias, en presencia de óxido de grafito (OG) como catalizador y ultrasonido (US) como fuente energética (Esquema 1.3).¹⁵



Esquema 1.3. Síntesis para la obtención de amidas mediante el uso de ultrasonido.

1.2.2 Síntesis de bencimidazoilamidas.

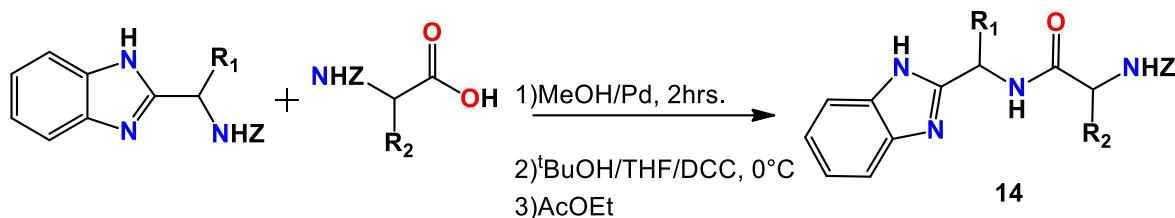
Las bencimidazoilamidas (o aminoamidas) se han sintetizado por diferentes métodos. Algunos de ellos conllevan el uso de procesos en donde se deben de utilizar métodos de *N*-protección. Así, Maekawa y Ohtani reportaron la preparación de amidas *N*-protegidas **14**.⁴ Para la síntesis de las amidas se utilizaron dos rutas diferentes. Uno es el método de ciclización, donde el péptido *N*-protegido se hace reaccionar con la *o*-fenilendiamina. (Esquema 1.4)



Z= Acetilo (Ac); Carbobenciloxy (Cbz); Benzoilo
 R₁,R₂=H;CH₃;CH(CH₃)₂;CH₂C₆H₅;CH₂CH(CH₃)₂

Esquema 1.4. Método de ciclización.

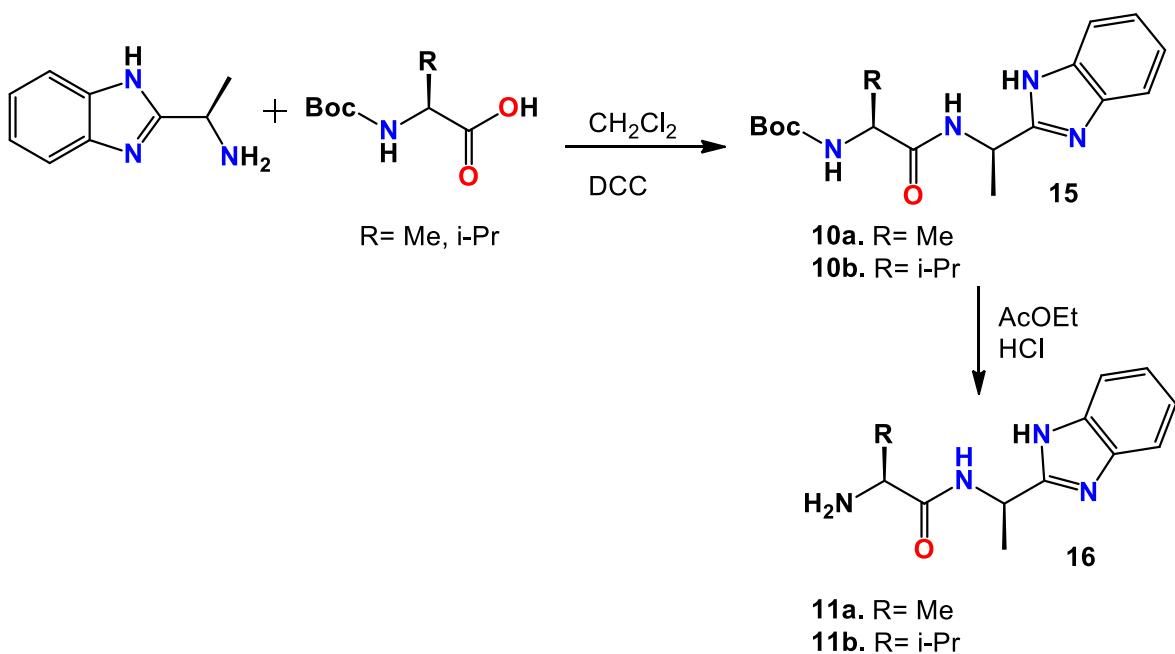
Otro método utilizado se denomina “de elongación” en donde el aminoácido protegido se hace reaccionar con el bencimidazol correspondiente (Esquema 1.5)



$\text{Z} = \text{Acetilo (Ac); Carbobencíloxi (Cbz); Benzoílo}$
 $\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{H;CH}_3; \text{CH}(\text{CH}_3)_2; \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5; \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Esquema 1.5. Método de elongación.

Por otra parte, Li *et al* obtuvieron amidas con dos centros de quiralidad a partir de la condensación de (R)-1-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etilamina con los aminoácidos (*L*-alanina, *L*-valina, *L*-prolina) protegidos con *tert*-butoxicarbonilo (Boc) y utilizando 1,3-diciclohexil-carboímidia (DCC) como agente de acoplamiento. Seguido de la desprotección en medio ácido (Esquema 1.6).⁵

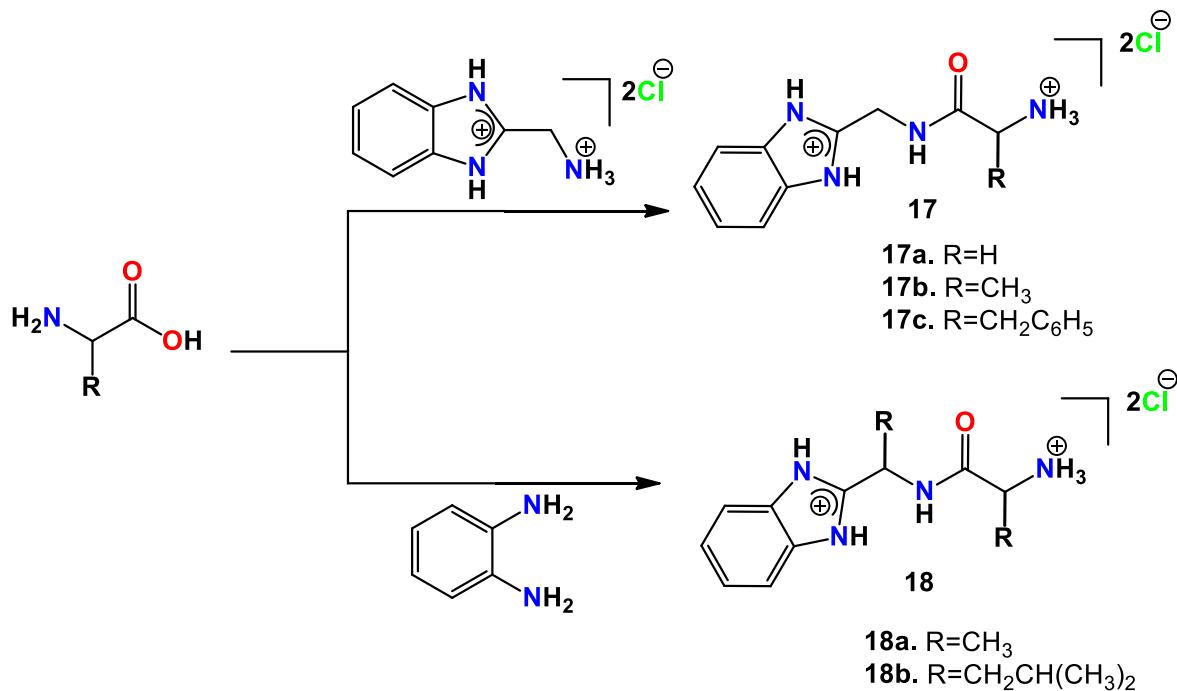


Esquema 1.6. Síntesis de amidas a partir del (R)-1-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etilamina y α -aminoácidos.

Cabe señalar que en los métodos de síntesis antes mencionados los procesos de purificación son muy largos.

Por otro lado, Falcón-León, Ávila-Montiel y Lechuga reportaron un método eficiente y sencillo para la síntesis de los clorhidratos aminoamidas de uno y dos centros de

quiralidad (**17** y **18**).^{6,16-17} Los compuestos fueron obtenidos mediante la reacción de 2.5 equivalentes de aminoácido con un equivalente de 2-AMBZ u *o*-fenilendiamina respectivamente en presencia de HCl como agente de condensación (Esquema 1.7).



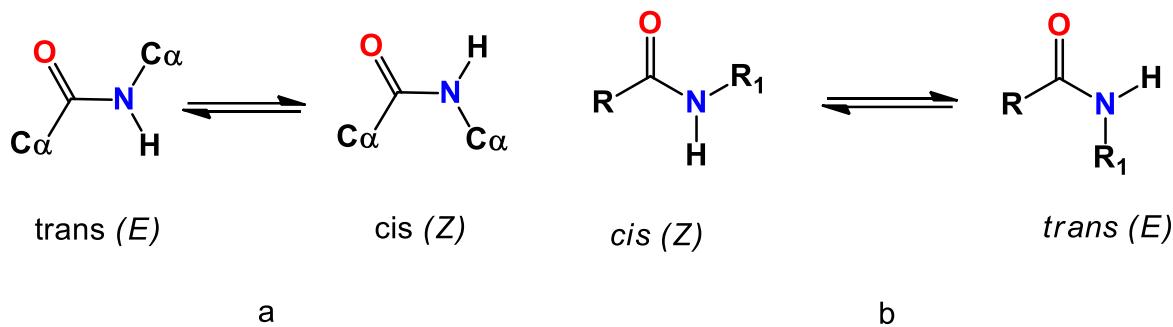
Esquema 1.7. Síntesis de clorhidratos de aminoamidas.

1.2.3 Estructura y comportamiento dinámico de amidas

1.2.3.1 Estereoquímica *E/Z* en amidas

Las amidas representan un modelo sencillo de los enlaces peptídicos. Se sabe que el proceso de isomerización *E/Z* en los enlaces peptídicos es de gran importancia en el plegamiento de proteínas y en procesos biocatalíticos. De tal manera, que en los péptidos la conformación *E* es la más favorecida porque hay menos impedimento estérico entre las cadenas laterales de los residuos de aminoácido.²⁴ Los descriptores *E/Z* en proteínas hacen referencia a la disposición espacial de las cadenas laterales ($C\alpha$) de los aminoácidos y no siguen las reglas de Cahn, Ingold y Prelog (Esquema 1.8 a).²⁴ Por otra parte, la asimetría del nitrógeno amídico en las amidas secundarias y terciarias hace que surja la posibilidad de formar dos isómeros [*trans* (*E*) y *cis* (*Z*)] considerando la disposición espacial entre el oxígeno y el grupo *N*-sustituyente (R_1) de mayor prioridad, según lo establecen

las reglas de Cahn, Ingold y Prelog (Esquema 1.8 b).¹⁸⁻¹⁹ En este trabajo de tesis se seguirán las reglas de Cahn, Ingold y Prelog para usar los descriptores *E/Z*.



Esquema 1.8. Isómeros del grupo amida a) en proteínas; b) amidas secundarias.

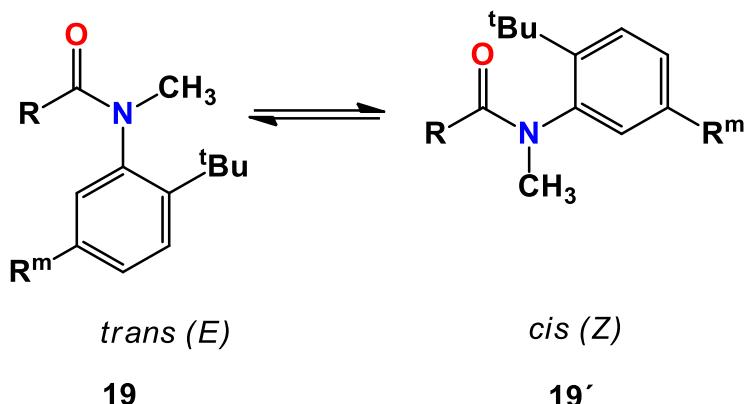
La preferencia isomérica de las amidas ha causado controversia y aún no están bien establecidas las causas que determinan el predominio de un isómero sobre otro.²⁰ Sin embargo, se ha reportado que el impedimento estérico²¹, efectos electrónicos²² y el pH²³, son factores que influyen en la formación de los isómeros *Z* o *E*.

1.2.3.2 Impedimento estérico.

La isomerización de amidas terciarias ha sido ampliamente investigada y solo se han reportado algunos estudios cinéticos sobre la isomerización de amidas en dipéptidos (amidas secundarias). Por lo cual, aquí se mencionarán algunos aspectos que intervienen en los procesos de isomerización de amidas terciarias.

Se sabe que en las *N*-metilacetanilidas el isómero *E* es el más favorecido.²⁵⁻²⁶ Esto se debe a que en el isómero *Z* existe repulsión electrón-electrón entre el par de electrones libres del oxígeno (grupo carbonilo) y el sistema π del anillo aromático.

En este contexto, Curran *et al* reportaron la isomerización de *o*-tertbutil-acetanilidas por RMN de ^1H (Esquema 1.9 y Tabla 1.1).²¹ En los espectros se observan dos señales para el grupo *N*-metílico. Dichos autores asignaron la señal que aparece a frecuencia alta al grupo *N*-metílico del isómero *Z* y la que se encuentra a frecuencia baja al isómero *E*.²⁷ Así, ellos concluyeron que el isómero *E* es el mayoritario, debido a que en el isómero *Z* el grupo *tert*-butilo sufre impedimento estérico causado por los pares de electrones libres del átomo de oxígeno.



Esquema 1.9. Isomerización del grupo amida en *o*-tertbutil acetanilidas.

Tabla 1.1. Relación de isómeros de los compuestos **19a-19e**.

| Molécula | R | R ^m | CDCl ₃ (<i>E/Z</i>) |
|------------|--------------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| 19a | CH ₂ =CH | H | 60/1 |
| 19b | Me | <i>t</i> -Bu | 37/1 |
| 19c | Me | H | 22/1 |
| 19d | Ph | H | 2.2/1 |
| 19e | CH ₂ =C(CH ₃) | H | 1.5/1 |

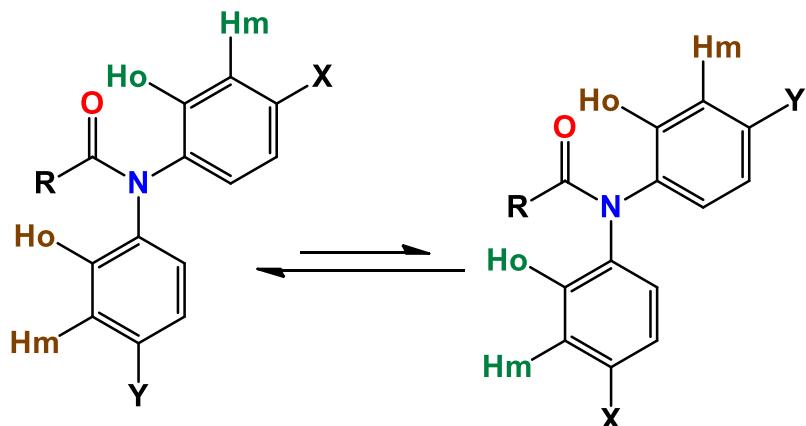
1.2.3.3 Efectos electrónicos

Yamasaki *et al* en 2003 estudiaron por RMN y difracción de rayos-X a las *N,N*-diarilamidas.²⁸ Ellos encontraron que el efecto electrónico influye en la isomería *E/Z* de dichas amidas.

El espectro de RMN de ¹H mostró cuatro señales para hidrógenos *ortho* y cuatro para hidrógenos *meta* lo cual indica la presencia de los dos isómeros. El isómero mayoritario es en donde el anillo más electrodeficiente se encuentra en posición *cis* al grupo carbonilo porque hay un efecto de estabilización de la amida cuando el átomo de oxígeno se encuentra *cis* a grupos electrodeficientes (Esquema 1.10).

Esto se debe a que el grupo -NO₂ pueden aceptar un par de electrones del anillo de benceno por efecto de resonancia dejando al anillo aromático electrodeficiente. En contraste, los grupos -OCH₃ y N(CH₃)₂ tienen electrones libres que pueden entrar en resonancia con el anillo aromático y aumentar su densidad electrónica. Por lo tanto, habrá repulsión electrónica del anillo aromático con el átomo de oxígeno.

Las estructuras obtenidas por difracción de rayos-X mostraron la presencia de los dos isómeros y corroboraron que el isómero *E* es el mayoritario.



20a. $R=CH_3$; $X=NO_2$; $Y=OCH_3$

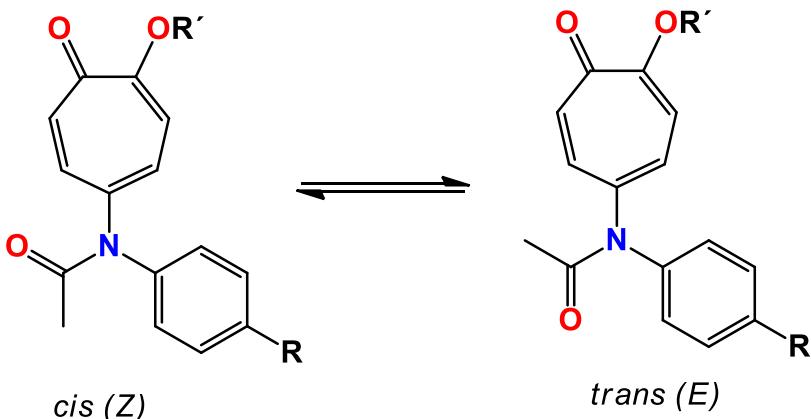
20b. $R=CH_3$; $X=H$; $Y=N(CH_3)_2$

20c. $R=Ph$; $X=NO_2$; $Y=OCH_3$

Esquema 1.10. Proceso de isomerización del grupo amida en los compuestos **20a-20c**.

1.2.3.4 Efectos ácido-base

En 2016 Ai Ito et al reportaron la síntesis de *N*-aril-*N*-troponilamidas y el cambio de la isomería de estos compuestos inducido por el ambiente ácido-base (Esquema 1.11).²³ Los espectros de RMN de 1H de los compuestos **21-25** mostró señales para cada tipo de hidrógenos de $-OCH_3$, $-C_6H_4-CH_3$ y $-COCH_3$ a temperatura de 303 K (29.85°C). Pero, al disminuir la temperatura hasta 283-273 K (11.85 a -0.15 °C) las señales coalescieron hasta observarse sólo dos tipos de hidrógenos que correspondieron a los isómeros *E* y *Z*. El isómero *Z* se favorece debido a la mayor densidad electrónica presente en cada anillo aromático.



21. R=OCH₃; R'=CH₃
 22. R=H; R'=CH₃
 23. R=CH₃; R'=H
 24. R=OCH₃; R'=H
 25. R=H; R'=H
 23a. R=CH₃; R'=Na
 24a. R=OCH₃; R'=Na
 25a R=H; R'=Na

Esquema 1.11. Estructura de los compuestos 21-25 y 23a-25a.

Esta preferencia estructural se puede explicar considerando que el grupo troponil puede presentar las mismas características que la tropolona, la cual puede estar en su forma catiónica o aniónica. Esto se debe a que el pKa de esta sustancia es de 6.92 y fácilmente puede pasar a la especie ácida o básica en función el pH del medio (Figura 1.1).²⁹

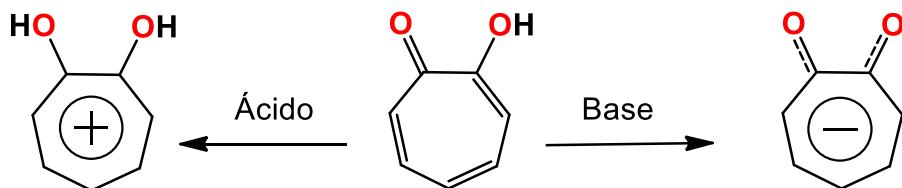
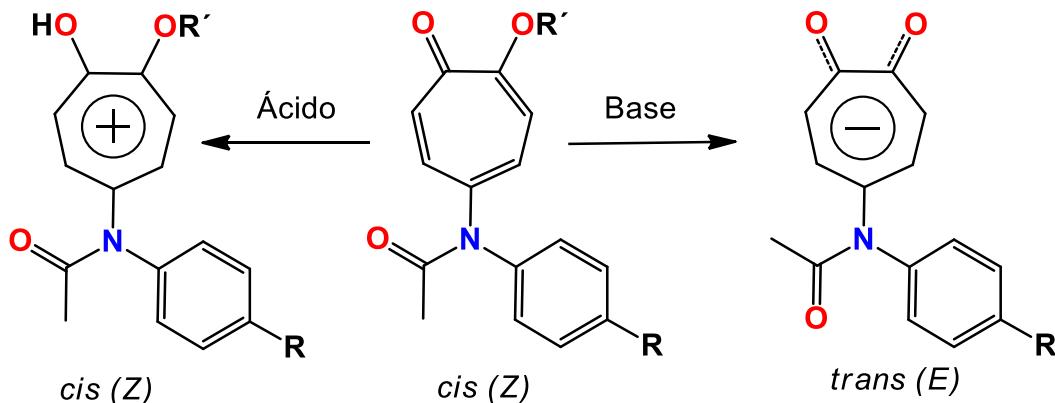


Figura 1.1. Especies ácida, neutra y básica de la tropolona.

Para demostrar que las *N*-aril-*N*-troponilamidas pueden estar en su forma catiónica o aniónica, se colocaron en ácido trifluoroacético (TFA) o el complejo de éter dietílico de ácido tetraflúorobórico (HBF₄•Et₂O) a los compuestos 21-25. Mientras que para evaluar las condiciones en las cuales pueden obtener las especies básicas, se les agregó etóxido de sodio a las amidas 23-25. Ellos

observaron por RMN de ^1H que la conformación *Z* de **21-23** continuaba siendo el isómero mayoritario en condiciones ácidas. Lo cual confirmó que el anillo troponil se encuentra electrodeficiente en estas condiciones. Por el contrario, en medios básicos se favoreció al isómero *E*, (Esquema 1.12 y Tabla 1.2).



Esquema 1.12. Proceso de isomerización del grupo amida por efectos ácido-base.

Tabla 1.2. Condiciones ácido-base de los compuestos **21-25** y resultados obtenidos por RMN de ^1H .

| Amida | R | R1 | Aditivo | Disolvente | Isómero | T (K) |
|------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------|-------|
| 21 | OCH ₃ | CH ₃ | HBF ₃ •Et ₂ O | CD ₂ Cl ₂ | <i>Z</i> (86%) | 233 |
| 22 | H | CH ₃ | HBF ₃ •Et ₂ O | CD ₂ Cl ₂ | <i>Z</i> (77%) | 213 |
| 23 | CH ₃ | H | TFA-d | CD ₂ Cl ₂ | <i>Z</i> | - |
| 23a | CH ₃ | Na | - | DMF-d ₇ | <i>E</i> (73%) | 233 |
| 24 | OCH ₃ | H | TFA-d | CD ₂ Cl ₂ | <i>Z</i> | - |
| 24a | OCH ₃ | Na | - | DMF-d ₇ | <i>E</i> (71%) | 243 |
| 25 | H | H | TFA-d | CD ₂ Cl ₂ | <i>Z</i> | - |
| 25a | H | Na | - | DMF-d ₇ | <i>E</i> (78%) | 243 |

Considerando que los ambientes ácido-base son importantes en los procesos de isomerización de amidas, es necesario conocer algunos métodos para determinar las constantes de acidez.

1.2.3.5 Determinación de constantes de acidez de grupos amina, bencimidazol y amida

Bezençon *et al* usaron la RMN de ^1H para obtener las constantes de acidez de compuestos orgánicos derivados de anilina, ácido barbitúrico y pirazolona, cuyas estructuras contienen grupos ionizables (Figura 1.2).³⁰ Los cambios del

desplazamiento químico de los protones adyacentes a los átomos de nitrógeno con cada variación del pH fueron graficados y el pKa se obtuvo del punto de inflexión. Para el compuesto **26** se consideraron los datos de los hidrógenos aromáticos, metíleno y metilo. En cambio, para **27** se usaron los protones metilénicos y para **28** se emplearon los del grupo metilo.

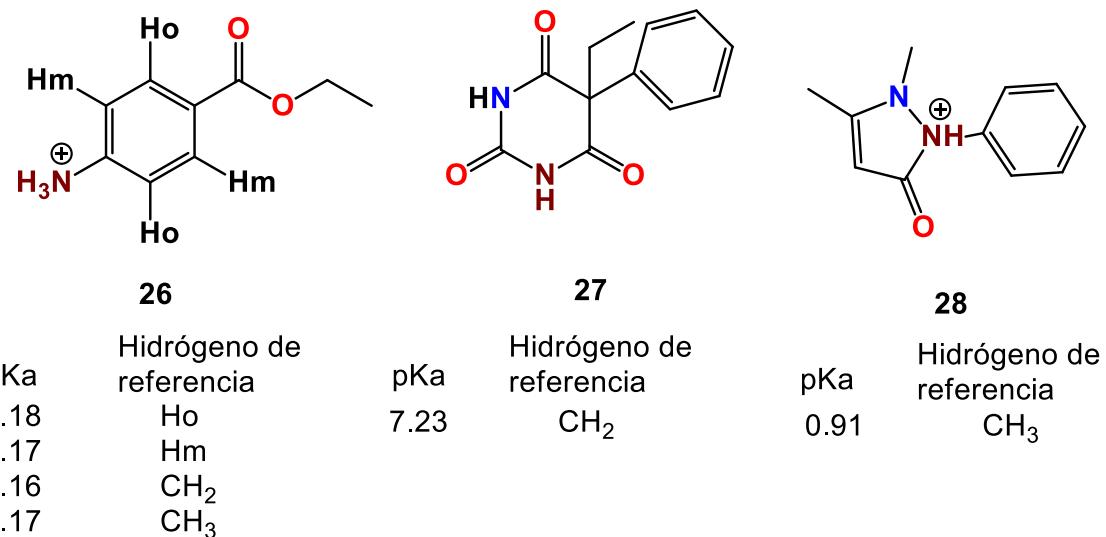
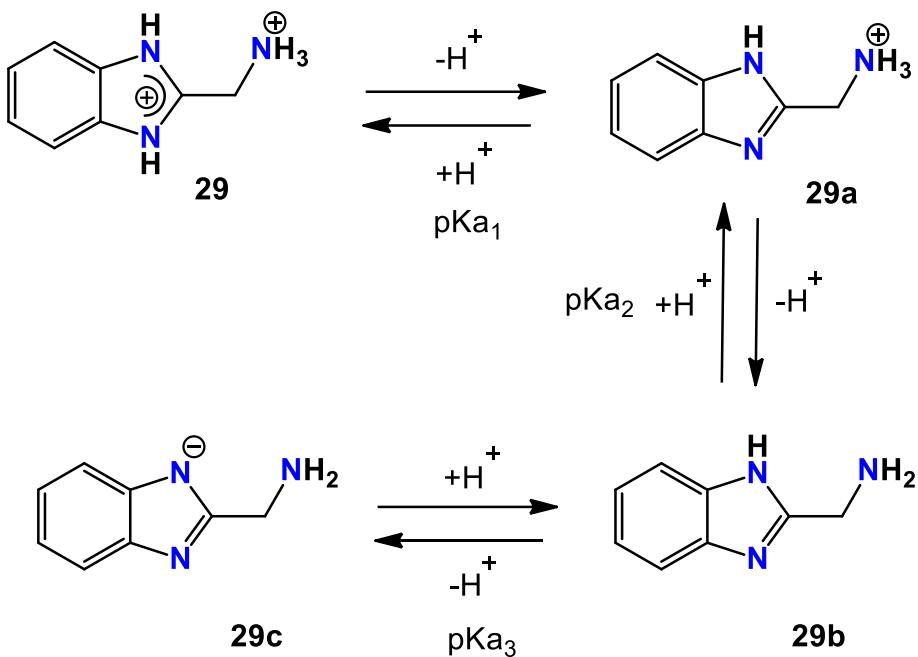


Figura 1.2. Estructuras de los compuestos **26-28** y valores de pKa

Por su parte, Sierra y colaboradores reportaron las constantes de acidez del 2-AMBZ.³¹ Estas constantes fueron determinadas por RMN de ¹³C, espectrofotometría de UV-visible y potenciometría. Además, con la información obtenida en la RMN de ¹³C dichos autores obtuvieron información suficiente para establecer el mecanismo de desprotonación del compuesto 2-AMBZ y se determinaron tres constantes de acidez (Esquema 1.13).

El clorhidrato del 2-AMBZ fue estudiado en un rango de valores de pHs que abarcó desde 1.1 hasta 13.2 (en intervalos de 1 unidad de pH). Así, al aumentar el pH desde 1 hasta 4, se observó que los núcleos C-8 y C-9 se desplazaban hacia frecuencias altas. Después de pH = 4 (y hasta pH = 11) dichas resonancias mantuvieron sus valores constantes. Así, se pudo deducir que el primer sitio de desprotonación del 2-AMBZ corresponde al nitrógeno imidazólico. El segundo sitio de desprotonación del 2-AMBZ corresponde al grupo amonio. Esto se evidenció al observar que después de la primera desprotonación los núcleos C-5 y C-6 no se desplazaron a frecuencias bajas. Lo cual indica que no se desprotonó el segundo NH-imidazólico.



Esquema 1.13. Proceso de desprotonación del 2-AMBZ.

La técnica de espectrofotometría de UV-visible, permite determinar los puntos isobésticos. De esta manera, Sierra y colaboradores también determinaron para el 2-AMBZ dos puntos isobésticos. Uno se encuentra localizado a pHs ácidos y otro más en la zona básica y corresponden a pK_{a1} y pK_{a3} . En el rango de pH neutro, no les fue posible observar el punto isobéstico debido a los cambios tan pequeños en absorbancia. Los resultados obtenidos mostraron que cuando el 2-AMBZ está en medios con pH mayores a 12 se genera el amiduro del imidazol **29c**. De este modo, las matrices de absorbancia evidenciaron la presencia de cuatro especies en el intervalo de pH estudiado.

Por otra parte, la potenciometría condujo a la medición de solo dos constantes de acidez, porque se utilizaron concentraciones bajas de NaOH y no se cubrió el rango de pH necesario. Es importante mencionar que los datos obtenidos en RMN, espectrofotometría y potenciometría, fueron refinados por los programas HypNMR, SQUAD y SUPERQUAD, respectivamente para obtener los valores de pK_a . (Tabla 1.3)

Tabla 1.3. Valores de pKa para el 2-AMBZ.³¹

| Método | $l/(NaClO_4)$ | [2-AMBZ]/M | pKa ₁ | pKa ₂ | pKa ₃ |
|----------------|---------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
| RMN | variable | 0.1 | 3.103±0.079 | 7.624±0.063 | 12.540±0.038 |
| UV-vis | variable | 2-15x10 ⁻⁵ | 2.777±0.111 | 7.481±0.073 | 12.593±0.010 |
| UV-vis | 1 | 2-15x10 ⁻⁵ | 2.982±0.116 | 7.887±0.082 | 12.487±0.015 |
| Potenciometría | variable | 1-50x10 ⁻³ | 2.996±0.006 | 7.569±0.003 | ND |
| Potenciometría | 0.1 | 1-10x10 ⁻³ | 3.044±0.016 | 7.611±0.008 | ND |

Por otra parte, Sari y Covington reportaron las constantes de acidez del ácido 4-(2'-bencimidazoil)-tiabutanoico (BTBA) **30**, así como de algunos de sus derivados (**31** y **32**) (Figura 1.3).³² Estas constantes fueron obtenidas mediante una titulación potenciométrica con $(CH_3)_4NOH$. Los datos fueron colectados y refinados con el programa SUPERQUAD. Así, el primer pK_{a1} para los compuestos **30-32** corresponde a la desprotonación del grupo carboxílico y posteriormente ocurre la desprotonación de un HN-imidazol (pK_{a2}). Los autores atribuyeron los resultados de la segunda desprotonación al efecto inductivo del anillo de aromático. En el caso del compuesto **32** hay un grupo amonio, y por lo tanto, el tercer pK_{a3} corresponde a su desprotonación. El pK_{a3} de los compuestos **30-31** y el pK_{a4} del compuesto **32** corresponden a la desprotonación del nitrógeno imidazólico generando los amiduros del imidazol correspondientes (Tabla 1.4).

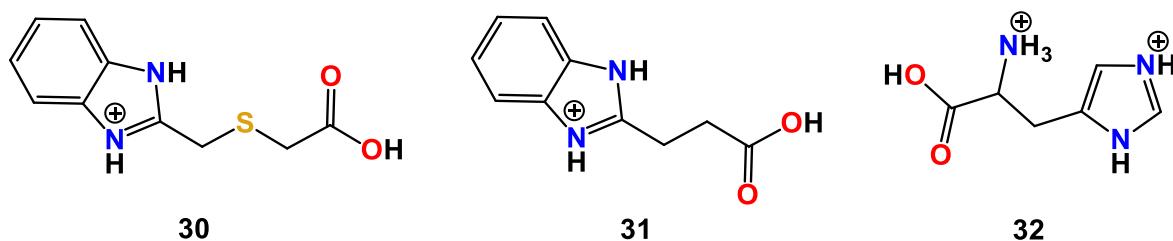


Figura 1.3. Estructuras de los compuestos 30-32

Tabla 1.4. Valores de pKa para los compuestos 30-32

| Compuesto | Nombre | pKa ₁ | pKa ₂ | pKa ₃ | pKa ₄ |
|-----------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 30 | Ácido 4-(2-bencimidazoil)-tiobutanoico | 3.33 | 5.46 | 11.32 | |
| 31 | Ácido 3-(2-bencimidazoil)-propionico | 3.75 | 6.37 | 11.71 | |
| 32 | Ácido 2-amino-3-(4-imidazoil)-propionico | 2.02 | 6.10 | 9.19 | 11.16 |

Bryantsev *et al.* utilizaron los métodos computacionales, para poder predecir las constantes de equilibrio de diversos compuestos.³³ Ellos utilizaron la teoría de los funcionales de la densidad (DFT), y un ciclo termodinámico para obtener las

constantes de acidez de moléculas del tipo aminas, diaminas y aminoamidas (Esquema 1.14).

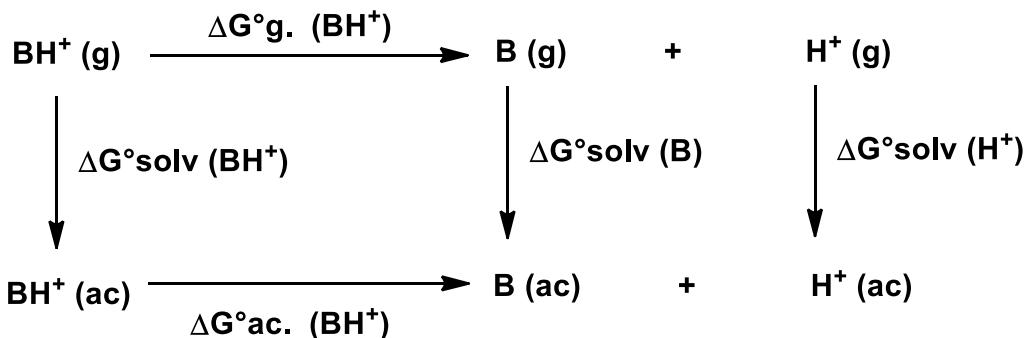


Figura 1.4. Ciclo termodinámico para el cálculo de pKa's, utilizado por Bryantsev *et al.*³³

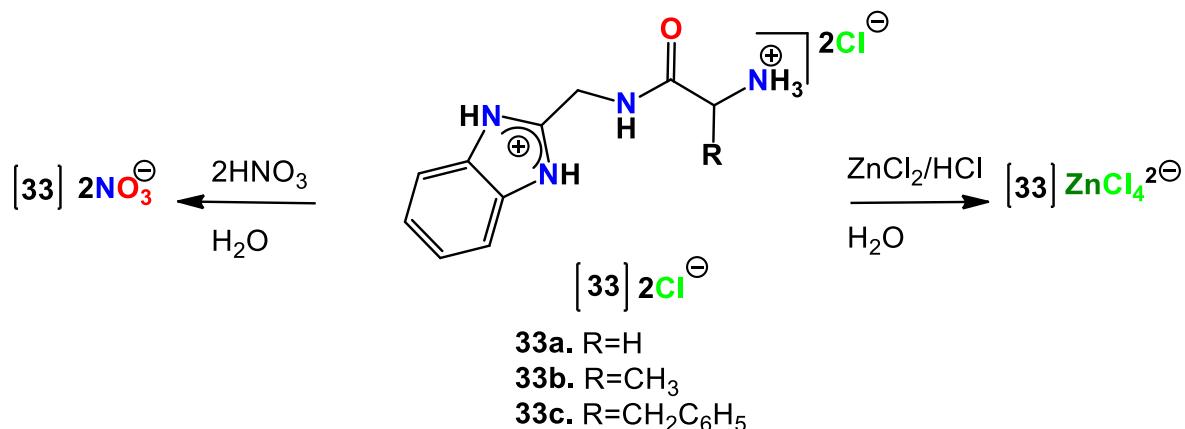
De los cálculos teóricos se obtienen las energías de desprotonación, y las energías de solvatación. Estos datos se sustituyen en la ecuación 1.1 para determinar los valores de pKa.

$$pK_a = -\log K_a = \frac{\Delta G^{\circ}\text{aq. deprot}(BH^+)}{(2.303RT)}$$

Ecuación 1.1. Ecuación para el cálculo de pKa's, utilizada por Bryantsev *et al.*³³

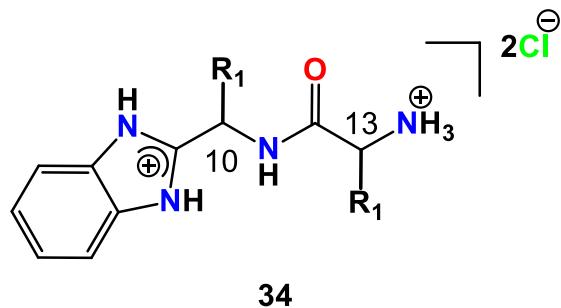
1.2.3.6 Estudios estructurales de sales benzoilamidas.

Ávila Montiel *et al* estudiaron las sales aminoamidas **33a-33c** por RMN de ¹H, ¹³C, IR y difracción de rayos-X.¹⁶ Dichos autores determinaron con la ayuda de la RMN que la acidez de los hidrógenos (-NH) bencimidazolicos está afectada por el tamaño y geometría del contráin. Así, la RMN de ¹H mostró que los hidrógenos del anillo imidazólico se desplazan a frecuencias más altas cuando el anión es el cloruro. Esto se debe a que el Cl⁻ es un anión de tamaño pequeño e interacciona fuertemente con estos hidrógenos, provocando un aumento en su acidez. En cambio, los nitratos y tetraclorozincatos al ser iones más grandes, la densidad de carga negativa se distribuye en sus átomos de oxígeno y cloro respectivamente, y las interacciones con estos hidrógenos son más débiles. Lo cual ocasiona que dichos átomos de hidrógeno no sean tan ácidos y que sus desplazamientos químicos se vayan a frecuencias bajas (Esquema 1.14).



Esquema 1.14. Intercambio de anión del compuesto 33.

Además, Lechuga reportó la RMN de ¹H, ¹³C en D₂O y difracción de rayos-X de las sales amino amidas **34a** y **34b** que contienen en su estructura dos carbonos quirales (Figura 1.5).⁶



- 34a.** R₁= CH₃
34b. R₁= CH₂CH(CH₃)₂

Figura 1.5. Estructura del compuesto 34

La difracción de rayos-X mostró que para **34a** y **34b** se obtiene la mezcla racémica (10R, 13S; 10S, 13R). En los compuestos **34a** y **34b** se generan pseudociclos S₂¹(10), debido a las interacciones (N-H...Cl...H-N) puente de hidrógeno de un átomo de cloro con el nitrógeno imidazólico (2.317 Å) y con el nitrógeno del grupo amonio (2.231 Å) [Figura 1.6]

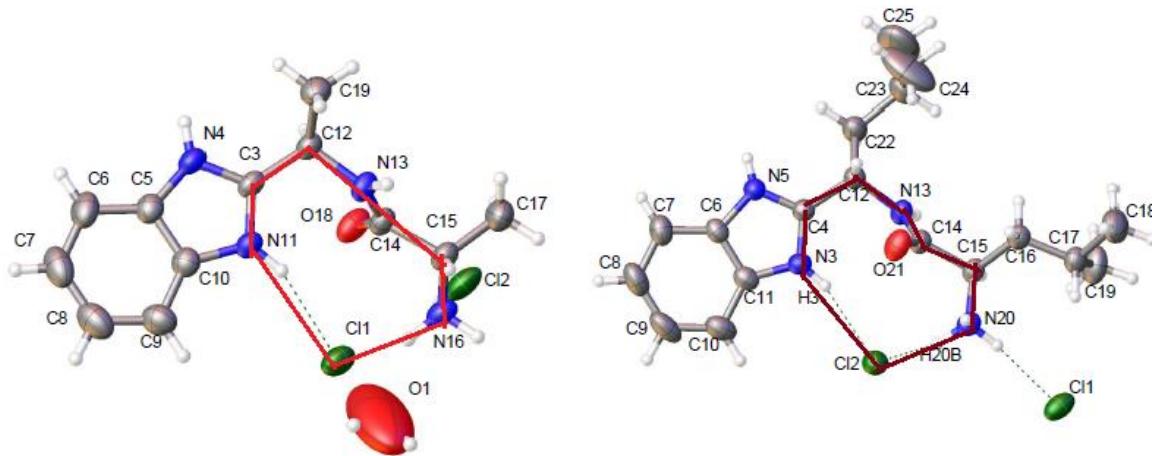


Figura 1.6. Estructura cristalina de los compuestos **34a** y **34b**

Los espectros de RMN de ^{13}C de **34** mostró que el tamaño del sustituyente afecta los desplazamientos de los carbonos metino C-10 y C-13. Esto se debe a la presencia de los efectos α , β y γ de la cadena alifática. En el compuesto **34a**, solo existen efectos α , por lo cual la resonancia de los núcleos C-10 y C-13 está desplazada a frecuencias más bajas en comparación con los núcleos de carbono homólogos del compuesto **34b**, donde los efectos α , β y γ si están presentes. Por otra parte, en la RMN de ^1H de estos compuestos se observó que los protones metínicos H-10 se encuentran a frecuencias más altas que los H-13. Esto se debe a que la protonación del anillo imidazólico ejerce un efecto electroatractor mayor sobre H-10 que el grupo amino.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Estudiar la isomerización de pseudopéptidos derivados de α -aminoácidos que pueden ser modelos moleculares que permitan entender la reactividad química y biológica de las proteínas.

1.3.2 Objetivos Específicos

Sintetizar los pseudopéptidos **1-3** constituidos por dos carbonos quirales, bencimidazol, amida y amonio.

Determinar las estructuras moleculares de **1-3** por medio de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{15}N , experimentos COSY, HSQC y HETCOR en dimetilsulfóxido-d6 y D_2O .

Realizar el estudio de isomerización de los pseudopéptidos **1-8** por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{15}N utilizando DMSO-d6 como disolvente.

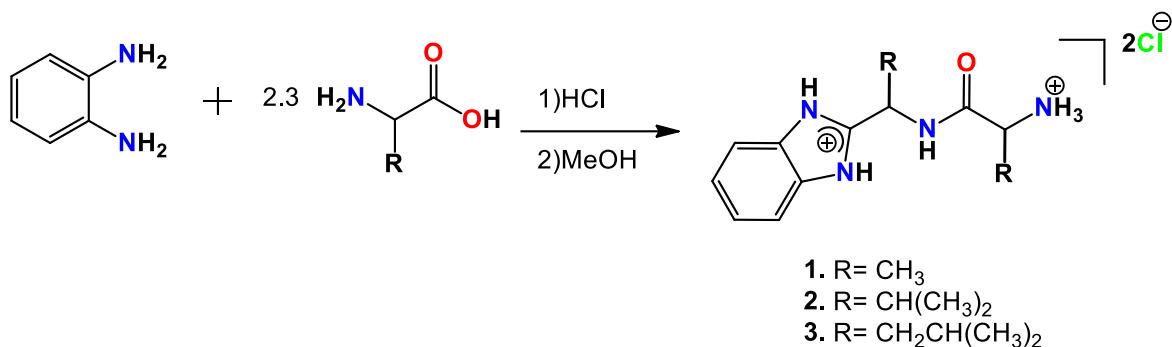
Estimar las constantes de acidez del pseudopéptido **1** por RMN de ^1H y ^{13}C utilizando D_2O como disolvente y 1,4-dioxano como referencia.

Optimizar las estructuras moleculares de los isómeros *Z* y *E* del pseudopéptido **1** para determinar la energía electronica del isómero más estable, mediante cálculos DFT.

1.4 Resultados y Discusión.

1.4.1 Síntesis de pseudopéptidos derivados de α -aminoácidos.

Las sales de los pseudopéptidos **1-3** se sintetizaron a partir de un equivalente de α -fenilendiamina con 2.3 equivalentes de α -aminoácidos (dI -alanina **1**; L -leucina **2**; L -valina **3**) en HCl como agente de condensación (Esquema 1.15).⁶ Cabe señalar que la estructura molecular del pseudopéptido **2** derivada de la L -valina se presenta por vez primera en este trabajo de investigación.



Esquema 1.15. Síntesis de las sales de pseudopéptidos **1-3**.

Las reacciones de condensación proceden con la epimerización del centro de quirialidad del aminoácido, y por lo tanto, los crudos de reacción están constituidos básicamente por mezclas de esteroisómeros. Sin embargo, por precipitación es posible separar uno de los pares de enantiómeros del compuesto **1** (*R,S* y *S,R*) y dos mezclas racémicas para **2** y **3** (*R,S;S,R* y *S,S;R,R*). La relación de esteroisómeros determinada por RMN de ¹H en DMSO-d₆ es 78/22 % para **2** y 65/35 % para **3**. No fue posible separar esta mezcla de esteroisómeros mediante la precipitación y esto puede atribuirse a la presencia de fuerzas intermoleculares entre los cuatro esteroisómeros que los mantienen unidos (Figura 1.7).

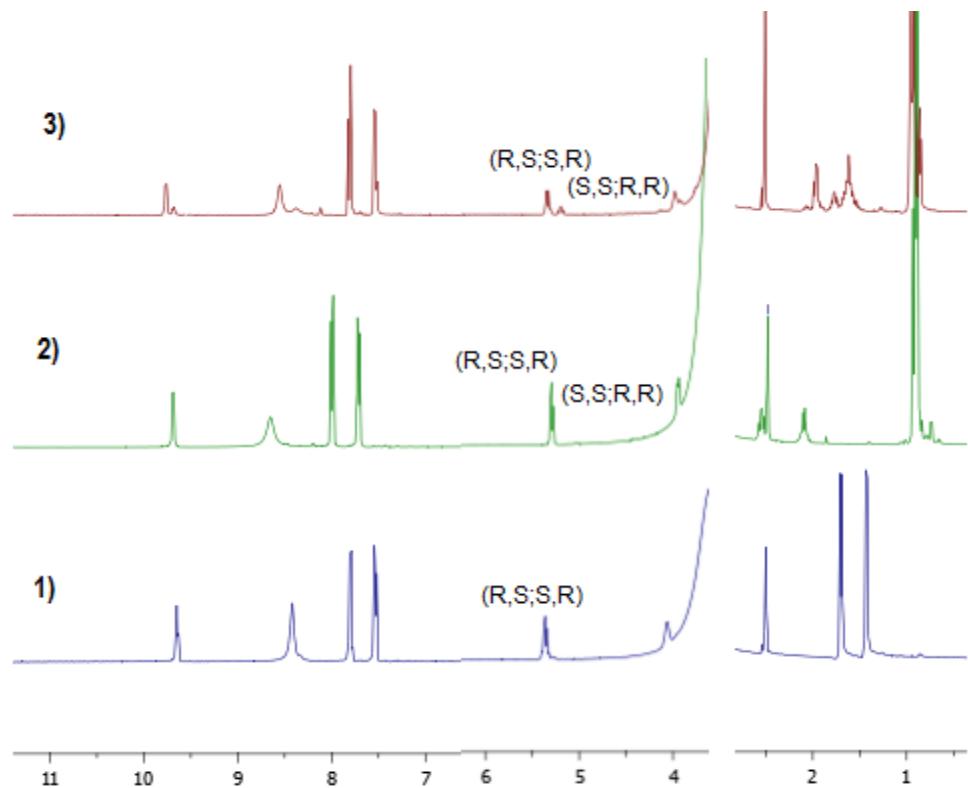


Figura 1.7. Espectros de RMN de ¹H en DMSO-d₆, para **1**(azul), **2**(verde), **3**(rojo).

Las aminoamidas fueron estudiadas a diferente pH por RMN en DMSO-d6 y D₂O utilizando como referencia el DMSO y 1,4-dioxano respectivamente.

1.4.2 Estudio estructural de los pseudopéptidos 1-3.

Los datos de RMN ¹H en DMSO-d6 para **1** y **3** ya han sido reportados por Lechuga.⁶ Sin embargo, aquí se presenta la RMN de ¹³C que contribuye a establecer fenómenos de isomerización del grupo amida. La asignación de los pseudopéptidos en RMN se realizó por medio de experimentos de dos dimensiones COSY, HETCOR o HSQC.

1.4.2.1 RMN de ¹H de los pseudopéptidos 1-3.

En la Tabla 1.5 se muestran los desplazamientos químicos de los protones de los cloruro de amidas **1-3**. La señal NH-amida (NH-11) es una señal doble debido a su acoplamiento con el protón metínico (H-10). Comparando los efectos del sustituyente se sugiere que el grupo isopropilo vecino al bencimidazol en el compuestos **2** genera un efecto de protección sobre los NH amida y CH metino (H-10,) ya que se encuentran desplazados a frecuencias más bajas con respecto a los mismos átomos de hidrógeno de las amino amidas **1,3**. De forma similar a los resultados obtenidos con los compuestos **1,3**, el hidrógeno metino H-10 del pseudopéptido **2** está desplazado a frecuencia más alta que hidrógeno metino H-13.

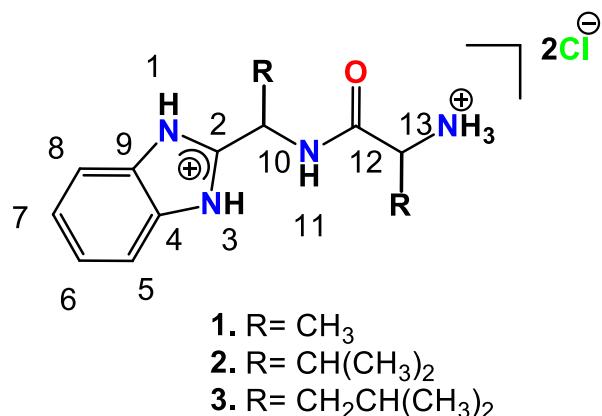


Figura 1.8. Numeración de la cadena principal de los compuestos **1-3**.

Tabla 1.5. δ de ^1H (ppm) en DMSO-d6

| Compuesto | H-11 | H-1, H-3, NH_3^+ | H-5 y H-8 | H-6 y H-7 | H-10 | H-13 |
|-----------|------|------------------------------|-----------|-----------|------|------|
| 1 | 9.66 | 8.47 | 7.80 | 7.53 | 5.38 | 4.08 |
| 2 | 9.48 | 8.57 | 7.82 | 7.54 | 5.28 | 3.97 |
| 3 | 9.76 | 8.55 | 7.80 | 7.53 | 5.33 | 3.97 |

Los experimentos COSY de las sales **1-3** permitieron localizar a los protones amonio ($-\text{NH}_3$) en el mismo intervalo de desplazamiento químico que los protones NH- imidazólicos (8.47-8.57 ppm). Información que es similar a lo reportado por Lambert para NH en las sales de amonio (6-8.5 ppm).³⁷ En la figura 1.9 se puede ver la correlación de la señal múltiple del metino H-13 con el grupo NH_3 (8.57 ppm) y el metino adyacente a frecuencia baja. Además del NH amida acoplada con el protón metino a frecuencia alta.

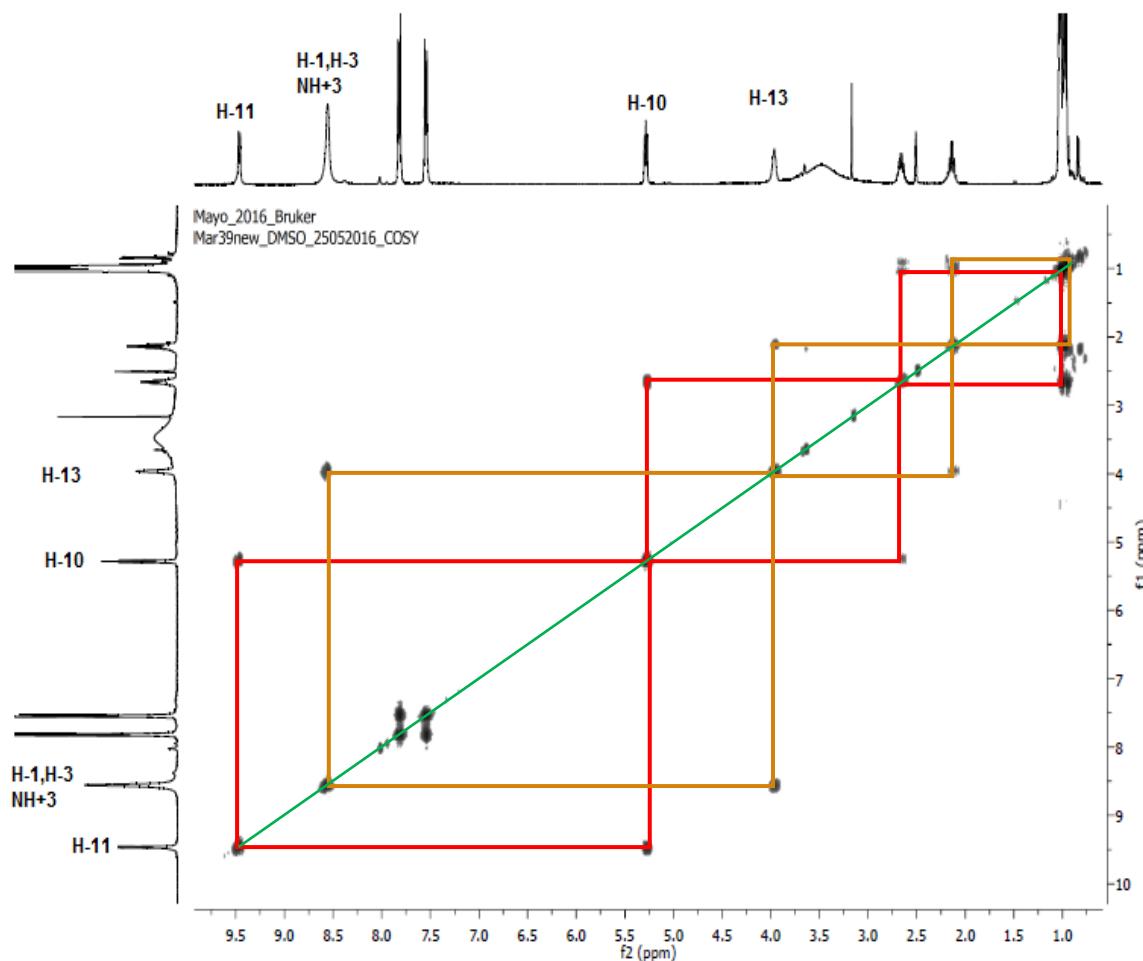


Figura 1.9. Experimento COSY para el compuesto **2**.

Asimismo, los espectros de protón de las amidas **2** (verde) y **3** (rojo) mostraron las señales para los cuatro grupos metilo diastereotípicos. Sin embargo, las señales dobles de los metilos de la amida **3** tienen desplazamientos químicos muy similares y no fue posible asignarlas (Figura 1.10).

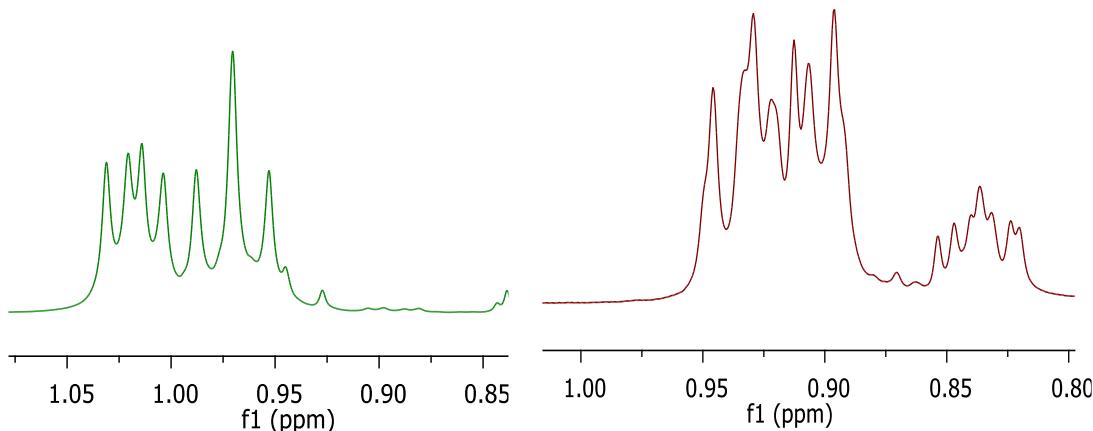


Figura 1.10. Espectros de RMN de ^1H en DMSO-d6 para **2** (verde) y **3** (rojo).

1.4.2.2 RMN de ^{13}C de pseudopéptidos **1-3**.

En la figura 1.11 se muestra como las asignaciones de los espectros de RMN de ^{13}C para **1-3** se dedujeron de los experimentos COSY, HETCOR y HSQC. La RMN de ^{13}C de los cloruro amino amidas mostró **3** señales para los carbonos C-4, C-5, C-6 aromáticos indicando la equivalencia química y magnética con C-9, C-8 y C-7.

Dentro de este contexto, podemos notar que los desplazamientos químicos de estos núcleos son iguales en los tres pseudopéptidos. Por lo tanto, los sustituyentes en los carbonos quirales no afectan el desplazamiento químico de los carbonos aromáticos. El carbono C-2 imidazólico del compuesto **2** aparece a frecuencia más baja (152.8 ppm) que en **1**, **3** (1.7 y 1.3 ppm respectivamente), lo que significa que el metilo debe generar un efecto estérico protector. Por el contrario, los desplazamientos químicos de los metinos para **2** están a frecuencias más altas que los núcleos de los derivados de alanina **1** ($\delta = 6$ ppm) y leucina **3** ($\delta = 10$ ppm). Este resultado muestra que en los núcleos de carbono metino del pseudopéptido **2** hay un aumento de la contribución paramagnética debido a la presencia del grupo isopropilo.

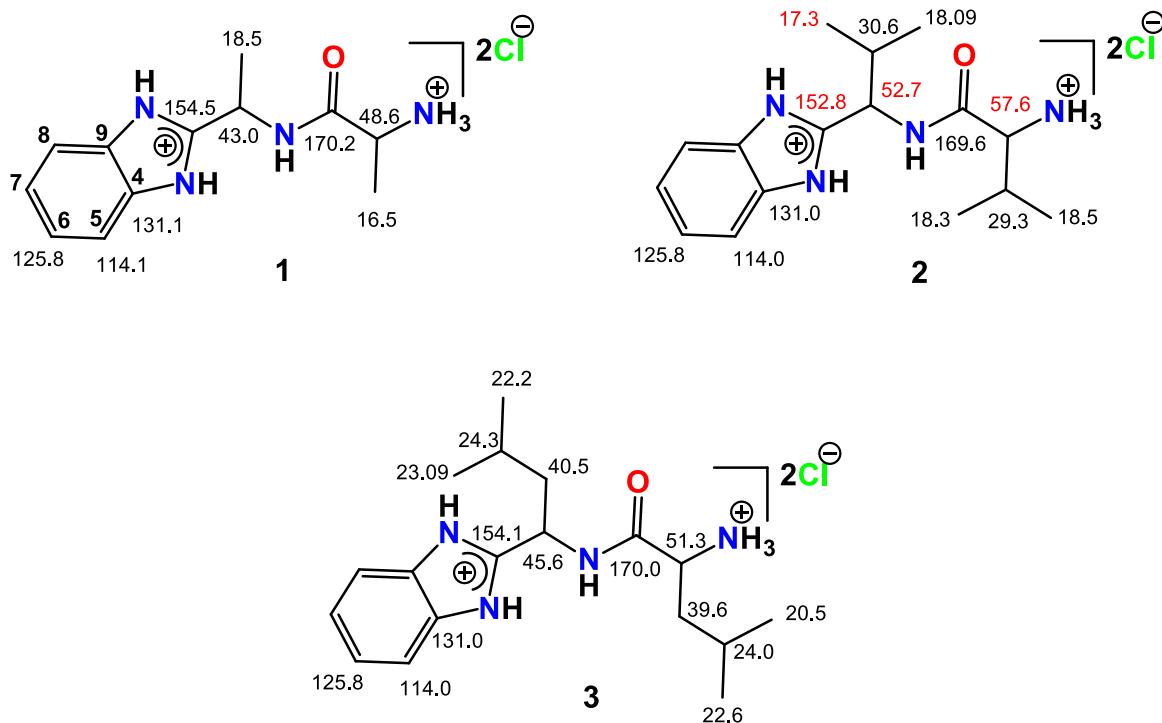


Figura 1.11. Asignación de los compuestos **1-3** por RMN de ^{13}C en DMSO-d6.

1.4.3 Estudio estructural de los pseudopéptidos **1-8** por RMN de ^1H , ^{13}C y ^{15}N en DMSO-d6.

1.4.3.1 RMN de ^1H y ^{13}C de pseudopéptidos **6, 7**

Las amidas **6** y **7** fueron sintetizadas por Ávila y caracterizadas por RMN en MeOD.¹⁶ Pero, aquí presenta la caracterización por RMN de ^1H y ^{13}C en DMSO-d6 porque los datos se utilizarán más adelante para compararlos con los resultados obtenidos de la titulación de estos compuestos con NaOH.

En la figura 1.10 se muestra que la RMN de ^1H y ^{13}C indican que el efecto estérico del grupo isopropilo es mayor que el grupo isobutilo. Esto se deduce a partir de observar que la frecuencia del metino adyacente al grupo carbonilo (C-12) del derivado de la valina está a frecuencias más altas que el carbono análogo en la amida derivada de la leucina. Además, los grupos bencimidazol de **6** y **7** presentan el mismo ambiente químico y magnético porque las señales tienen desplazamientos químicos similares. Con base a los resultados se propone que en disolución el isómero que observamos en RMN es el *Z* porque representa menos repulsión estérica entre las cadenas laterales (bencilo y alquilo).

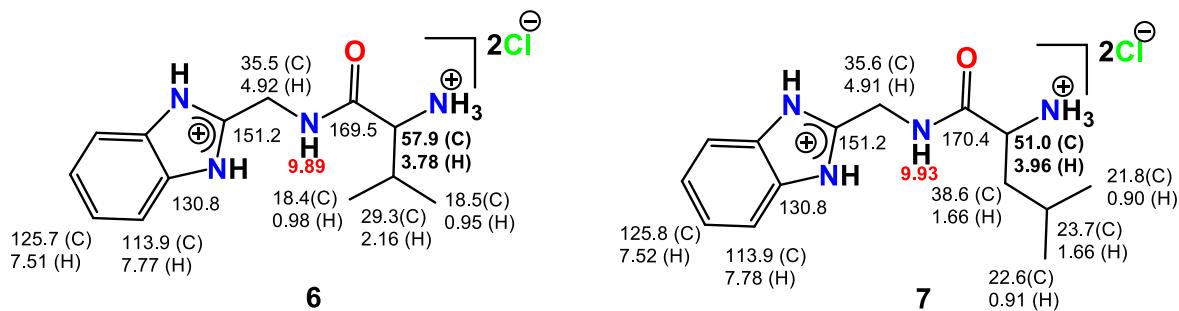


Figura 1.12. Asignación de los compuestos **6** y **7** por RMN de ^1H y ^{13}C en DMSO-d_6 .

1.4.3.2 RMN de ^1H y ^{13}C de los pseudopéptidos de **1-8** a pH diferente.

Los pseudopéptidos **1-8** fueron estudiados a diferente pH, pero primero se describe el estudio del compuesto **1**. Este compuesto se caracteriza por contener dos carbonos quirales y en la RMN podríamos observar los isómeros resultantes de los fenómenos de epimerización o de la isomerización *Z/E* (Figura 1.13).

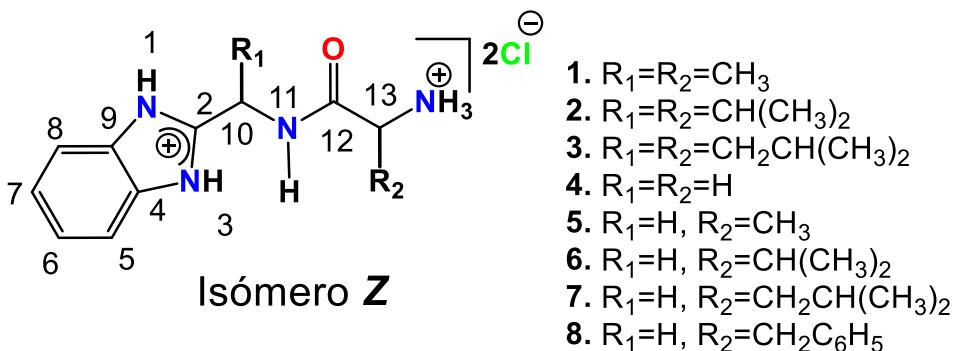


Figura 1.13. Estructuras de los cloruros de aminoamidas **1-8**.

La amida **1** fue estudiada en un rango de pHs que comprendió valores desde 4.0 hasta 11.0. Los intervalos de pH de estudio (5 y 1.0) se establecieron con la ayuda de NaOH 2.0 M. Las titulaciones fueron llevadas a cabo en tubos de ensaye, seguido de la evaporación del medio acuoso. La RMN de ^1H y ^{13}C en DMSO-d_6 fue obtenida y permitió observar las señales NH -amida, NH -imidazol y NH -amonio.

En la figura 1.14 se presentan tres espectros de ^1H a pHs de 4, 5 y 8 (valores de pH antes de evaporar el disolvente acuoso) en los cuales podemos observar que la señal del NH -imidazólico y NH -amonio (8.5 ppm) comienzan a desaparecer con

el aumento de la concentración de iones hidroxilo. Es decir, se pierde un NH-imidazólico pero se mantiene el equilibrio tautomérico del segundo NH imidazol. A pH = 8 no es posible observar el segundo NH-imidazólico y el NH₃ porque estos hidrógenos son lábiles y el disolvente contiene humedad.

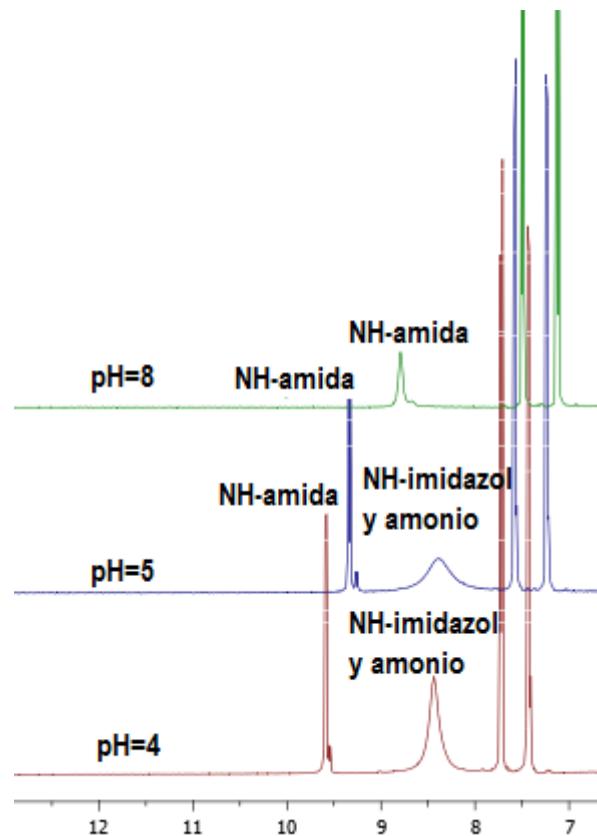


Figura 1.14. Espectros de RMN de ¹H en DMSO-d6 de **1** a pH=4 (rojo), pH=5 (azul) y pH=8 (verde).

La variación del desplazamiento químico de los núcleos de ¹H y ¹³C del compuesto **1** se graficaron con respecto al pH (pH: 4 a 11). En la figura 1.15 se muestra como los carbonos C-2 del imidazol y C-13 del metino adyacente al NH₃⁺ se desplazan hacia frecuencias altas al aumentar el pH. Esto se debe a la presencia del par de electrones libres resultante de la pérdida de los hidrógenos H-imidazólicos y H-amonio respectivamente. El grupo carbonilo a pH's de 7, 8 y 9 sigue esta misma tendencia, obteniéndose valores de desplazamiento químico de 170.4 ppm, 172.9 ppm y 175.6 ppm respectivamente. Estos datos sugieren que a pH de 7, 8 y 9 es posible obtener a los ligantes mono y didentado con el par de electrones libres en los nitrógenos imino y amina.

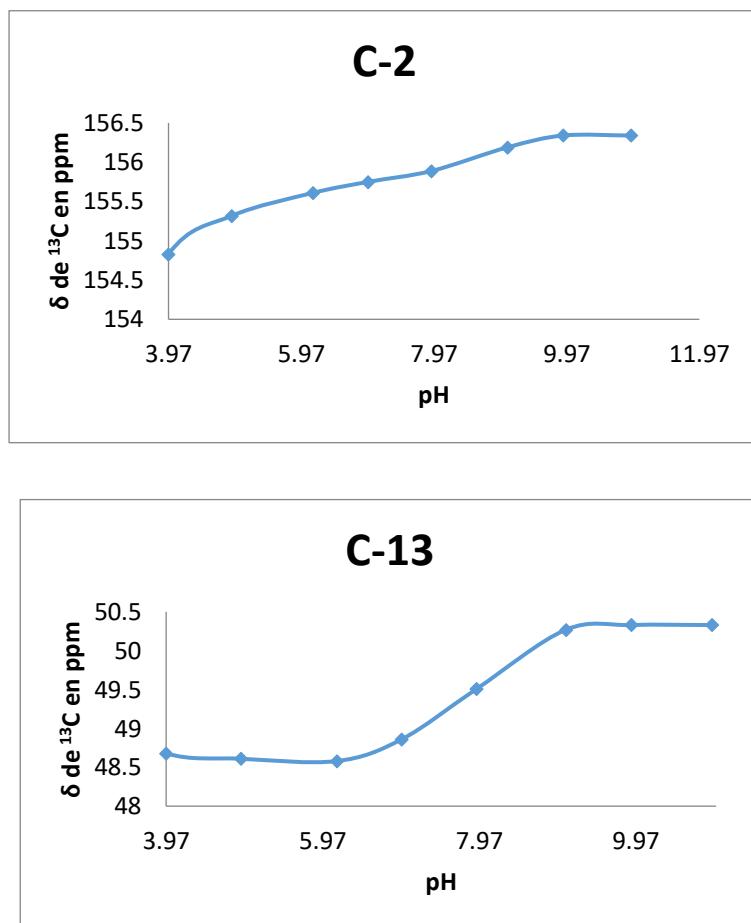


Figura 1.15. Gráficas de δ de ^{13}C vs pH para los núcleos C-2 y C-13 del compuesto 1. Los valores de pH fueron determinados antes de evaporar el disolvente acuoso.

Por otra parte, los espectros de ^1H y ^{13}C a pH de 10 mostraron un segundo grupo de señales, las cuales se pueden atribuir a otro isómero amino amida (Figura 1.16). Entonces, se propone la rotación del enlace nitrógeno-carbonilo (N-CO) para dar la isomería Z/E. El isómero mayoritario en disolución es el Z porque muestra una repulsión menor entre las cadenas laterales de la molécula. En contraste, la epimerización en amidas no se propone debido a la estabilidad de la geometría plana de la amida que impide el equilibrio ceto-enólico de los sistemas colocados en posición alfa al carbonilo.

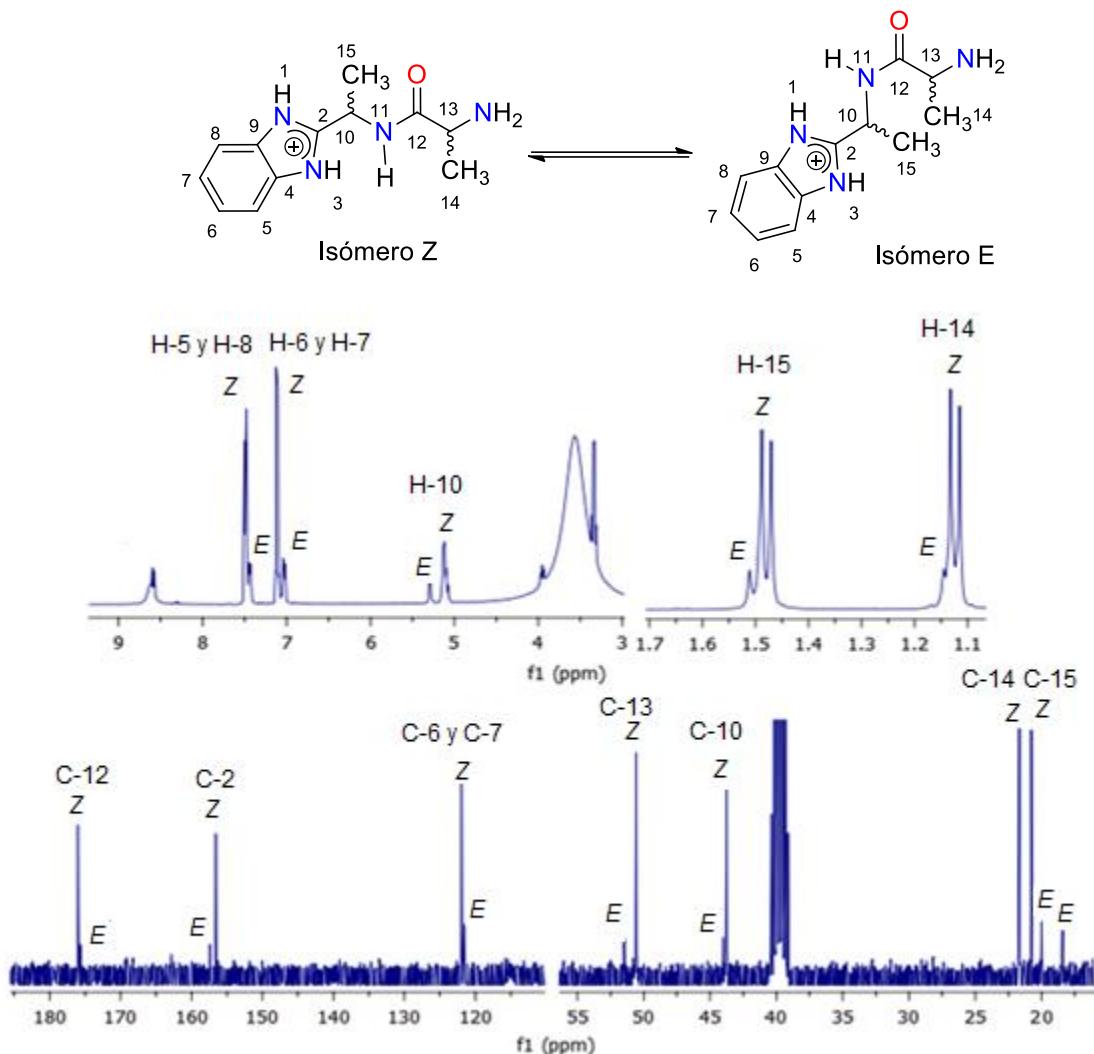


Figura 1.16. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C en DMSO-d_6 para el compuesto 1 a $\text{pH}=10$.

En función de los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento de la RMN del compuesto 1, se realizaron los estudios correspondientes para los clorhidratos 2-8. Estos compuestos se titularon con NaOH 1.0 M a pHs de 6.5, 7, 8 y 9. Además, como información complementaria se revisó el efecto que ejerce la temperatura sobre el comportamiento molecular de algunas muestras.

En la gráfica de la figura 1.17 se muestran las tendencias hacia frecuencia alta de los carbonos imino (C-2) al alcanzar el pH de 8. Nótese que con excepción del compuesto 2 (derivado de la valina) la tendencia es ascendente. La explicación de esta tendencia para 1, 3-5, 8 es la desprotonación del NH imidazólico que ocurre entre pH 7 y 8. Es decir, el par de electrones libres del átomo de nitrógeno imidazólico genera un efecto electroatractor sobre C-2, aunque el equilibrio tautomérico en el bencimidazol se mantiene.

Por otra parte, la amida **2** con dos carbonos quirales derivada de valina solo es estable como clorhidrato, mientras que la amidas **6** y **7** derivadas de Leucina y valina con un solo carbono quiral son estables hasta pH de 6.6 y 7 respectivamente. El resultado indica que el sustituyente voluminoso contribuye en el aumento de la hidrólisis del compuesto cuando el pH aumenta.

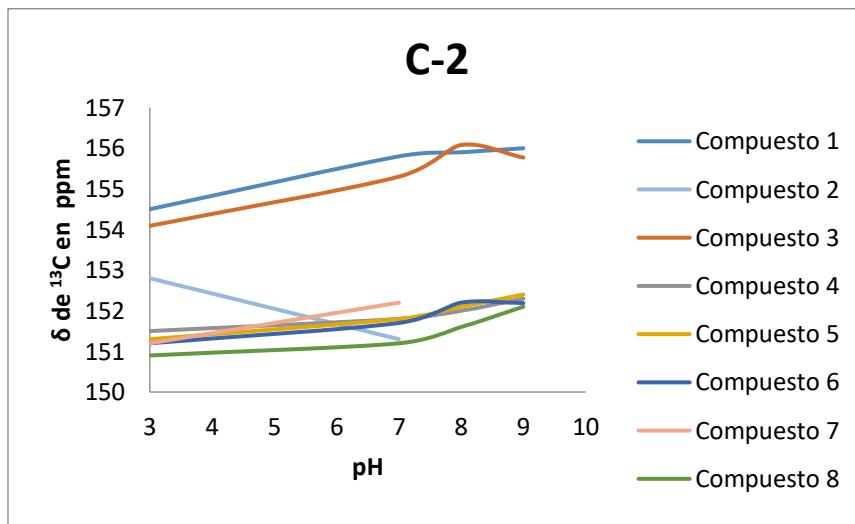


Figura 1.17. Gráfica de δ de ^{13}C vs pH de C-2 para los compuestos **1-8**. Los valores de pH fueron determinados antes de evaporar el disolvente acuoso.

Por el contrario, el carbono C-6 y C-7 aromáticos se desplaza a frecuencia baja cuando aumenta el pH lo que evidencia que el bencimidazol ya no se encuentra en su forma catiónica (Figura 1.18).

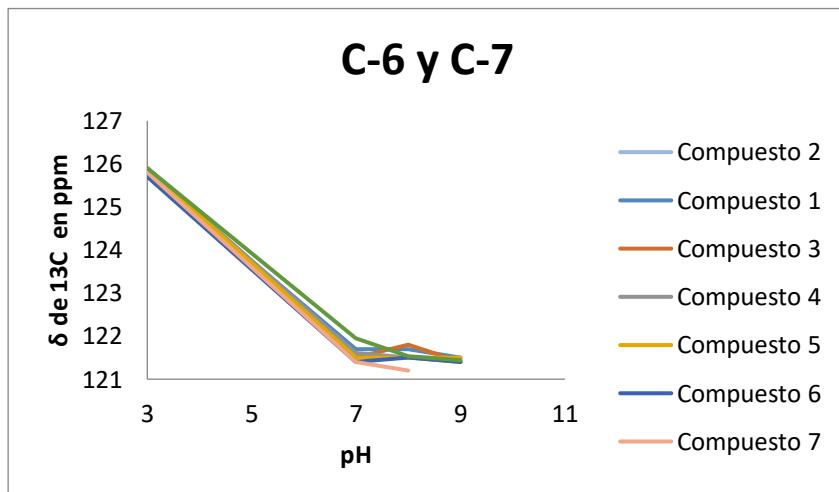


Figura 1.18. Gráfica de δ de ^{13}C vs pH de C-6 y C-7 para los compuestos **1-8**. Los valores de pH fueron determinados antes de evaporar el disolvente acuoso

Las gráficas de las figuras 1.17 y 1.18 mostraron que los carbonos arómicos C-2, C-6, C-7 prácticamente mantienen el desplazamiento químico en pH=8 y pH=9. Entonces se demuestra que no se forma la especie aniónica del bencimidazol y solo está presente el equilibrio tautomérico del bencimidazol. Por otra parte, No fue posible observar en los espectros de RMN de ^{13}C todos los núcleos de bencimidazol (C-4=C-9, C-5=C-8) debido a la relajación de los núcleos y a la concentración baja de la muestra.

El efecto de la pérdida de un protón imidazólico también se refleja en el carbono C-10 (metileno o metino) vecino a bencimidazol porque se desplaza de 0.9 a 1.6 ppm hacia frecuencias altas en pH de 7 respecto al de los clorhidratos (Figura 1.19).

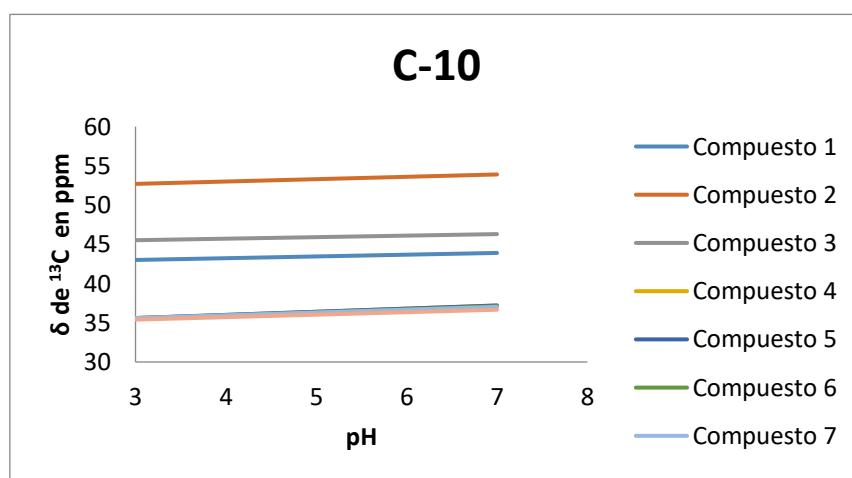


Figura 1.19. Gráfica de δ de ^{13}C vs pH de C-10 (metileno o metino) para los compuestos 1-8. Los valores de pH fueron determinados antes de evaporar el disolvente acuoso.

De la misma manera se graficaron los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de los metinos C-13 vs pH (7, 8 y 9) de los compuestos 1-8 (Figura 1.20). Como se puede observar en las gráficas, a partir de pH = 8-9 la resonancia de C-13 se desplaza hacia frecuencias altas. Esto se debe a que a estos valores de pH el grupo amonio se desprotona.

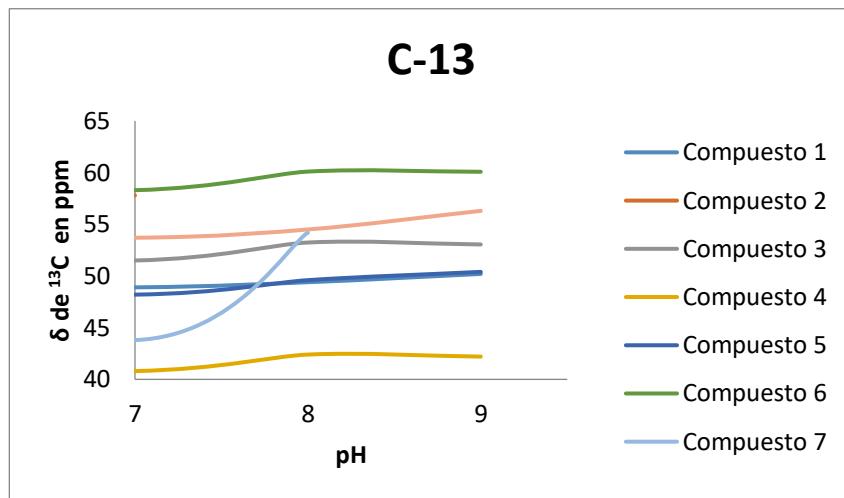


Figura 1.20. Gráfica de δ de ^{13}C vs pH de C-13 para los compuestos 1-8. Los valores de pH fueron determinados antes de evaporar el disolvente acuoso

La pérdida del protón amonio también afecta el desplazamiento químico de C-12, el cual se desplaza de 2.2 a 4.0 ppm hacia frecuencias altas con respecto a su desplazamiento a pH = 7 (Figura 1.19).

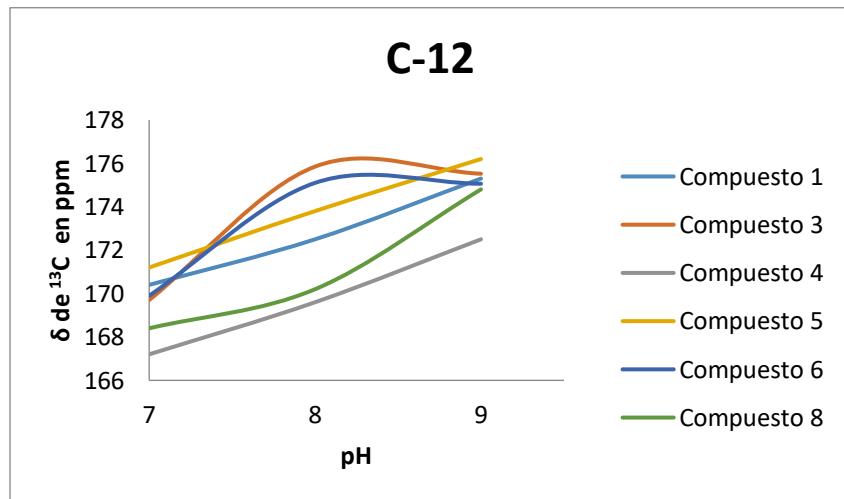


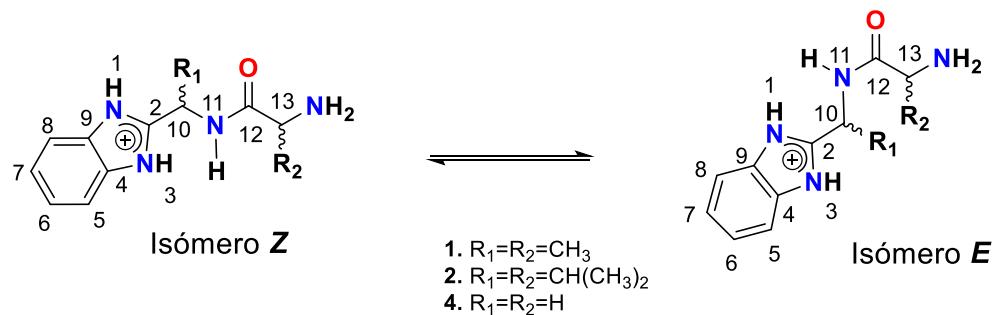
Figura 1.19. Gráfica de δ de ^{13}C de C=O (C-12) vs pH de para los compuestos 1-8. Los valores de pH fueron determinados antes de evaporar el disolvente acuoso.

Finalmente, con el presente estudio se demuestra que los compuestos monodentados de **1,3-5 y 8** derivados de la desprotonación del Nitrógeno imidazólico se pueden aislar en un intervalo de pH 7-8. Mientras, que los ligantes didentados (desprotonación de nitrógenos imidazol y amonio) se pueden obtener a

pH de 8-9. En contraste, las amidas **2** y **6** se hidrolizan al aumentar el pH. Así, **2** (que contiene dos carbonos quirales) es una molécula estable en su forma de clorhidrato, y **6** (con un carbono quiral) forma al ligante modondentado a pH = 6.6. De tal manera que es posible concluir que el efecto estérico que ejercen los grupos isopropilo afecta a la estabilidad de la amida cuando pH del medio aumenta.

1.4.3.3 Estudio por RMN de ^1H y ^{13}C del efecto de la temperatura en los pseudopéptidos **1**, **2** y **4**.

Lechuga propuso que la epimerización del compuesto **1** ocurre a temperatura alta sin la presencia de disolvente.⁶ Pero, en el presente trabajo también se encontró que la isomerización *Z/E* de los compuestos **1-8** por factores térmicos también es posible. Así, los hidrocloruros de las amidas **1**, **2** y **4** (derivados de la alanina, valina y glicina, respectivamente) fueron calentados en disolución de DMSO-d6 a 115 °C para corroborar la formación de sus posibles isómeros (Esquema 1.16).



Esquema 1.16. Proceso de isomerización del grupo amida en los compuestos **1**, **2** y **4**.

Los espectros de ^1H y ^{13}C mostraron dos grupos de señales para el hidrocloruro de la amida **1**, lo que sugiere que la isomerización *Z/E* ocurre a temperaturas altas. Sin embargo, el resultado con el derivado de la glicina (**4**) descartó la epimerización del compuesto porque no contiene átomos quirales y también mostró en la RMN dos grupos de señales que deben pertenecer a los isómeros *Z/E* (Figura 1.22).

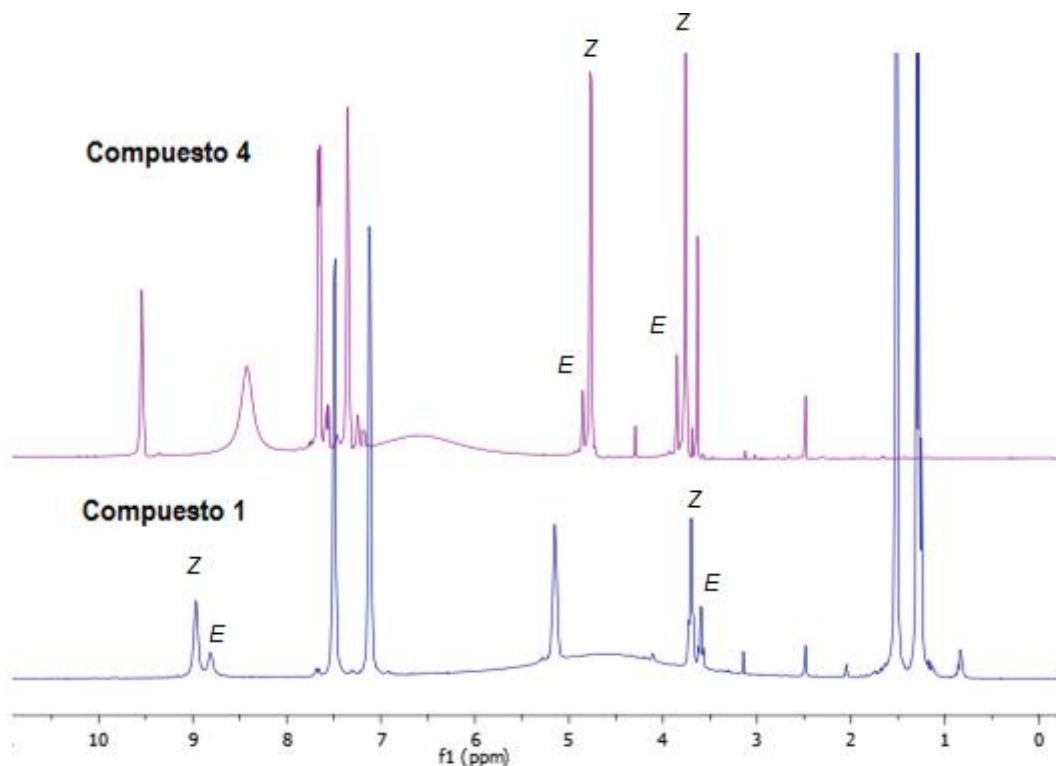


Figura 1.22. Espectros de RMN de ^1H en DMSO-d6 de los compuestos **1** y **4** a 115°C.

Asimismo, cuando el compuesto **1** a pH de 7 y 8 fue calentado hasta 115 °C, los espectros de RMN mostraron una vez más que el grupo amida se isomeriza. Esto se deduce porque en los espectros se observa un segundo grupo de señales con diferencias de tan solo 0.2 ppm en ^{13}C (Figura 1.23). Por lo tanto, se propone que el isómero *Z* de la amida **1** es el predominante tanto en su forma protonada como ligante mono y bidentado (pH de 7 y 8 respectivamente).

En el caso de la amida **2** la muestra se calentó a una temperatura menor a 115 °C y no ocurrió la isomerización. Pero a 115 °C, el compuesto se destruye. Esto posiblemente se debe que el efecto estérico que producen los sustituyentes impide la rotación del enlace carbono nitrógeno de la amida.

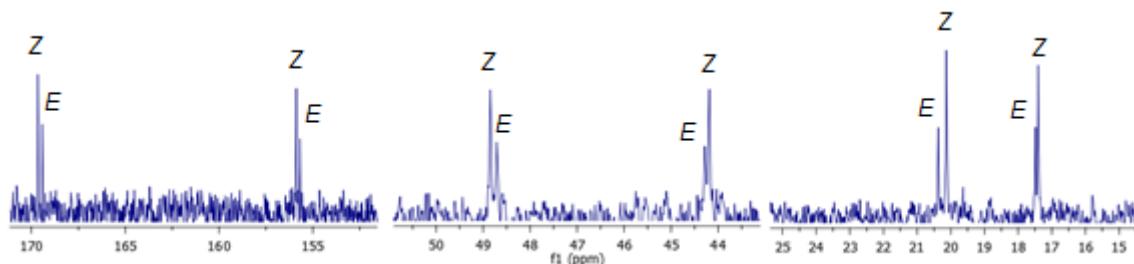


Figura 1.23. Espectro de RMN de ^{13}C en DMSO-d6 del compuesto **1** a pH = 8 y calentado hasta 115°C.

1.4.3.4 RMN de ^{15}N de los pseudopéptidos de 1-8 a diferente pH y temperatura

La RMN de ^{15}N permite evidenciar la geometría de los átomos de nitrógeno en las moléculas. Por lo tanto, se obtuvieron los espectros de ^{15}N de los compuestos **1-8** (Tabla 1.6). Así, en estos compuestos se observaron los grupos amonio en 336.2 a -349.7 ppm los nitrógeno amida en -259.3 a -274.4 ppm.³⁸ Por otra parte, se sabe que los átomos de nitrógeno de amida tienden a tener geometría trigonal plana y que son grupos donadores hacia el grupo carbonilo.³⁹ Sin embargo, encontramos que en los compuestos **1-3** los desplazamientos químicos para estos núcleos aparecen a frecuencias más altas que en **5-7** ($\Delta\delta = 9.8\text{-}13.7$ ppm). Además, las señales de los grupos *N*-amida en **4** y **8** (derivados de glicina y fenilalanina respectivamente) aparecen también a frecuencias más bajas que **1** y **3**. Por lo tanto, se propone que en las amidas **5-7** el nitrógeno amídico pierde planaridad debido a la repulsión estérica sobre el átomo de oxígeno que ejercen los sustituyentes R_1 y R_2 . Es decir el ángulo de torsión O-C-N-C puede ser diferente de cero, el átomo de nitrógeno cambiaría su geometría a piramidal y el par libre de electrones del nitrógeno amídico produciría una contribución paramagnética pequeña.

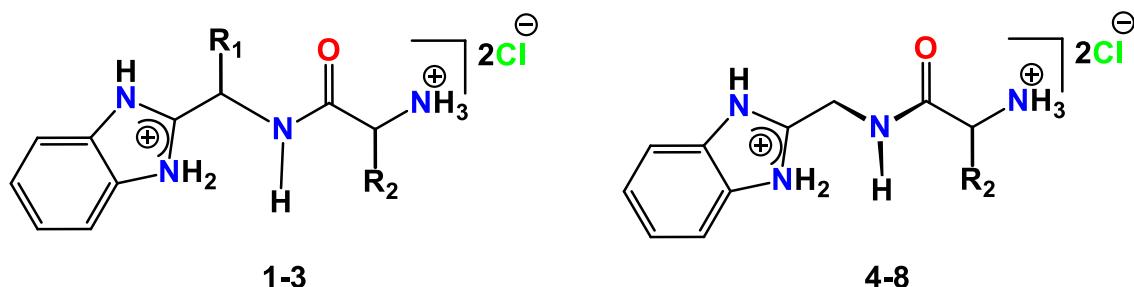


Figura 1.24. Estructuras de los compuestos 1-8

Tabla 1.6. δ de ^{15}N (ppm) **1-8** y $\Delta\delta$ de ^{15}N (ppm) en DMSO-d6

| | $\text{R}_1 = \text{R}_2$ | NH amida | NH amonio | R_2 | NH amida | NH amonio | $\Delta\delta$ (NHamida) | |
|----------|---|-------------|--------------|--------------|---|--------------|-----------------------------|------|
| 1 | CH ₃ | -260.1 | -336.2 | 5 | CH ₃ | -273.7 | -335.6 | 13.7 |
| 2 | CH(CH ₃) ₂ | -260.1 | -336.2 | 6 | CH(CH ₃) ₂ | -269.9 | -339.1 | 9.8 |
| 3 | CH ₂ CH(CH ₃) ₂ | -259.3 | -336.3 | 7 | CH ₂ CH(CH ₃) ₂ | -271.3 | 336.4 | 12.0 |
| 4 | H | -274.4 | -349.7 | 8 | CH ₂ C ₆ H ₅ | -270.8 | -337.3 | |

En la Tabla 1.7 se presentan los desplazamientos químicos de ^{15}N de los compuestos **1-8** a diferentes valores de pH y temperatura. Es relevante notar que a pH de 7, se corroboran la pérdida de un protón imidazólico puesto que los núcleos de nitrógeno se desplazan a frecuencias altas comparados con sus respectivas sales (cerca de 3 ppm). Pero, a pHs de 8 y 9 no existe una tendencia como tal, ya que algunas señales no cambian y otras se desplazan hacia frecuencias diferentes (Tabla 1.7). Esto se puede atribuir al acomodo espacial de las moléculas, es decir menos restricción conformacional y más interacciones intermoleculares con el disolvente. Puesto que el DMSO-d6 no fue secado y presenta residuos de agua, en solución de la amida debe suceder el intercambio de los NH-imidazólicos y NH-amina con agua.

Tabla 1.7. δ de ^{15}N (ppm) **1-8** en DMSO-d6

| | Sin tratamiento térmico | | | | Con tratamiento térmico 115 °C | | |
|----------|-------------------------|--------|--------|--------|--------------------------------|--------|--------|
| | Sal | pH* | | | pH* | 7 | 8 |
| | | 7 | 8 | 9 | | | |
| 1 | -260.1 | -256.4 | -257.6 | -255.2 | -258.9 | -256.2 | -258.0 |
| 2 | -260.1 | -257.7 | | | -258.4 | -256.5 | -258.9 |
| | | | | | -258.3 | | |
| | | | | | -244.8 | | |
| 3 | -259.3 | -254.9 | -259.5 | -259.5 | | | |
| 4 | -274.4 | -270.2 | -271.5 | -273.1 | -272.3 | | |
| 5 | -273.7 | -271.4 | -273.1 | -270.2 | | | |
| 6 | -269.9 | -266.8 | -271.5 | -271.6 | | | |
| 7 | -271.3 | -273.2 | | | | | |
| 8 | -270.8 | -267 | -268.1 | -272.5 | | | |

* Los valores de pH fueron determinados antes de evaporar el disolvente acuoso.

Por otra parte, los pseudopéptidos **1**, **2** y **4** también se calentaron hasta 115 °C (Tabla 1.7). En el caso del compuesto **1**, las tres especies químicas participantes de los equilibrios ácido-base (diprotonada, monoprotonada y neutra) mostraron en la RMN de ¹⁵N dos señales en la región de los nitrógenos amida. Pero, los desplazamientos químicos tienen diferencias pequeñas con respecto a la muestra sin calentar ($\Delta\delta = 0.2$ a 2.1 ppm). Este resultado se puede atribuir a una pérdida ligera de la planaridad de la geometría trigonal del nitrógeno amídico. Así mismo, en los espectros de las muestras sometidas a temperatura elevada ya no se observan las señales correspondientes al grupo amonio.³⁹ Esto se debe a que a temperatura alta aumenta la velocidad de intercambio de los hidrógenos lábiles con la humedad del disolvente y puede llegar a suceder la pérdida de HCl. Por otra parte, la RMN muestra que el compuesto **2** se descompone después del tratamiento térmico. La integración de las señales de RMN de ¹H muestran la presencia de una aminoamida y otro compuesto. Sin embargo, en la RMN ¹⁵N se observa la presencia de dos nitrógenos amídicos. Así, la señal en -258.3 ppm corresponde a la aminoamida y la resonancia a -244.8 ppm podría atribuirse a la amida resultante de la hidrólisis del bencimidazol. Finalmente, la RMN de ¹⁵N de la amida derivada de glicina solo mostró una señal lo que indica que no hay restricción conformacional.

1.4.4 Estimación de las constantes de acidez del pseudopéptido **1**

Aunque los estudios de RMN en DMSO del compuesto **1** nos permitieron proponer el pH de formación del ligante didentado, la medición de los pKas son importantes porque nos dan información sobre las propiedades, químicas y bioquímicas del pseudopéptido.

De esta manera, en el presente trabajo se lograron determinar las constantes de acidez del pseudopéptido **1** por medio de la RMN de ¹H y ¹³C. Los espectros iniciales de RMN de ¹H y ¹³C se obtuvieron de una solución [0.1312 M] de **1** en D₂O. A esta muestra se le fue modificando el pH al adicionar NaOD [0.7580 M]. El pH inicial de la muestra fue de 3.25 y el pH final fue de 10.75.

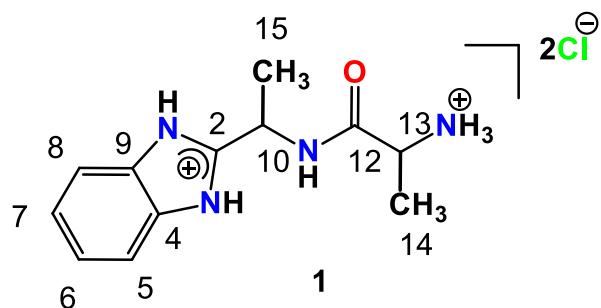


Figura 1.25. Numeración del compuesto **1**.

En los espectros de RMN de ^1H en D_2O se observan solo las señales para los hidrógenos enlazados a carbono porque los NH-imidazol, NH-amida y NH-amonio son lábiles. Para los hidrógenos aromáticos, solo se observan dos señales múltiples debido a la simetría del anillo imidazólico causada por los fenómenos tautoméricos del sistema que hace equivalentes a dos nitrógenos aromáticos. Así mismo, las señales de los hidrógenos metinos (H-10 y H-13) tienen una multiplicidad cuadruple y los metilo doble (Figura 1.26)

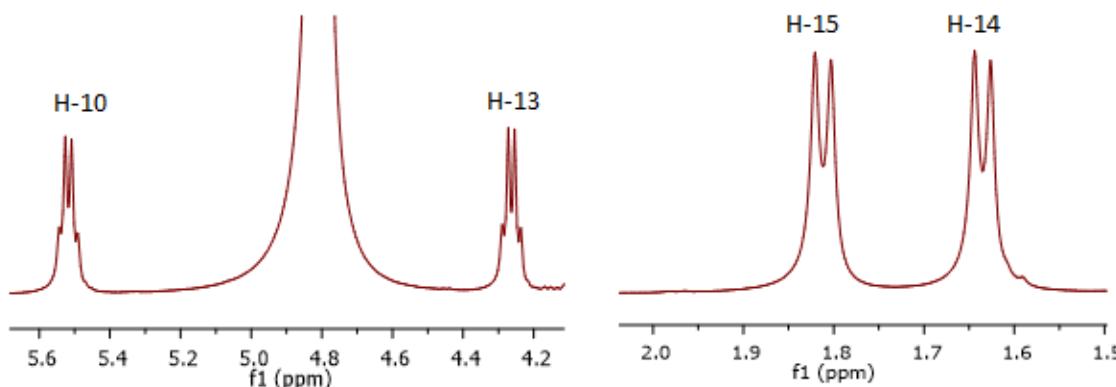


Figura 1.26. Espectros de RMN de ^1H en D_2O para el compuesto 1.

Para asignar correctamente los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se realizaron experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HETCOR.

En el espectro HETCOR para el compuesto 1, se muestra la correlación del C-15 (metilo) a frecuencias más altas que el C-14 (metilo), debido al efecto desprotector por parte del anillo imidazólico (Figura 1.27).

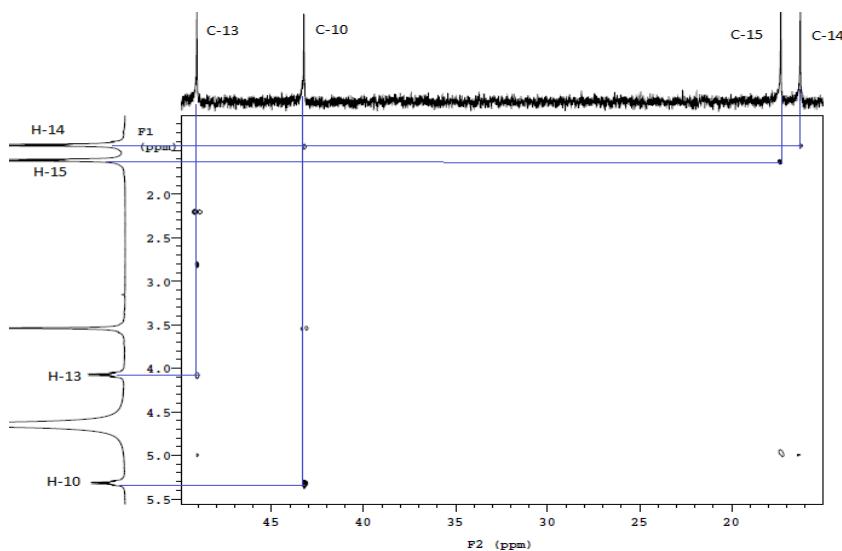


Figura 1.27. Experimento HETCOR para el compuesto 1.

En la Figura 1.28 Se muestran los espectros de RMN de ^1H del compuesto 1 a diferente pH. Con respecto a la especie bis-clorhidrato inicial todas las señales de los protones se desplazan a frecuencias bajas al aumentar el pH. Esto indica que la pérdida de los hidrógenos NH-imidazol y NH-amonio, cambia la acidez del pseudopéptido. Por lo tanto, tendríamos en el equilibrio a las especies monoprotonadas, diprotonadas y neutras como predominantes aunque siguen siendo lágiles los hidrógenos imidazol, amida y amonio.

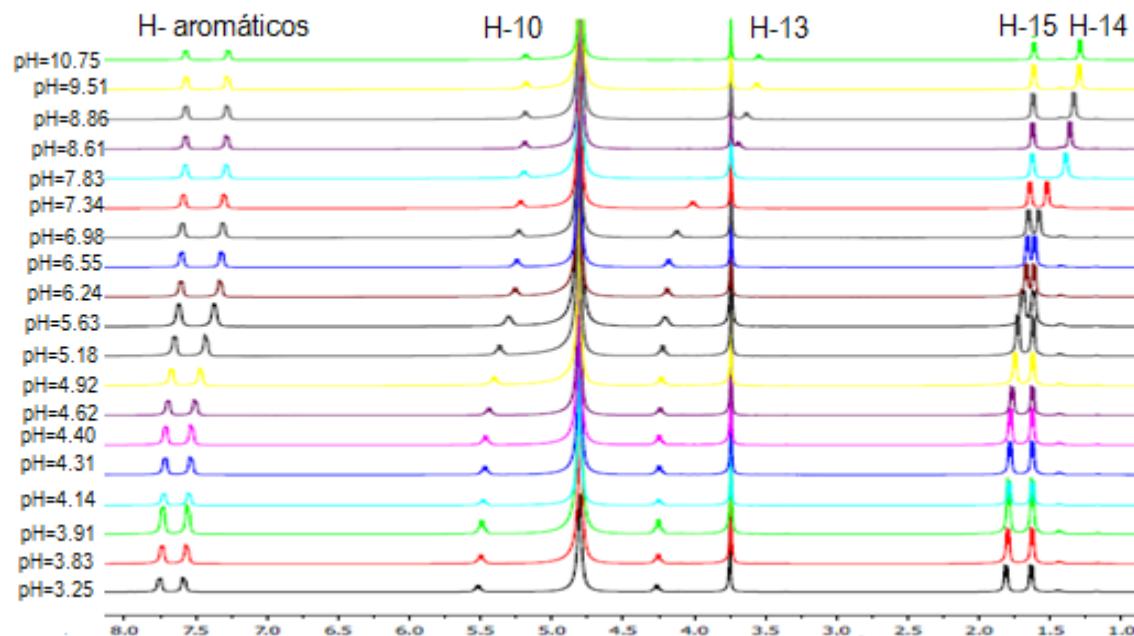


Figura 1.28. Espectros apilados de ^1H a diferentes pH's para el compuesto 1.

Por otra parte, en los espectros de RMN de ^{13}C se puede observar que conforme se aumenta el pH, las señales adyacentes a los nitrógenos imidazólicos se desplazan a frecuencias más altas. Esto se debe al aumento del efecto inductivo que ejercen los pares de electrones que se liberan al desprotonarse dichos nitrógenos (Figura 1.29).

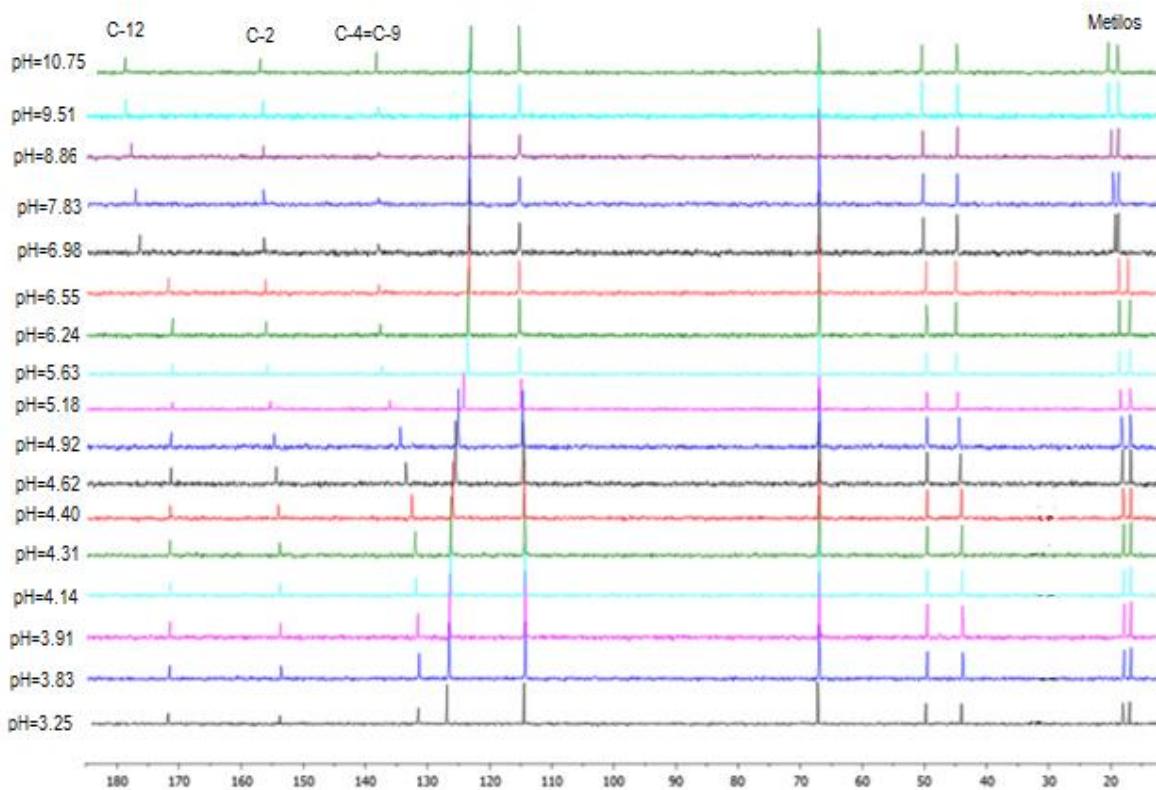


Figura 1.29. Espectros apilados de ^{13}C a diferentes pH's para el compuesto 1.

En la figura 1.28 se puede observar la dependencia de los desplazamientos químicos de los carbonos aromáticos C-4, C-9 con respecto a la variación del pH (3.25 a 6.50). En dicha gráfica se puede observar que de pH igual a 3.25 hasta 6.24 hay una variación considerable del desplazamiento químico de dichos núcleos ($\Delta\delta = 6.55$ ppm). Dicho comportamiento se puede explicar si se asume que éste es el primer sitio de desprotonación es en el anillo imidazólico.

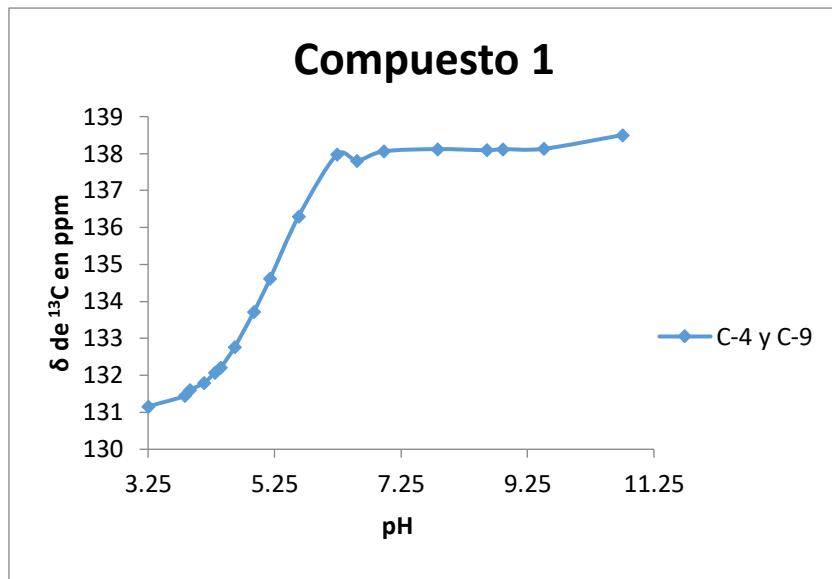


Figura 1.28. Gráfica de δ de ¹³C vs pH para C-4 y C-9 del compuesto 1.

Por otra parte, resultó interesante el cambio del desplazamiento químico de los grupos metilo (C-14 y C-15) porque se encontró que el efecto de la desprotección de los átomos de nitrógeno de la molécula afectan de manera diferente a estos núcleos. En la figura 1.29 se puede observar como cambia el desplazamiento de C-14 y C-15 con respecto al pH. Cuando se varía el pH de la solución desde 5.0 hasta 7.83 las señales de los metilos tienden a juntarse (el desplazamiento químico tiene tan solo una diferencia de $\Delta\delta= 0.53$). Sin embargo, a valores de pH por encima de 7.83 las señales tienden a separarse. Esto se puede atribuir a que el grupo amonio se desprotona cuando aumenta la basicidad del medio (Figura 1.30). Así, el efecto electroatractor fuerte que ejerce el par de electrones libres del nitrógeno desplazan hacia frecuencias altas al metilo vecino al grupo amino.

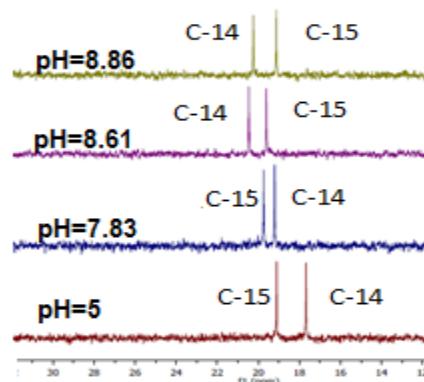


Figura 1.30. Espectros de RMN de ¹³C para el compuesto 1 a diferentes valores de pH.

Para asignar los núcleos de carbono de los grupos metilo fue necesario obtener los espectros COSY y HSQC del compuesto **1** a valores de pH de 7.0, 8.21 y 11.0.

Por medio de los espectros COSY se observó que las tendencias de los desplazamientos químicos de los metilos se mantienen a los diferentes pHs. Sin embargo, con los experimentos HSQC se demostró que el metilo geminal al nitrógeno amina está desprotegido por el aumento de la electronegatividad vecinal del nitrógeno amina. (Figura 1.32). El resultado muestra que el efecto de la desprotonación los desplazamientos químicos de los grupos metilo en RMN de ^1H , pero si en RMN de ^{13}C en donde su resonancia es más sensible al par de electrones libres.

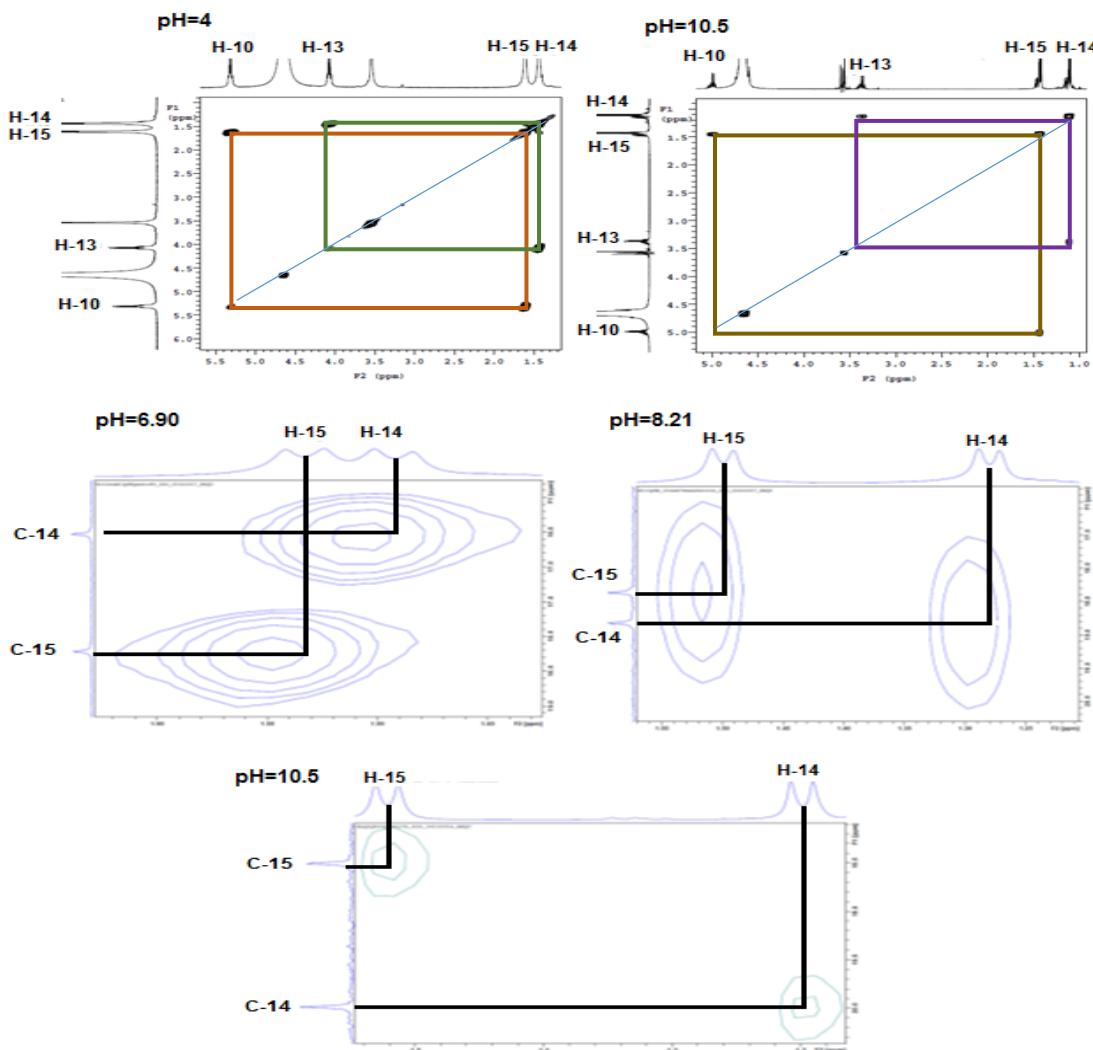


Figura 1.32. Experimentos COSY y HSQC para el compuesto **1**.

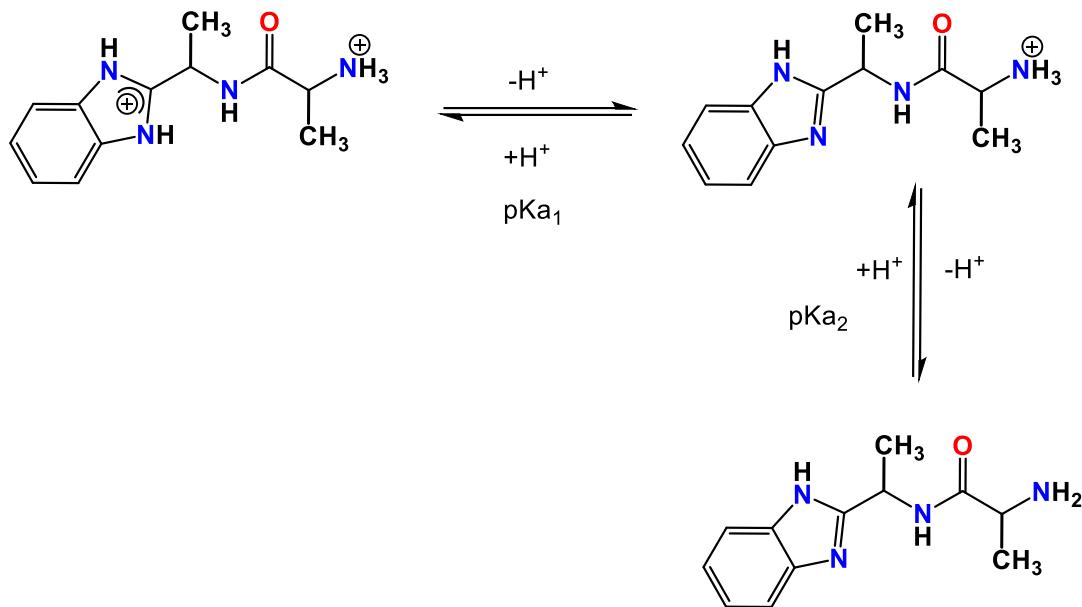
Después de asignar los espectros de RMN del pseudopéptido a diferentes valores de pH, se procesaron los datos de desplazamiento químico de C-2, con el programa WinEQNMR2.⁴⁰ De esta manera, se determinaron las constantes de acidez para el compuesto **1**. Para corroborar la medición de las constantes de acidez, también se trataron los datos de desplazamiento químico de los protones aromáticos (H-6 y H-7) [Tabla 1.8].

Para corroborar que los datos de pKa obtenidos por ¹³C y ¹H fueran equivalentes se realizó una prueba de contraste *F* para comprobar que no existe diferencia entre las desviaciones estándar, y posteriormente se realizó la comparación de las medias experimentales con un contraste *t*. Se encontró que para los valores de pKa₁, debido a los valores tan pequeños de desviación estándar (s), es imposible asegurar que los valores son equivalentes a pesar de su cercanía. Por otra parte, los valores de desviación estándar para el pKa₂ son muy grandes, por lo cual se concluye que los valores obtenidos por ¹³C y ¹H son equivalentes a pesar de tener mayor diferencia entre ellos (Tabla 1.8). Es importante mencionar que al hacer el análisis de χ^2 de los residuos en todos los casos se comprobó una distribución normal de estos, sugiriendo que no existe sesgo en el cálculo de los pKa's.

Tabla 1.8. Valores de pKa encontrados por el programa WinEQNMR2.

| Núcleo utilizado | pKa ₁ | Error (s) | <i>t</i> exp | <i>t</i> tab | pKa ₂ | Error (s) | <i>t</i> exp | <i>t</i> tab |
|------------------|------------------|-----------|--------------|--------------|------------------|-----------|--------------|--------------|
| C-2 | 4.975 | 0.0032 | | 81.70 | 2.50 | 8.333 | 0.2015 | |
| H-6 y H-7 | 5.064 | 0.0020 | | | | 8.020 | 0.1509 | 0.53 3.05 |

Con los datos obtenidos del comportamiento ácido-base de **1** se puede proponer que la primera desprotonación ocurre en el grupo N-H imidazólico. Por consiguiente, la segunda desprotonación corresponde al grupo amonio (Esquema 1.17).



Esquema 1.17. Equilibrios ácido-base en el compuesto 1.

1.4.5 Análisis cristalográfico de la especie monoprotonada de 1.

El clorhidrato del pseudopéptido 1 se fijó a un pH = 7.0 con hidróxido de sodio. Después, el medio acuoso fue evaporado y el sólido obtenido fue disuelto en MeOH para su cristalización. Así, la especie monoprotonada cristalizó en un sistema triclinico con un grupo espacial *P*-1 (Figura 1.33). El estudio detallado de la celda cristalina muestra que la estructura molecular del compuesto está estabilizada por un átomo de cloro y una molécula de agua. El grupo espacial (*P*-1) contiene un centro de inversión lo cual corrobora que 1 está constituida por una mezcla racémica (centros estereogénicos *R,S;S,R*).

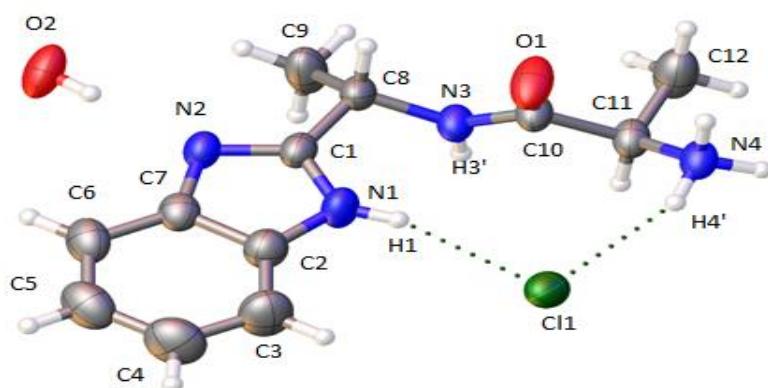


Figura 1.33. Estructura cristalina del compuesto 1 a pH = 7.

Asimismo, en la figura 1.33 se puede observar que el anillo imidazólico a pH = 7.0 se encuentra desprotonado. La presencia del par de electrones libre genera una interacción por puente de hidrógeno con una molécula de agua. Por su parte, el átomo de cloro interacciona con un hidrógeno imidazólico [2.389(17) Å] y con un hidrógeno del grupo amonio [2.360(3) Å] generando un pseudociclo con serie gráfica $S_2^1(10)$ (Figura 1.33).

Además, el átomo de cloro interacciona con un hidrógeno del grupo amonio de una molécula vecina generando especies pseudo-diméricas. Estas especies pseudo-diméricas dan lugar a la formación de anillos con series gráficas $R_4^2(8)$ y $R_4^2(20)$ (Figura 1.34).

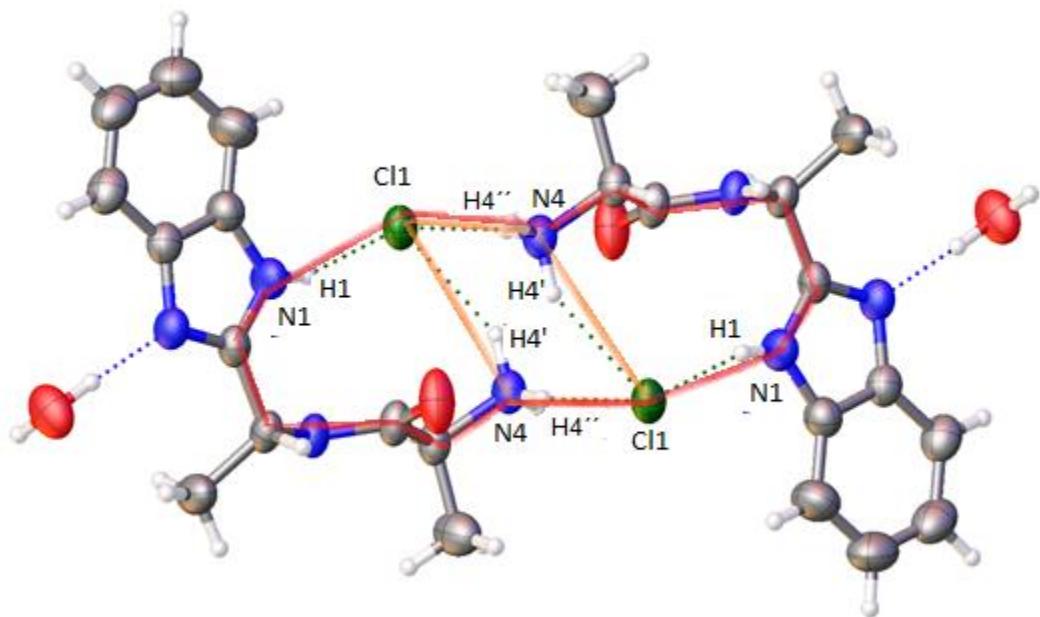


Figura 1.34. Especie pseudo-dimérica del compuesto 1 a pH = 7.

A continuación se muestra una comparación de la estructura del compuesto 1 a pH = 7 (monoprotonado) y de la sal del compuesto 1 (diprotonado) [Figura 1.35] reportada por Lechuga (Tabla 1.9).⁶

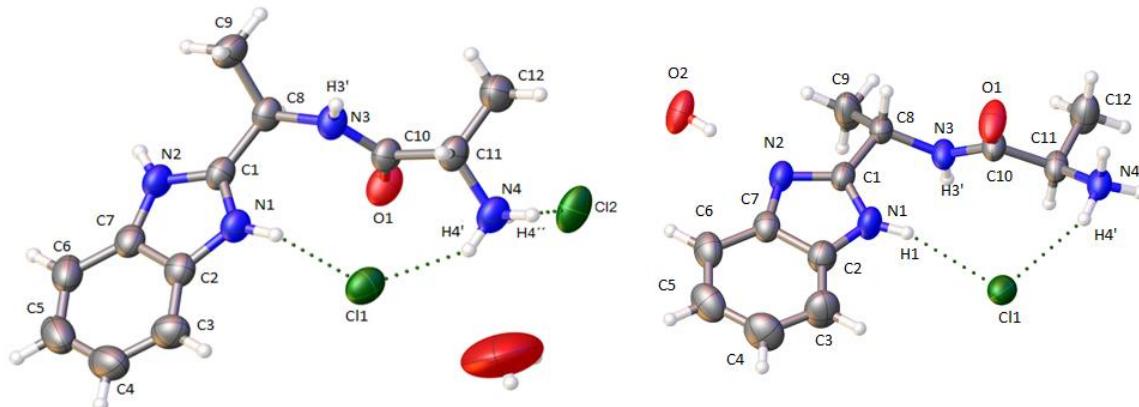


Figura 1.35. Estructura cristalina del compuesto **1** y **1** a pH=7.⁶

La sal del compuesto **1** presenta distancias N1-C1 y N2-C1 similares porque ambos átomos de nitrógeno están protonados. Por el contrario, la especie monoprotonada muestra distancias N1-C1 y N2-C1 ligeramente diferentes debido a la desprotonación del átomo de nitrógeno, N2. Sin embargo, en ambos casos el anillo imidazólico mantiene interacciones por puente de hidrógeno.

Tabla 1.9. Distancias de enlace en Å para el compuesto el bis-clorhidrato (sal) y el mono-clorhidrato (pH = 7) del compuesto **1**.

| | Sal | pH=7** |
|------------------|----------|-----------|
| N1-C1 | 1.326(3) | 1.349(2) |
| N2-C1 | 1.329(3) | 1.314(2) |
| C10-N3 | 1.333(3) | 1.340(2) |
| C10-O1 | 1.226(3) | 1.219(19) |
| H1 \cdots Cl1 | 2.277 | 2.389(17) |
| H4' \cdots Cl1 | 2.545 | 2.360(3) |

**El valor de pH fue determinado antes de evaporar el disolvente acuoso.

Al superponer las estructuras de rayos-X de la sal del compuesto **1** y del compuesto obtenido a pH=7 (figura 1.36), podemos observar que son similares. Los ángulos de enlace y ángulos de torsión de la sal muestran que ambas moléculas presentan conformación Z y geometría trigonal plana para los nitrógenos amida. El resultado corrobora el fenómenos de resonancia electrónica entre el par libre del nitrógeno con el enlace doble C=O (Tabla 1.10).

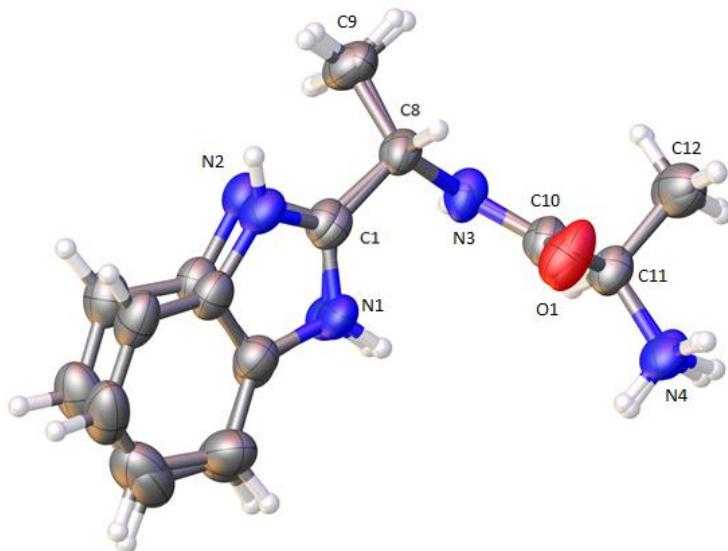


Figura 1.36. Estructura superpuesta del compuesto **1** y **1** a pH=7.

Tabla 1.10. Ángulos de enlace y torsión (en $^{\circ}$) para la especie bis-clorhidrado (sal) y la especie mono-clorhidrato de **1**.

| | Sal | pH = 7 |
|---------------|------------|-------------|
| H3-N3-C8 | 119.25(4) | 118.70(12) |
| C8-N3-C10 | 121.54(5) | 123.51(14) |
| H3-N3-C10 | 119.20(5) | 117.20 (12) |
| C8-N3-C10-O1 | 4.71(4) | 5.80(4) |
| C8-N3-C10-C11 | -174.24(4) | -171.00(2) |
| N3-C8-C1-N1 | 0.56(5) | 22.1(5) |
| N3-C8-C1-N2 | 179.93(5) | -158.78(16) |

Por otra parte, se realizaron cálculos teóricos del compuesto **1** (*R,S*) en conformación *E* y *Z* del grupo amida para conocer la energía electrónica. Los cálculos se realizaron con el programa GaussView⁴¹ con la base B3LYP nivel teórico 3-31G.

En la figura 1.36 se muestra la energía electrónica mínima sin corrección para la conformación *E* y *Z* del grupo amida. El confórmero *Z* tiene un valor de energía menor que el isómero *E*, y por lo tanto *Z* es la más estable. Este resultado coincide con los obtenidos por difracción de rayos-X y RMN.

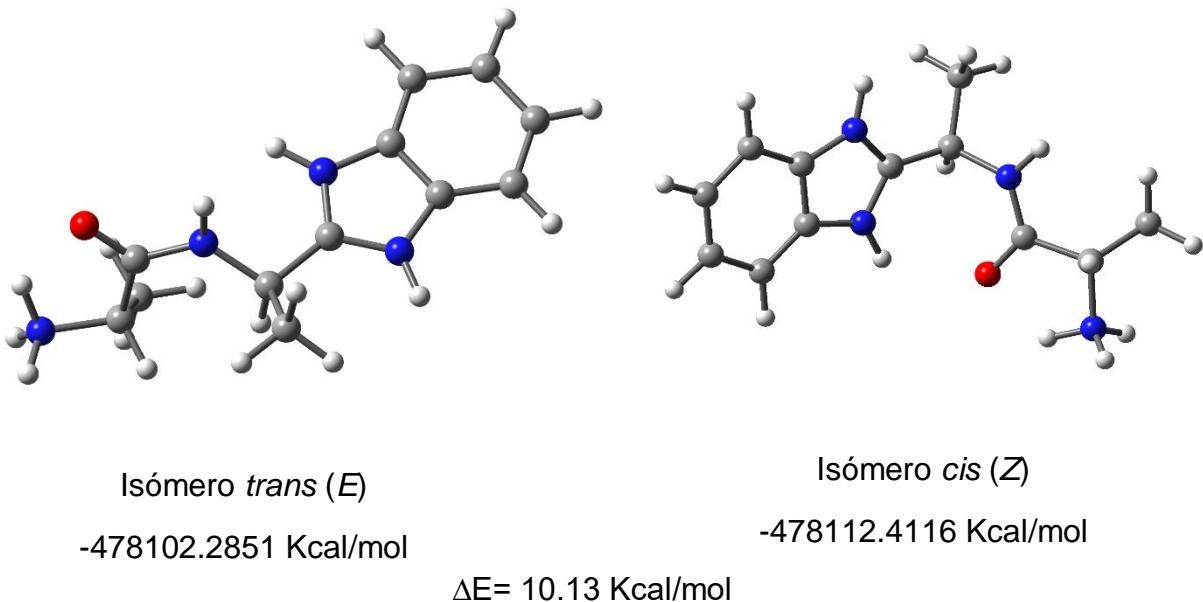


Figura 1.36. Energía de optimización del compuesto 1.

Tabla 1.11. Ángulos de enlace (en $^{\circ}$) y torsión teóricos de la conformación *Z* y *E* para el compuesto 1.

| | <i>E</i> | <i>Z</i> |
|---------------|----------|----------|
| H3-N3-C8 | 120.5194 | 118.675 |
| C8-N3-C10 | 119.1503 | 123.51 |
| H3-N3-C10 | 120.3255 | 117.168 |
| C8-N3-C10-O1 | 179.6947 | 1.137 |
| C8-N3-C10-C11 | 1.137 | 179.6947 |

1.5 Conclusiones

Se sintetizaron las aminoamidas **1-3** derivada de aminoácidos. El efecto estérico de los sustituyentes en **1-3** y **6, 7** se evidencio en los espectros de RMN de ^{13}C obtenidos en DMSO-d6. Así, el grupo isopropilo (**2** y **6**) genera repulsión estérica mayor que el isobutilo (**3** y **7**).

Del estudio del efecto del pH y temperatura sobre el comportamiento químico y físico de los compuestos **1-8** se estableció que a un pH mayor a 9.0 ó un tratamiento térmico de la muestra a 115°C, favorece la isomerización del grupo amida. La RMN de ^1H y ^{13}C en DMSO-d6 mostró los dos grupos señales correspondientes a los isómeros *Z* y *E*. La RMN de ^{15}N confirmó que la geometría de la amida es trigonal a pH ácido, pero a pH = 7.0 es factible que el nitrógeno pierda su planaridad. Asimismo, se demostró que se puede preparar la especie monoprotonada del pseudopéptido a pHs entre 6.5 – 8.0. Adicionalmente, es posible preparar al ligante neutro a pHs entre 8 y 9.

Se realizó un estudio de pH para el compuesto **1** y este proceso se siguió por RMN de ^1H y ^{13}C en D_2O (referencia 1,4 dioxano). Los datos obtenidos fueron procesados con el programa WinEQNMR2 para obtener los valores $\text{pK}_{\text{a}1}$ y $\text{pK}_{\text{a}2}$. Así, el $\text{pK}_{\text{a}1}$ corresponde a la desprotonación del nitrógeno imidazólico y el $\text{pK}_{\text{a}2}$ a la desprotonación del grupo amonio.

Se obtuvieron cristales del compuesto **1** a pH = 7. La difracción de rayos-X corroboró que el primer sitio de desprotonación ocurre en el anillo imidazólico.

Se calculó la energía electronica del compuesto **1** (*R,S*) con isomería *E* y *Z* de la amida. Los resultados mostraron que la conformación *cis* (*Z*) es la más estable, lo cual corrobora lo obtenido experimentalmente.

1.6 Desarrollo experimental

Síntesis del compuesto 1: diclorhidrato de 2-[(1*R*)-1-[(2*S*)-2-amoniopropanoil]amino}etil]-1*H*-bencimidazol-3-io.

Una mezcla de L-alanina (9.4768 g, 106.37 mmol) y o-fenilendiamina (5.0159 g, 46.40 mmol) se disolvió en 10.0 mL de HCl concentrado y 2 mL de agua desionizada. La mezcla se agitó y calentó hasta lograr la homogenización. El calentamiento se detiene al evaporarse el agua y el ácido, y obtener un líquido viscoso color café oscuro.

Posteriormente, la precipitación de **1** se indujo por la adición de metanol. El precipitado obtenido se filtró al vacío y se lavó con metanol, obteniéndose un sólido blanco-beige (3.5008g, 24.72%)

δ_H (400 MHz, DMSO-d6): 1.43 (3H, d, H-14), 1.70 (3H, d, H-15), 4.08 (1H, m, H-13), 5.38 (1H, m, H-10), 7.53 (2H, m, H-6 y H-7), 7.80 (2H, m, H-5 y H-8), 8.47 (5H, a, H-1, H-3 y NH_3^+), 9.66 (1H, d, H-11); δ_C (100 MHz, DMSO): 16.5 (C-14), 18.5 (C-15), 43.0 (C-10), 48.6 (C-13), 114.1 (C-5 y C-8), 125.8 (C-6 y C-7), 131.1 (C-4 y C-9), 154.5 (C-2), 170.2 (C-12); δ_N (40 MHz, DMSO-d6) -336.2 (NH_3^+), -260.1 (NHCO).

δ_H (400 MHz, D₂O, 1,4-dioxano): 1.63 (3H, d, H-14), 1.81 (3H, d, H-15), 4.26 (1H, m, H-13), 5.52 (1H, m, H-10), 7.58 (2H, m, H-6 y H-7), 7.75 (2H, m, H-5 y H-8); δ_C (100 MHz, D₂O, 1,4-dioxano): 17.0 (C-14), 18.0 (C-15), 44.0 (C-10), 49.8 (C-13), 114.4 (C-5 y C-8), 127.0 (C-6 y C-7), 131.2 (C-4 y C-9), 153.7 (C-2), 171.78 (C-12).

Síntesis del compuesto 1 a pH=7: clorhidrato de 2-[(1*R*)-1-[(2*S*)-2-amoniopropanoil]amino}etil]-bencimidazol-3-io.

Se pesaron 0.5077 g (1.6651 mmol) del compuesto **1** y se disolvieron en 2 mL de agua desionizada. Posteriormente, ésta solución se llevó a un pH= 6.99 con una solución de NaOH 2M. Después, el agua se evaporó con aire, y el sólido resultante se lavó con MeOH.

Se obtuvo un sólido cristalino de color amarillo claro (0.314 g, 70.26%). El producto se recristalizó con MeOH.

δ_H (400 MHz, DMSO-d6): 1.38 (3H, d, H-14), 1.54 (3H, d, H-15), 3.87 (1H, m, H-13), 5.16 (1H, m, H-10), 7.14 (2H, m, H-6 y H-7), 7.51 (2H, m, H-5 y H-8); δ_C (100 MHz, DMSO): 17.8 (C-14), 20.0 (C-15), 43.9 (C-10), 48.9 (C-13), 121.7 (C-6 y C-7), 155.8 (C-2), 170.4 (C-12); δ_N (40 MHz, DMSO-d6) -256.4 (NHCO).

δ_H (400 MHz, D₂O, 1,4-dioxano): 1.59 (3H, d, H-14), 1.66 (3H, d, H-15), 4.13 (1H, m, H-13), 5.24 (1H, m, H-10), 7.31 (2H, m, H-6 y H-7), 7.60 (2H, m, H-5 y H-8); δ_C (100 MHz, D₂O, 1,4-dioxano): 17.5 (C-14), 18.9 (C-15), 45.2 (C-10), 50.0 (C-13), 115.4 (C-5 y C-8), 123.6 (C-6 y C-7), 138.1 (C-4 y C-9), 156.3 (C-2), 171.9 (C-12).

Síntesis del compuesto 2: diclorhidrato de 2-[(1*R*)-1-[(2*S*)-2- amoniometilbutanoil]amino]-2-metilpropil]-1*H*-bencimidazol-3-*io*

Una mezcla de *L*-valina (12.4585 g, 106.35 mmol) y *o*-fenilendiamina (5.0081 g, 46.37 mmol) se disolvió en 10 mL de HCl concentrado. La mezcla se agitó y calentó hasta lograr la homogenización. El calentamiento se detuvo al evaporarse el ácido, y obtener un líquido viscoso color café.

Posteriormente, la precipitación se indujo por la adición de metanol. El precipitado obtenido se filtró al vacío y se lavó con metanol, obteniéndose un sólido blanco (1.237 g, 7.39%)

δ_H (400 MHz, DMSO-d6): 0.97 (3H, d, H-19), 0.98 (3H, d, H-15), 1.01 (1H, m, H-18), 1.02 (1H, d, H-16), 2.13 (1H, m, H-14), 2.65 (1H, d, H-17), 3.97 (1H, m, H-13), 5.28 (1H, m, H-10), 7.54 (2H, m, H-6 y H-7), 7.82 (2H, m, H-5 y H-8), 8.57 (5H, a, H-1,H-3, NH₃⁺), 9.48 (1H, d, H-11); δ_C (100 MHz, DMSO): 17.3 (C-19), 18.1 (C-18), 18.3 (C-15), 18.5 (C-16), 29.3 (C-14), 30.6 (C-17), 52.7 (C-10), 57.6 (C-13), 114.0 (C-5 y C-8), 125.8 (C-6 y C-7), 131.0 (C-4 y C-9), 152.8 (C-2), 169.6 (C-12); δ_N (40 MHz, DMSO-d6) -336.2 (NH₃⁺), -260.1 (NHCO).

Síntesis del compuesto 3: diclorhidrato de 2-[(1*R*)-1-[(2*S*)-2- amoniometilpentanoil]amino]-3-metilbutil]-1*H*-bencimidazol-3-*io*

Una mezcla de *L*-leucina (4.1905 g, 31.94 mmol) y *o*-fenilendiamina (1.5040 g, 13.91 mmol) se disolvió en 12 mL de HCl concentrado y 4 mL de agua desionizada. La mezcla se agitó y calentó hasta lograr su homogenización. El calentamiento se detuvo al evaporarse el agua y el ácido obteniéndose un líquido viscoso de color café oscuro.

Posteriormente, la precipitación se indujo por la adición de metanol. El precipitado obtenido se filtró al vacío, y se lavó con metanol, obteniéndose un sólido blanco (2.1078 g, 38.92%)

δ_H (400 MHz, DMSO-d6): 0.84 (3H, d, H-17), 0.86 (3H, d, H-20), 0.91 (3H, d, H-16), 0.93 (3H, d, H-21), 1.62 (1H, m, H-15), 1.77 (1H, d, H-19), 1.98 (2H, m, H-14, H-18), 3.95 (1H, m, H-13), 5.31 (1H, m, H-10), 7.53 (2H, m, H-6 y H-7), 7.80 (2H, m, H-5 y H-8), 8.55 (5H, a, H-1,H-3, NH₃⁺), 9.76 (1H, d, H-11); δ_C (100 MHz, DMSO): 20.5 (C-16), 22.2 (C-20), 22.6 (C-17), 23.09 (C-21), 24.0 (C-15), 24.3 (C-19), 39.5 (C-14), 40.5 (C-18), 45.6 (C-10), 51.3 (C-13), 114.0 (C-5 y C-8), 125.8 (C-6 y C-7), 131.0 (C-4 y C-9), 154.1 (C-2), 170.0 (C-12); δ_N (40 MHz, DMSO-d6) -336.3 (NH₃⁺), -259.3 (NHCO).

1.7 Referencias

- 1.- Kunal, K.; Divya, A.; Seung, Y. L.; Cummings E. J.; Knudson S. E.; Richard, A. S.; Iwao, O.; *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 3318–3326.
- 2.- Özgür, D. C.; Ümide, D. Ö.; Zafer, A. K.; Öztürk, Y.; *Arch. Pharm. Res.* 2009, 32, 9, 1293-1299.
- 3.- Alasmary F. A. S.; Snelling, A. M.; Zain E. M.; Alafeefy, M. A.; Awaad S. A.; Karodia, N.; *Molecules* 2015, 20, 15206-15223.
- 4.- Maekawua, K.; Ohtani, J. *Agr. Biol. Chem.* 1977, 41, 811-818.
- 5.- Xiao-Na, Li; Hong-Yong, Zhou; Lei, F.; Kai, D.; Jia-Xi, W.; *Appl. Organomet. Chem.* 2012; 26; 168-174.
- 6.- Lechuga, I. V. D.; Tesis de licenciatura; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; Mineral de la Reforma; 2014.
- 7.- Carey, F. A; *Química Orgánica*, sexta edición; México; McGraw Hill; 2006.
- 8.- Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure* quinta edición, Nueva Jersey, John Wiley & Sons, 2001.
- 9.- Meshram, H. M.; Reddy, G. S.; Reddy, M. M.; Yadav, J. S.; *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 4103-4106.
- 10.- Hargreaves, M. K.; Pritchard, J. G.; Dave, H. R.; *Chem. Rev.* 1970, 70, 439-440.
- 11.- Pattabiraman, R. V.; Bode, W. J.; *Nature* 2011, 480, 471-479.
- 12.- Nordstrøm, L. U.; Vogt, H.; Madsen, R.; *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 17672–17673
- 13.- Huanfeng, J.; Bifu, L.; Yibiao, L.; Azhong, W.; Huawen, H.; *Org. Lett.* 2011, 13 (5), 1028–1031
- 14.- Perreux, L.; Loupy, A.; Volatron, F.; *Tetrahedron*. 2002, 58, 2155.
- 15.-Mirza, A. M.; Ganjikhsh, N.; Mahdieh, M. T.; Boukherroub, R.; *Ultrason. Sonochem.* 2016, 32, 37–43
- 16.- Avila, M. C.; Tapia, B. A. R.; Falcón, L. M.; Ariza, C. A.; Tlahuext, H.; Tlahuextl, M.; *J. Mol. Struct.* 2015, 1100, 338-347
- 17.- Falcón, L. M. P.; Tesis de doctorado; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; Pachuca de Soto, 2014.

- 18.- Troganis, A. N.; Sicilia, E; Barbarossou, K.; Gerohanassis, I. P.; Russo, N.; J. Phys. Chem. A. 2005, 109, 11878-11884.
- 19.- Bisceglia, J. A.; Tesis de doctorado; Universidad de Buenos Aires; Buenos Aires; 2014.
- 20.-Reyes, B. M. A.; Barneto, J. L.; Bravo, J. L.; Cintas, P.; Jiménez, J. L.; Palacios, J. C.; J. Org. Chem. 2001, 66, 7275-7282
- 21.- Curran, D. P.; Hale, G. R.; Geib, S. J.; Balog, A.; Cass, Q. B.; Degani, G. A. L.; Hernandes, M. Z.; Freitas, G. L. C.; Tetrahedron: Asymmetry, 1997; 8; 23; 3955-3975.
- 22.- Susumu, K.; Norihiko, T.; Hidetsugu, T.; Tetsuta, O.; Hideaki, N.; Hideyo, T.; Tetrahedron Lett. 2016; 57; 2395–2398.
- 23.- Ito, A.; Sato, M.; Yamasaki, R.; Okamoto, I.; Tetrahedron Lett. 2016; 57; 438–441.
- 24.- Nguyeng, K.; Iskander, M.; Rabenstein, D. L.; J. Phys. Chem. B. 2010; 114; 3387-3392.
- 25.- Pederson, B. E; Pederson, B.; Tetrahedron Lett. 1956, 2995-3001.
- 26.- Itai, A.; Toriumi, Y.; Saito, S.; Kagechika, H.; Shudo, K.; J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 10649-10650.
- 27.- Stewart, W. E.; Siddall III T. H.; Chem. Rev. 1970, 70 (5), 517-551.
- 28.- Yamasaki, R.; Tanatani, A.; Azumaya, I.; Saito, S.; Yamaguchi, K.; Kagechika, H.; Org. Lett. 2003; 5 (8); 1265-1267
- 29.- Ito, A.; Muratake, H.; Shudo, K.; J. Org. Chem., 2013, 78 (11), 5470–5475.
- 30.- Bezençon, J.; Wittwer, M. B; Cutting, B.; Smiesko, M.; Wagner, B.; Kansy, M.; Ernst, B.; J. Pharm. Biomed. Anal. 2014, 93, 147–155.
- 31.- Sierra, Z. A.; Galán V. C. A.; Tapia, B. R.; J. Mex. Chem. Soc. 2002, 46, 2, 125-130.
- 32.- Sari, H.; Covington, A. K.; J. Chem. Eng. Data 2005, 50, 1425-1429.
- 33.- Bryantsev, V. S.; Diallo, M. S.: Goddard III, W. A.; J. Phys. Chem. A 2007, 111, 4422-4430
- 34.- Bunkowsky, G.; Sack, I.; Limbach, H. H.; Kling, B.: Fuhrhop, J.; J. Phys. Chem. B 1997, 101, 11265-11272.
- 35.- Barfield M.; Fagerness, P.; J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 8699-8711.

- 36.- Semenov, V. A.; Samultsev, D. O.; Krivdin, L. B.; Magn. Reson. Chem. 2015, 53, 433–441.
- 37.- Lambert, J. B.; Mazzola, P. E.; Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods, Primera Edición, New Jersey, Financial Times Prentice Hall, 2003.
- 38.- Aguilar, C. L.; Tlahuextl, M.; Tapia, B. A. R.; Alvarado, R. J. G.; Structural Chemistry, 2004, 15, 3, 215-221.
- 39.- Shinji, Y.; J. Org. Chem. 1996, 61, 941-946.
- 40.- Hynes, M. J.; J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1993, 311-312.
- 41.- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Milliam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Stain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Gead-Gordon, M.; Reprogle, E. S.; Pople, J. A.; Gaussian 98, revision A.11; Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 2001.

CAPÍTULO II: INFLUENCIA DEL ZINC Y DEL pH EN LA FORMACIÓN DEL ADUCTO DERIVADO DE PSEUDOPÉPTIDO Y ACRILONITRILO

2.1 Introducción

La química de coordinación desempeña un papel relevante en los procesos bioquímicos. Los diferentes procesos químicos involucrados en el metabolismo de las células no podrían efectuarse sin la presencia de iones metálicos tales como: Cu(II), Cd(II), Ni(II) y Zn(II).¹⁻² Por ejemplo, los complejos ternarios formados por iones metálicos y aminoácidos (o péptidos) son considerados como modelos de las interacciones sustrato-metal, metal-enzima, así como de algunas interacciones bioquímicas.³

Se sabe que el zinc es uno de los metales esenciales para los humanos y animales. La deficiencia de este elemento está asociada a problemas como el hipogonadismo, así como de disfunciones neurológicas y defectos de crecimiento.^{4,5} Se han reportado más de 300 enzimas donde el átomo de Zn tiene una función importante, ya sea como catalizador, co-catalizador o como estabilizante estructural.⁶

Por otra parte, se ha demostrado que los sitios reactivos de las metalo-enzimas contienen residuos de histidina en donde el Zn(II) se coordina a los grupos imidazólicos.^{7,8} Por lo cual, el estudio de complejos que contengan grupos imidazólicos o bencimidazólicos se ha vuelto un tema muy importante para la explicación química y biológica de las interacciones metal-enzima y del rol de los metales en el cuerpo humano.⁷

En la literatura se ha reportado que la presencia de Zn(II) en las metalo-enzimas desempeña un rol inhibitorio en la adición de acrilonitrilo a los residuos de histidina presentes en los centros reactivos de las enzimas.¹⁰ Por esta razón, el estudio de la reactividad de los grupos imidazoles y aminas frente al acrilonitrilo es importante en la síntesis de compuestos nuevos.⁹

En este capítulo se presenta la síntesis y estructura del complejo de zinc derivado de la alanina (**1a** en la figura 2.1), la estimación de la constante de acidez del pseudopéptido en presencia del ZnCl₂ y el estudio de la influencia del zinc en las adiciones 1,4 del pseudopéptido en el acrilonitrilo.

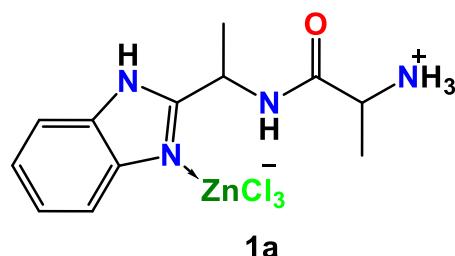


Figura 2.1. Estructura del compuesto **1a**.

2.2 Antecedentes

El estudio de compuestos de coordinación biológicamente importantes, como la hemoglobina y las metalo-enzimas, ha sido de gran importancia en la química y, en particular, en la comprensión del papel que juegan estos compuestos en el metabolismo de los seres vivos.¹¹⁻¹²

El imidazol y bencimidazol son ligantes con actividad biológica relevante.¹³ Por ello han sido usados para formar diversos complejos metálicos y se han hecho estudios estructurales, de reactividad y actividad biológica.

2.2.1 Complejos metálicos derivados de bencimidazoles.

El bencimidazol tiene similitud estructural con compuestos derivados de la purina. Además, los grupos bencimidazólicos están presentes en compuestos con actividad biológica como la vitamina B₁₂.^{2,14}

Por esta razón, el bencimidazol ha formado complejos de V(V), Cr(II), Cr(III), Cu(II), Zn(II), Ni(II), Au(I) y Mn(II).^{1,9-10,15-18} Estos compuestos han sido estudiados ampliamente por su aplicación posible en farmacología, en la fabricación de dispositivos emisores de luz y en la fabricación de materiales nuevos.^{15,19-17}

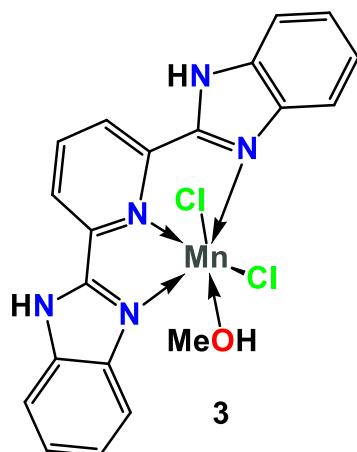


Figura 2.2. Estructura de un compuesto de manganeso birrefringente¹⁹

Por otra parte, los complejos de coordinación derivados del 2-(aminometil)bencimidazol (2AMBZ) presentan propiedades relevantes.²⁰ Por ejemplo, los complejos ternarios en donde participan 2AMBZ y ácidos dicarboxílicos tienen actividad antihistamínica.¹³ Así, la síntesis de estos compuestos es importante porque ellos pueden servir como fármacos nuevos con propiedades antibacteriales, antitumorales, fungicidas o citotóxicas (figura 2.3).^{2,13,20-21}

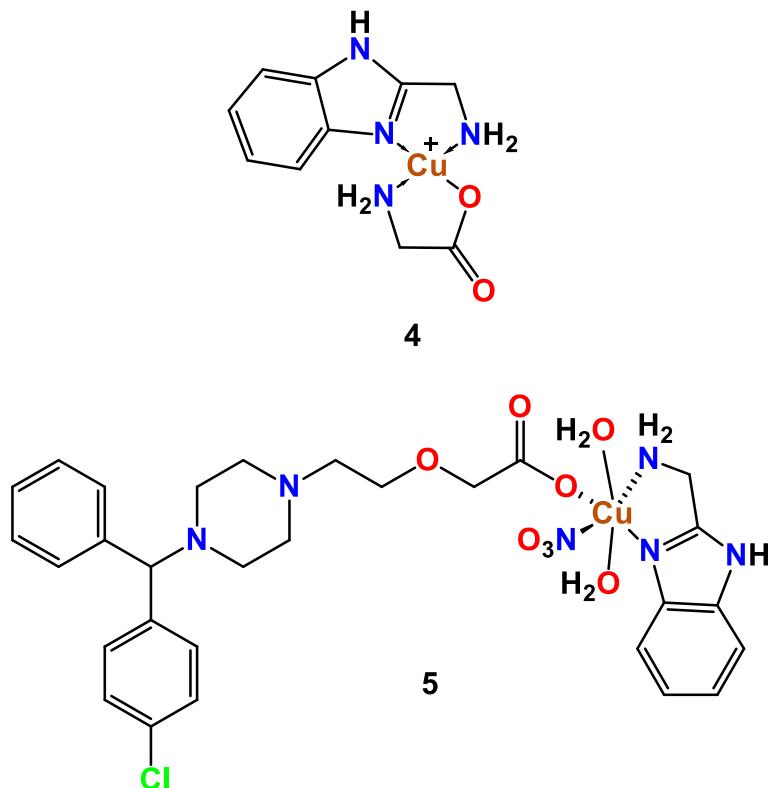
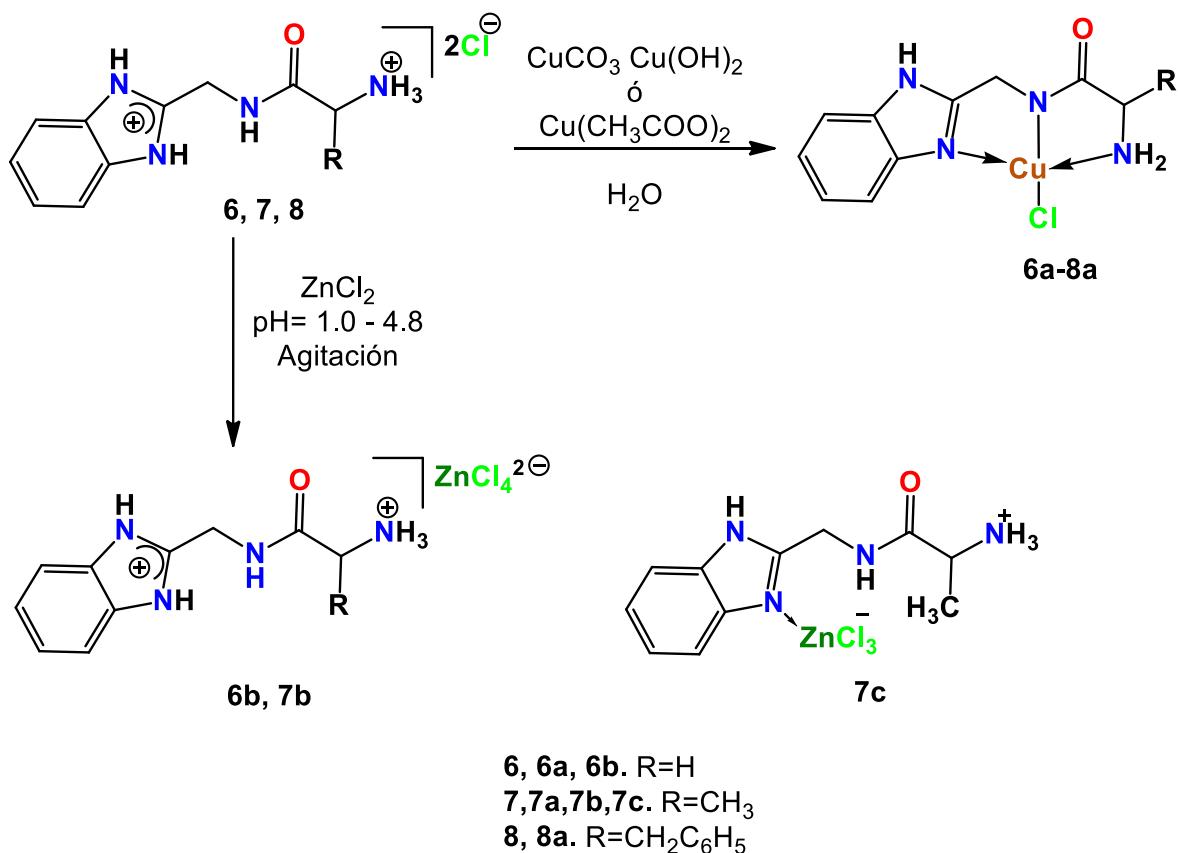


Figura 2.3. Estructura molecular de compuestos de coordinación derivados de **2AMBZ** con propiedades antibacterial (4) y fungicidas (5).^{2,20}

2.2.2 Complejos de Cu(II) y Zn(II) derivados de bencimidazoil aminoamidas.

Como se ha mencionado arriba, los complejos de coordinación derivados de amino-amidas pueden llegar a tener propiedades químicas relevantes y útiles en campos diversos de la tecnología, medicina y ciencia. Por esta razón, desde hace tiempo en nuestro grupo de trabajo tenemos interés en la síntesis de estos compuestos. Así, Falcón y colaboradores reportaron la síntesis y estudio estructural de complejos de Cu(II) y Zn(II) derivados de bencimidazoil aminoamidas que contienen un carbono quiral.⁹

Los complejos de Cu **6a-8a** fueron obtenidos a partir de las amino amidas y sales de cobre como: CuCO₃, Cu(OH)₂ y Cu(CH₃COO)₂ en medio acuoso y en un rango de pHs de 2.5 a 4.0 (Esquema 2.1). De este modo, el estudio cristalográfico de **6a** y **8a** mostró que en estos compuestos el átomo de cobre tiene una geometría cuadrada plana distorsionada, con enlaces covalentes con un átomo de cloro y el nitrógeno amídico. También, se observó que la presencia de una molécula de agua en la celda cristalina es importante porque estabiliza la estructura supramolecular y que la presencia de interacciones puente de hidrógeno intermoleculares (N-H \cdots O-H \cdots O=C) da lugar a pseudo-ciclos.



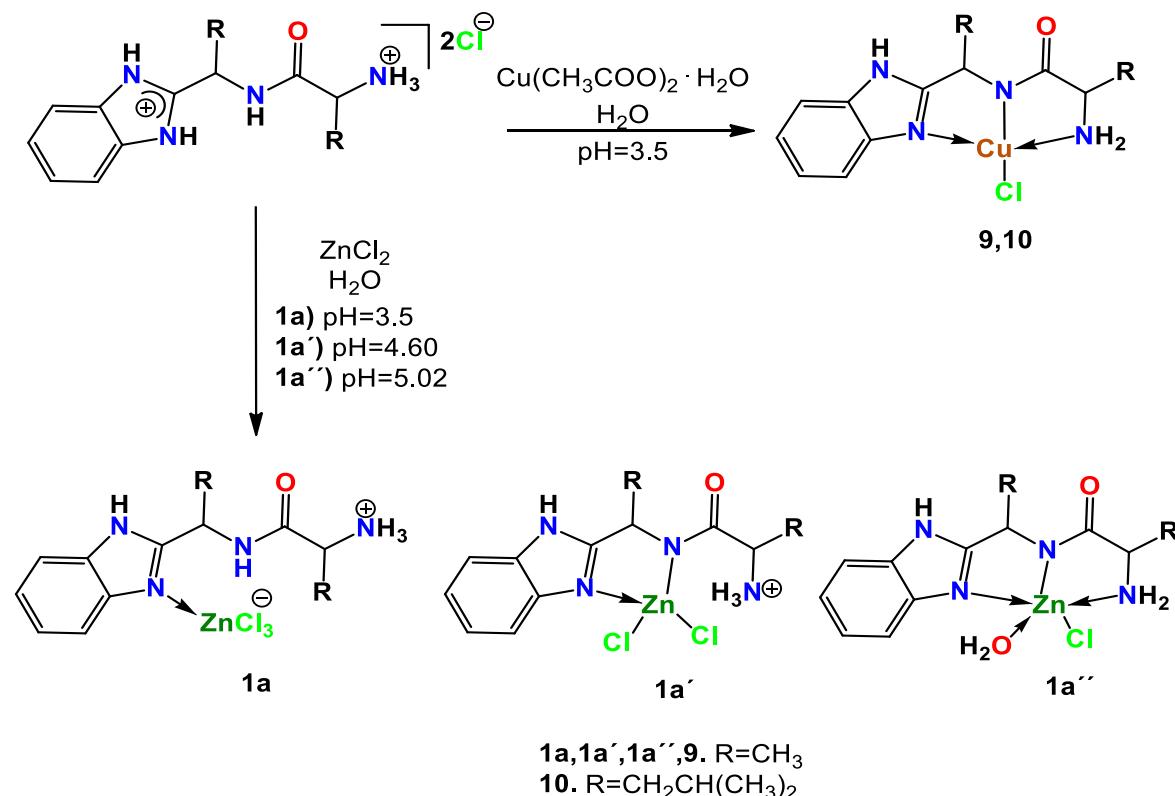
Esquema 2.1. Síntesis de compuestos de Cu y Zn reportados por Falcón.⁶

Para obtener a los compuestos de zinc, se llevaron a cabo las reacciones de las aminoamidas con ZnCl_2 y en medio acuoso en un rango de pH de 1.0 a 4.8. En estas condiciones de reacción se formaron principalmente las sales de aminoamidas **6b-8b** en donde el contraión correspondió al tetraclorozincato (Esquema 2.1). La difracción de rayos X mostró que para los compuestos **6b** y **7b** existen interacciones intermoleculares por puente de hidrógeno a través de los átomos de cloro del ion tetraclorozincato con la aminoamida protonada. Esto da lugar a estructuras moleculares con estructuras pseudocíclicas de nueve miembros ($\text{N}-\text{H}_{\text{imidazol}}^{\bullet\bullet\bullet}\text{Cloro}\bullet\bullet\text{H}-\text{N}_{\text{amida}}$). Sin embargo, el análisis por RMN de ^{13}C y difracción de rayos-X de los cristales que se obtuvieron de la reacción de la aminoamida derivada de la alanina con ZnCl_2 (a pH=3.5) mostraron la formación del compuesto **7c**. En esta molécula, el átomo de zinc se encuentra unido a un nitrógeno imidazólico mediante un enlace de coordinación (Esquema 2.1). Así mismo, la estructura cristalina de este compuesto está estabilizada por la presencia de una molécula de agua que genera pseudo-ciclos de diez y trece miembros ($\text{C}-\text{H}\bullet\bullet\text{Cl}\bullet\bullet\text{H}-\text{N}_{\text{amonio}}$).

Asimismo, Lechuga y colaboradores reportaron la estructura cristalográfica de los complejos de cobre **9** y **10** derivados de aminoamidas con dos centros de

quiralidad.¹ Estos complejos se obtuvieron haciendo reaccionar las amino-amidas correspondientes con acetato de cobre monohidratado en medio acuoso. Dichos autores encontraron que la formación de los complejos de Zn es dependiente del pH. Es importante hacer notar que la formación de los enlaces N→Cu ocurre a un pH ácido de 3.5 (Esquema 2.2). La estructura de rayos X del complejo **9** es similar a las estructuras reportadas por Falcon.⁹ En esta molécula el átomo de cobre está enlazado covalentemente con un átomo de cloro y con los nitrógenos amídico e imidazólico forma enlaces de coordinación. Una vez más, la presencia de una molécula de agua estabiliza la estructura cristalina mediante interacciones puente de hidrógeno.

Por otro lado, Lechuga también describe la síntesis de complejos de zinc obtenidos a diferentes valores de pH (3.5 - 5.02) [Esquema 2.2].¹ La propuesta de estructura molecular para los complejos **1a** reportada por dicho autor se basó en función de los datos de RMN de ¹H y ¹³C e infrarrojo. Sin embargo, ahora sabemos que los cloruros de pseudopéptido se encuentran en equilibrio ácido-base dependiendo del pH (capítulo 1 de esta tesis). Por tal razón, el pH del medio puede causar cambios en el desplazamiento químico de los núcleos y no da certeza de que el átomo de zinc forma parte de la estructura. Así, en este capítulo se retoma este trabajo para revisar y reproducir los resultados de reactividad de los pseudopéptidos con el cloruro del zinc y el pH.



Esquema 2.2. Síntesis de compuestos de Cu y Zn reportados por Lechuga.¹

2.2.3 Reacciones de adición aza-Michael

La reacción de adición aza-Michael ha sido de gran importancia ya que a través de ella se sintetizan productos naturales biológicamente activos, así como precursores de antibióticos, intermediarios farmacéuticos y β -amino alcoholes.²²

Se sabe que compuestos con grupos funcionales como las aminas e imidazoles son susceptibles a llevar a cabo reacciones de adición 1,4, con etilenos conjugados como el acrilonitrilo.⁹ También, algunos aminoácidos como la histidina, cisteína y valina pueden llevar reacciones de adición 1,4 con acrilonitrilo y acrilamida (Figura 2.4).²³

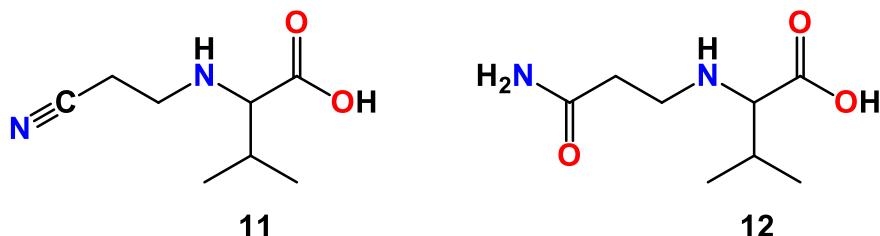


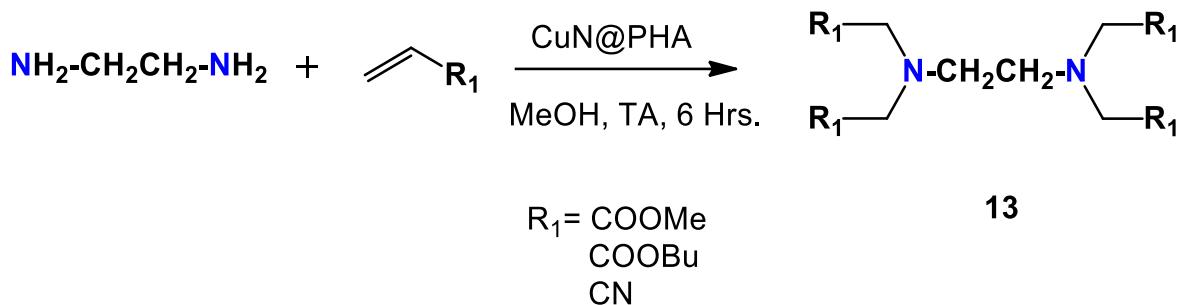
Figura 2.4. Productos de adición de valina hacia acrilonitrilo (**11**) y acrilamida(**12**).²³

Por otra parte, se ha documentado que en las metalo-enzimas de Zn los nitrógenos imidazólicos de los residuos de histidina no reaccionan con el acrilonitrilo. Pero, en los grupos amino de residuos como la lisina si se lleva a cabo la reacción de adición.⁹⁻¹⁰

2.2.3.1 Reactividad de aminas hacia acrilonitrilo.

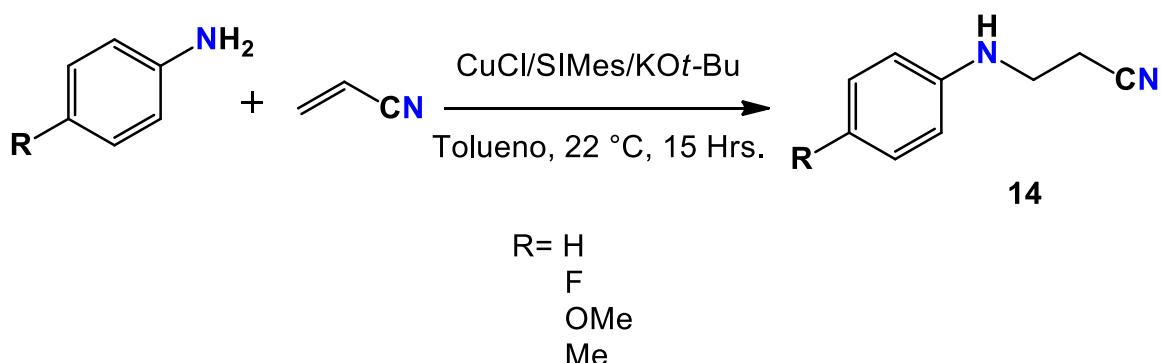
En la literatura se encuentran diversos reportes de adiciones de acrilonitrilo hacia aminas primarias y secundarias. Por lo cual se citan los trabajos más recientes sobre este tema.

Mandal *et al* llevaron a cabo la reacción de adición aza-Michael de aminas primarias como la etilendiamina y aminas secundarias hacia compuestos α,β -insaturados como el acrilonitrilo, acrilato de metilo y acrilato de butilo.²² La reacción es catalizada por biocelulosa basada en un complejo de cobre con ácido polihidroxámico (Esquema 2.3).



Esquema 2.3. Reacciones de adición de la etilendiamina hacia acrilonitrilo, acrilato de metilo y acrilato de butilo.²²

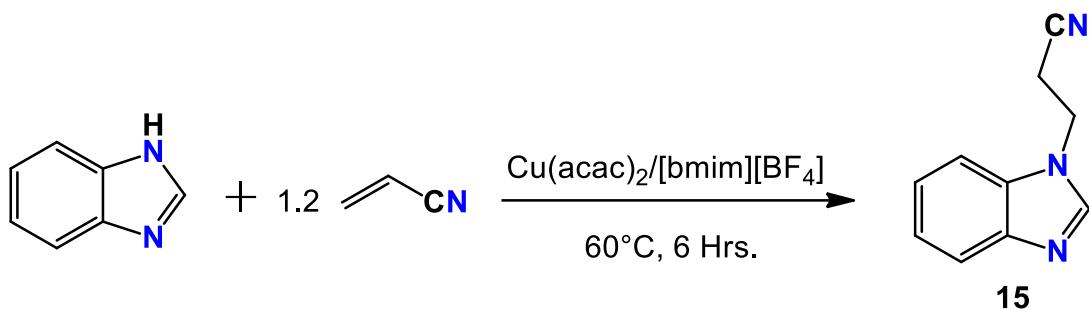
Por su parte Kim *et al* estudiaron la reacción de adición aza-Michael de aminas aromáticas hacia acrilonitrilo y otras olefinas α,β -insaturadas.²⁴ En este trabajo dichos autores reportaron que al efectuar las reacciones en presencia de CuCl, se pueden obtener rendimientos mayores a comparación con otras condiciones de reacción reportadas (Esquema 2.4).



Esquema 2.4. Reacciones de adición de anilinas hacia acrilonitrilo.²⁴

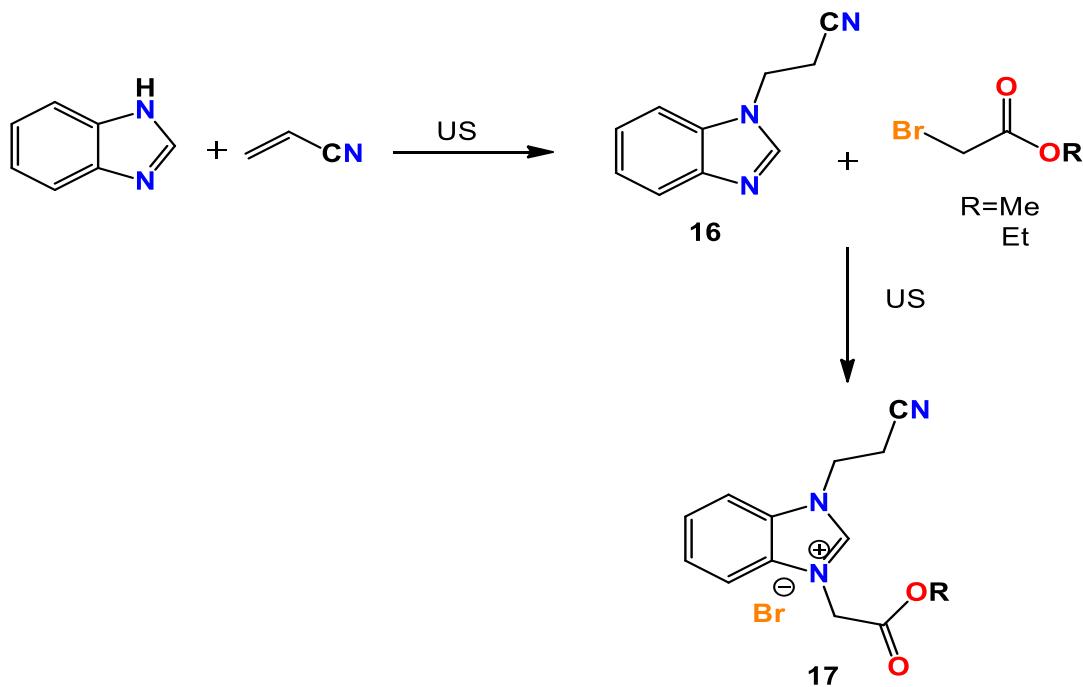
2.2.3.2 Reactividad de bencimidazol hacia acrilonitrilo.

El bencimidazol, al poder actuar como nucleófilo, se ha utilizado para la formación de aductos con acrilonitrilo. Se ha reportado que este tipo de procesos necesitan compuestos metálicos y líquidos iónicos como promotores de esta reacción (Esquema 2.5).²⁵



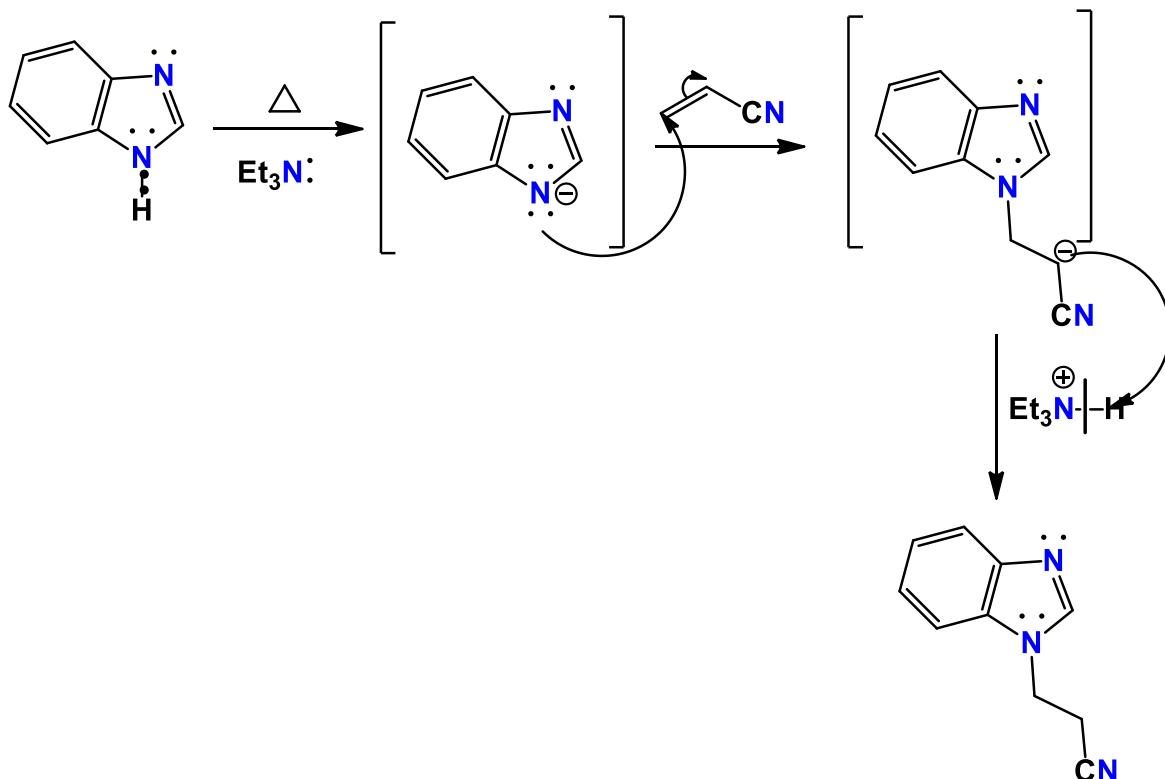
Esquema 2.5. Reacciones de adición del bencimidazol hacia acrilonitrilo.²⁵

Recientemente, técnicas como el ultrasonido y microondas han ayudado a hacer más eficientes a estas reacciones.²⁶⁻²⁷ Así, Zbancioc y colaboradores reportaron la síntesis de sales de imidazolio, comparando los rendimientos y tiempos de reacción cuando se aplica ultrasonido (US) y cuando se lleva la reacción a temperaturas elevadas.²⁶ Entre los derivados de imidazol utilizados, se encuentra el bencimidazol. El primer paso de la reacción es la adición del acrilonitrilo. Posteriormente, el aducto se hace reaccionar con bromo acetato de etilo, o de metilo, para generar la sal de imidazolio correspondiente (Esquema 2.6). Cuando se usa ultrasonido la adición sucede hasta el 90% en tan solo dos horas de reacción. Al efectuarse el proceso a altas temperaturas se utiliza tolueno como disolvente y trietilamina como catalizador. El rendimiento de la reacción no se ve afectado bajo estas condiciones, aunque, los tiempos se amplían hasta 36 horas.



Esquema 2.6. Síntesis de sales de imidazolio reportad por Zbancioc et al²⁶

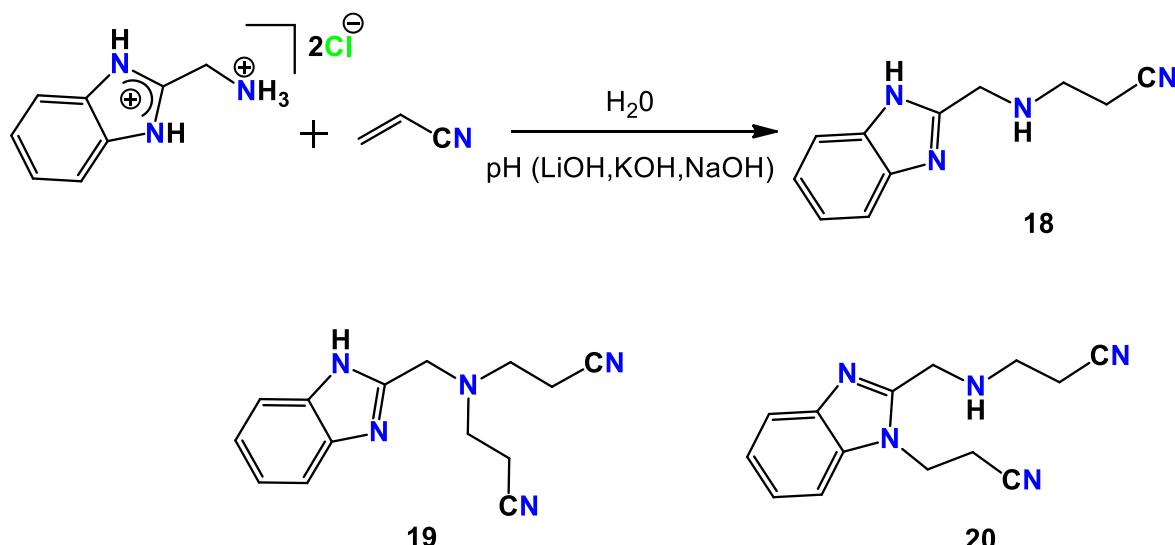
Tambien, dichos autores sugieren que al utilizar temperaturas altas, y trietilamina como catalizador, el enlace N-H se rompe heterolíticamente formando el ion imidazolio. Así, el anión puede atacar nucleofilicamente al acrilonitrilo formando un carbanión sobre el átomo de carbono en posición alfa al grupo nitrilo. Por último, el amonio formado cederá un protón para neutralizar al aducto correspondiente (Esquema 2.7).



Esquema 2.7. Mecanismo de reacción de la adición del bencimidazol hacia acrilonitrilo propuesto por Zbancioc y colaboradores.²⁶

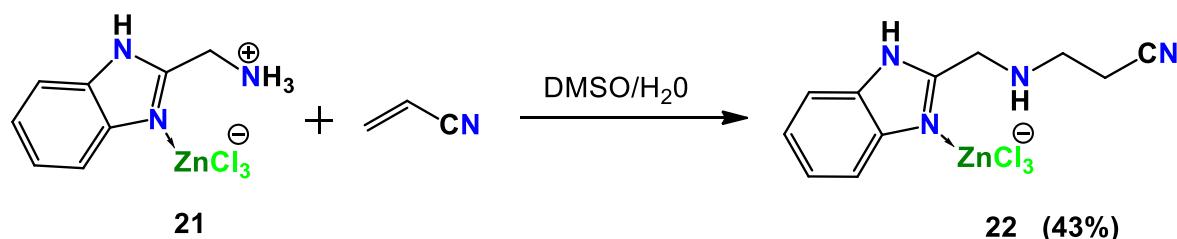
Uno de los tópicos más estudiados sobre los proceso de aza-adición se refiere al efecto que tienen sobre esta reacción la presencia de iones metálicos. De este modo, Falcon *et al* reportaron la influencia de iones metálicos (como Na^+ , K^+ y Li^+) en la adición del 2AMBZ hacia acrilonitrilo en agua.⁹ Sin embargo, dichos investigadores encontraron que estos iones solo son especies químicas espectadores en el proceso y que variables como el pH tienen relevancia significativa en la reacción (Esquema 2.8). Así, en la RMN de ^{13}C y ^1H se puede observar que a pH = 3.8 se forma el monoadducto **18**, con rendimientos del 7%. Pero, a pH = 6.8 se forman el monoadducto **18** y los diaductos **19** y **20**. Aunque, bajo estas condiciones solo se pudo separar el diaducto **19**.

Por otra parte, cuando se utiliza como medio de reacción una mezcla de DMSO/H₂O, y un pH=7.8, se obtiene al monoadducto **18** (con rendimiento del 62%). Si bien, a pH = 3.5 en la mezcla DMSO/D₂O no sucede la reacción de aza-adición.



Esquema 2.8. Síntesis de productos de adición del cloruro del 2-AMAZ hacia acrilonitrilo.⁹

Finalmente, estos autores también informaron sobre la reacción del complejo de zinc **21** con acrilonitrilo. De este modo, al llevar a cabo la reacción en agua, solo se obtiene un 27% del mono-aducto **22** y materia prima sin reaccionar. Al cambiar el disolvente por una mezcla DMSO/H₂O el rendimiento aumenta hasta el 43% (Esquema 2.9). Con esto se concluyó que la coordinación del Zn (II) al 2AMAZ, promueve la adición del grupo amino hacia el acrilonitrilo y no permite una segunda adición en los nitrógenos imidazólicos



Esquema 2.9. Reacción de complejo 21 con acrilonitrilo.

Como fue demostrado por Falcón y colaboradores el Zn juega un rol importante en los procesos de aza-adición. Al parecer, este comportamiento químico es importante en sistemas biológicos. Esto hace que el estudio de la aza-adición

sobre sistemas peptídicos sea relevante. Por esta razón, en el presente capítulo se mostrará el estudio de la síntesis del complejo de zinc derivado de la alanina, el análisis de los datos de RMN y difracción de rayos-X, la estimación de la constante de acidez del pseudopéptido en presencia del $ZnCl_2$ y el estudio de la influencia del zinc en las adiciones 1,4 del pseudopéptido en acrilonitrilo.

2.3. Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Estudiar la influencia que ejerce la coordinación del Zn(II) y el pH en los procesos de aza-adición de un pseudopéptido con dos carbonos quirales sobre el acrilonitrilo.

2.3.2 Objetivos Específicos

Sintetizar y caracterizar por RMN de ^1H y ^{13}C a los complejos de zinc **1a** y **2a** obtenidos a partir de los pseudopéptidos derivados de la alanina.

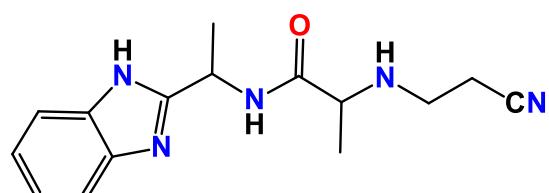
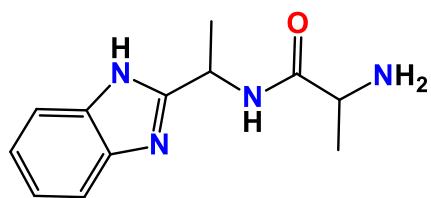
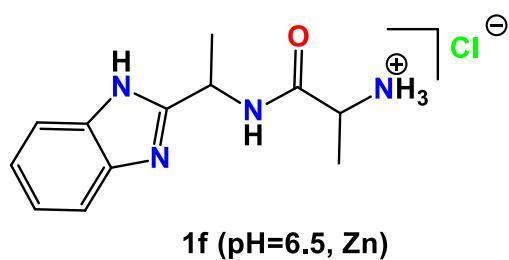
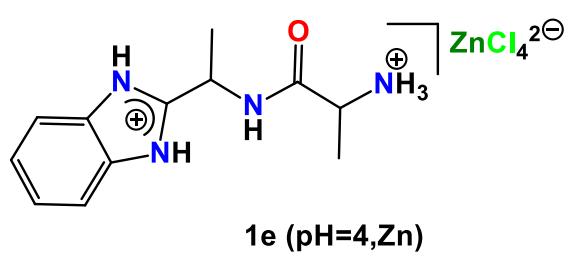
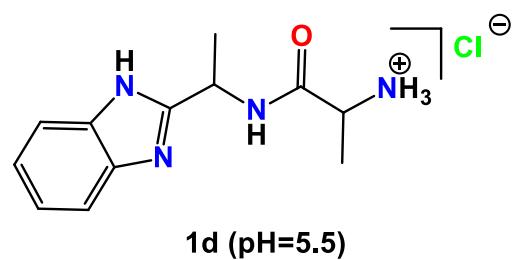
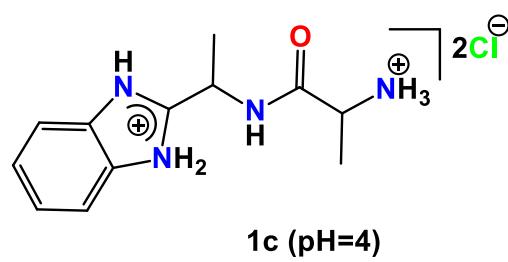
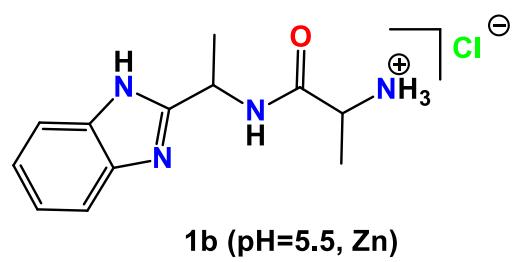
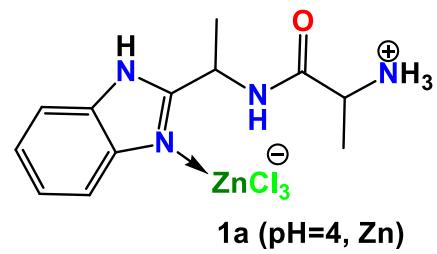
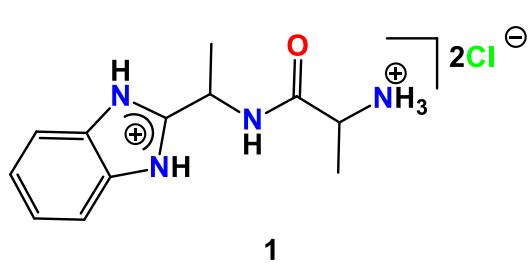
Estimar las constantes de acidez de los complejos **1a** y **2a** por RMN de ^1H y ^{13}C utilizando D_2O como disolvente.

Realizar las reacciones correspondientes para estudiar la influencia del Zn(II) y del pH del medio en las aza-adiciones del pseudopéptido **1** sobre el acrilonitrilo.

Determinar la estructura molecular de los aductos obtenidos en el proceso de aza-adición por medio de la RMN de ^1H y ^{13}C .

2.4 Discusión de Resultados

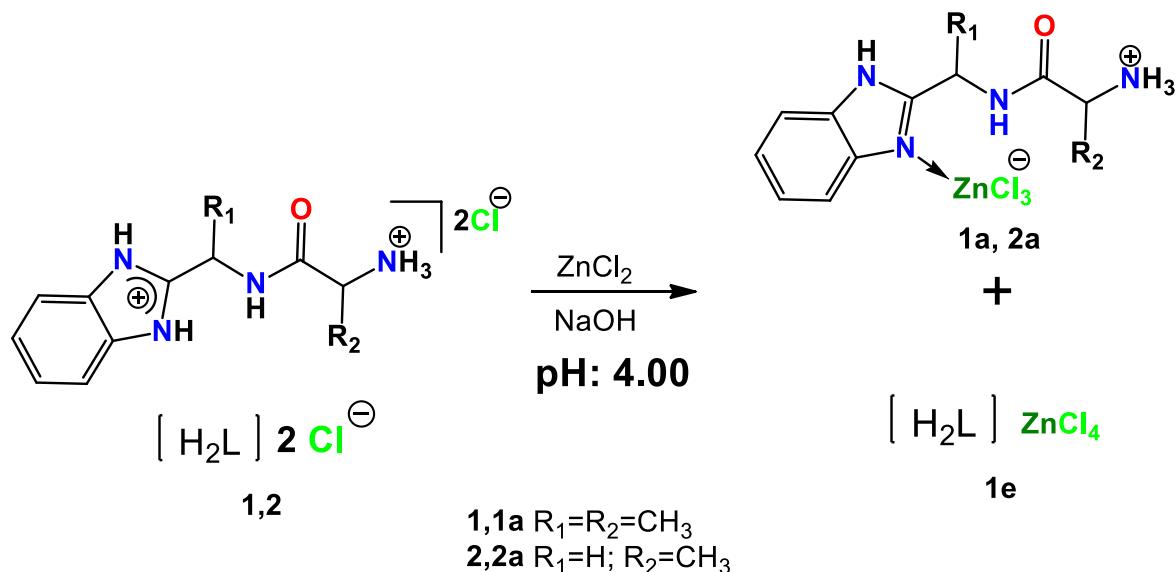
Para facilitar y no hacer repetitiva la información y figuras, a continuación se muestra la numeración, así como las estructuras de materias primas y productos.



1Pb. (pH=5.5, Zn)
 1Pd. (pH=5.5)
 1Pf. (pH=6.1, Zn)
 1Pg. (pH=10.75)

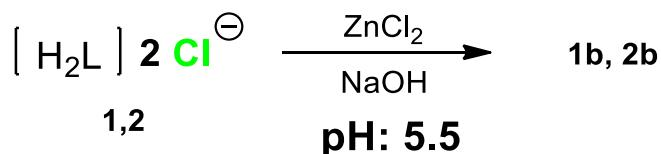
2.4.1 Estudio de la Síntesis de los complejos de Zn derivados de alanina a pH = 4 y pH = 5.5.

Los complejos de zinc **1a** y **2a** se prepararon a partir de la solución 0.10 M de la sal de pseudopéptido y 0.01 M de cloruro de zinc titulada con NaOH 1.0 M hasta pH de 4. El disolvente de reacción se evaporó y los sólidos se disolvieron en MeOH:H₂O para obtener los cristales de **1a** y **1e** (Esquema 2.10).



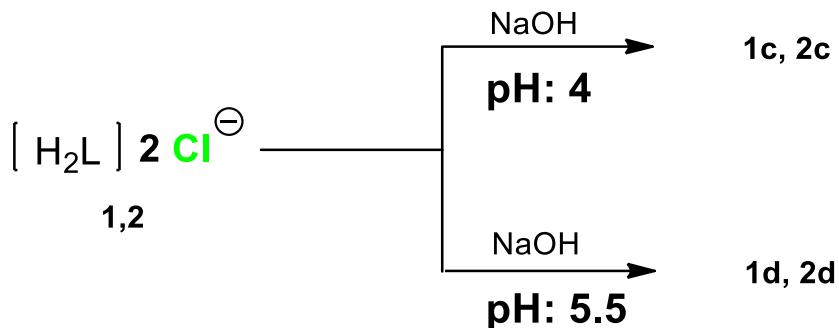
Esquema 2.10. Síntesis de los compuestos **1a-1e** y **2a**.

La mezcla de ZnCl_2 0.10 M y el bis-clorhidrato del pseudopéptido **1** (o **2** en su debido caso) llevó hasta $\text{pH} = 5.5$ con el NaOH 1.0 M. Después de evaporar el disolvente se obtuvo el complejo correspondiente **1b** (o **2b**) (Esquema 2.11).



Esquema 2.11. Síntesis de los compuestos **1b** y **2b**.

Por otra parte, tanto los bis-clorhidratos del pseudopéptido **1** (como los de **2**) se titularon con NaOH 1.0 M hasta dejar la mezcla de reacción a pH = 4 y 5.5 en ausencia ZnCl₂ para obtener los sólidos amorfos **1c**, **2c**, **1d** y **2d** respectivamente (Esquema 2.12).



Esquema 2.12. Síntesis de los compuestos **1c, 2c** y **1d-2d**

Todos los productos **1a-1d** fueron caracterizadas por RMN de 1H y ^{13}C en MeOD y D_2O . De este modo, los compuestos **1b** y **2b** fueron ligeramente solubles en MeOD. El dato de la poca solubilidad de **1b** y **2b** indica que estos compuestos tienen mayor polaridad que las materias primas. Además, la presencia de centros donadores (N-H) y aceptores (Cl⁻) de puentes de hidrógeno fomenta la presencia de interacciones intermoleculares que disminuyen la solubilidad de estos compuestos.

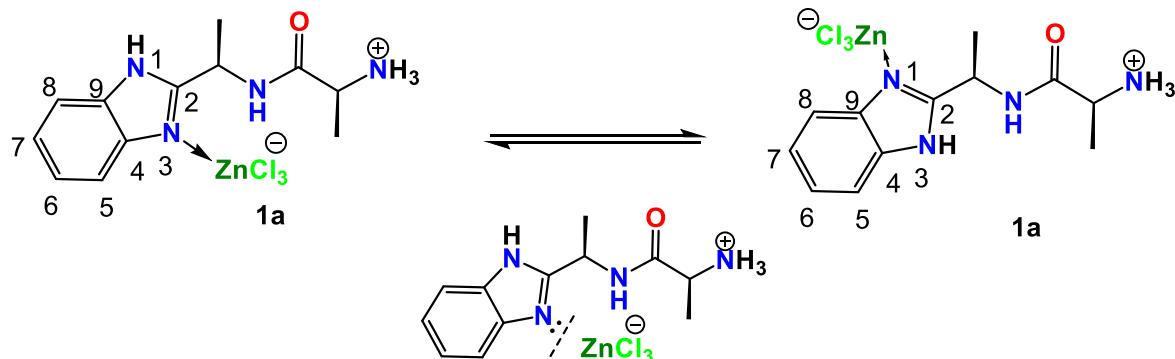
2.4.2 Estudio por RMN de ^{13}C de los complejos de Zn derivados de alanina a pH = 4 y pH = 5.5.

La RMN de ^{13}C en D_2O de complejo **1a** (compuesto que contiene dos carbonos quirales y fue obtenido a pH=4) mostró solo cuatro señales para el anillo bencimidazólico. Esto se debe a que el enlace de coordinación N→Zn es lábil y en solución están presentes los equilibrios $C=N_{\text{aromático}} \rightleftharpoons ZnCl_3 \rightleftharpoons C=N_{\text{aromático}} + ZnCl_3$. Así mismo, este proceso de formación y ruptura del enlace de coordinación es un proceso lento que permite el equilibrio tautomérico $HN-C=N \rightleftharpoons N=C-NH$ sobre el anillo imidazólico. Los desplazamientos químicos de los carbonos C-2 y C-4 (= C9) del bencimidazol de **1a** (con Zn) se desplazan hacia frecuencias más altas (0.7 – 1.8 ppm) que los homólogos de **1c** (no contiene Zn). Esto se atribuye a que en el equilibrio el átomo de Zn se enlaza al nitrógeno imidazólico. Por lo tanto, la electronegatividad de estos nitrógenos aumenta y desprotegen a los carbonos adyacentes (Tabla 2.1, Esquema 2.13). La interacción del átomo de zinc con los nitrógenos imidazólicos en **1a** se corrobora porque los desplazamientos químicos de C-2, C4 (= C9) y C6 están a frecuencia más alta que los del bis-clohidrato del pseudopéptido **1** (pH = 3.25). En la tabla 2.1 se puede observar que los núcleos de carbono del metino, metilo y carbonilo de **1**, **1a** y **1c** tienen desplazamiento químico similares, y por lo tanto, el grupo amonio se mantiene preferentemente protonado en estas condiciones de reacción.

Tabla 2.1. δ de ^{13}C (ppm) en D_2O de los compuestos **1**, **1a** y **1c**.*

| Compuesto | pH | C-2 | C-4 y C-9 | C-6 y C-7 | C-5 y C-8 | C-10 | C-12 | C-13 |
|-----------|------|-------|-----------|-----------|-----------|------|-------|------|
| 1a | 4.00 | 154.6 | 133.6 | 125.8 | 114.8 | 44.4 | 171.6 | 49.8 |
| 1c | 4.00 | 153.9 | 131.8 | 126.7 | 114.5 | 44.1 | 171.7 | 49.8 |
| 1 | 3.25 | 153.7 | 131.2 | 126.9 | 114.4 | 44.0 | 171.8 | 49.8 |

*Referencia: 1,4-dioxano



Esquema 2.13. Equilibrio tautomérico del compuesto **1a**

Los datos de RMN de ^{13}C de **2a** (molécula que contiene Zn) y **2c** (no contiene Zn) demuestran que el átomo de zinc prácticamente no interacciona con el pseudopéptido (diferencia máxima de 0.6ppm). (Tabla 2.2 y Figura 2.5)

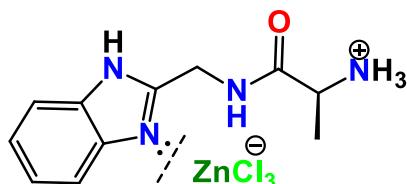


Figura 2.5. Compuesto **2a** en solución.

Tabla 2.2. δ de ^{13}C (ppm) en D_2O de los compuestos **2a** y **2c**.*

| Compuesto | pH | C-2 | C-4 y C-9 | C-6 y C-7 | C-5 y C-8 | C-10 | C-12 | C-13 |
|--------------------|----|-------|-----------|-----------|-----------|------|-------|------|
| 2a (con Zn) | 4 | 150.2 | 131.8 | 126.8 | 114.5 | 36.3 | 172.4 | 49.8 |
| 2c | 4 | 150.4 | 132.3 | 126.5 | 114.7 | 36.4 | 172.4 | 49.8 |

*Referencia: 1,4-dioxano

Los desplazamientos químicos en la RMN de ^{13}C de los sólidos amorfos **1b** y **1d** (obtenidos a pH = 5.5) mostraron una diferencia pequeña ($\Delta\delta = 0.4$) entre ellos (Tabla 2.3). Esto indicaría que al aumentar la concentración de iones hidroxilo se

pierde la coordinación $\text{N}\rightarrow\text{Zn}$. Así, esto probablemente se debe a que la concentración de $\text{Zn}(\text{II})$ disminuyó debido a la formación de $\text{Zn}(\text{OH})_2$.

De la misma manera que los desplazamientos químicos de **1b** y **1d** son similares en la RMN de ^{13}C , la resonancia de **2b** y **2d** es muy semejante. La diferencia máxima es de tan solo 1.0 ppm en los núcleos C4 = C9 (Tabla 2.3 y Figura 2.6).

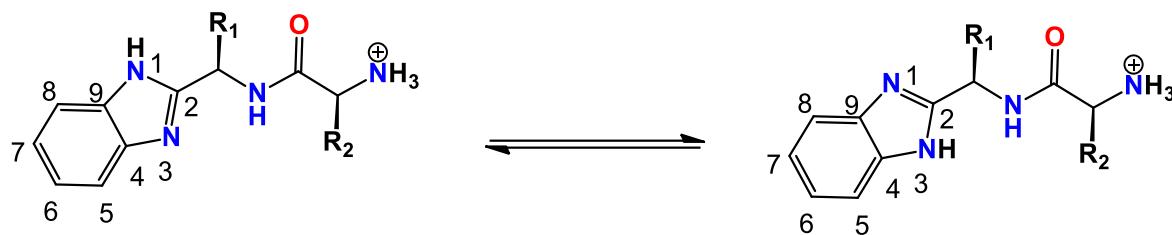


Figura 2.6. Equilibrio tautomérico de **1**.

Tabla 2.3. δ de ^{13}C (ppm) en D_2O de los compuestos **1b**, **1d**, **2b** y **2d**.*

| Compuesto | pH | C-2 | C-4 y C-9 | C-6 y C-7 | C-5 y C-8 |
|--------------------|-----|-------|-----------|-----------|-----------|
| 1b (con Zn) | 5.5 | 156.0 | 136.0 | 124.6 | 115.2 |
| 1d | 5.5 | 155.6 | 136.3 | 124.4 | 115.2 |
| 2b (con Zn) | 5.5 | 151.9 | 136.8 | 124.3 | 115.3 |
| 2d | 5.5 | 152.1 | 137.8 | 123.8 | 115.4 |

*Referencia: 1,4-dioxano

2.4.3 Estudio del Efecto del $\text{Zn}(\text{II})$ en la constante de acidez de los pseudo-peptídos.

Las constantes de acidez de los bis-clorhidratos de los pseudopeptídos derivados de la alanina fueron estimadas por RMN de ^{13}C en presencia del ZnCl_2 . De esta manera, el cloruro de zinc se adicionó a una solución 0.0675 M del compuesto **1**. Los espectros de RMN se obtuvieron en un intervalo de pH que va desde 3.67 hasta 6.94. Sin embargo, el estudio no se pudo continuar después de pH = 7.0 porque se formó un precipitado de que corresponde al $\text{Zn}(\text{OH})_2$.

Por otra parte, en la RMN de ^1H del complejo **1a** se puede observar que la resonancia de todos los núcleos de hidrógeno en la molécula se desplazan a frecuencias más bajas. Esto se debe a que se pierde uno de los hidrógenos imidazólicos y la carga positiva sobre el anillo de bencimidazol también se elimina. Este mismo comportamiento se observa cuando no está presente la coordinación $\text{N}\rightarrow\text{Zn}$ (Figura 2.7).

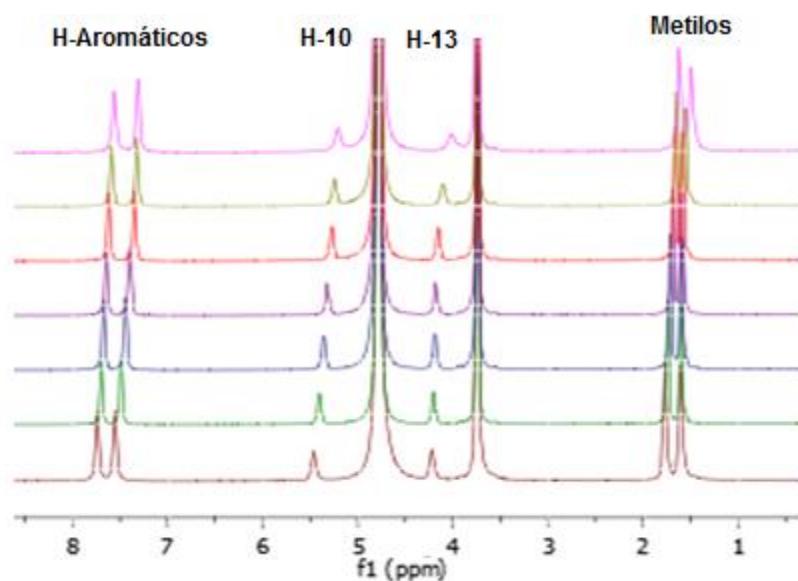


Figura 2.7. Espectros apilados de RMN de ^1H del compuesto **1a** (utilizando 1,4-dioxano como referencia).

En la RMN de ^{13}C se puede observar la tendencia contraria a la observada en ^1H . La resonancia de los núcleos de los carbonos aromáticos se desplaza hacia frecuencias altas cuando la especie mono-clorhidrato predomina en solución. Además, el efecto electroatractor no está presente el átomo de Zn. Al aumentar el pH, aumenta el efecto inductivo por lo cual las señales se desplazan a frecuencias más altas. (Figura 2.8)

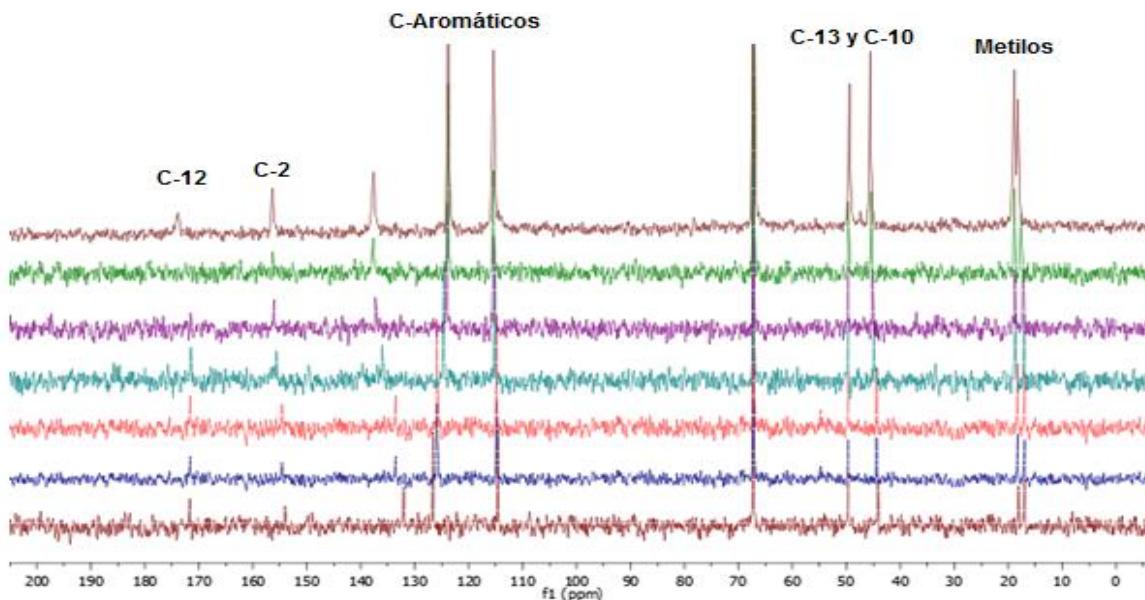


Figura 2.8. Espectros apilados de RMN de ^{13}C del compuesto **1a** a diferentes valores de pH (D_2O como solvente y 1,4-dioxano como referencia).

Es importante observar que a valores de pH menores a 5.5 la presencia del ion Zn(II) ocasiona que los núcleos de los carbonos bencimidazólicos se desplace hacia frecuencias mayores. Pero, dichas señales de resonancia no cambian significativamente cuando el pH de la solución es mayor a 5.5. Estos resultados parecen indicar que a valores de pH menores a 5.5 el Zn(II) tiene una interacción relevante con el anillo imidazólico del pseudo-péptido y modifica el equilibrio ácido-base. Sin embargo, la presencia del ion Zn(II) no afecta los equilibrios ácido-base cuando el pH de la solución es mayor a 5.5 (como se puede observar en la figura 2.9).

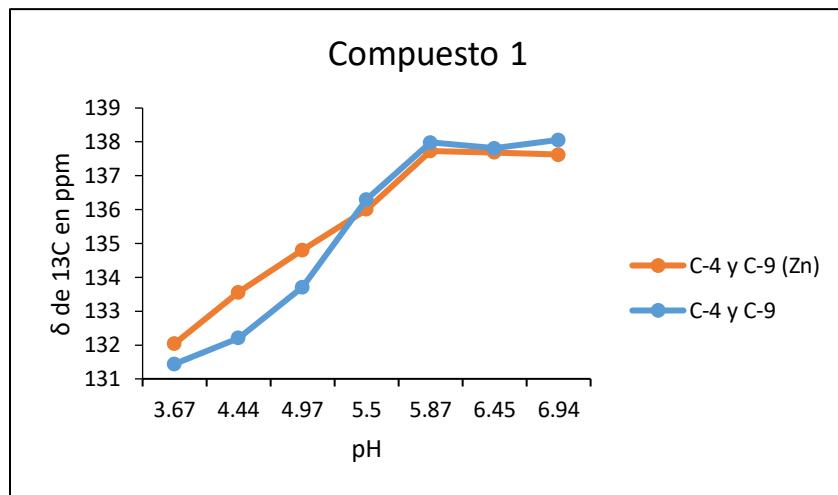


Figura 2.9. Grafica de δ de ^{13}C vs pH de los carbonos C-4=C-9 en 1.

La curva azul corresponde al pseudo-péptido sin la presencia del ion Zn(II). La curva naranja corresponde al comportamiento del pseudo-péptido en presencia de Zn(II).

El mismo procedimiento se realizó para el compuesto 2. En este caso en la RMN de ^{13}C de C'4(=C9) se observó que el átomo de Zn ejerce un efecto protector sobre los carbonos bencimidazólicos. En comparación con el ligante libre de Zn(II), los desplazamientos químicos del complejo aparecen a frecuencias más bajas (Figura 2.10).

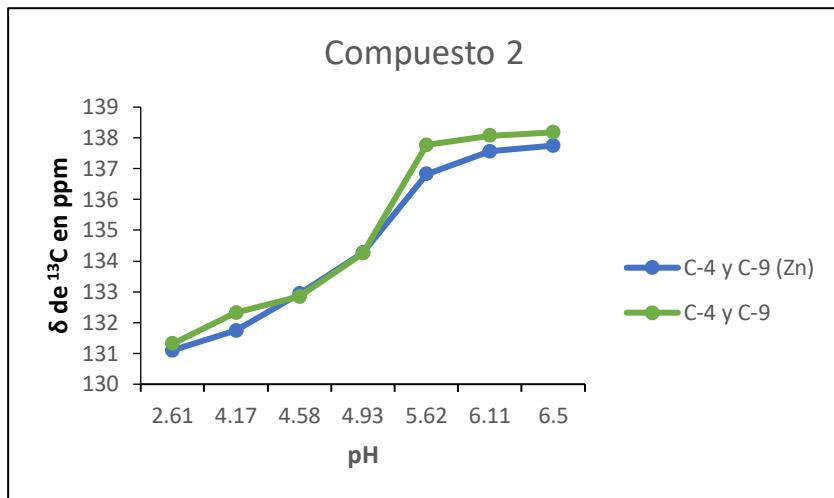


Figura 2.10. Grafica de δ vs pH de C-4=C-9 para **2** con y sin Zn

Con la finalidad de corroborar el efecto que ejerce la coordinación del Zn(II) sobre las propiedades ácido-base se decidió realizar la estimación de las constantes de acidez de los complejos **1** y **2**. El cálculo de pKa se realizó utilizando las gráficas de los desplazamientos químicos en la RMN de ^{13}C de los núcleos C4 y C9 vs pH para el compuesto **1**. Para determinar las constantes de acidez en el complejo **2** se utilizaron las frecuencias de los núcleos C-2 vs el pH (Figuras 2.11 y 2.12).

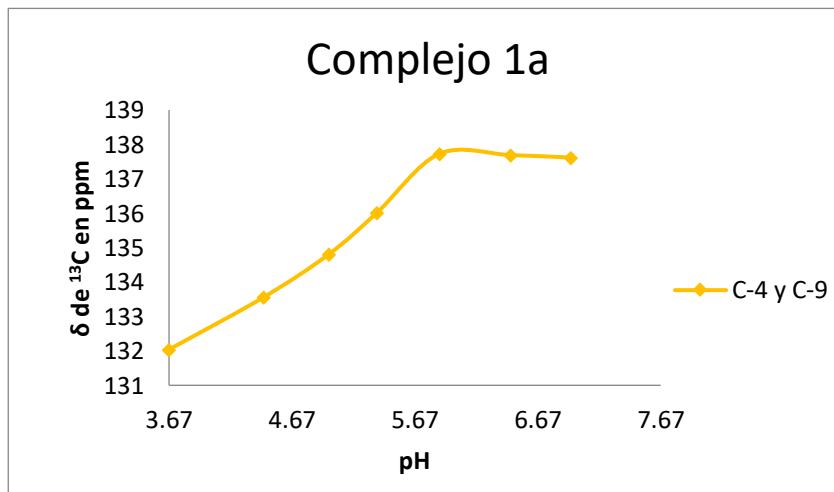


Figura 2.11. Gráfica de δ de ^{13}C de C-4, C-9 vs pH de para **1**.

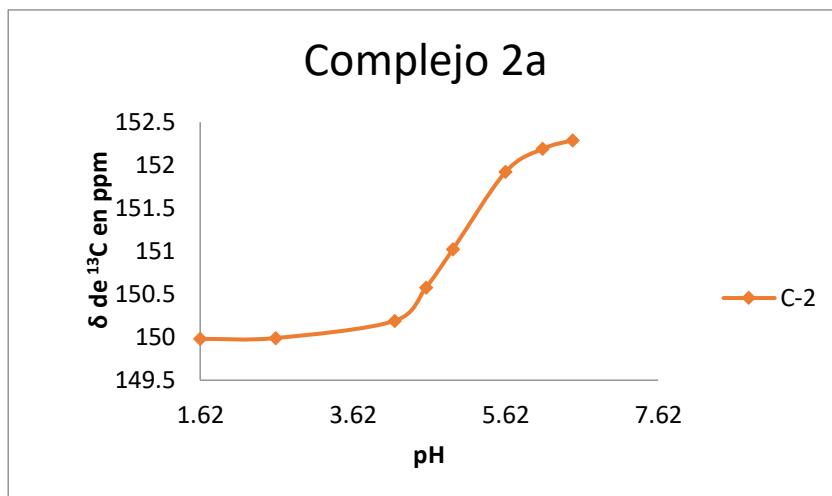
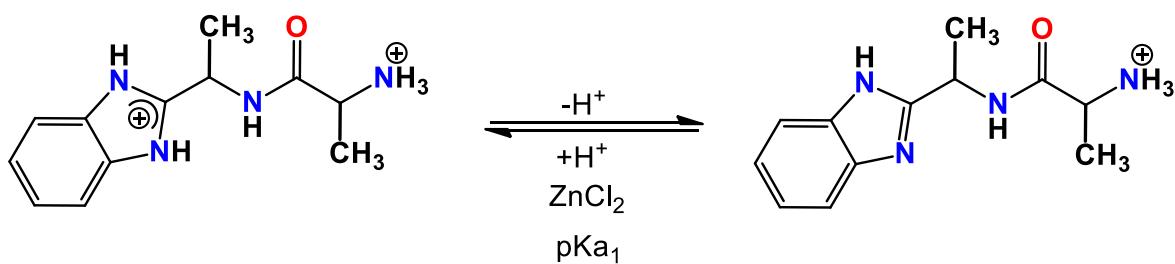


Figura 2.12. Gráfica de δ de ^{13}C de C-2 vs pH para **2**.

Los datos fueron procesados por el programa WinEQNMR2.²⁸ Con los resultados obtenidos solo fue posible calcular una constante para cada compuesto, debido a la precipitación del $\text{Zn}(\text{OH})_2$ y/o de la amida.

Como puede observarse en la tabla 2.4, la presencia del ion $\text{Zn}(\text{II})$ aumenta ligeramente el valor del pK_a . Esto significa que al formarse el complejo de coordinación disminuye la acidez del sistema $\text{N}_{\text{imidazólico}}\text{-H}$. Este cambio en el comportamiento ácido-base de los pseudo-péptidos **1** y **2** se puede atribuir a la presencia del enlace de coordinación $\text{N} \rightarrow \text{Zn}$ que bloquea a uno de los pares de electrones libres del anillo imidazólico. Esto ocasiona que la presencia de las interacciones por puente de hidrógeno tipo $\text{N-H} \cdots \text{N}=\text{C}$ estén menos favorecidas y el equilibrio ácido-base se desplace hacia la izquierda (Esquema 2.14).



Esquema 2.14. Equilibrio de desprotonación del compuesto **1a**.

Tabla 2.4. Valores de pKa encontrados por el programa WinEQNMR2

| | pKa ₁ | ΔpKa |
|-----------------|------------------|---------|
| 1 sin Zn | 4.97531(6) | |
| 1 con Zn | 5.01156(19) | 0.03625 |
| 2 sin Zn | 4.82907(12) | |
| 2 con Zn | 5.03265(2) | 0.20358 |

2.4.4 Análisis estructural del complejo de zinc **1a** y del tetraclorozincato **1e** por difracción de rayos-X.

Los compuestos de pseudopéptido **1a** y **1e** cristalizaron en solución MeOH/H₂O (50:50). Los cristales de **1a** y **1e** fueron separados manualmente porque los de **1e** se formaron primero y después los de **1a**. Así, la difracción de rayos-X de mono cristal mostró la presencia de las estructuras moleculares del tetraclorozincato **1e** y del complejo del zinc **1a**. En **1a** el átomo de zinc está enlazado al nitrógeno imidazólico.

2.4.4.1 Análisis estructural del compuesto **1a** por difracción de rayos-X.

El compuesto **1a** cristalizó en un sistema triclinico con un grupo espacial *P*2₁/n. En la estructura se observa que está presente un átomo de Zn(II), que presenta una geometría tetraédrica, ya que está unido a un nitrógeno bencimidazólico N2…Zn1 [2.023(3) Å] y a tres átomos de cloro.

Tabla 2.5. Distancias de enlace en Å y ángulos de enlace en ° para el compuesto **1a**.

| | Distancia | Ángulo |
|-----------|-----------|-----------------------|
| N2-Zn1 | 2.023(3) | N2-Zn1-Cl1 107.98(11) |
| Zn1-Cl1 | 2.238(13) | N2-Zn1-Cl2 112.84(10) |
| Zn1-Cl2 | 1.279(13) | N2-Zn1-Cl3 105.07(11) |
| Zn1-Cl3 | 1.266(13) | Cl1-Zn1-Cl2 108.01(5) |
| O2-H2…Cl3 | 2.260(8) | Cl1-Zn1-Cl3 113.18(6) |
| O3…H4-N4 | 2.545 | Cl2-Zn1-Cl3 109.83(5) |

Se puede observar que la estructura cristalina se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno con una molécula de metanol O2-H2…Cl3 [2.66(8) Å] y una molécula de agua N4-H4…O3 [1.913(10) Å] (Figura 2.13).

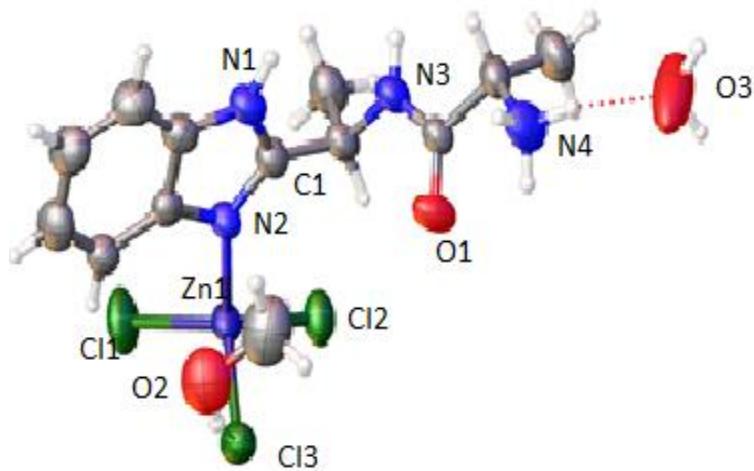


Figura 2.13. Representación Ortep del compuesto **1a**

Por otra parte, los átomos de cloro interactúan con otra molécula de amida generando especies diméricas. Las interacciones $\text{H3-N3} \cdots \text{Cl3}'$ [2.461 Å] y $\text{N1-H1} \cdots \text{Cl2}'$ [2.34 Å] dan lugar a un pseudo-ciclo con serie gráfica $R_2^2(9)$. En esta especie dimérica se puede formar el pseudomacrociclo $R_3^3(19)$. (Figura 2.14)

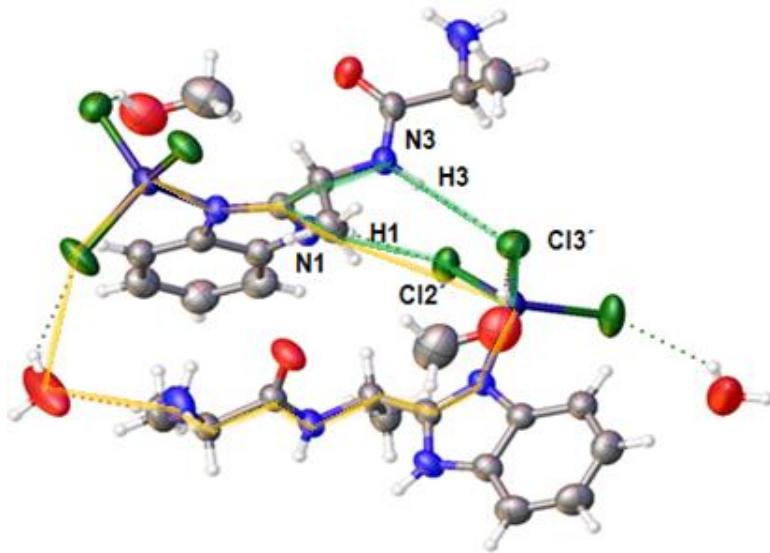


Figura 2.14. Especie dimérica del compuesto **1a**

Adicionalmente, al analizar la estructura polimérica del sistema se puede observar que las moléculas de agua participan (mediante puentes de hidrógeno con el grupo amonio $\text{N3-H3} \cdots \text{O3}$ [1.913(10) Å] y átomos de cloro) en la formación de cadenas intermoleculares. y $\text{O3-H3} \cdots \text{Cl1}'$ [2.458 Å]. (Figura 2.15).

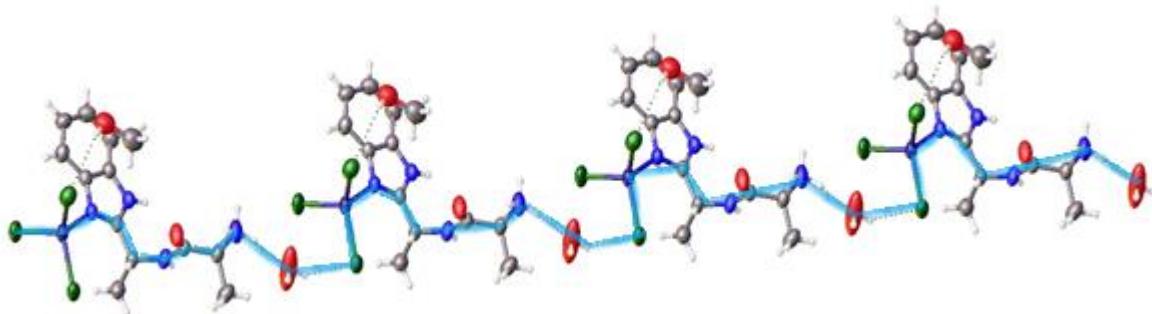


Figura 2.15. Cadena generada por el compuesto **1a**.

2.4.4.2 Análisis estructural del compuesto **1e** por difracción de rayos-X.

El compuesto **1e** cristalizó en un sistema triclinico con un grupo espacial $P\bar{2}_1/n$. La estructura molecular del pseudo-péptido está di-protonada, lo cual permite que la estructura cristalina sea estabilizada mediante interacciones puente de hidrógeno con una molécula de metanol y por el anión tetraclorozincato. Así, las interacciones intramoleculares entre el N2-H2 \cdots O1 [2.330(3) Å] dan lugar a un pseudo-ciclo con serie gráfica $S_1^1(7)$. Mientras que las interacciones N2-H2 \cdots Cl1 [2.520(3) Å] y N4-H4 \cdots Cl2 [2.710(3) Å] forman dos pseudo-ciclos con series gráficas, $S_2^3(9)$; $S_2^2(12)$ (Figura 2.16).

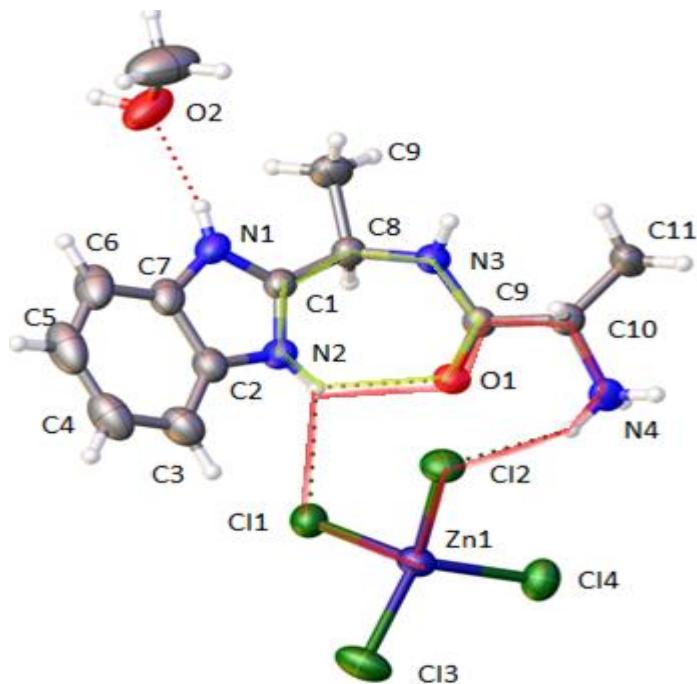


Figura 2.16. Estructura cristalina del compuesto **1e**.

Por otro lado, los átomos de cloro del tetraclorozincato pueden interaccionar con hidrógenos de moléculas vecinas dando lugar a especies diméricas que conforman pseudo-macrociclos de diecisiete y veintitrés miembros. $[R_4^3(17); R_4^4(23)]$ (Figura 2.17).

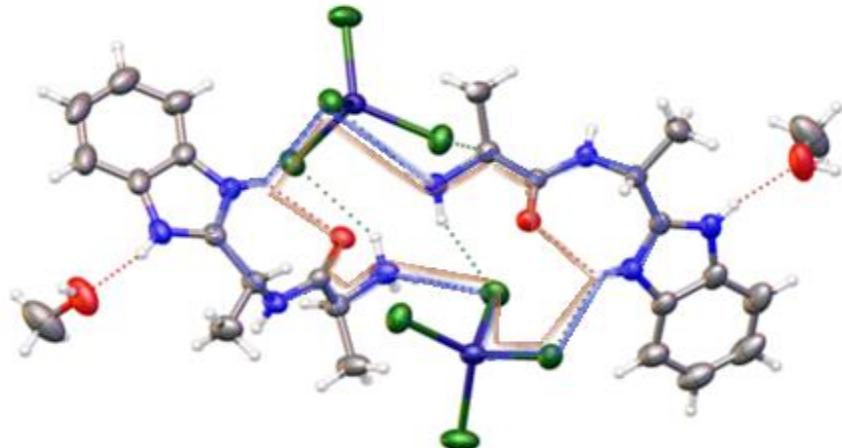


Figura 2.17. Especie dimérica en el compuesto **1e**.

Los cloruros del tetraclorozincato **1e** mantienen interacciones con cuatro moléculas de pseudopéptido. En estos sistemas los cuatro cloros del anión participan formando interacciones débiles. Así, dos átomos de cloro son aceptores de dos enlaces puente de hidrógeno que provienen de los grupos amonio. Los otros dos cloros son aceptores de un sólo puente de hidrógeno cuyo donador es el grupo -CH adyacente al amonio (Figura 2.18).

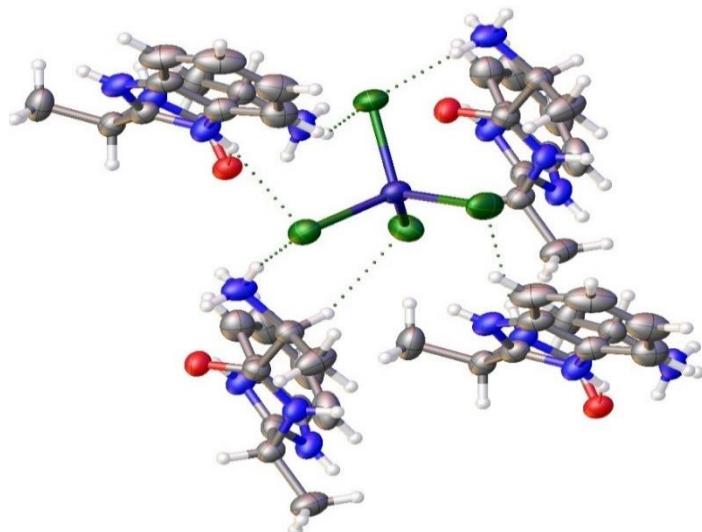


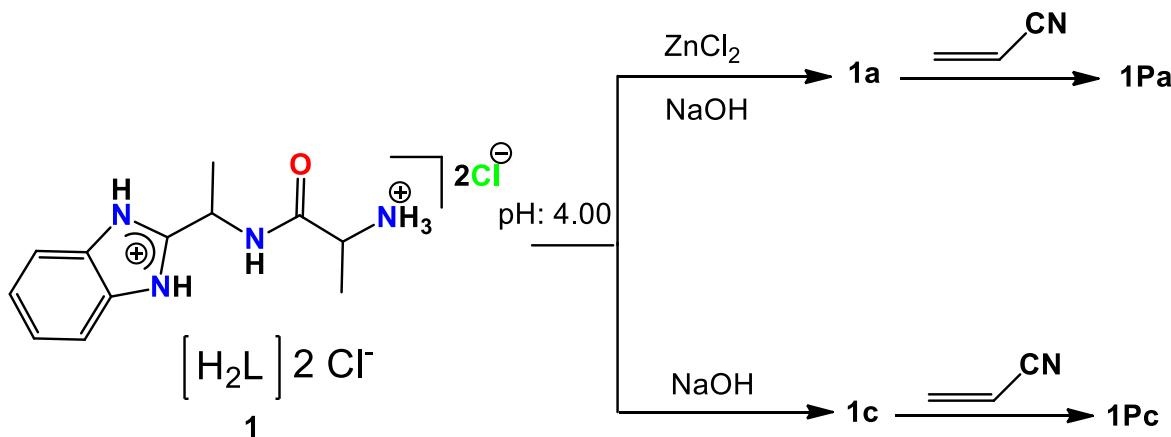
Figura 2.18. Interacciones puente de hidrógeno del anión tetraclorozincato en el compuesto **1e**.

2.4.5 Influencia del pH y del zinc en la adición 1,4 del pseudopéptido en el acrilonitrilo.

El estudio de la reactividad del compuesto **1** con acrilonitrilo se realizó a diferentes valores de pH en presencia y ausencia de Zn(II) (Esquema 2.15). La formación de los productos **1Pa-1Pg** se siguió por RMN de ^1H y ^{13}C en MeOD/D₂O debido a la solubilidad. Sin embargo, la RMN mostró que cuando los espectros se obtuvieron solamente en MeOD fue factible revisar la interacción del catión Zn(II) con el pseudo-péptido

2.4.5.1 Formación del aducto del pseudopéptido derivado de la alanina

Los sólidos **1a** y **1c** (obtenidos a pH 4) se hicieron reaccionar con el acrilonitrilo en la mezcla de disolventes metanolagua (relación molar 1:15). Sin embargo, en estas condiciones de reacción la aza-adición (del pseudo-péptido al acrilonitrilo) no ocurre.



Esquema 2.15. Reacciones llevadas a cabo con acrilonitrilo a pH=4.00.

Los espectros de RMN mostraron solo las señales para **1a** y **1c**. Es decir, no se observaron señales en el intervalo de 2.5 a 3.2 ppm que deberían corresponder a los productos **1Pa** y **1Pc**. Esto indica que el pseudo-péptido no contiene sitios nucleofílicos y el Zn(II) no promueve la adición a este pH (Figura 2.19).

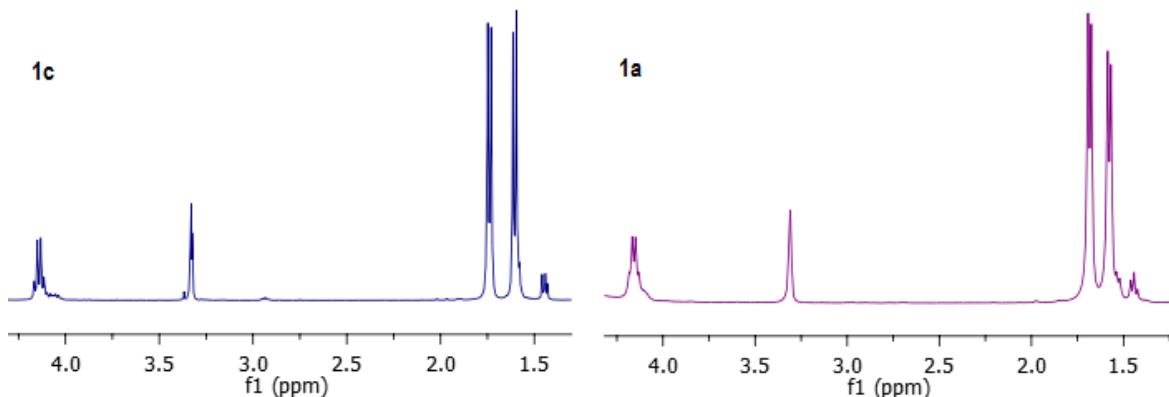
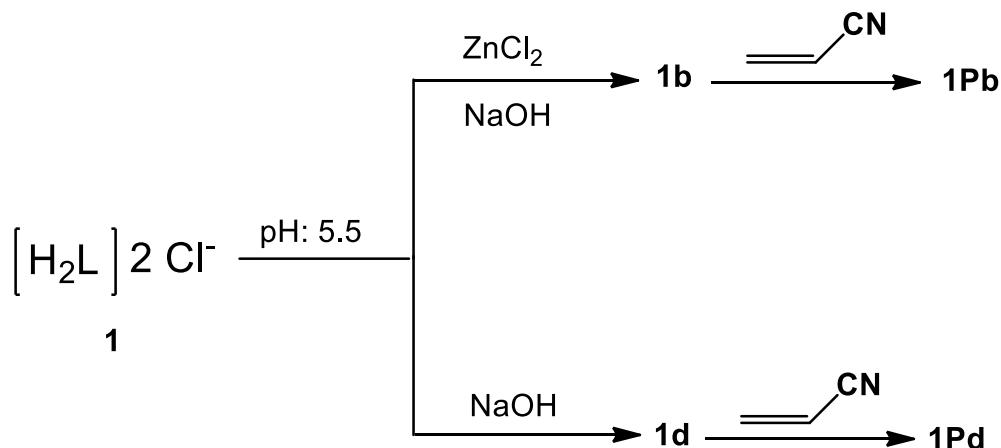


Figura 2.19. Espectros de RMN de ^1H en MeOD de **1c** y **1a**.

La reacción de aza-adición de los pseudopéptidos tiene una dependencia directa con respecto al pH. Así, cuando el pH del proceso se fijó hasta un valor de 5.5, la adición del peudo-péptido hacia el acrilonitrilo si sucedió (productos **1Pb** y **1Pd**). Esto se puede explicar porque a pH = 5.5 está presente la especie monoácida del pseudo-péptido (**1b** y **1d**).



Esquema 2.16. Reacciones de aza-adición del pseudo-péptido **1** hacia acrilonitrilo a pH = 5.5.

En ambos casos, la RMN de ^1H muestra señales múltiples que corresponden a los dos grupos metíleno resultantes de la adición 1,4 (2.5 a 3.2 ppm) [Figura 2.20]. Cabe mencionar que la adición ocurre solo hasta un 50% en ambos casos (determinado de la integral en RMN de ^1H). Esto se debe a que a pH 5.5 está presente el equilibrio: $-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2 + \text{H}^+$ en los compuestos **1b** y **1d**. Así, en ambos casos el equilibrio está desplazado preferentemente hacia la izquierda lo

cual limita el rendimiento de la reacción. Sin embargo, este proceso se desplaza cuando la reacción de adición se realiza en la mezcla MeOH/H₂O.

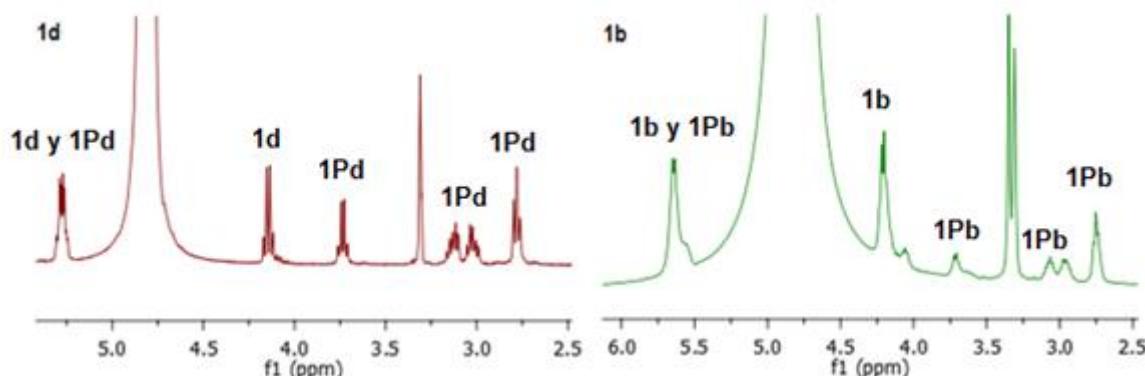
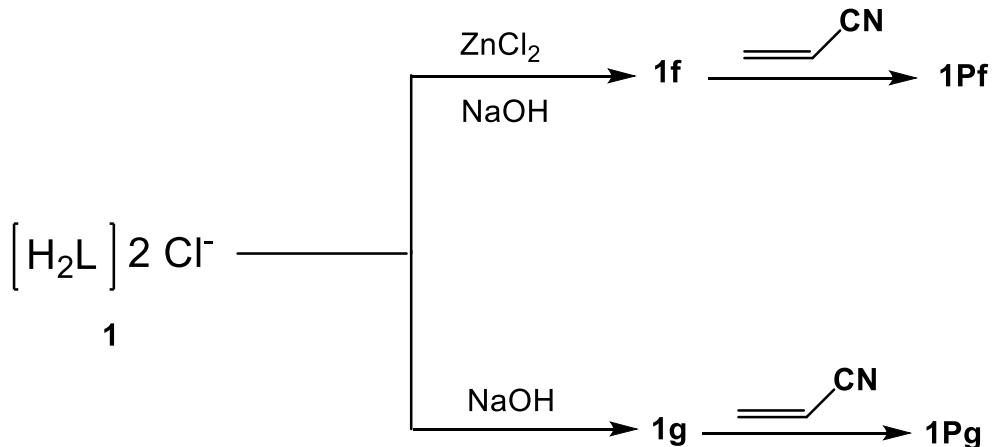


Figura 2.20. Espectro de RMN de ¹H en MeOD. Para **1d** (ausencia del zinc) y para **1b** (complejo de zinc)

Como experimentos adicionales a las muestras de **1**, que se utilizaron para determinar los pKa en presencia (pH de 6.5, **1f**) y ausencia del zinc (pH 10.75, **1g**), se les adicionó el acrilonitrilo.



Esquema 2.17. Reacciones de **1f** (pH=6.5) y **1g** (pH=10.75) con acrilonitrilo.

De este modo, se encontró que a pH = 6.5 la reacción ocurre tan solo en un 31.45%. Pero, a pH=10.75 la aza-adición da rendimientos del 100% (valores determinados con la RMN de ¹H). Por lo tanto, cuando el equilibrio se desplaza al pseudopéptido neutro se favorece la adición del nitrógeno amina en el acrilonitrilo (Figura 2.19). Así, en el espectro para **1g** se puede observar un solo grupo de señales las cuales integran para el aducto correspondiente.

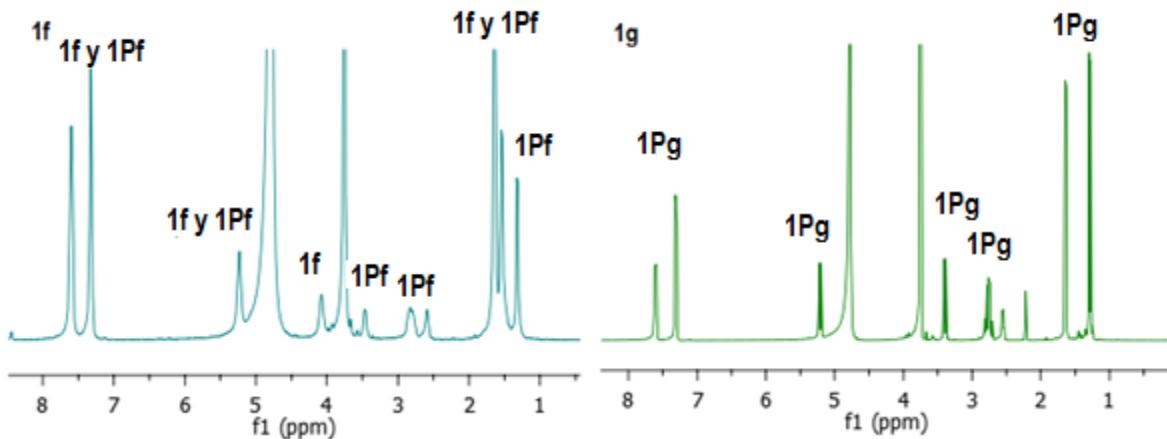


Figura 2.21. Espectro de RMN de ^1H en D_2O para **1f** ($\text{pH} = 6.5$) y **1g** ($\text{pH} = 10.75$).

2.4.5.2 Análisis Estructural por RMN de ^1H del aducto **1P**

El espectro de RMN de ^1H del compuesto **1Pd** muestra un sistema AB para los protones diasterotópicos H-16 (Figura 2.22). La señal del sistema AB integra para dos hidrógenos, mientras que la señal triple que corresponde al metileno adyacente al CN integra para un solo hidrógeno. Esto se debe a que en el proceso de la aza-adición puede participar uno de los deuterios lábiles del disolvente el cual se enlaza al carbono C-17. El resultado es similar a los reportes de adiciones 1,4 que indican que el protón que se adiciona proviene del disolvente. (Fig. 2.22). Cabe mencionar que la relación de integrales para los protones H-13: H-16 : H-17 es de 1:2:2 cuando se utiliza MeOH/ H_2O como medio de reacción.

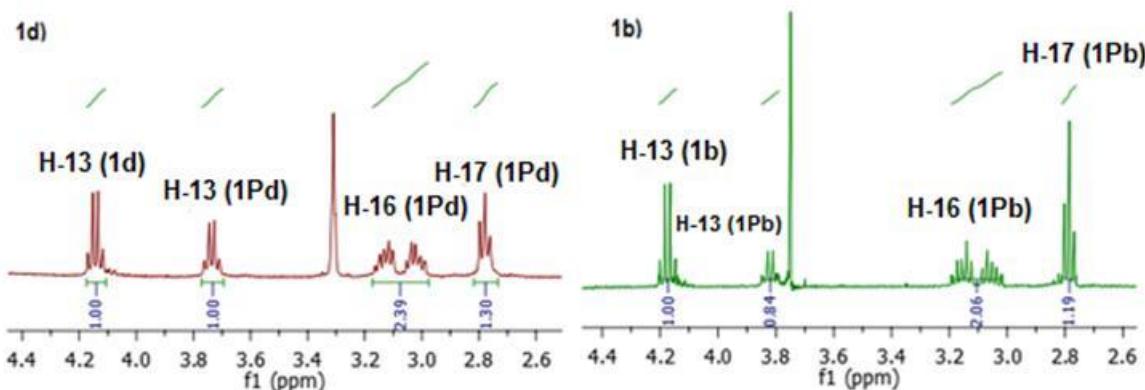


Figura 2.22. Espectro de RMN de ^1H en D_2O para **1d** (con Zn) y **1b** (sin Zn). Falta una o dos estructuras para entender la asignación.

La estructura del compuesto que se propone es la adición del nitrógeno amina en el acrilonitrilo porque en la RMN de ^1H solo se observan dos señales multipletes para dos tipos de átomo de hidrógeno aromáticos. Esto indica que la simetría del bencimidazol se mantiene debida a su equilibrio tautomérico.(Figura 2.23). Además, se descarta la formación de la amina terciaria porque la integral de los metino H-13:H16 tiene una relación 1:2.

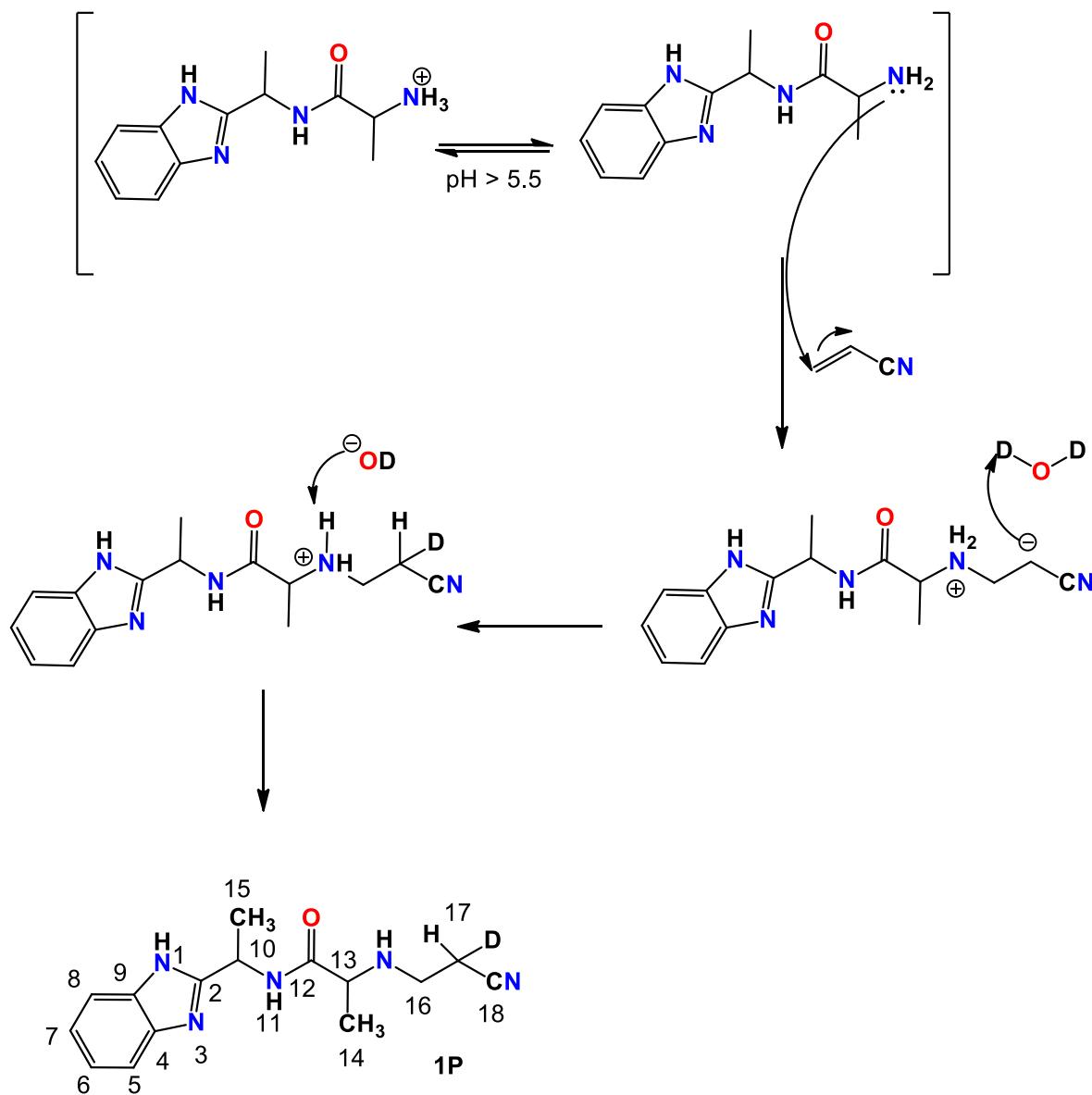


Figura 2.23. Mecanismo de reacción propuesto para la formación del aducto.

La tabla 2.6 muestra la asignación de los aductos **1Pb-1Pg** en RMN de ^1H . Los desplazamientos químicos del aducto **1Pg** se encuentran desplazados a

frecuencias más bajas que el resto de los aductos. Por otro lado, los desplazamientos químicos entre **1Pb** y **1Pd** presentan muy poca diferencia a pH de 5.5. Entonces, se puede proponer que el ion Zn(II) no está coordinado al pseudo-péptido y la diferencia en desplazamiento químico se debe a equilibrios de tipo tautomérico de NH imidazol y de ácido-base del grupo NH amonio.

Tabla 2.6. δ de ^1H (ppm) en D_2O para **1P**

| | pH | H-5 y H-8 | H-6 y H-7 | H-10 | H-13 | H-14 | H-15 | H-16 | C-17 |
|---------------------|-------|-----------|-----------|------|------|------|------|------|------|
| 1Pb (con Zn) | 5.5 | 7.64 | 7.38 | 5.26 | 3.83 | 1.48 | 1.68 | 3.11 | 2.79 |
| 1Pd | 5.5 | 7.64 | 7.36 | 5.31 | 4.18 | 1.47 | 1.67 | 3.09 | 2.79 |
| 1Pf (con Zn) | 6.5 | 7.60 | 7.33 | 5.23 | 4.07 | 1.32 | 1.63 | 2.82 | 2.59 |
| 1Pg | 10.75 | 7.60 | 7.31 | 5.21 | 3.39 | 1.28 | 1.64 | 2.76 | 2.55 |

2.4.5.3 Análisis Estructural por RMN de ^{13}C del aducto **1P**

El MeOD es un disolvente menos polar que el D_2O . Por lo tanto, para evaluar la interacción del Zn(II) o el efecto del pH en el aducto **1P**, se realizó el estudio estructural de este compuesto por RMN de ^{13}C en ambos disolventes.

La tabla 2.7 presenta los desplazamientos químicos de los núcleos de ^{13}C en MeOD de los compuestos **1Pb**, **1Pd** y **1Pg**. La diferencia en desplazamiento químico entre los aductos **1Pb** y **1Pg** (ambos de pH de 5.5) no siguen una tendencia que indique que el zinc interacciona con algún átomo del pseudo-péptido. Aunque, debe mencionarse que el sólido que contiene Zn(II) es ligeramente soluble en MeOD/ D_2O y en presencia del acrilonitrilo se vuelve soluble. Entonces podría suponerse que se pierde la coordinación del zinc en presencia del acrilonitrilo y las diferencias en desplazamiento se deben a un cambio en el pH.

Tabla 2.7. δ de ^{13}C (ppm) en MeOD para **1Pb** (con Zn(II)), **1Pd** y **1Pg**.

| | pH | C-2 | C-4 y C-9 | C-5 y C-8 | C-6 y C-7 | C-10 | C-12 | C-13 | C-14 | C-15 | C-16 | C-17 | C-18 |
|------------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|
| 1Pb | 5.5 | 157.4 | 137.6 | 115.9 | 124.5 | 45.7 | 173.4 | 57.9 | 17.7 | 19.8 | 43.5 | 17.0 | 118.4 |
| 1Pd | 5.5 | 156.8 | 138.8 | 115.7 | 123.7 | 45.4 | 175.2 | 58.1 | 18.5 | 19.9 | 44.0 | 18.1 | 119.6 |
| 1Pg | 10.75 | 156.7 | 140.0 | - | 123.7 | 45.2 | 177.4 | 57.8 | 19.2 | 19.8 | 43.7 | 18.2 | 120.8 |

La tabla 2.8 corresponde a los núcleos de ^{13}C de los aductos **1Pb-1Pg** en D_2O . los desplazamientos químicos son similares en los tres compuestos con una diferencia $\delta\Delta$ de 0.0 a 0.6. Esto indica que dichos compuestos tienen la misma estructura molecular. Así, la solvatación del aducto es la misma en presencia y ausencia del Zn(II).

Tabla 2.8. δ de ^{13}C (ppm) en D_2O para **1P**.

| | pH | C-2 | C-4 y C.9 | C-5 y C-8 | C-6 y C-7 | C-10 | C-12 | C-13 | C-14 | C-15 | C-16 | C-17 | C-18 |
|------------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|
| 1Pb | 5.5 | 156.1 | 136.7 | 115.3 | 124.2 | 45.1 | 173.6 | 57.1 | 17.2 | 18.8 | 42.5 | - | 119.3 |
| 1Pd | 5.5 | 156.0 | 137.3 | 115.3 | 124.0 | 45.0 | 174.2 | 57.2 | 17.1 | 18.8 | 42.5 | - | 119.5 |
| 1Pf | 6.5 | 156.7 | - | 115.8 | 123.5 | 45.0 | 177.4 | 57.2 | 17.8 | 19.0 | 42.9 | 18.6 | 120.8 |
| 1Pg | 10.75 | - | 137.8 | 115.4 | 123.8 | 45.0 | - | 57.1 | 17.9 | 18.8 | 42.9 | 18.4 | - |

Las señales en la RMN de ^{13}C de los carbonos metino (C-13), los dos metilenos (C-16 y C-17) y el nitrilo (C-18) dan evidencia que el aducto si se formó.

2.5 Conclusión.

Se estimaron los pKa de los pseudopéptidos en presencia del Zn(II). Los valores de pKa se modifican ligeramente debido a que a pH de 5.5 se pierde la interacción del Zn(II) con el nitrógeno imidazólico.

Se demostró que en disolución a pH de 4 el ión Zn(II) impide la adición de N-imidazol en el acrilonitrilo. Esto se debe a que la coordinación N→Zn restringe equilibrio tautomérico imidazólico.

Por otra parte, se pudo corroborar que el nitrógeno imidazólico no se adiciona al acrilonitrilo, pero los nitrógenos de amina si se adicionan a partir de pHs ácidos de 5.5. La formación del aducto del pseudopéptido que tiene dos centros quirales se favorece a pH básico debido a que el equilibrio está desplazado hacia la base. El estudio demostró que el hidrógeno que se adiciona al carbono en posición alfa al grupo nitrilo proviene del disolvente.

2.6 Referencias.

- 1.- Lechuga, I. V. D.; Tesis de licenciatura; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; Mineral de la Reforma; 2014.
- 2.- Aljahdali, M.; Spectrochim. Acta A. 2013, 112, 364-376.
- 3.- García, R. A.; Fiol, J.; Adrover, B.; Tauler, P.; Pons, A.; Mata, I.; Espinosa, E.; Molins, E.; Polyhedron. 2003, 22, 3255-3264.
- 4.- Liangping, J.; Bo, W.; Bo L.; Chan,W.; Yongkang L.; Food Res. Int. 2014, 64, 91–98.
- 5.- Maret, W., Krezel, A.; Mol. Med. 2007, 13(7–8), 371-375.
- 6.- McCall, K. A.; Huang, C. C.; Fierke, C. A.; J. Nutr. 2000, 130, 1437S-1446S.
- 7.- Aljahdali, M.; El-Sherif A. A.; J. Solution Chem., 2012, 41:1759–1776.
- 8.- Sivasankaran, M.; Venkatachalapathi N. K.; Santappa, M.; J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1982, 555-559.
- 9.- Falcón, L. M. P.; Tesis de doctorado; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; Pachuca de Soto, 2014.
- 10.- Dienys, G.; Sereikaité, J.; Gavénas, G.; Kvederas, R.; Bumelis, V.; Bioconjugate Chem. 1998, 9, 744-748.
- 11.- Cotton, F.A.; Wilkinson, G. Advanced inorganic Chemistry tercera edición, USA, John Wiley & Sons, 1972.
- 12.- Cotton, F.A. en: Müller, A. & Diemann, E. Eighty Years of Coordination Chemistry, Weinheim, Verlag Chemie, 1981.
- 13.- Abdelkarim, A. T.; Al-Shomrani, M. M.; Rayan, A. M.; El-Sherif, A. A.; J. Solution Chem. 2015, 44,1673–1704.
- 14.- El-Sherif, A.; Shoukry, M.; Inorg. Chim. Acta 2007, 360, 473-487.
- 15.- Chen, Z.; Zhang, J.; Zeng, P.; Zhang, S.; Jin, C. Z.; Anorg. Allg. Chem. 2014, 640, 1506-1513.
- 16.- Abdel-Ghani, N. T.; El-Ghar, M. F. A.; Mansour, A. M.; Spectrochim. Acta A. 2013, 104, 134-142.
- 17.- Mansour, A. M.; Inorg. Chim. Acta 2013, 408, 186-192.

- 18.- Abdel-Ghani, N. T.; Mansour, A. M.; *J. Mol. Struct.* 2011, 991, 108-126.
- 19.- Thompson, J. R.; Ovens, J. S.; Williams, V. E.; Leznoff, D. B.; *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 16572–16578.
- 20.- El-Sherif, A. A.; *J. Solution Chem.* 2010, 39, 1562-1581.
- 21.- Gümüs, F.; Algül, Ö.; Eren, G.; Eroglu, H.; Diril, N.; Gür, S.; Özkul, A. *Eur. J. Med. Chem.* 2003, 38, 473-480.
- 22.- Bablu, H. M.; Rahman M. L.; Mohd, H. A.; Sarkar, R. S. M.; *ChemistrySelect* 2016, 1, 2750 – 2756.
- 23.- Wu, H.; Glaser, R.; *Chem. Res. Toxicol.* 2005, 18, 111-114.
- 24.- Seongcheol, K.; Seongil K.; Gihyeon K.; Yunmi L.; *J. Org. Chem.* 2016, 81, 4048-4057.
- 25.- Kantam, M. L.; Neelima, B.; Reddy, Ch. V.; Chakravarti, R.; *Ind. Eng. Chem. Res.* 2007, 46, 8614-8619.
- 26.- Zbancioc, G.; Mangalagiu, I. I.; Moldoveanu, C.; *Ultrason. Sonochem.* 2015, 23, 376–384.
- 27.- Zbancioc, G.; Bejan, V.; Risca, M.; Moldoveanu, C.; Mangalagiu, I. I.; *Molecules* 2009, 14, 403-411.
- 28.-Hynes, M. J.; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1993, 311-312.

CAPÍTULO III: REACTIVIDAD DEL PSEUDOPÉPTIDO DERIVADO DE ALANINA FRENTE AL ARSÉNICO

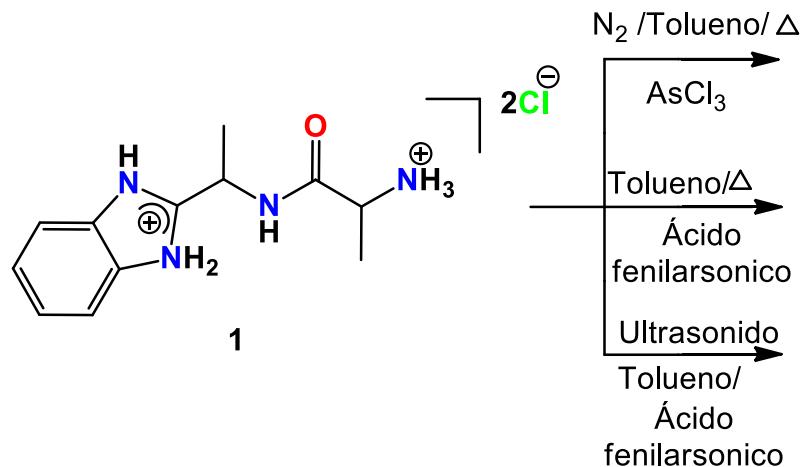
3.1 Introducción

El arsénico es un elemento con el cual los seres humanos estamos continuamente expuestos en la comida, agua, aire y suelo.¹ Se encuentra principalmente en dos estados de oxidación: As (III) y As (VI). Pero, los estudios biológicos han demostrado que el As (III) es más tóxico que el As (VI).² A pesar de su toxicidad, las generaciones pasadas hacían uso de este elemento como pigmento, pesticida y medicamento en el tratamiento de ulceras, sífilis, malaria y cáncer.¹

La actividad citotóxica de compuestos de arsénico ha sido estudiada. Algunos de estos compuestos se han utilizado como antitumorales (As_2O_3) y como medicamentos auxiliares para tratar algunos tipos de cáncer.²

Sabemos que el arsénico forma enlaces con el átomo de oxígeno y que presenta un comportamiento dinámico de pseudorrotación de Berry o de tutomería.³

Sin embargo, resulta interesante conocer ¿cuál sería la reactividad de los pseudopéptidos ya descritos en esta tesis frente a este elemento? Por esta razón, en este capítulo se hablará sobre las reacciones del compuesto **1** con AsCl_3 y con el ácido fenilarsónico. (Esquema 3.1)



Esquema 3.1. Reacciones del compuesto **1** con As.

3.2 Antecedentes

3.2.1 El Arsénico en la industria

El arsénico y muchos compuestos que lo contienen, han sido utilizados con fines industriales. Dentro de estos se puede destacar su uso en la elaboración de aleaciones de plomo y cobre para la fabricación de baterías.³ También, se ha utilizado en la fabricación de vidrio y semiconductores.⁴ Un ejemplo de ello es el arseniuro de galio (GaAs), que por sus propiedades se ha utilizado en semiconductores de alta potencia.³

A pesar de la alta toxicidad del arsénico y sus derivados, se han encontrado aplicaciones en actividades agrícolas. El acetoarsenito de cobre (o bien conocido como verde-parís) es un compuesto que se utilizaba como colorante. La alta toxicidad de este compuesto condujo a la búsqueda de nuevas aplicaciones y en 1900 se usó como insecticida.¹ (Figura. 3.1)

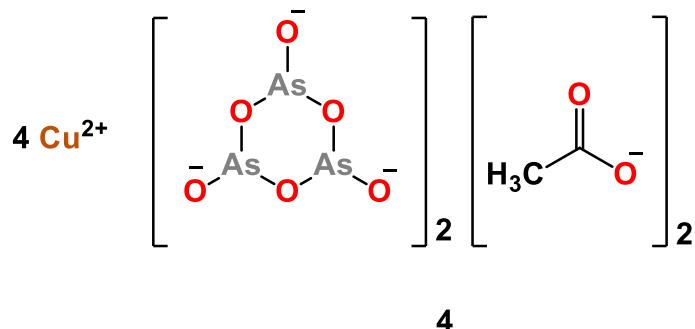


Figura 3.1. Estructura del acetoarsenito de cobre.¹

Otro ejemplo es el arseniato de plomo, el cual es un pesticida. Debido a los daños que este compuesto ocasiona en las plantas, él fue remplazado por compuestos menos tóxicos.¹ Actualmente, se utiliza el metanoarsonato monosódico como herbicida para la fabricación de algodón (Figura. 3.2).^{3,5}

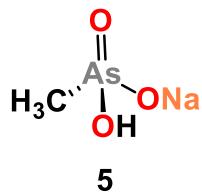


Figura 3.2. Estructura del metanoarsonato monosódico.

3.2.2 Arsénico en la medicina

El uso de arsénico en diferentes áreas del quehacer humano no es nuevo. Se piensa que personajes como Hipócrates, Aristóteles y Paracelso, hacían uso de este elemento con fines medicinales.^{6,7}

En el siglo XVIII los médicos utilizaban la solución de Fowler (1% arsenito de potasio) para el tratamiento de enfermedades como la sífilis, malaria, eczema y asma.⁸ Además, se han encontrado textos del siglo XIX, donde se reporta el uso de pastas con arsénico, para el tratamiento de cáncer de piel y pecho.⁹

Resulta interesante notar que, antes del descubrimiento de la penicilina, el medicamento más utilizado y eficaz para curar sífilis era el Salvarsan o arsfenamina. La estructura correcta del compuesto ha causado controversia y se cree que está constituida por dos anillos de arsenico (uno de tres miembros y otro de cinco) [Figura. 3.3].^{7,10}

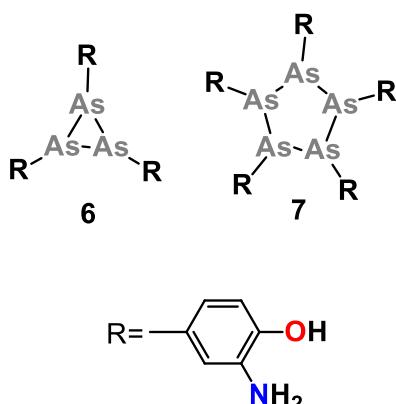


Figura 3.3. Estructura del medicamento Salvarsan.

El trióxido de arsénico (As_2O_3) es uno de los compuestos más utilizado en medicina por sus propiedades antitumorales y sus efectos positivos contra la leucemia (Figura. 3.4).^{2,11} El mecanismo de acción en el organismo no se conoce pero se propone sus propiedades se deben a su afinidad por el azufre, que afecta la actividad de enzimas como la tirosina fosfatasa y tirosina quinasa que se relacionan con la formación de tumores.¹²

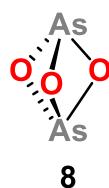
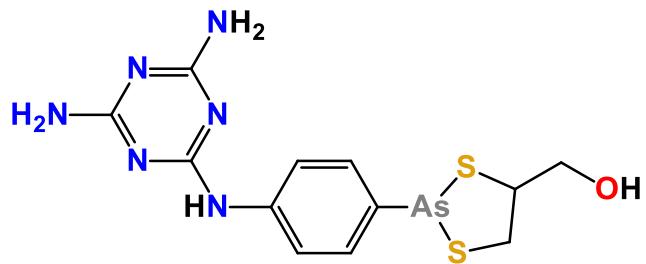


Figura 3.4. Estructura del trióxido de arsénico.

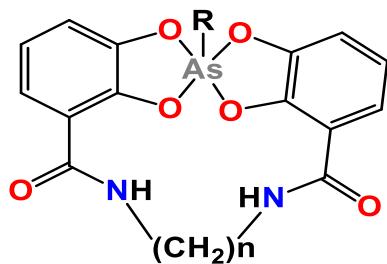
El Melarsoprol, es un heterociclo de arsénico que se utiliza para combatir la tripanosomiasis africana, comúnmente conocida como la enfermedad del sueño (Figura. 3.5).¹³



9

Figura 3.5. Estructura del Melarsoprol.

Algunos efectos secundarios del melarsoprol, son convulsiones y la hipertensión. Por esta razón se han llevado a cabo investigaciones nuevas para sintetizar compuestos efectivos contra la enfermedad del sueño. Loiseau *et al* reportan espiroarsoranos con buenos resultados para el tratamiento de esta enfermedad (Figura 3.6).¹⁴

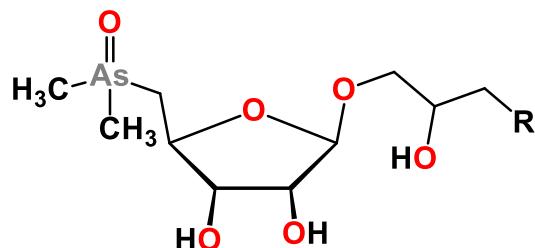


- | | | |
|-----|---|--------------------|
| 10. | n | R |
| 11. | 4 | fenil |
| 12. | 4 | metil-4 fenil |
| 13. | 4 | amino-4 fenil |
| | 6 | acetoamida-4 fenil |

Figura 3.6. Espiroarsoranos con actividad biológica hacia la tripanosomiasis africana.

3.2.3 Arsénico y carbohidratos

En la naturaleza existen carbohidratos con arsénico en su estructura. A estos compuestos se les conocen como arseno-azúcares. Estas sustancias se encuentran principalmente en algas marinas y los dimetil arsinoil ribósidos son los más abundantes de la serie (Figura. 3.7).^{3,15}



- R**
- 14. -OH
 - 15. - $\text{OPO}_3\text{HCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
 - 16. - OSO_3H
 - 17. - SO_3H

Figura 3.7. Dimetil arsinoil ribósidos encontrados en la naturaleza.

Las condiciones necesarias para sintetizar este tipo de compuestos han provocado que ésta sea actualmente una línea de investigación poco habitual. Aunque, en la literatura se ha reportado la síntesis de carbohidratos con arsénico en su estructura.³

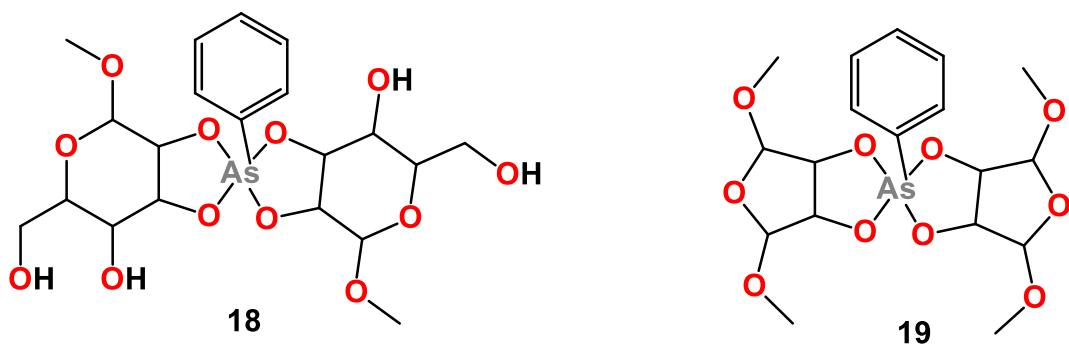


Figura 3.8. Espiroarsoranos derivados de carbohidratos.

De este modo, Betz *et al* reportarán la síntesis de espiroarsoranos a partir de la reacción del ácido fenilarsónico con la metil β -D-ribofuranósido y la metil α -D-manopiranósido, utilizando benceno como disolvente. (Figura 3.8).¹⁶ La reacción fue llevada en medio acuoso a un pH 3.6 y 7. En condiciones ácidas se forma el compuesto en bajos rendimientos. Y a pH neutro (pH=7), no se lleva a cabo la reacción.

Gaspar López³ reporta la síntesis de arsenatos derivados de carbohidratos. Para la obtención se usaron condiciones anhidras y AsCl_3 (Figura 3.9).

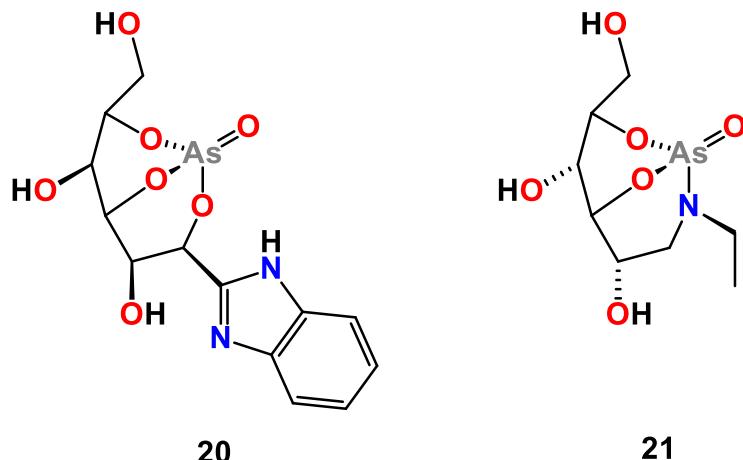
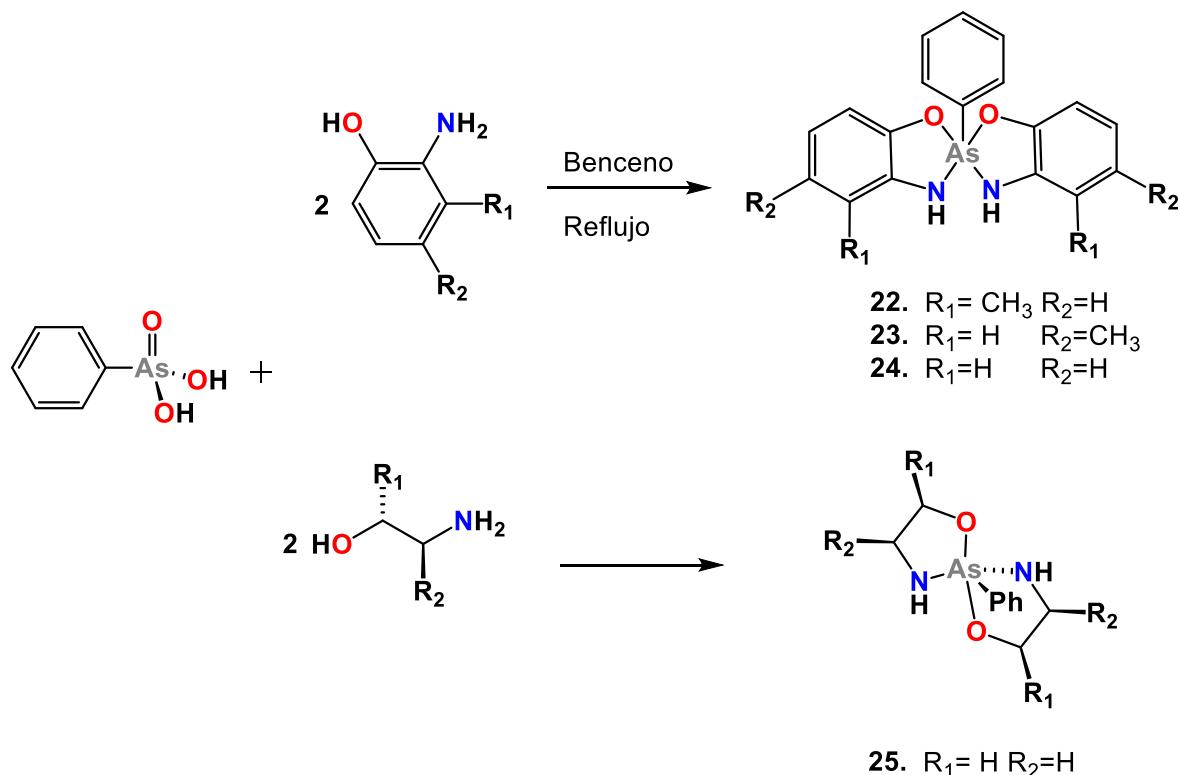


Figura 3.9. Arsenatos derivados de carbohidratos.

Los estudios estructurales por RMN de ^1H y ^{13}C mostraron que en solución los arsenatos existen en equilibrios tautoméricos.

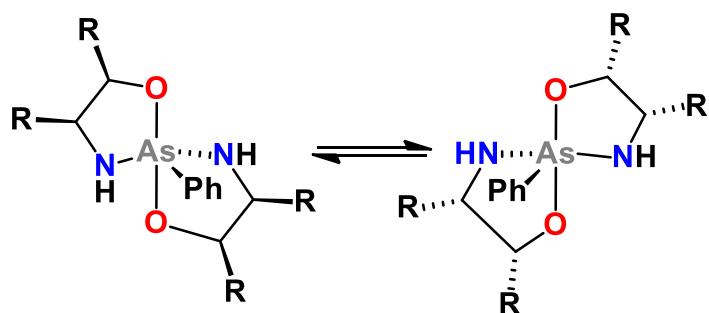
3.2.4 El átomo de nitrógeno en los compuestos de arsénico

Pérez García *et al* reportaron la síntesis de espiroarsoranos derivados de 2-aminofenoles y etanolaminas.¹⁷ Estos compuestos se obtuvieron a partir de la reacción de un equivalente del ácido fenilarsónico con dos equivalentes del aminofenol o etanolamina (Esquema 3.2).



Esquema 3.2. Síntesis de espiroarsoranos derivados de 2-aminofenoles y etanolaminas.¹⁷

En rayos-X se pudo observar que en estos compuestos el átomo de arsénico presenta una geometría BPT, en donde los átomos de oxígeno ocupan las posiciones axiales y los átomos de nitrógeno y carbono se encuentran en las posiciones ecuatoriales. Además, Los estudios por HPLC y RMN de 1H y ^{13}C mostraron que el arsénico es un centro estereogénico y que la isomerización es por pseudorrotación de Berry. De esta manera, el equilibrio de los isómeros de menor energía puede ser entre dos enantiomeros o diastereoisómeros dependiendo de los carbonos quirales (Esquema 3.3).



Esquema 3.3. Proceso de isomerización de espiroarsoranos.

En el presente capítulo se informa de los resultados obtenidos de las reacciones del pseudopéptido derivado de alanina con cloruro de arsénico y ácido fenilarsónico.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo General

Entender la reactividad del compuesto **1** con cloruro de arsénico y ácido fenilarsónico para formar los heterociclos de arsénico.

3.3.2 Objetivos Específicos

Sintetizar los ligantes **1a**, **2a**, **3a** a partir del pseudopéptido **1** a pH 7, 8 y 9.

Llevar a cabo las reacciones de los ligantes con cloruro de arsénico.

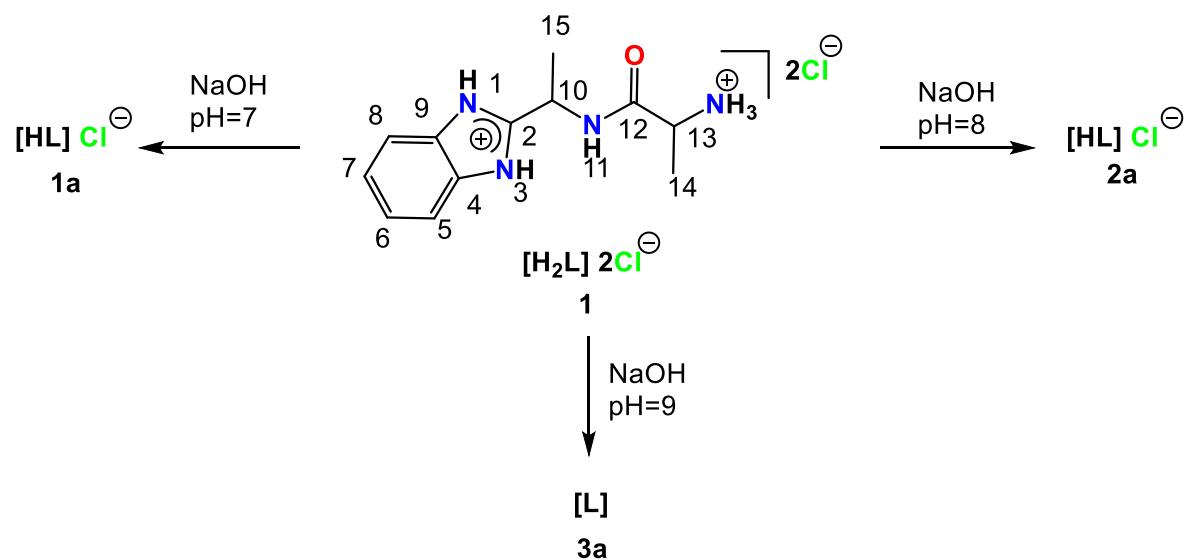
Llevar a cabo las reacciones **1** y **2a** con ácido fenilarsónico respectivamente.

Mediante estudios de RMN de ^1H y ^{13}C determinar la formación de los compuestos de arsénico

3.4 Discusión de Resultados.

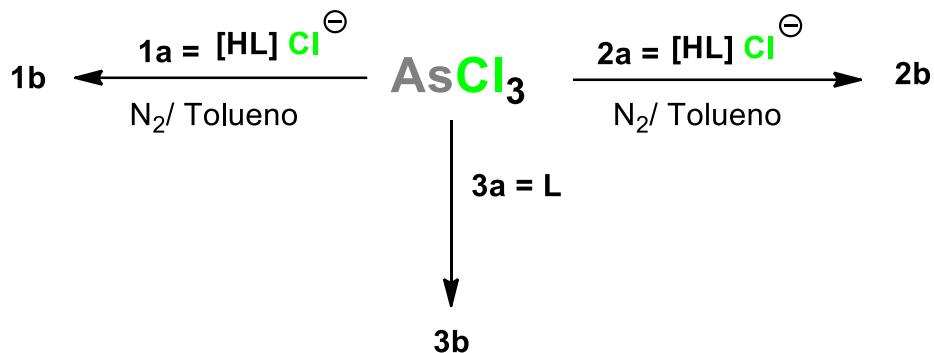
3.4.1 Reactividad del compuesto **1** con AsCl_3 .

Previo a las reacciones con arsénico, se obtuvieron los ligantes **1a**, **2a** y **3a** a partir del clorhidrato amino amida **1**. El disolvente fue evaporado y el sólido se lavó con metanol. La solución metanólica se evapora y el sólido se secó con calentamiento y vacío. (Esquema 3.4)



Esquema 3.4. Obtención de los ligantes **1a**, **2a**, **3a**.

Los compuestos **1a** y **2a** se hicieron reaccionar con AsCl_3 a reflujo en tolueno bajo condiciones anhidras. Las reacciones se siguieron por RMN de ^1H y ^{13}C en $\text{MeOD/D}_2\text{O}$ y $\text{DMSO-d}6$. (Esquema 3.5)



Esquema 3.5. Reacción de los ligantes **1a**, **2a**, **3a** con AsCl_3 .

La RMN de ^{13}C en $\text{MeOD/D}_2\text{O}$ muestra cambios de desplazamientos químico en los C-4, C-6 y C-12 de los compuestos **1a** **1b** y **1** respectivamente. (Tabla 3.1). Aunque hay una diferencia de 1.83-4.06 ppm, se puede afirmar que el enlace $\text{As-N}_{\text{imidazol}}$ no se formó. Esto se deduce de las cuatro señales que aparecen en los espectros de ^{13}C para el anillo bencimidazólico, lo cual indica que el anillo heterocíclico tiene simetría alta debido a los fenómenos de tautomería $\text{H-N-C=N} \rightleftharpoons \text{N=C-N-H}$ en el imidazol. Por otra parte, el desplazamiento químico de C-13 de **1b** es similar al de **1a** y **1**, por lo cual, también se descarta la presencia del enlace $\text{As-N}_{\text{amina}}$. Este resultado se atribuyó a que pH de la solución es demasiado bajo y los centros reactivos del pseudo-péptido no estaban disponibles para reaccionar con el arsénico. Para corroborar dicha hipótesis se obtuvo el espectro de RMN de ^{13}C de **1b** en $\text{DMSO-d}6$.

Tabla 3.1. δ de ^{13}C en $\text{MeOD/D}_2\text{O}$ para **1a** (pH=7) y **1b** (As, pH=7)

| Compuesto | C-2 | C-4 y C-9 | C-5 y C-8 | C-6 y C-7 | C-12 | C-13 |
|-----------|-------|-----------|-----------|-----------|-------|------|
| 1b | 155.3 | 134.7 | 115.3 | 126.0 | 171.7 | 50.3 |
| 1a | 156.6 | 138.7 | 115.8 | 123.8 | 173.6 | 50.6 |
| 1 | 154.7 | 131.8 | 114.9 | 127.6 | 172.0 | 50.3 |

Los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C (en $\text{DMSO-d}6$) para los carbonos del compuesto **1b** se compararon con los de **1a** y **1** (pH de 4.5). La diferencia de 1.3-2.4 ppm entre **1a** y **1b** en el desplazamiento químico de los núcleos C-6 y C-14 se debe al cambio del pH (Tabla 3.2), puesto que los desplazamientos químicos de **1b** y **1** son similares (0.1 a 0.6 ppm). Es decir, El AsCl_3 debió reaccionar con la humedad residual del ligante para producir HCl y bloquear los

sitios nucleofílicos. Por consecuencia el arsénico debió enlazarse a los átomos de oxígeno para formar $\text{As}(\text{OH})_3$ y no el compuesto deseado.

Tabla 3.2. δ de ^{13}C en DMSO-d6 para **1a** (pH=7), **1b** (As, pH=7) y **1** (pH=4.5).

| | C-2 | C-5 y C-8 | C-6 y C-7 | C-12 | C-10 | C-13 | C-14 |
|-----------|-------|-----------|-----------|-------|------|------|------|
| 1b | 155.1 | 114.5 | 124.0 | 169.9 | 43.4 | 48.6 | 16.8 |
| 1a | 155.4 | - | 121.6 | 170.2 | 43.4 | 48.7 | 18.1 |
| 1 | 155.3 | 114.7 | 123.4 | 169.8 | 43.6 | 48.7 | 16.9 |

En el caso del producto **2b**, la espectroscopía mostró que el producto obtenido fue el bisclorhidrato del pseudopéptido **1**. Los desplazamientos químicos entre **2a** y **1** son similares (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. δ de ^{13}C en DMSO-d6 para **1** (sal), **2b** (As, pH = 8) y **2a** (pH = 8).

| | C-2 | C-4 y C-9 | C-5 y C-8 | C-6 y C-7 | C-12 | C-10 | C-13 |
|-----------|-------|-----------|-----------|-----------|-------|------|------|
| 2b | 154.6 | 131.3 | 114.2 | 125.7 | 170.2 | 43.1 | 48.6 |
| 2a | 155.9 | - | - | 121.7 | 172.5 | 43.6 | 49.4 |
| 1 | 154.5 | 131.1 | 114.1 | 125.8 | 170.2 | 43.0 | 48.6 |

La reacción de AsCl_3 se llevó a cabo con **3a** en ausencia del disolvente con calentamiento. El resultado fue la sublimación de un compuesto cuya estructura no se pudo determinar.

La muestra **1b** se calentó a 115 °C, pero, en la RMN de ^{13}C no se observan cambios significativos en los desplazamientos comparado con muestra sin calentar. Pero, en los espectros se observó la presencia de conjunto nuevo de señales que se atribuyeron al isómero *E*. Esto corrobora que la temperatura promueve la isomerización del grupo amida (Figura. 3.10). Lo que significa que el arsénico no forma parte de la molécula.

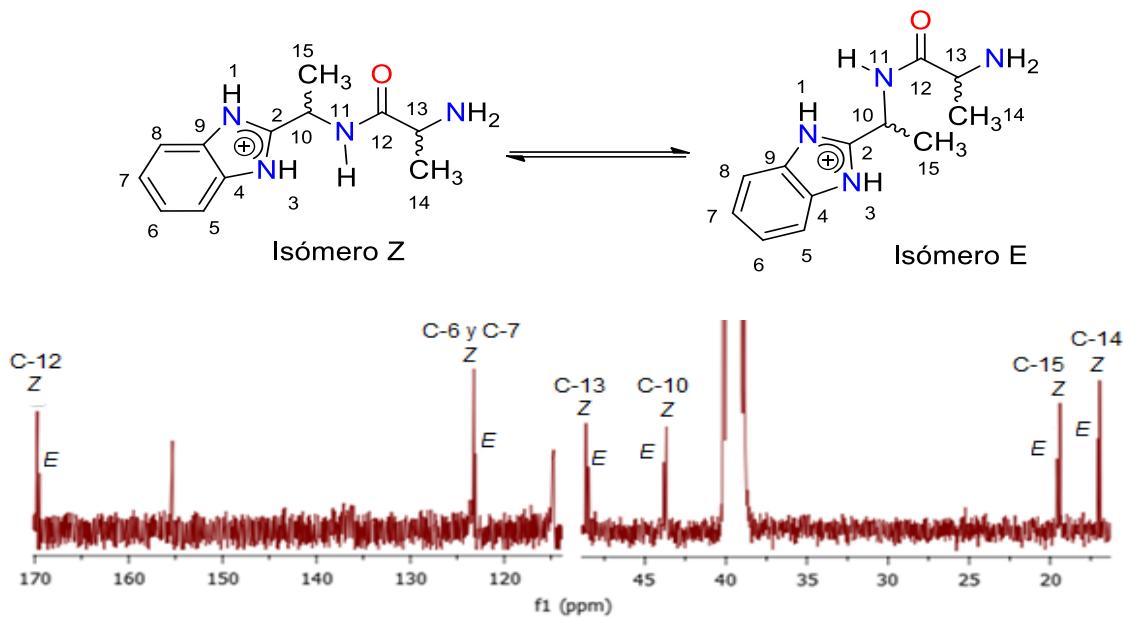


Figura 3.10. Espectros de RMN de ^{13}C en DMSO-d_6 para **1b** (As, pH=7) a 115 $^{\circ}\text{C}$.

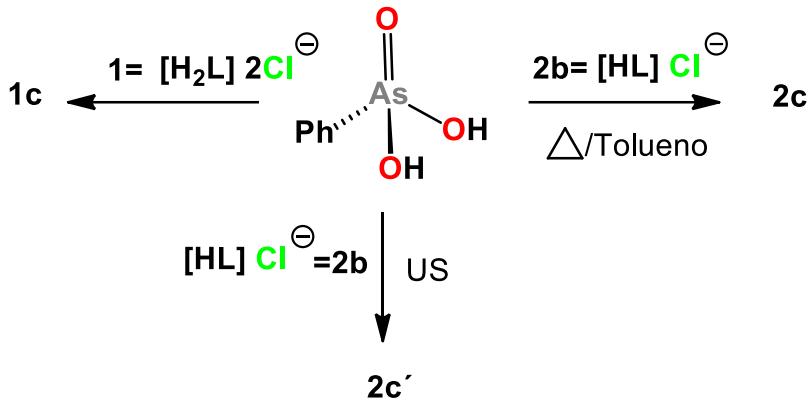
Al comparar los desplazamientos de **1b** a 115 $^{\circ}\text{C}$ con los del compuesto **1** a pH=7 y a 115 $^{\circ}\text{C}$, se observa que en los desplazamientos químicos de los núcleos C-6 y C-12 se diferencian por 0.58-1.32 ppm. Entonces, se corrobora que la reacción con AsCl_3 no sucede y que los cambios en desplazamiento químico se deben a efecto del cambio de pH. (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. δ de ^{13}C en DMSO-d_6 para **1b** (pH=7), **1b** Δ , y **1** (Δ , pH=7).

| | C-2 | C-4 y C-9 | C-5 y C-8 | C-6 y C-7 | C-12 | C-10 | C-13 |
|----------------------------|-------|-----------|-----------|-----------|-------|------|------|
| 1b | 155.1 | 134.5 | 114.5 | 124.0 | 169.9 | 43.5 | 48.6 |
| 1b Δ | 155.1 | - | 114.8 | 123.2 | 169.7 | 43.7 | 48.6 |
| 1 (pH=7, Δ) | 155.8 | - | 115.0 | 121.9 | 170.3 | 44.0 | 48.9 |

3.4.2 Reactividad del compuesto **1** con el ácido fenilarsónico.

Las reacciones del ácido fenilarsónico se llevaron a cabo con **1**, **2a** respectivamente (Esquema 3. 6)



Esquema 3.6. Reacciones de los compuestos **1** y **2b** con ácido fenilarsónico

Primero se llevó a cabo la fusión del compuesto **1** con el ácido fenilarsónico. Nuevamente, el espectro de RMN de ^{13}C mostró que no hubo reacción, ya que los desplazamientos químicos de **1c** comparados con los del clorhidrato **1** son casi iguales. Cabe mencionar que se observó un nuevo par de señales correspondientes a la isomerización de la amida. (Tabla. 3.5).

Tabla 3.5. δ de ^{13}C en DMSO-d6 para **1** y **1c**.

| | C-2 | C-4 y C-9 | C-5 y C-8 | C-6 y C-7 | C-12 | C-10 | C-13 |
|---------------|-------|-----------|-----------|-----------|-------|------|------|
| 1 | 154.5 | 131.1 | 114.1 | 125.8 | 170.2 | 43.0 | 48.6 |
| 1c (Z) | 154.8 | 130.1 | 114.3 | - | 170.0 | 43.3 | 48.6 |
| 1c (E) | 154.8 | 130.1 | 114.4 | - | 169.6 | 43.5 | 48.6 |

El producto **2c** de la reacción del ácido fenilarsónico con el compuesto **2a** en reflujo de tolueno fue analizado por RMN de ^{13}C . El espectro presentó las señales del ácido fenilarsónico y los desplazamientos químicos del pseudo-péptido fueron similares a los del compuesto **1** reportado a pH=6.1 (Tabla 3.6). El comportamiento de la reacción fue similar al observado con AsCl_3 . Es decir los desplazamientos químicos corresponden solo a un cambio del pH.

La reacción de **2a** con el ácido fenilarsónico en tolueno se llevó a cabo por segunda vez pero aplicando ultrasonido. En este caso se obtiene que los desplazamientos químicos de **2c'** que son similares a los del compuesto **1** a pH = 7 (Tabla 3.6).

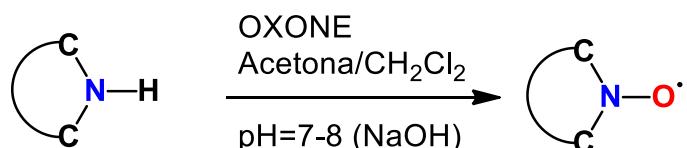
Tabla 3.6. δ de ^{13}C en DMSO-d6 para **2b** (pH = 8), **2c** (As, pH = 8, refluxo), **1** (pH = 6.1), **2c'** (As, pH = 8, US) y **1** (pH = 7).

| | C-2 | C-4 y C-9 | C-5 y C-8 | C-6 y C-7 | C-12 | C-10 | C-13 |
|--------------------|-------|-----------|-----------|-----------|-------|------|------|
| 2c | 155.6 | 133.9 | 115.2 | 121.8 | 169.4 | 43.9 | 48.6 |
| 1(pH = 6.1) | 155.6 | - | - | 121.7 | 169.4 | 43.9 | 48.6 |
| 2c' | 155.7 | 132.2 | 115.0 | 121.6 | 170.4 | 43.8 | 48.8 |
| 1 (pH=7) | 155.8 | - | - | 121.7 | 170.4 | 43.9 | 48.9 |
| 1 | 154.5 | 131.1 | 114.1 | 125.8 | 170.2 | 43.0 | 48.6 |

Se propone un equilibrio ácido base de entre el ligante protonado (HL) y el ácido fenilarsonico (ácido de Brönsted-Lowry) porque disminuye el pH pero no ocurre la formación del pseudopéptido diprotonado. Esto puede ser factible porque el DMSO-d6 no es un disolvente seco y puede haber intercambio de los NH-imidazol con el agua y favorecer el equilibrio tautomérico.

El mayor número de ejemplos en la literatura es para compuestos arsenito o arsenato. Por lo que se planeó oxidar al átomo de nitrógeno imidazólico y posteriormente hacer la reacción con arsénico. Sin embargo, solo se pudo avanzar en la primera etapa que cito a continuación.

El compuesto **1** fue sometido a la oxidación para obtener un nitróxido (N-O) usando el método reportado por Brick.¹⁸ Los resultados obtenidos por RMN de ^{13}C mostraron que al hacer reaccionar el compuesto con OZONE (peroximonosulfato de potasio) y acetona se formaba una mezcla de productos. Del proceso de separación por disolución en diferentes disolventes se pudo observar en RMN de ^{13}C la probablemente formación del producto de oxidación (Esquema 3.7).



Esquema 3.7. Reacción para la obtención de nitroxidos propuesta por Brick¹⁸.

3.5 Conclusión

Las reacciones del compuesto [L] con cloruro de arsénico o ácido fenilarsónico demostraron que el pseudopéptido es una base de Brönsted fuerte y no actúa como nucleófilo.

Se requiere aumentar la nucleofilia del pseudopéptido para formar el heterociclo de arsénico. Es decir, introducir en la estructura molecular el grupo etanolamina el cual ya sabemos que forma enlaces nitrógeno-arsénico y oxígeno-arsénico.

El ácido fenilarsónico modifica el pH y por lo tanto el cambio de desplazamiento químico de los núcleos de ^{13}C del ligante no da evidencia de la formación de enlaces con átomos de arsénico.

3.6 Referencias

- 1.- Hughes, M. F.; Beck, B. D.; Chen, Y.; Lewis, A. S.; Thomas, D.; J.; *Toxicol. Sci.* 2011, 123(2), 305–332.
- 2.- Platanias, L. C.; *J. Biol. Chem.* 2009. 284 (28), 18583–18587.
- 3.- Gaspar, L. F. J.; Tesis de licenciatura; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, 2015.
- 4.- IARC monographs. Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. A Review of Human Carcinogens. Volume 100C. 2012. 41-93.
- 5.- EPA. Sección IV, Otros pesticidas. 2011.
- 6.- Cullen, W. R.; *Is Arsenic an Aphrodisiac?: The Sociochemistry of an Element*; Royal Society of Chemistry, 2008, Cambridge, U.K.
- 7.- Riethmiller, S.; *Chemotherapy*. 2005, 51, 235–242.
- 8.- Rohe, G. H.; Arsenic. In *Reference-Book of Practical Therapeutics*, Vol 1, 1896. F. P. Foster, Ed., D. Appleton and Company, New York.
- 9.- Antman, K. H.; *Oncologist*. 2001 6(Suppl. 2), 1–2.
- 10.- Lloyd, N. C.; Hugh W. M.; Nicholson K. B.; Ronimus S. R.; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 941 –944.
- 11.- Rust, D. M.; Soignet, S. L.; *Oncologist*. 2001, 6(Suppl. 2), 29–32.
- 12.- Rehman, K.; Chen, Z.; Wen, W. W.; Wang, Y. W.; Sakamoto, A.; Zhang, Y. F.; Naranmandura, H.; Suzuki, N.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012. 263, 273–280.
- 13.- Burri, C.; Nkunku, S.; Merolle, A.; Smith, T.; Blum, J.; Brun, R.; *Lancet*. 2000. 355, 1419-1425.
- 14.- Loiseau, P.M.; Trabelsi, M.; Gayral, P.; Wolf, J.G.; *Acta Trop.* 1995. 59, 237-241.
- 15.- Almela, C.; Laparra, J. M.; Vélez, D.; Barberá, R.; Farré, R.; Montoro, R.; *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7344-7351

- 16.- Betz, R.; Klüfers, P.; Inorg. Chem. 2009, 48, 925-935.
- 17.- Pérez, G. F.; Tapia, B. A. R.; Tlahuext, H.; Álvarez, A.; Tlahuextl, M.; Struct. Chem. 2006, 17:359–366.
- 18.- Brik, M. E.; Tetrahedron Lett. 1995, 36, 31, 5519-5522.

ANEXOS

| Compuesto | 1 a pH=7 | 1a | 1e |
|--|---|--|--|
| Fórmula empírica | C ₁₂ H ₁₉ ClN ₄ O ₂ | C ₁₃ H ₂₃ Cl ₃ N ₄ O ₃ Zn | C ₁₃ H ₂₂ Cl ₄ N ₄ O ₂ Zn |
| Peso molecular | 286.76 | 455.11 | 473.52 |
| Sistema Cristalino | Triclínico | Monoclínico | Monoclínico |
| Grupo espacial | P-1 | P2 ₁ /n | P2 ₁ /n |
| a (Å) | 7.8714(4) | 12.5300(9) | 9.9168(3) |
| b (Å) | 10.1644(6) | 10.6664(7) | 7.9154(2) |
| c (Å) | 10.9091(5) | 15.6356(12) | 25.9550(7) |
| α (°) | 116.239(6) | 90 | 90.00 |
| β (°) | 100.769(4) | 110.373(9) | 100.102(3) |
| γ (°) | 97.484(5) | 90 | 90.00 |
| Volumen (Å³) | 746.32(9) | 1959.0(3) | 2005.75(9) |
| Z | 2 | 4 | 4 |
| ρ_{calc} (g/cm³) | 1.2760 | 1.5430 | 1.568 |
| μ (mm⁻¹) | 0.260 | 1.682 | 1.771 |
| F(000) | 304.4 | 939.3 | 968.0 |
| 2Θ (°) | 5.94 a 59.14 | 6.4 a 59.24 | 6.06 a 59.4 |
| Reflecciones Colectadas | 16963 | 21458 | 86093 |
| Reflecciones Independientes (R_{int}) | 3783 (0.0269) | 4989 (0.0614) | 5526 (0.0389) |
| Datos/restricciones/parametros | 3783/0/201 | 4989/0/224 | 5526/0/249 |
| Confiabilidad del ajuste sobre F² | 1.076 | 1.065 | 1.084 |
| Índice final de R [I>=2σ (I)] | R ₁ = 0.0419, wR ₂ = 0.1001 | R ₁ = 0.0575, wR ₂ = 0.1541 | R ₁ = 0.0337, wR ₂ = 0.0737 |
| Índices de R [all data] | R ₁ = 0.0582, wR ₂ = 0.1126 | R ₁ = 0.0925, wR ₂ = 0.1877 | R ₁ = 0.0487, wR ₂ = 0.0811 |