

Estudios hacia la síntesis de suberaminas

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Química de
la Universidad de Los Andes

Laura Marcela Becerra Cely
Director: Diego Alexander Gamba Sánchez
Químico M.Sc, Ph.D.



Departamento de Química

Bogotá, 06 de mayo de 2013

A mis padres y tía.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a Dios por darme la oportunidad de estudiar mi pregrado en una universidad tan prestigiosa y exigente como lo es la Universidad de los Andes.

A mis padres por haberme fomentado los valores que ahora me sirven como herramientas para desenvolverme en la vida. Por apoyarme, quererme, aconsejarme, preocuparse y estar para mí durante toda mi vida.

A mi tía Rosa por siempre estar pendiente de mi formación tanto intelectual como personal.

A mi director Diego Gamba por su paciencia, dirección, enseñanza y guía a lo largo de mi trabajo experimental y por su aporte en mi formación como química.

A mi novio por su colaboración emocional, motivación y su apoyo incondicional.

A mis amigos que conocí al principio, durante y al final de mi carrera por su ánimo y apoyo incondicional, por siempre tratar de estar sonriendo, por acompañarme tanto en los buenos como en los malos momentos.

A mis compañeros de laboratorio por explicarme, colaborarme, aconsejarme, aguantarme mis momentos de mal genio, hiperactividad y alegrías y por hacer que el trabajo en el laboratorio fuera más ameno.

CONTENIDO

	Pág
1. Introducción	5
2. Marco Teórico	6
3. Planteamiento del Problema	9
4. Objetivos	11
4.1. Objetivos Generales	11
4.2. Objetivos Específicos	11
5. Resultados y Discusión	12
5.1. Suberamina A, ent-A	12
5.2. Suberamina B, ent-B	15
6. Conclusiones y perspectivas	17
7. Parte experimental	17
8. Referencias	23

INTRODUCCIÓN

En el presente documento se describe el trabajo realizado en el semestre 2013-1 en el laboratorio de Síntesis Orgánica Bio-y Organocatálisis de la Universidad de los Andes. Esta investigación fue supervisada permanentemente por el Dr. Diego Gamba Sánchez y su objetivo central fue sintetizar suberaminas A, ent-A y B, ent-B, como posibles inhibidores de la enzima ICMT. En las siguientes páginas se podrá evidenciar los resultados obtenidos hasta la fecha, haciendo una detallada descripción de los problemas experimentales que se tuvieron en cada uno de los pasos de síntesis y las soluciones propuestas para obtener cada compuesto. Por ende, el presente manuscrito se divide en tres partes.

En la primera parte, se explicará el proceso de modificación postraduccional que sufren algunas proteínas debido a su motivo terminal y explicaremos porque este proceso tiene interés para nosotros y como se conecta la síntesis de suberaminas con este interés. Seguidamente explicaremos el aislamiento y síntesis de la aplisamina 6, inhibidor de la enzima ICMT e inspirador de nuestra propuesta de síntesis. El aislamiento de suberaminas A y B y propuesta de síntesis para estas.

Luego nos centraremos en la descripción y discusión de cada una de las reacciones que se llevaron a cabo para poder obtener las moléculas objetivo. Esta parte del trabajo se subdividió en dos partes: la primera para las suberaminas A, ent-A y la segunda para las suberaminas B, ent-B.

Finalmente se encuentra la parte experimental donde describimos todas las técnicas y los procedimientos experimentales que usamos durante el trabajo y se presenta la información que corresponde a la caracterización de cada uno de los compuestos obtenidos.

MARCO TEÓRICO

Las proteínas son sustancias orgánicas nitrogenadas que se encuentran en las células animales y vegetales. Son polímeros lineales que están compuestos por aminoácidos, estos se pliegan en una gran diversidad de formas tridimensionales lo cual les proporciona una variedad de funciones. Las proteínas son componentes esenciales de todas las células vivas. Su misión en el organismo depende del tipo de proteína, entre ellas se encuentran unas de tipo estructural y otras de tipo funcional.¹

Los residuos de aminoácidos que se producen en péptidos y proteínas sufren ciertas transformaciones conocidas como modificaciones postraduccionales;² las cuales sirven a menudo para proteger los péptidos y a las proteínas de una rápida descomposición biológica y en muchas ocasiones alteran las propiedades funcionales de las proteínas.³

Los genes Ras son una familia de oncogenes estrechamente relacionados, los cuales se han detectado en tumores humanos y en células normales. Todas las proteínas tienen un conjunto de motivos que las identifica. Los genes Ras codifican para cuatro proteínas; estas proteínas tienen un motivo CAAX en su extremo C-terminal, donde “C” es cisteína, “AA” es por lo general un residuo de aminoácido alifático y “X” es cualquier aminoácido. Este motivo en las proteínas eucariotas sirve como marcador para que se realicen modificaciones postraduccionales que son importantes para su localización y función.^{4,5}

En el esquema 1 se observa el proceso de modificación de proteínas con dicho motivo, esta transformación se lleva a cabo por una secuencia de tres reacciones. El proceso inicia con el ataque de un lípido isoprenil a la cisteína del C-terminal. Dependiendo de “X” en el motivo CAAX la cisteína forma un enlace covalente con un grupo de 20 carbonos que provienen del lípido geranylgeranil, catalizado por la proteína geranylgeraniltransferasa o un grupo de 15 carbonos del lípido farnesil, catalizado por la proteína farnesiltransferasa (a). Después del proceso de prenilación se da la eliminación de los tripéptidos AAX, ésta reacción es catalizada por el gen RCE1 (b). En la última etapa del proceso de modificación el C-terminal de la isoprenilcisteína es metilado por la enzima isoprenilcisteína carboxi metiltransferasa (ICMT) (c).³

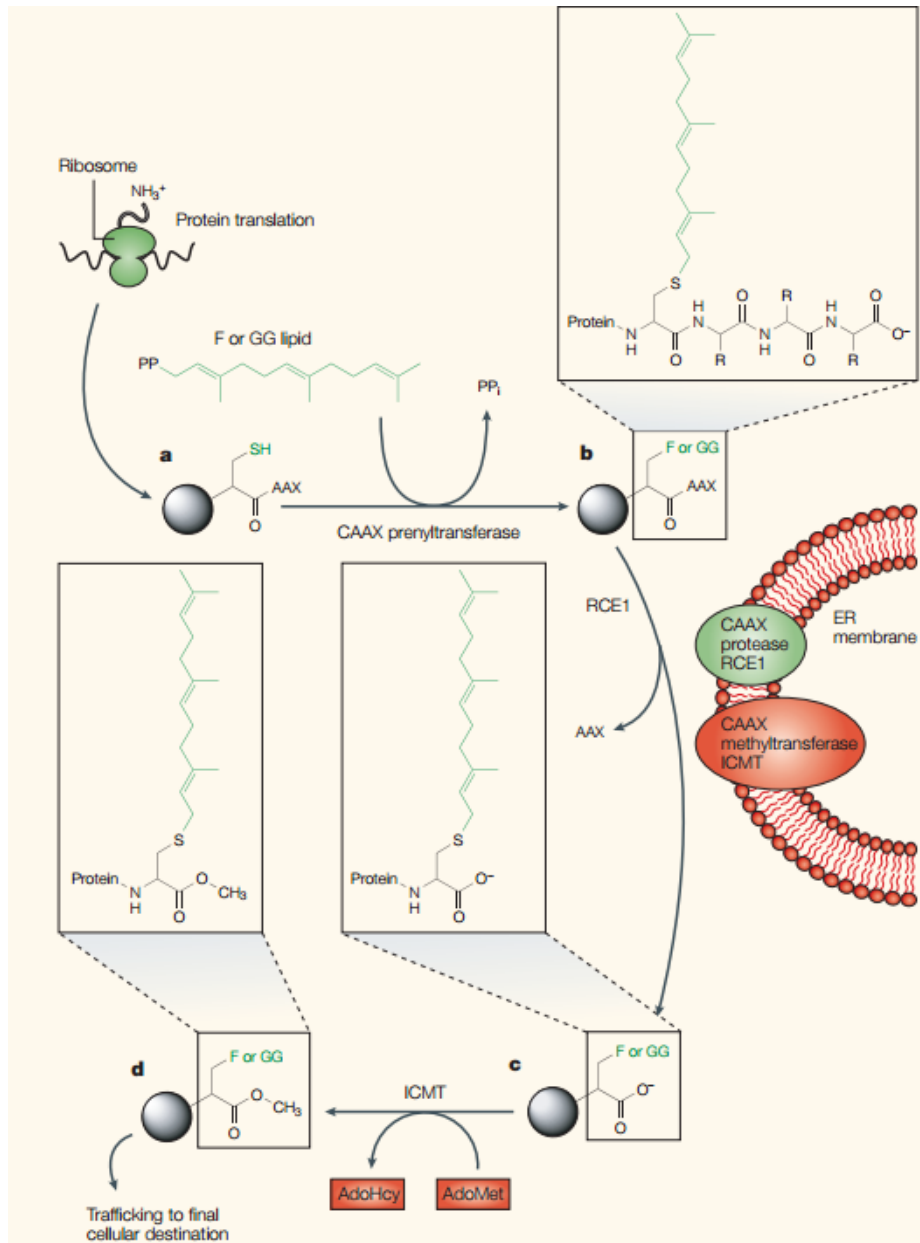
¹ Tejón, J. *Bioquímica Estructural*; Editorial Tebar, 2001; Vol. 2001, pp. 53–54.

² Koolman, J.; Röhm, K.-H. *Bioquímica: textos y atlas*; 3ra edición.; Ed. Médica Panamericana: Madrid, 2005; Vol. 60, pp. 62–63.

³ Esterl, W. M. *Bioquímica.: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*; Centelles, J., Ed.; Reverte: Barcelona, 2009; pp. 89–90.

⁴ Voet, D.; Voet, J. G. *Bioquímica.*; Ed. Médica Panamericana, 2006; pp. 416–417.

⁵ Yang, J.; Kulkarni, K.; Manolaridis, I.; Zhang, Z.; Dodd, R. B.; Mas-Droux, C.; Barford, D. *Mol. Cell.*, **2011**, *44*, 997–1004.



Esquema 1. Modificación de proteínas con motivo CAAX.⁶

Esta *vía* de modificación de proteínas ha sido estudiada como posible blanco en la terapia contra el cáncer debido a que la mayoría de los miembros de la familia Ras, (que contiene muchos oncogenes), son modificados por el proceso de prenilación. Existen ciertos estudios acerca de la inhibición específica de la enzima ICMT, en donde se muestra que al inhibir la enzima se inhibe la señalización mediada por Ras, el crecimiento celular, y la oncogénesis. Estos estudios evidencian que la tumorigénesis es notablemente afectada en las células que carecen de ICMT.⁷ Por esto el desarrollo de inhibidores para esta enzima es un nuevo enfoque para encontrar fármacos contra el cáncer.

⁶ Winter-Vann, A. M.; Casey, P. J. *Nature Reviews. Cancer* **2005**, *5*, 405–412.

⁷ Cushman, I.; Casey, P. J. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27964–27973.

Con el fin de descubrir inhibidores de ICMT, se realizó un bioensayo dirigido a la purificación de extractos de la esponja *Pseudoceratinasp.* (*Pseudoceratinidae*) proporcionando un nuevo derivado de bromotirosina conocido como apllsamina 6. Este inhibidor está compuesto por una unidad derivada de bromotirosina y una de bromometóxicinamol. La apllsamina 6 tiene un enlace α,β -insaturado a un grupo amida como componente activo.⁸ Apllsamina 6 muestra la inhibición de ICMT con IC_{50} de $14 \mu\text{M}$, gracias a este valor de inhibición es una nueva adición a la pequeña lista de los inhibidores de la enzima ICMT.⁹

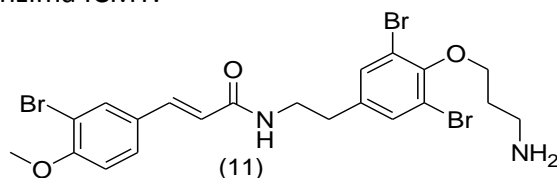
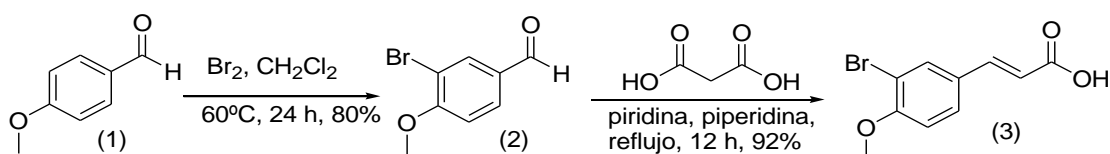


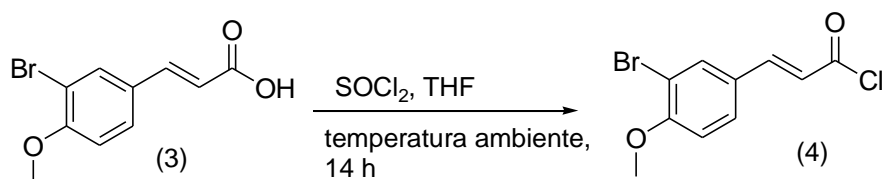
Figura 1. Estructura de apllsamina 6.¹⁰

La más reciente síntesis total de la apllsamina 6 se inició con la síntesis del ácido *trans*-(3-bromo-4-metoxi-fenil) propenoico (3), el cual se observa en el esquema 2. El *p*-anisaldehído (1) reacciona con bromo molecular durante 24 h para obtener 3-bromo-4-metoxibenzaldehído (2), el cual por medio de una condensación de Doebner-Knoevenagel utilizando ácido malónico en presencia de piridina y piperidina permite obtener el compuesto (3).⁹



Esquema 2. Síntesis del compuesto 3.

El ácido (3) es transformado en el correspondiente cloruro de ácido (4) utilizando cloruro de tionilo (esquema 3), puesto que luego sufrirá una sustitución nucleofílica por su alta reactividad.⁹



Esquema 3. Síntesis del compuesto 4.

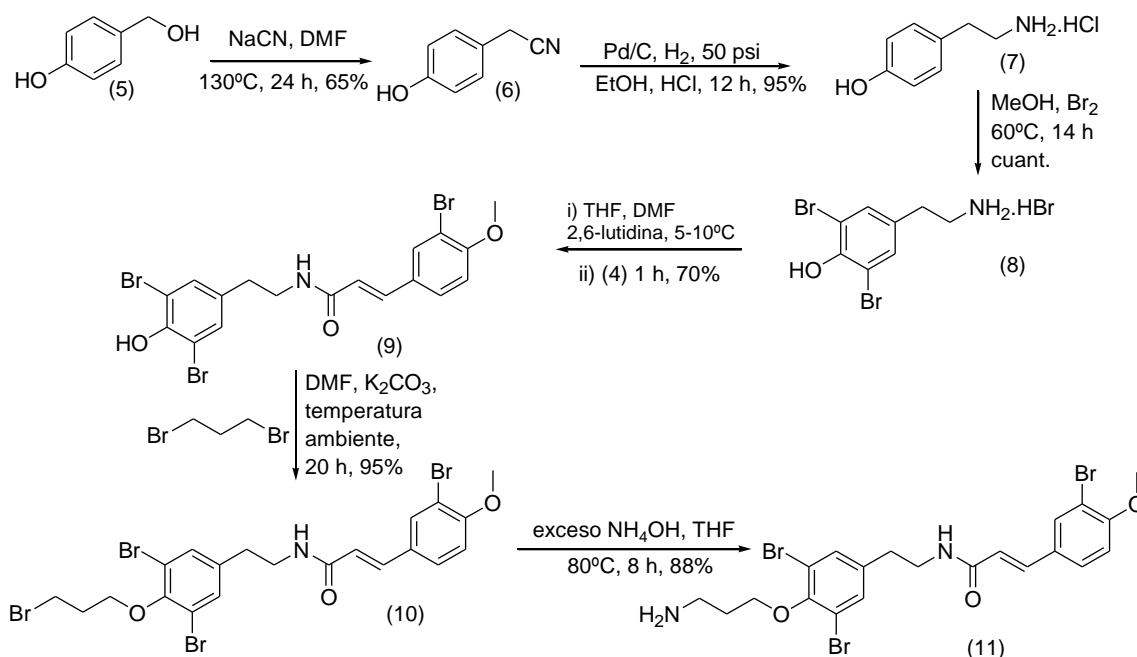
El siguiente paso de la síntesis es la bromación de 4-hidroxifenetilamina (7), la cual es preparada a partir de 4-hidroximetilfenol (5) en metanol con bromo a 60°C para dar el fenol dibromado (8) con rendimiento cuantitativo. La síntesis continúa con la acilación quimioselectiva del aminofenol (8). La solución del cloruro de ácido (4) se agregó a la solución del dibromuro (8) en una mezcla de THF y DMF (1:1) de $5\text{--}10^\circ\text{C}$ utilizando

⁸ Buchanan, M. S.; Carroll, A. R.; Fechner, G. a; Boyle, A.; Simpson, M.; Addepalli, R.; Avery, V. M.; Hooper, J. N. a; Cheung, T.; Chen, H.; Quinn, R. J. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1066–1067.

⁹ Ullah, N.; Arafah, K. M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 158–160.

¹⁰ García, J.; Pereira, R.; De Lera, A. R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5028–5030.

como base 2,6-lutidina, lo cual produjo la amida (9) que se purificó mediante cromatografía de columna. La amida (9) se sometió a alquilación por la adición de un exceso de 1,3-dibromopropano en DMF utilizando carbonato de potasio como base para obtener el compuesto (10), que a su vez se hizo reaccionar con hidróxido de amonio en exceso a 80°C durante 8 h en un tubo sellado para producir finalmente la aplisamina 6 (11). (Esquema 3).⁹



Esquema 4. Síntesis de aplisamina 6 (12) a partir de los compuestos 4 y 7.

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

Las suberaminas A y B son un tipo especial de productos naturales bromados, aislados en 2011 de Red Sea Sponge mollis, las cuales fueron estudiados como posibles agentes antioxidantes pero no mostraron actividad significativa.¹¹ Dada su similitud estructural con la aplisamina 6, son posibles candidatos inhibidores de ICMT.

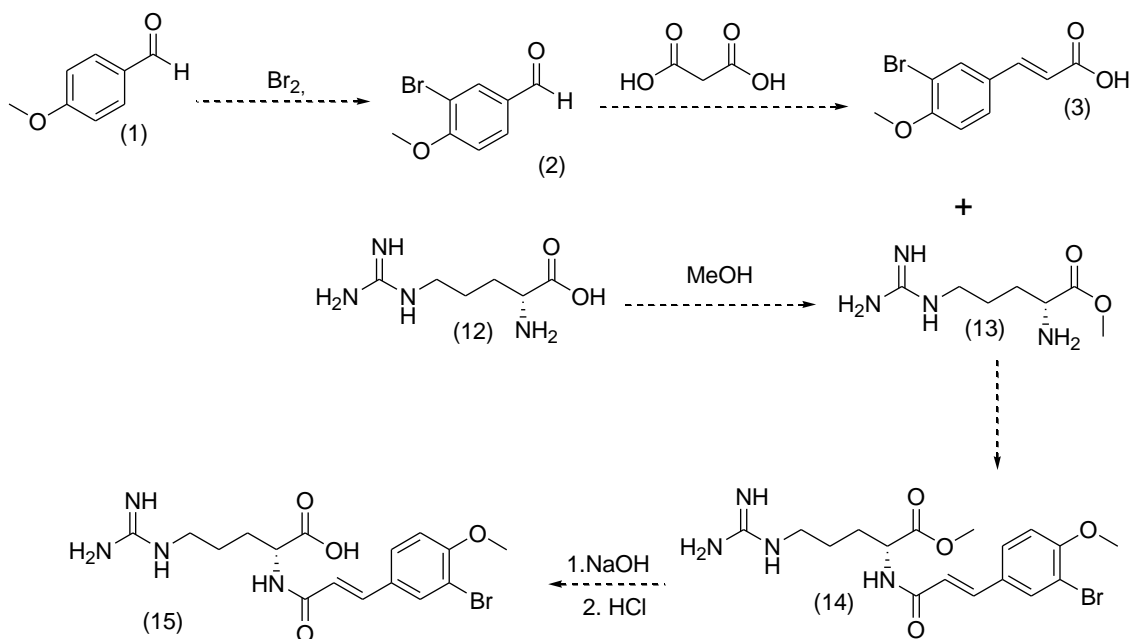
Cabe señalar que a pesar de su simplicidad estructural las suberaminas aún no han sido sintetizadas.

Como muchos productos naturales aislados de organismos marinos, la configuración absoluta del aminoácido en las suberaminas es contraria a la encontrada en humanos, por esta razón planteamos sintetizar tanto las suberaminas naturales como sus enantiómeros.

La propuesta de obtención de las suberaminas A y ent-A (15) se muestra en el esquema 4: comienza por la obtención de 3-bromo-4-metoxibenzaldehído (2) por

¹¹ Shaala, L.; Bamane, F. H.; Badr, J. M.; Youssef, D. T. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1517–20.

medio de la bromación de 4-metoxibenzaldehído.¹² El siguiente paso es una condensación de Doebner-Knoevenagel utilizando ácido malónico en presencia de piridina y piperidina para obtener el ácido *trans*-(3-bromo-4-metoxifenil)propenoico (3).¹³ La (L) o (D)-arginina (12) se protege por esterificación.¹⁴ Para la obtención de las suberaminas A y ent-A se planea realizar una amidación tipo Steglich a partir del compuesto (3), y el éster de la arginina (13) obtenido previamente.¹⁵



Esquema 5. Propuesta de Síntesis de suberamina A y ent-A (15).

La propuesta para la obtención de las suberaminas B y ent-B (20) es mostrada en el esquema 6. La síntesis parte de 4-hidroxibenzaldehído (15) que al ser más activado que (1) debería permitir obtener el producto dibromado, usando las mismas condiciones descritas anteriormente. Luego el compuesto (16) debe metilarse con MeI y así obtener 3,5-dibromo-4-metoxibenzaldehído (17).¹⁶ Los siguientes pasos de la síntesis deben ser idénticos a los usados en la síntesis de suberaminas A y ent-A.

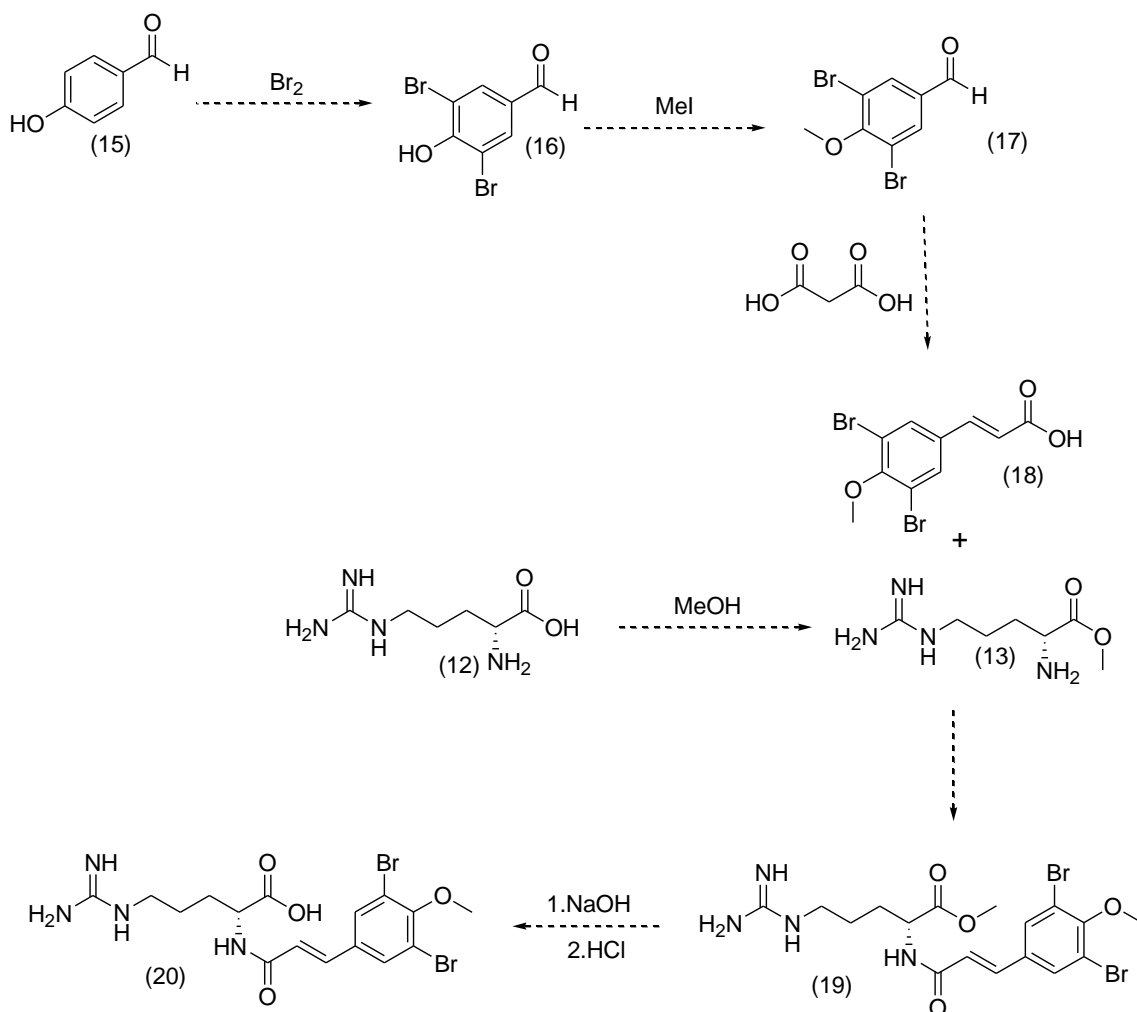
¹² Adaptación de: Ji, Y.-F.; Zong, Z.-M.; Wei, X.-Y. *Synthetic Commun.* **2002**, *32*, 2809–2814.

¹³ **Adaptación de:** Cao, T.; Chen, J.; Yang, C.; Cao, W. *New J. Chem.* **2001**, *25*, 305–307.

¹⁴ Campbell, C. D.; Concellón, C.; Smith, A. D. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2011**, *22*, 797–811.

¹⁵ Furlan, A.; Colombo, F.; Kover, A.; Issaly, N.; Tintori, C.; Angeli, L.; Leroux, V.; Letard, S.; Amat, M.; Asses, Y.; Maigret, B.; Dubreuil, P.; Botta, M.; Dono, R.; Bosch, J.; Piccolo, O.; Passarella, D.; Maina, F. *Eur J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 239–54.

¹⁶ Takahashi, M.; Yamamoto, A.; Inuzuka, T.; Sengoku, T.; Yoda, H. *Tetrahedron.* **2011**, *67*, 9484–9490.



Esquema 6. Propuesta de Síntesis de suberamina B y ent-B (20).

OBJETIVOS

Objetivos General

Realizar estudios orientados a la síntesis de las suberaminas A, ent-A, suberamina B y ent-B, como posibles inhibidores de la enzima ICMT.

Objetivos específicos

- Bromar el *p*-anisaldehído y el *p*-hidroxibenzaldehído.
- Metilar el producto obtenido del *p*-anisaldehído.
- Obtener los ácidos insaturados provenientes de los aldehídos previamente sintetizados.
- Esterificar la arginina natural y no natural.
- Caracterizar completamente los compuestos obtenidos mediante análisis IR, espectrometría de masas y espectroscopia RMN ^1H y ^{13}C .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

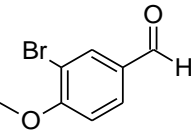
Teniendo en cuenta que la síntesis total de productos naturales, aún de moléculas aparentemente sencillas, no es algo simple. Nosotros enfocamos nuestros estudios en la síntesis de suberaminas, sin embargo, dado el carácter exploratorio de este trabajo, únicamente logramos llegar a los productos precursores del acoplamiento de Steglich. Esto se debe principalmente a que es un trabajo dirigido y la intensidad horaria no es mayor a 4 horas semanales. Debemos anotar que se realizó un trabajo previo en el curso de Química Orgánica III y además los resultados adicionales de este trabajo están en curso, con miras a terminar el trabajo inicialmente planteado.

Suberamina A (15) y ent-A (15a)

El primer paso que se realizó para la síntesis de estos dos compuestos fue la bromación del *p*-anisaldehído. Esta reacción se trato de llevar a cabo por medio de varios procedimientos con el fin de encontrar el mejor rendimiento de reacción, el producto esperado sin mezclas, eliminar complicaciones experimentales y quizás reducir costos en materiales y reactivos utilizados.

En la tabla 1 se pueden observar las variaciones en los reactivos, condiciones, y rendimiento de cada procedimiento que se llevó a cabo para obtener la molécula (2).

Tabla 1. Síntesis del compuesto (2).
(No determinado (N.D))

Compuesto	Reacción	Reactivos	Condiciones	Conversión	Rendimiento de reacción
 (2)	1	<i>p</i> -anisaldehído, etanol, bromo molecular, amberlita	72 h, temperatura ambiente	0%	-----
	2	<i>p</i> -anisaldehído, bromo molecular, ácido acético	48 h, 50°C	100%	N.D
	3	<i>p</i> -anisaldehído, bromo molecular, diclorometano	24 h, 60°C	baja	N.D
	4	<i>p</i> -anisaldehído, bromo molecular, metanol	120 h, reflujo	100%	40%

La entrada 1 muestra un ensayo de bromación en presencia de Amberlita como catalizador. Este procedimiento se hizo tratando de reproducir una metodología descrita para la bromación de cetonas aromáticas usando esta resina como catalizador.¹⁷ A pesar de haber seguido el procedimiento descrito, no se observó conversión alguna, aun después de 72 h y varias adiciones de amberlita.

Este resultado sugiere que si bien la bromación de α -cetonas y metil cetonas aromáticas en presencia de Amberlita puede ser un método interesante, su aplicación es limitada y faltan estudios que permitan determinar la aplicabilidad (alcances y limitaciones) de la reacción.

¹⁷ Camargo, D. Síntesis y caracterización de α -bromocetonas, Trabajo de Grado, Universidad de los Andes, 2012, pp. 1–14.

La entrada 2¹⁸ se siguió por cromatografía de capa delgada. La reacción se trató cuando se observó que el precursor se había consumido completamente. Para este procedimiento se considera que las condiciones son muy fuertes debido a que se obtuvieron múltiples productos, e incluso después de realizar una cromatografía de columna no fue posible obtener un producto puro por lo tanto decidimos explorar otras opciones y no usar este método.

La entrada 3 reproduce las condiciones descritas en la literatura.⁹ En nuestro caso es posible evidenciar un nuevo producto por CCD que probablemente sea el compuesto que nos interesa, sin embargo, la conversión es demasiado baja. En CCD observamos el compuesto de partida y el producto pero este último con poca conversión.

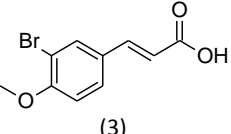
Este resultado nos llevó a cuestionarnos sobre la pureza de nuestro aldehído inicial pero el análisis mostró que se encontraba suficientemente puro.

Decidimos entonces usar un disolvente más polar que fuese capaz de solvatar y disociar la molécula de Br₂ haciendo al bromo más electrofílico.

Luego de varios ensayos y de buscar y optimizar las condiciones de reacción se obtuvo 3-bromo-4-metoxibenzaldehído (2) con 40% de rendimiento y alta pureza, evidenciada tanto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas como por IR.¹⁹

Por otro lado, para la obtención del compuesto (3) se realizaron dos reacciones que difieren entre ellas solo por el catalizador usado. Las condiciones, reactivos, rendimientos y conversión de cada una de las reacciones se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Síntesis del compuesto (3).

Compuesto	Reacción	Reactivos	Condiciones	Conversión	Rendimiento de reacción
	5	Compuesto (2), ácido malónico, piridina, prolina	17 h, reflujo	100%	<86%
	6	Compuesto (2), ácido malónico, piridina, piperidina	19 h, reflujo	100%	36%

El cambio de catalizadores en la reacción 5 y 6 se hizo con el fin de encontrar el procedimiento con mayor rendimiento de reacción. A pesar que la reacción 6 esta reportada en literatura¹⁰ y la reacción 5 es una adaptación de esta, en la tabla 2 se evidencia que la entrada 5, que utiliza prolina como catalizador, tiene un mayor rendimiento.

El mecanismo que sigue esta reacción tanto para la piperidina como la prolina es exactamente el mismo. Solamente difieren en el ion iminio que se forma, dicha formación se da gracias al ataque del nitrógeno al carbonilo. La formación del ion iminio siempre se da con una carga positiva en el nitrógeno. En el caso de la prolina dicha carga será estabilizada por la carga negativa que proviene del radical carboxilo que tiene en su estructura. Gracias a la estabilización se produce la formación de un intermediario más estable lo cual trae consigo una energía de activación menor.

¹⁸ Erb, W.; Payet, E. *l'actualité chimique*. **2010**, 345, 33–37.

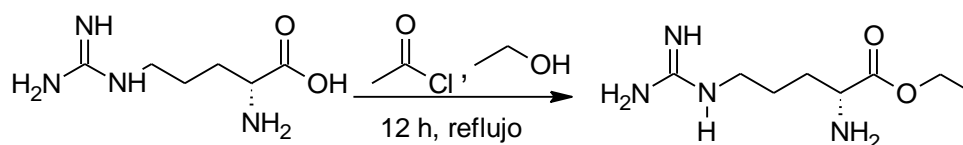
¹⁹ **Adaptacion de:** Hentschel, F.; Sasse, F.; Lindel, T. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 7120–33.

Dada la mínima solubilidad de este ácido en disolventes como DCM, AcOEt, Pentano, etc, este compuesto no se purificó por cromatografía de columna. El procedimiento de purificación consistió en formar la sal sódica del ácido, a la cual se le realizaron lavados con un disolvente orgánico y posteriormente se obtuvo el ácido de interés por medio de precipitación al disminuir el pH.

Luego de seguir el procedimiento y las condiciones de la entrada 5 y 6 obtuvimos el ácido *trans*-(3-bromo-4-metoxifenil)propenoico caracterizado tanto por RMN ^1H y ^{13}C como por IR.

Basándonos en el análisis espectroscópico para el compuesto (3), se puede evidenciar que el ácido α,β -insaturado de la entrada 6 tiene una alta pureza, a pesar de ser el ácido con menor proporción de masa obtenida. Por el contrario, la información suministrada por los espectros para el ácido de la entrada 5 nos permite evidenciar que el compuesto contiene pequeñas cantidades de una impureza no identificada, pensamos entonces que es necesario en el futuro mejorar el proceso de extracción y purificación de este ácido por ambos métodos, con el fin de obtener purezas comparables y así resultados concluyentes en términos de rendimiento.

La siguiente reacción que se llevó a cabo para completar la síntesis propuesta fue la esterificación de L-arginina. La reacción 7 reproduce las condiciones descritas en la literatura.²⁰



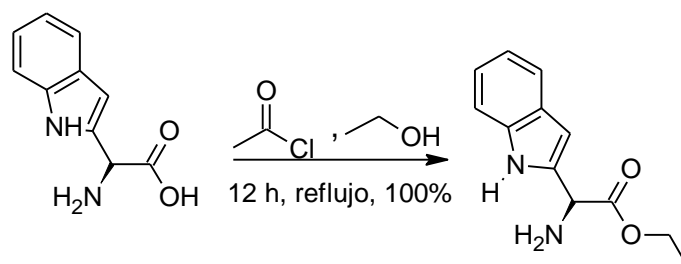
Esquema 7. Condiciones de síntesis del compuesto (13).

Al realizar CCD fue posible evidenciar un nuevo producto que probablemente sea el ester buscado, la conversión es completa, pero la identidad del producto obtenido no pudo ser corroborada dada su mínima solubilidad en disolventes deuterados disponibles. Por lo tanto no se realizó la purificación ni caracterización pertinente del compuesto (13). De acuerdo con la literatura,²¹ el ester es un sólido cristalino, en nuestro caso aun después de tiempos prolongados de secado y coevaporación del agua con tolueno, solo obtuvimos dicho sólido una vez, este es delicuesente y por una falla de manipulación no logramos usarlo con éxito en la siguiente etapa de reacción. Debemos señalar que este método de esterificación ha sido usado con éxito en otros aminoácidos en el laboratorio como lo son L-serina, L-triptofano entre otros.

Adicionalmente, con el fin de sintetizar análogos de las suberaminas se realizó la esterificación de L-triptofano. La reacción 8 reproduce las condiciones que se utilizaron para la esterificación de L-arginina.²⁰

²⁰ Zern, B. J.; Chu, H.; Osunkoya, A. O.; Gao, J.; Wang, Y. *Adv. Funct. Mater.*, **2011**, *21*, 434–440.

²¹ Anjun, L.; Kezhuang, S.; Zhen-Yuan, Z.; Fran, A. *Asian J. Chem.*, **2012**, *24*, 4819–4820.



Esquema 8. Condiciones de síntesis del compuesto (21).

Esta reacción se siguió por cromatografía de capa delgada observando un nuevo producto que quizás sea el compuesto de interés. Se puede evidenciar que la conversión es completa y si asumimos un compuesto puro (probable de acuerdo a lo que muestran las placas) el rendimiento es bastante alto. El producto (21) se caracterizó por medio de espectroscopia infrarroja, confirmando la obtención del ester de L-triptofano, sin embargo, es necesario realizar otros análisis con el fin de confirmar su pureza y corroborar su formación.

En este momento se están buscando y optimizando las condiciones para llevar a cabo la reacción de esterificación de los aminoácidos de tal manera que se puedan purificar y caracterizar los productos obtenidos. Además se están realizando ciertos ensayos para lograr el acoplamiento de la los esteres de aminoácidos con ácidos α,β -insaturados.

Suberamina B (20) y ent-B (20a)

El primer paso de la síntesis de la suberamina B y ent-B fue la bromación de 4-hidroxibenzaldehído. Esta reacción se llevó a cabo por varios procedimientos y condiciones con el fin de optimizar las condiciones de reacción. En la tabla 6 podemos observar las condiciones, rendimiento y conversión que se llevaron a cabo para obtener el compuesto (16).

Tabla 5. Síntesis del compuesto (16).

Compuesto	Reacción	Reactivos	Condiciones	Conversión	Rendimiento de reacción
 (16)	9	4-hidroxibenzaldehído, bromo molecular, hierro	48 h, temperatura ambiente	100%	N.D
	10	4-hidroxibenzaldehído, bromo molecular, metanol	48 h, temperatura ambiente	100%	100%

La entrada 9 de la tabla 5 muestra un ensayo de un método de bromación enseñada en los cursos de teoría de química orgánica.²² A pesar que la reacción se siguió por medio de CCD y se evidenció la formación de un nuevo producto teniendo una conversión completa se verificó por medio de espectrometría de masas acoplado a

²² Adaptación de: Vogel, A. I.; Furniss, B. S. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*; Longman, 1989; p. 864.

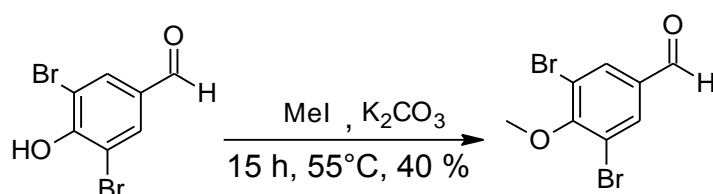
gases que dicho compuesto no era el esperado, hace falta caracterización y encontrar cual fue el producto obtenido. A pesar de haber seguido el procedimiento descrito se puede decir que el método es bastante limitado o que quizás solo sea útil en caso de anillos altamente desactivados.

La entrada 10 es una adaptación de condiciones descritas en literatura.¹⁹ Era de esperarse que el 4-hidroxibenzaldehído se bromara en las posiciones orto al grupo -OH debido a que este sustituyente es un grupo activador fuerte, esto en el anillo aromático afecta la reactividad del anillo tanto para la sustitución como para la orientación gracias al efecto de resonancia. Por otra parte, la influencia del bromo también afecta la orientación que se dé en la sustitución. Esta orientación depende básicamente de la alta electronegatividad. Debido a la polarización del enlace carbono-bromo se da la disminución de la densidad electrónica del anillo, por lo tanto se evidencia una disminución en la velocidad de reacción. La influencia del disolvente es crucial en este punto, al ser polar ayuda a la polarización del enlace bromo-bromo, haciéndolo más dispuesto al ataque nucleofílico del anillo.

Luego de optimizar condiciones y alcanzar una conversión completa para esta reacción obtuvimos el 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído (16) con un rendimiento cuantitativo y una alta pureza evidenciada tanto por RMN ¹H y ¹³C como por espectrometría de masas acoplada a gases y por espectroscopia IR.

El producto fue caracterizado y sus espectros corresponden a los descritos previamente en la literatura.^{23,24}

El siguiente paso de la síntesis fue la metilación del compuesto (16). La reacción 11 es la reproducción de las condiciones descritas en la literatura.¹⁶



Esquema 9. Condiciones de síntesis del compuesto (17).

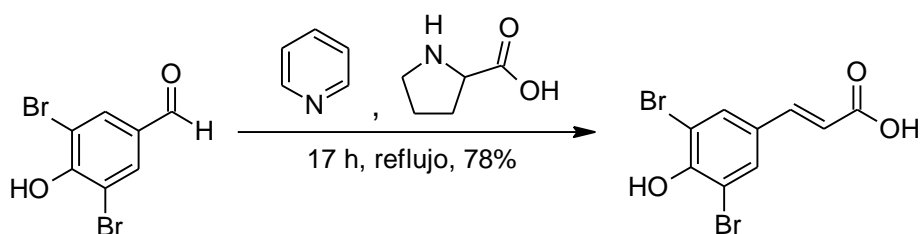
Gracias a CCD se pudo observar que la conversión de la reacción fue completa. Se pudo evidenciar que se obtuvo el compuesto 3,5-dibromo-4-metoxibenzaldehído (17) con un 40% de rendimiento y una alta pureza observada en el análisis RMN ¹H y ¹³C como por espectrometría de masas acoplada a gases y espectroscopia IR.

El producto fue caracterizado y sus espectros corresponden a los descritos previamente en la literatura.¹⁶

²³ Ji, Y.-F.; Zong, Z.-M.; Wei, X.-Y. *Synthetic Commun.* **2002**, 32, 2809–2814.

²⁴ Zhu, G.; Yang, F.; Balachandran, R.; Ho, P.; Day, B. W. *J. Med. Chem.* **2006**, 2063–2076.

El último paso que se realizó en la síntesis de estas suberaminas fue la formación del ácido α,β -insaturado dibromado, donde se reprodujeron las condiciones de reacción descritas en la literatura.¹⁰



Esquema 10. Condiciones de síntesis del compuesto (22).

Para la síntesis del compuesto (22) se utilizó como catalizador la prolina debido a que en síntesis preliminares de otros ácidos α,β -insaturado en el presente trabajo nos había dado buenos resultados y por las restricciones legales al no contar con piperidina en la universidad.

Para la síntesis del producto (22) seguimos el mismo proceso de purificación que para los ácidos anteriores, sin embargo, en este caso la pureza del producto obtenido no es alta, los espectros RMN muestran claramente el producto deseado como compuesto mayoritario de la mezcla, pero se evidencian también algunas impurezas en proporciones no despreciables, pero no identificadas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En conclusión, llegamos un poco más allá de la mitad de la síntesis para cada una de las suberaminas. Solo nos queda faltando realizar los acoplamiento de los aminoácidos con los ácidos α,β -insaturado, saponificar el compuesto que se obtenga y sintetizar algunos análogos (perspectiva).

Los rendimientos en cada una de las etapas se pueden mejorar debido a que el seguimiento por cromatografía de placa delgada en cada una de las reacciones que se realizaron indicó una conversión total del 100%. De igual manera se deben implementar mejores métodos de purificación en especial para los ácidos α,β -insaturados.

EXPERIMENTAL

General

Physical Data and Spectroscopic Measurements

¹H NMR spectra were recorded on a BRUKER Avance 300 (300 MHz) instruments and EFT-90 Anasazi (90 MHz) instruments, Inc. (90 MHz). The chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) referenced to TMS. Data are reported as follows: δ , chemical shift; multiplicity (recorded as br, broad; s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; quint,

quintuplet and m, multiplet), coupling constants (J in Hertz, Hz), integration and assignment (aromatic, ar).

¹³C NMR spectra were recorded on the same instrument at 75 MHz and 22.5 MHz. The chemical shift are expressed in parts per million (ppm), referenced to TMS. Assignments were obtained using J-mod experiments, and when necessary, COSY, NOESY and HSQC experiments.

Infrared spectra (IR) were obtained on a PERKIN-ELMER FT 1600 instrument or on a PERKIN-ELMER Spectrum 2000 and are reported in terms of frequency of absorption (ν , cm^{-1}) using CaF₂ or NaCl cells (solution of the product in CH₂Cl₂).

Mass spectra (MS) were obtained on a GC/MS coupling with a HEWLETT-PACKARD HP 5890 chromatograph. Ionization was obtained by electron impact (EI) or chemical ionization with ammonia (CI, NH₃). Mass spectrum data are reported as m/z.

Chromatography

Flash chromatography was performed using silica gel 60, 40-63 mesh.

Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on precoated plates of silica gel 60F 254. Visualization was performed with an UV light then potassium permanganate ethanolic solution, followed by heating as developing agents.

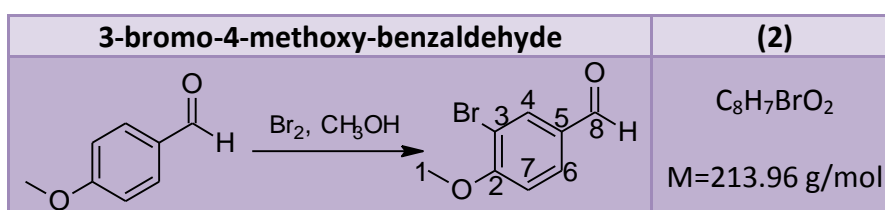
- Basic KMnO₄ solution was prepared using K₂CO₃ (40 g) with KMnO₄ (6 g) in water (600 mL) and NaOH 10% (5mL).

Nomenclature

IUPAC nomenclature was used for all compounds (determined by Chem Draw Ultra 11.0.1 or MarvinSketch 5.9.0).

For the description of NMR spectra, the numbering used follows the chain extension as described on the formula, not the IUPAC numbering. Compounds that are not fully characterized have already been described in the literature, according to the references cited.

Suberamina A and ent-A



p-Methoxybenzaldehyde (0.2g, 0.2 mL, 1.46mmol) was dissolved in MeOH (14.5 mL) in ice bath. Bromine (0.2mL, 0.56g, 3.52mmol) was added slowly and the reaction mixture was stirred 28h at rt. A small amount of solid NaHSO₃ was added to the mixture until the solution take a clearer coloration, the mixture was stirred for 20 min. The solvent was evaporated. 10 mL of water was added and the reaction was stirred for 1 h at 0°C. The compound was filtered, washed with cold water and 30% MeOH-water and died in vacuo.¹⁹ Flash chromatography with (500 mL) pentane: ethyl acetate (7:3) was performed to yield the title compound in 40%.

¹H NMR (δ, ppm) CDCl₃, 90 MHz.

9.83 (s, 1H, C=O), 8.03 – 8.06 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, CH-4), 7.74 – 7.83 (dd, 1H, *J* = 9.5 Hz, 2.3 Hz, CH-6), 6.96 – 7.04 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, CH-7), 4.01(s, 3H, CH-1).

¹³C NMR (δ, ppm) CDCl₃, 22.5 MHz.

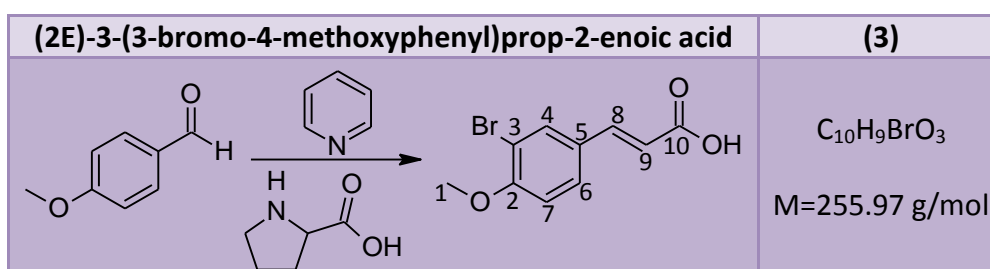
185 (C=O), 170 (C-2), 136 (C-4), 132 (C-5), 129 (C-6), 110 (C-7), 107 (C-3), 53 (C-1).

IR (ν, cm⁻¹)

3084, 2949, 2823, 2739, 1686 (C=O), 1593, 1569, 1493, 1388, 1319, 1285, 1197, 1012.

MS (EI)

215.00 (M+H).



3-Bromo-4-methoxy-benzaldehyde (1.01g, 4.67 mmol), malonic acid (1.53 g, 10.70 mmol), pyridine (9.2 mL) and proline (0.02 g, 0.18 mmol) were mixed in a 25 mL round bottom flash equipped with a condenser. The mixture was heated for 17h at reflux. Then cooled to 0°C and hydrochloric acid (2mL) was added. The precipitate was filtered and washed with 4 mL of 10% hydrochloric acid and water. The collected solid was diluted in water and a few pellets of NaOH were added. The mixture was heated until the solid completely dissolved. The mixture was filtered with a stemless funnel. Hydrochloric acid was added to the collect liquid until pH 2-3. The precipitate was filtered and dried and used in the next step without further purification.¹⁰

¹H NMR (δ, ppm) DMSO-*d*₆, 300 MHz.

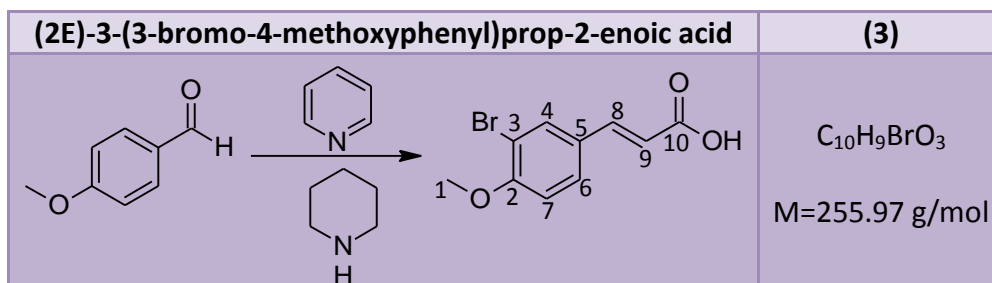
7.22 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, CH-6), 7.12 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH-4), 6.84 – 6.85 (dd, *J* = 8.6, 2 Hz, 1H, CH-8), 6.29 – 6.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH-7), 5.60 – 5.65 (d, *J* = 15 Hz, 1H, CH-9), 3.05 – 3.09 (s, 3H, CH-1),

¹³C NMR (δ, ppm) DMSO-*d*₆, 75 MHz.

168.55 (C=O), 157.70 (C-2), 143.23 (C-8), 133.44 (C-4), 130.28 (C-6), 129.36 (C-3), 119.06 (C-9), 113.71 (C-7), 112.14 (C-5), 57.41 (C-1).

IR (ν , cm^{-1})

2980, 2844, 2590, 1679 (C=O), 1625, 1595, 1553, 1497, 1424, 1298, 1268, 1213, 1053.



3-Bromo-4-methoxy-benzaldehyde (3.83 g, 28.14 mmol), malonic acid (5.98 g, 42.74 mmol), pyridine (35 mL) and piperidine (2 mL) were mixed in a 50 mL round bottom flask equipped with a condenser. The mixture was heated for 19h at reflux. Then cooled to 0°C and hydrochloric acid (7.4 mL) was added. The precipitate was filtered and washed with 10 mL of 10% hydrochloric acid and water. The collected solid was diluted in water and a few pellets of NaOH were added. The mixture was heated until the solid completely dissolved. The mixture was filtered with a stemless funnel. Hydrochloric acid was added to the collect liquid until pH 2-3. The precipitate was filtered and dried and used in the next step without further purification.¹⁰

$^1\text{H NMR}$ (δ , ppm) DMSO-*d*₆, 300 MHz.

7.14 - 7.15 (d, $J = 2 \text{ Hz}$, 1H, CH-8), 6.87 - 6.90 (dd, $J = 8.6, 2 \text{ Hz}$, 1H, CH-6), 6.68 - 6.73 (d, $J = 16 \text{ Hz}$, 1H, CH-7), 6.31 - 6.34 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, CH-4), 5.62 - 5.67 (d, $J = 16 \text{ Hz}$, 1H, CH-9), 3.08 - 3.11 (s, 3H, CH₃-1).

$^{13}\text{C NMR}$ (δ , ppm) DMSO-*d*₆, 75 MHz.

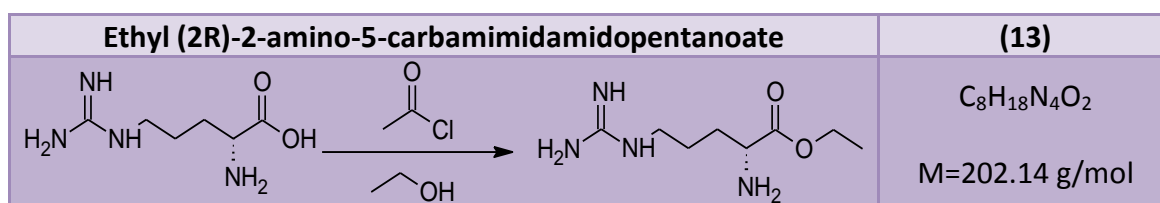
168.52 (C=O), 157.69 (C-2), 143.21 (C-8), 133.27 (C-4), 130.27 (C-6), 120.35 (C-3), 119.05 (C-9), 113.70 (C-7), 112.12 (C-5), 57.40 (C-1).

IR (ν , cm^{-1})

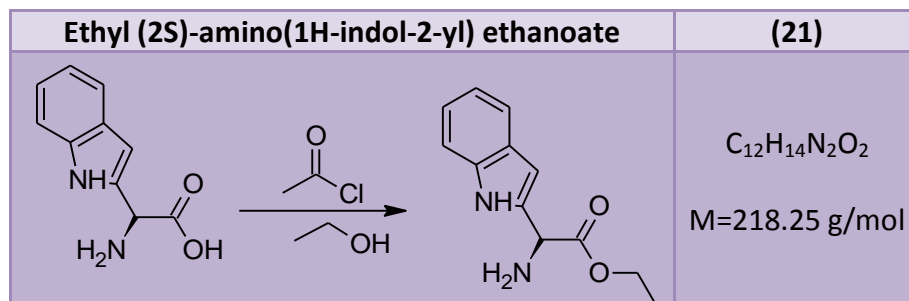
2982, 2844, 2675, 2590, 2362, 1678 (C=O), 1625, 1594, 1552, 1498, 1426, 1307, 1268, 1156.

MS (EI)

256 (M^+).



L-Arginine ethyl ester was synthesized by vigorously stirring L-arginine monohydrochloride (1.04 g, 5.74 mmol) and excess anhydrous ethanol (12mL) in an ice bath. Acetyl chloride (1.2mL, 15.49 mmol) was added dropwise to the cold solution. The mixture was refluxed overnight. The reactants and side products were evaporated under reduced pressure to obtain the product.²⁵

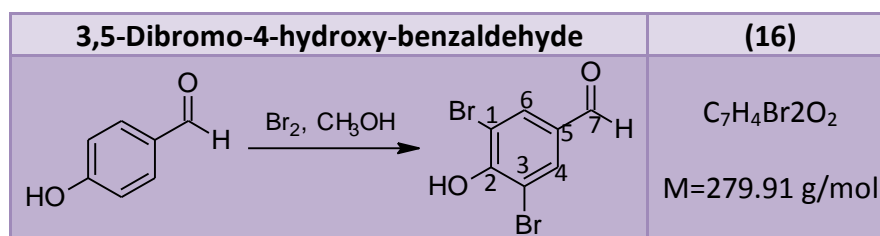


L-Tryptophan ethyl ester was synthesized by vigorously stirring L-tryptophan monohydrochloride (1.01 g, 4.89 mmol) and excess anhydrous ethanol (12mL) in an ice bath. Acetyl chloride (1mL, 13.22mmol) was added dropwise to the cold solution. The mixture was refluxed overnight. The reactants and side products were evaporated under reduced pressure to obtain the product.²¹

IR (ν , cm^{-1})

3282, 2982, 2870, 1745 (C=O), 1618, 1577, 1508, 1436, 1353, 1286, 1232, 1205.

Suberamina B and ent-B



p-Hydroxybenzaldehyde (2g, 16.37 mmol) was dissolved in MeOH (163mL) in ice bath. Bromine (2mL, 5.49 g, 34.37 mmol) was added slowly and the reaction mixture was stirred 5h at rt. A small amount of NaHSO_3 was added to the mixture until the solution takes a clearer coloration, the mixture was stirred for 20 min. The solvent was evaporated. 110mL of water was added and the reaction was stirred for 1 h at 0°C. The compound was filtered, washed with water, cold water and 30% MeOH-water and dried.¹⁹

Flash chromatography with (500 mL) pentane: ethyl acetate (7:3) was performed to yield the title compound in 100%.

¹H NMR (δ , ppm) CDCl_3 , 300 MHz.

9.76 (s, 1H, C=O), 8.03 (s, 2H, CH-4 and CH-6).

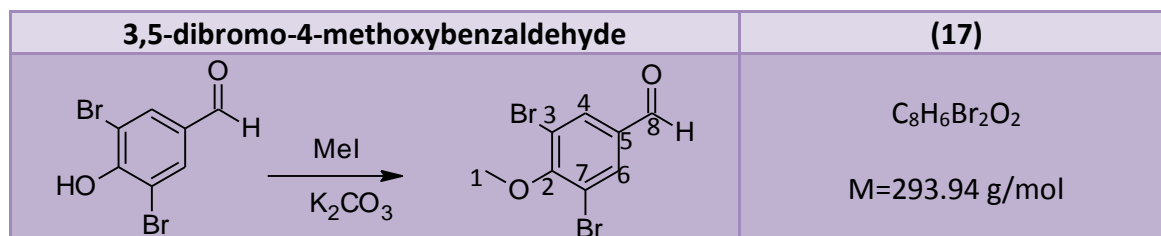
²⁵ Adaptación de: Zern, B. J.; Chu, H.; Osunkoya, A. O.; Gao, J.; Wang, Y. *Advanced functional materials*. **2011**, *21*, 434–440.

¹³C NMR (δ, ppm) CDCl₃, 75 MHz.

190.46 (C=O), 157.07(C-2), 134.61 (C-4) and (C-6), 131.43 (C-5), 112.95 (C-1) and (C-3).

IR (ν, cm⁻¹)

3178, 2849, 1672 (C=O), 1578, 1546, 1475, 1416, 1380, 1301, 1229, 1199, 1119, 931.



To a solution of 3,5-dibromo-4-hydroxybenzaldehyde (1.09 g, 3.92 mmol) and methyl iodide (0.6mL, 1.25 g, 8.83 mmol) in DMF (16mL) was added anhydrous potassium carbonate (1.07 g, 7.86 mmol). The reaction mixture was stirred at 55°C for 15 h, cooled to room temperature, and quenched by addition of water (88mL). The resultant white precipitate was filtered under vacuum, washed with water, and dried.¹⁶

Flash chromatography with (500 mL) pentane was performed to yield the title compound in 40.5%.

¹H NMR (δ, ppm) CDCl₃, 300 MHz.

9.86 (s, 1H, C=O), 8.03(s, 2H, CH-4 and CH-6), 3.97(s, 3H, CH-1).

¹³C NMR (δ, ppm) CDCl₃, 75 MHz.

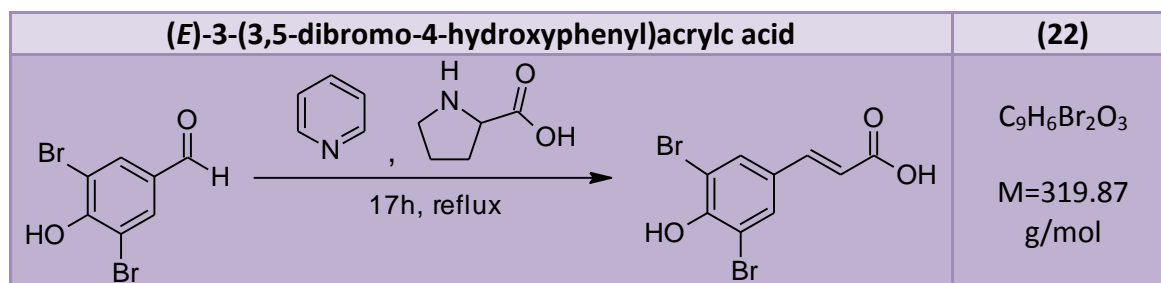
188.38(C=O), 133.91(C-4) and (C-6), 119.30(C-3) and (C-7), 60.87 (C-1),

IR (ν, cm⁻¹)

3057, 3037, 2951, 2929, 2856, 1687 (C=O), 1546, 1581, 1469, 1420, 1367, 1262, 1206, 1107.

MS (EI)

294 (M⁺).



3,5-Dibromo-4-hydroxy-benzaldehyde (0.85 g, 3.06 mmol), malonic acid (0.55 g, 3.98 mmol), pyridine (6 mL) and proline (0.018g) were mixed in a 25 mL round bottom flask equipped with a condenser. The mixture was heated for 17h at reflux. Then cooled to 0°C and hydrochloric acid (3 mL) was added. The precipitate was filtered and washed with 10 mL of

10% hydrochloric acid and water. The collected solid was diluted in water and a few pellets of NaOH were added. The mixture was heated until the solid completely dissolved. The mixture was filtered with a stemless funnel. Hydrochloric acid was added to the collected liquid until pH 2-3. The precipitate was filtered and dried and used in the next step without further purification.¹⁰

¹H NMR (δ , ppm) DMSO-*d*₆, 300 MHz.

7.90 (s, 2H, CH-3 and CH-5), 7.40 – 7.45 (d, *J* = 16 Hz, 1H, CH-7), 6.43 – 6.49 (d, *J* = 16 Hz, 1H, CH-8).

¹³C NMR (δ , ppm) DMSO-*d*₆, 75 MHz.

168.37 (C=O), 153.07 (C-1), 132.97 (C-3 and C-5), 129.93 (C-4), 120.02 (C-8), 113.1 (C-2 and C-6).

IR (ν , cm⁻¹)

3429, 2974, 2671, 1670, 1623, 1548, 1478, 1423, 1320, 1281, 1240, 1200, 1140, 979.

REFERENCIAS

1. Tejón, J. *Bioquímica Estructural*; Editorial Tebar, 2001; Vol. 2001, pp. 53–54.
2. Koolman, J.; Röhm, K.-H. *Bioquímica: textos y atlas*; 3ra edición.; Ed. Médica Panamericana: Madrid, 2005; Vol. 60, pp. 62–63.
3. Esterl, W. M. *Bioquímica.: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*; Centelles, J., Ed.; Reverte: Barcelona, 2009; pp. 89–90.
4. Voet, D.; Voet, J. G. *Bioquímica.*; Ed. Médica Panamericana, 2006; pp. 416–417.
5. Yang, J.; Kulkarni, K.; Manolaridis, I.; Zhang, Z.; Dodd, R. B.; Mas-Droux, C.; Barford, D. *Mol. Cell.* **2011**, *44*, 997–1004.
6. Winter- Vann, A. M.; Casey, P. J. *Nature Reviews. Cancer.* **2005**, *5*, 405–12.
7. Cushman, I.; Casey, P. J. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27964–73.
8. Buchanan, M. S.; Carroll, A. R.; Fechner, G. a; Boyle, A.; Simpson, M.; Addepalli, R.; Avery, V. M.; Hooper, J. N. a; Cheung, T.; Chen, H.; Quinn, R. J. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1066–1067.
9. Ullah, N.; Arafah, K. M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 158–160.
10. García, J.; Pereira, R.; De Lera, A. R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5028–5030.
11. Shaala, L.; Bamane, F. H.; Badr, J. M.; Youssef, D. T. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1517–20.
12. **Adaptación de:** Ji, Y.-F.; Zong, Z.-M.; Wei, X.-Y. *Synthetic Commun.* **2002**, *32*, 2809–2814.
13. **Adaptación de:** Cao, T.; Chen, J.; Yang, C.; Cao, W. *New J. Chem.*, **2001**, *25*, 305–307.
14. Campbell, C. D.; Concellón, C.; Smith, A. D. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2011**, *22*, 797–811.
15. Furlan, A.; Colombo, F.; Kover, A.; Issaly, N.; Tintori, C.; Angeli, L.; Leroux, V.; Letard, S.; Amat, M.; Asses, Y.; Maigret, B.; Dubreuil, P.; Botta, M.; Dono, R.; Bosch, J.; Piccolo, O.; Passarella, D.; Maina, F. *Eur J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 239–54.
16. Takahashi, M.; Yamamoto, A.; Inuzuka, T.; Sengoku, T.; Yoda, H. *Tetrahedron.* **2011**, *67*, 9484–9490.

17. Camargo, D. Síntesis y caracterización de α -bromocetonas, Trabajo de Grado, Universidad de los Andes, 2012, pp. 1–14.
18. Erb, W.; Payet, E. *l'actualité chimique*. **2010**, *345*, 33–37.
19. **Adaptacion de:** Hentschel, F.; Sasse, F.; Lindel, T. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 7120–33.
20. Zern, B. J.; Chu, H.; Osunkoya, A. O.; Gao, J.; Wang, Y. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 434–440.
21. Anjun, L.; Kezhuang, S.; Zhen-Yuan, Z.; Fran, A. *Asian J. Chem.* **2012**, *24*, 4819–4820.
22. **Adaptación de:** Vogel, A. I.; Furniss, B. S. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*; Longman, 1989; p. 864.
23. Ji, Y.-F.; Zong, Z.-M.; Wei, X.-Y. *Synthetic Commun.* **2002**, *32*, 2809–2814.
24. Zhu, G.; Yang, F.; Balachandran, R.; Ho, P.; Day, B. W. *J. Med. Chem.* **2006**, 2063–2076.
25. **Adaptación de:** Zern, B. J.; Chu, H.; Osunkoya, A. O.; Gao, J.; Wang, Y. *Advanced functional materials*. **2011**, *21*, 434–440.