



Poros hidrofílicos.
Crambescidina-816 un inhibidor de los canales
de calcio

Diego A. Fort
Sevilla 2010



Poros hidrofílicos.
Crambescidina-816 un inhibidor de los canales
de calcio

Memoria presentada por
Diego A. Fort
Para optar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas

Sevilla, 2010

**Dr. D. Julio D. Martín, Dr. D. Ricardo Pérez Afonso y
Dr. D^a. Natalia Pérez-Hernández**

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado "Poros hidrofílicos. Crambescidina-816 un inhibidor de los canales de calcio" ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC-Universidad de Sevilla) durante los cursos 2006-2010, constituyendo la Memoria que presenta Diego A. Fort para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Setiembre de 2010

Fdo. Julio D.
Profesor de Investigación del CSIC

Fdo. Ricardo Pérez Afonso
Científico Titular del CSIC

Fdo. Natalia Pérez-Hernández
Contratada JAE del CSIC

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones Químicas del CSIC bajo la dirección de los Doctores D. Julio D. Martín, D. Ricardo Pérez Afonso y D^a. Natalia Pérez-Hernández, a quienes expreso mi más sincero agradecimiento.

Agradecimientos:

La Química está en el fondo del balón, botija.

A mi Abuela.
A mi Padre.

INDICE

INTRODUCCION	3
Estructura del agua y consecuencias.	5
Capítulo 1	19
Efecto de la temperatura en la salida y entrada de agua en poros.	19
1.1 Introducción.	21
1.2 Antecedentes y objetivos.	31
1.3 Materiales y métodos.	37
<i>1.3.1 Difracción de rayos-X.</i>	37
<i>1.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).</i>	37
<i>1.3.3 Termogravimetría (TG) y análisis térmico diferencial (DTA).</i>	38
<i>1.3.4 Difracción de rayos-X en polvo a temperatura variable (VT-PXRD).</i>	38
1.4 Discusión de resultados.	39
1.5 Conclusiones.	52
Capítulo 2	55
Efecto del agua en la formación de estructuras cristalinas tubulares.	55
2.1 Introducción.	57
2.2 Antecedentes y objetivos.	60
2.3 Materiales y métodos.	68
<i>2.3.1 Microscopía óptica.</i>	68
<i>2.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).</i>	68
<i>2.3.3 Difracción de rayos-X en polvo (PXRD).</i>	69
2.4 Discusión de resultados.	69
2.5 Material complementario	79
2.6 Conclusiones.	84
Capítulo 3	85
Aislamiento, purificación y caracterización de extractos de esponja CRAMBE CRAMBE	85
3.1 Introducción.	87
3.2 Aislamiento y Purificación	88
3.2.1 Estabilidad de la muestra	92
3.3 Caracterización	93
3.3.1 Resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C.	93
3.3.1.1 Experimentos monodimensionales:	93
3.3.1.2 Experimentos bidimensionales:	94

3.3.2 Resonancia magnética nuclear de ¹⁵N	102
3.3.3 Espectrometría de masas	103
3.3.4 Espectroscopía de infrarrojo	104
3.4 Conclusiones	105
Capítulo 4	107
Planteamiento sintético de la crambescidina 816 y compuestos relacionados	107
4.1 Introducción	109
4.2 Antecedentes sintéticos de crambescidinas	115
4.3 Plan de síntesis de la Crambescidina-816 (4)	119
4.4 Plan de síntesis del núcleo de Crambescidina-816	122
4.4.1 Síntesis de posibles compuestos de partida para la construcción del núcleo de crambescidina-816	122
4.4.1.1 Preparación del vinilstannano 38	124
4.4.1.2 Preparación de las ester halo lactonas 28	126
4.4.1.2.1 Modelos de lactonas tipo 28 a partir del anhídrido maleico	131
4.4.1.2.1.1 Modelos de acoples tipo Wittig sobre succinimidias protegidas	139
4.4.1.2.1.2 Diferenciación C ₂ -C ₅ en succinimidias protegidas	143
4.5 Aproximación hacia la síntesis de Cimipronidine	150
4.6 Reacciones de hidrólisis de modelos de ésteres α,β-insaturados	154
4.7 Síntesis de la cadena lateral de la Ptilomicalina A	163
4.8 Conclusiones	166
4.9 Abreviaturas y símbolos	167
4.10 Parte Experimental	169
4.10.1 Técnicas instrumentales generales	169
4.10.2 Descripción de reacciones y datos físicos y espectroscópicos de los compuestos preparados en este capítulo	172

INTRODUCCION

Estructura del agua y consecuencias.

A diferencia de otros líquidos, las moléculas de agua se encuentran fuertemente cohesionadas y estabilizan esta condición por formación de enlaces por puentes de hidrógeno con las moléculas vecinas hasta un número máximo de cuatro enlaces.¹ El resultado es la organización de una red intermolecular de moléculas con geometría tetraédrica en la que cada una ocupa el centro del tetraedro y coordina con otras cuatro que se localizan en los vértices (Figura 1). En dos de los enlaces, el oxígeno de la molécula de agua actúa como doble aceptor de puentes de hidrógeno y coordina con dos moléculas de agua. Los dos hidrógenos de la molécula a su vez son dadores de puentes de hidrógeno y conectan con otras dos moléculas de agua. Sin embargo, este comportamiento estructural sólo se ralentiza y fija como tal en el estado sólido, en el resto de situaciones diferentes a las del hielo, las moléculas de agua se interrelacionan simultaneando la estructura intermolecular tetraédrica con un movimiento molecular variable, exhibiendo fluctuaciones y continuas reorganizaciones en escalas de tiempo que en el estado líquido están en rangos de femto- a pico-segundos. Estos movimientos son los que definen la "estructura del agua" y juegan un papel primordial en un número importante de procesos químicos y biológicos. A pesar de que la continua evolución de la estructura del agua es fundamental en la comprensión de estos procesos, la vinculación de los cambios estructurales del agua con la evolución química y/o biológica de las moléculas involucradas, sigue siendo un problema no resuelto aunque de investigación constante.

¹ D. Eisenberg, W. Kauzmann. *The Structure and Properties of Water*, Oxford University Press: London, 1969.

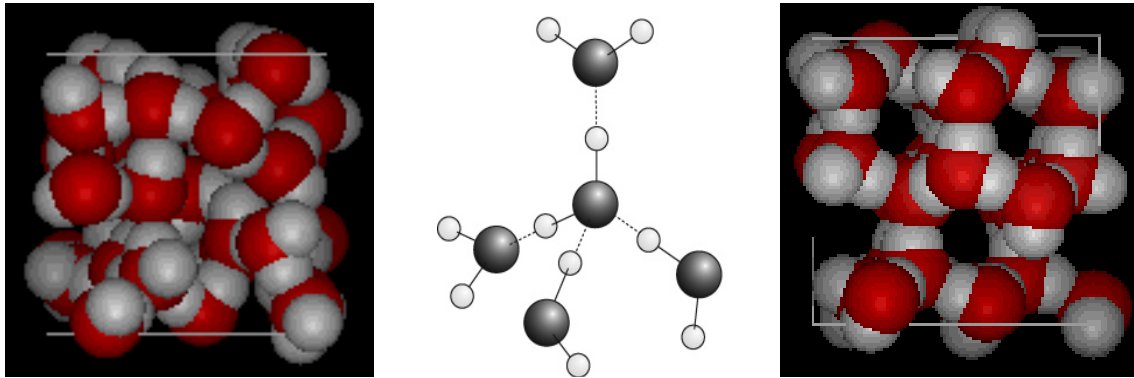


Figura 1. Centro: la hibridación sp^3 del átomo de oxígeno del agua genera una geometría de coordinación esencialmente tetraédrica en la que cada molécula de agua se coordina con otras cuatro que ocupan los vértices del tetraedro. Derecha: coordinación de moléculas de agua en estado sólido. Izquierda: simulación de un instante de la estructura del agua en estado líquido.

Los cambios en la estructura y dinámica del agua, inducidos por grupos no polares, se considera que juegan un papel que es clave en el plegamiento e interacciones entre biopolímeros o en la formación de membranas celulares.² Las primeras conclusiones obtenidas de datos termodinámicos, sugirieron que las moléculas de agua forman alrededor de fragmentos no polares estructuras rígidas tipo clatrato, definidas como "iceberg".³ A pesar de que tal consideración no es hoy día aceptada,⁴ los resultados acumulados, tanto experimentales^{5,6} como teóricos⁷ demuestran que la movilidad de las moléculas de agua cuando rodean a solutos no polares se reduce en relación con el agua líquida. Además, medidas de simulación y otros argumentos teóricos relacionan el tamaño del fragmento no polar con la estructura del agua que lo rodea;⁸ así, la tendencia de las moléculas de agua a alejarse de la superficie no polar, da lugar a una interfase similar a la que ocurre en el mundo macroscópico en la interfase aire-agua.⁹ Este fenómeno de ordenamiento molecular es consistente con los datos de solvatación termodinámica; así, la entropía de hidratación, que es el cambio de entropía que ocurre cuando la molécula se transfiere desde la fase gas a la

² C. Tanford, *Science*, **1978**, *200*, 1012-1018.

³ H.S. Frank, J.W. Evans, *J. Chem. Phys.*, **1945**, *13*, 507.

⁴ H.S. Ashbaugh, D. Asthagiri, L.R. Pratt, S.B. Rempe, *Biophys. Chem.*, **2003**, *105*, 323-338.

⁵ Y. L. A. Rezus, H. J. Bakker, *Phys. Rev. Lett.*, **2007**, *99*, 148301.

⁶ J. Qvist, B. Halle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10345-10353.

⁷ D. Laage, G. Stirnemann, J.T. Hynes, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 2428-2435.

⁸ K. Lum, D. Chandler, J.D. Weeks, *J. Chem. Phys. B*, 1999, *103*, 4570.

⁹ D. Chandler, *Nature*, **2005**, *437*, 640-647.

fase líquida, es invariablemente negativa. Un caso típico relacionado con este punto es el clásico efecto hidrofóbico, cuya fuerza inductora surge de reorganizaciones estructurales del agua.¹⁰

Las moléculas de agua no pueden formar enlaces por puentes de hidrógeno con entornos no polares, lo que da lugar a una interrupción del más favorable entramado estructural, que ocurre cuando sólo son moléculas de agua las que interaccionan entre sí. Las moléculas de agua que están en contacto con fragmentos no polares se enlazan fuertemente con sus vecinas, dando lugar a estructuras más rígidas, de dinámica más atenuada y diferentes de cuando se rodean sólo con otras moléculas de agua. La asociación de dos fragmentos no polares en medio acuoso causa eliminación de superficie hidrofóbica, fenómeno de entropía favorable debido a que ocurre por expulsión de moléculas de agua desde la interfase, con el consiguiente incremento de entropía (Figura 2).

Las proteínas son largas cadenas de aminoácidos que se pliegan en estructuras complejas y la secuencia por la que ocurre el plegamiento de las cadenas tiene un efecto profundo sobre su actividad. De forma generalizada se acepta que el movimiento de las proteínas es fundamental en el funcionamiento del mundo viviente y se sustenta en los movimientos concertados de los fragmentos particulares que las constituyen. La explicación de la dinámica que en general se observa en los biopolímeros se supedita, por tanto, al conocimiento de las dinámicas particulares que ocurren a nivel atómico.¹¹ Los cambios estructurales del agua son causa directa del plegamiento y, por tanto, de la bioactividad que el biopolímero pueda presentar.

¹⁰ C. Tanford. *The hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, John Wiley and Sons, 1980.

¹¹ R.P Feynman, *Six Easy Pieces*, Addison Wesley, Reading, MA, 1963, pag. 59.

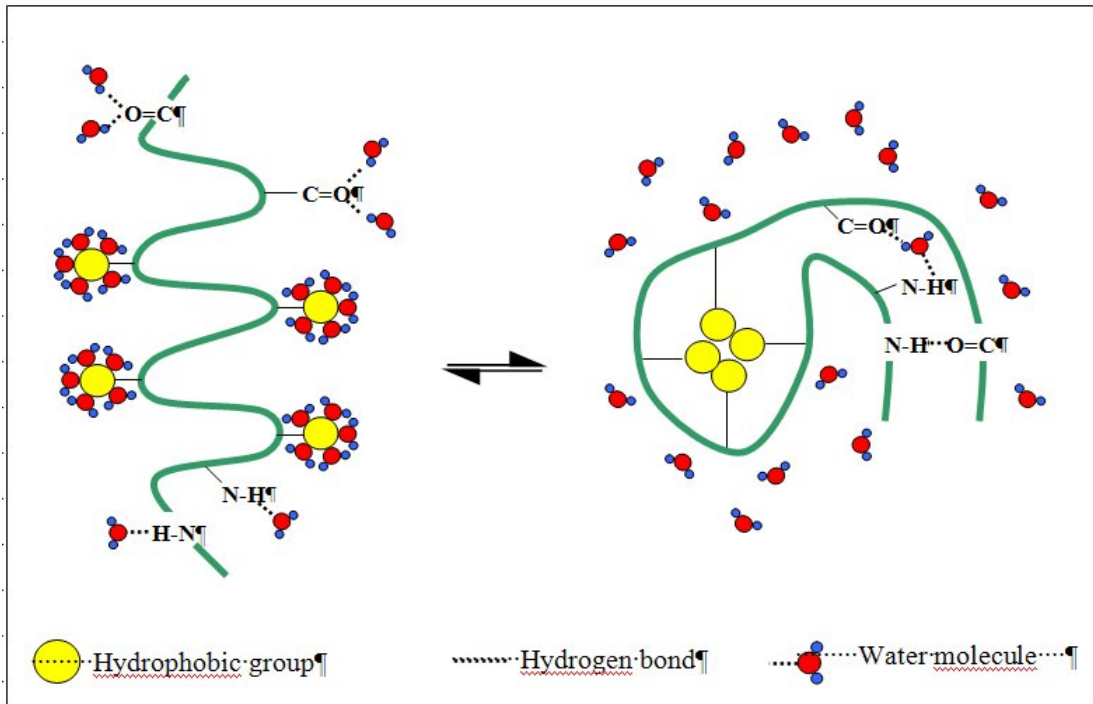


Figura 2. Representación esquemática en la que se resume cambios estructurales de un biopolímero ocasionados por la suma de cambios en la estructura del agua, inducidos por el conocido efecto hidrofóbico, que estabiliza contactos no polares por eliminación de moléculas de agua.

Sin embargo, los bioquímicos en general obvian esta relación en los cálculos de estudio del plegamiento de macro-moléculas, debido quizás a que el agua resulta transparente a la mayoría de las técnicas y su comportamiento difícil de evaluar mediante medidas espectroscópicas.¹² Aunque se han hecho progresos en este sentido, el problema está aún muy lejos de ser comprendido en su totalidad (Figura 3).

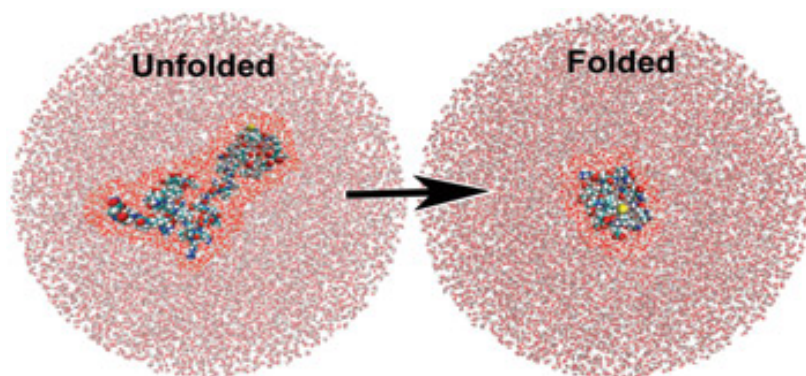


Figura 3. Simulación en la que se muestra las moléculas de agua que rodean una proteína desplegada y plegada. Las moléculas de agua que están más cerca de la superficie de la proteína se resaltan con color rojo brillante.

¹² S.J. Kim, B. Born, M. Havenith, M. Gruebele, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 6486-6489.

Estudios espectroscópicos recientes demuestran que las moléculas de agua que se encuentran en posiciones cercanas a la proteína tienen estructura diferente y participan en el proceso de plegamiento.

La estructura tetraédrica del agua en estado líquido, en relación con las cuatro moléculas vecinas que la rodean, es muy cuestionada lo que ha sido noticia de periodismo científico.¹³ Sofisticados estudios de medición ultrarrápida de dispersión en Raman y absorción de rayos-X^{14,15} o los resultados de difracción de electrones,¹⁶ concluyen que las moléculas de agua en estado líquido forman, preferentemente, estructuras lineales y cíclicas en las que cada molécula se conecta con sólo dos de sus vecinas mediante fuertes enlaces por puentes de hidrógeno, en lugar de los tres-cuatro hasta ahora consideradas. Esta aporía o problema sin "visible" solución, continúa siendo un objetivo largamente perseguido. Para obviar los inconvenientes que surgen como consecuencia de identificar la estructura del agua con la de una teoría concreta, lo mejor es adecuarla a la dinámica del instante. Así, mientras esta circunstancia persista, la estructura se puede concebir sin más, como una red de moléculas de agua conectadas por puentes de hidrógeno, sometidas a una dinámica que varía según sean las condiciones en que se encuentren. Esta estructura del agua, en estado líquido, fluctúa y se reorganiza en escalas de tiempos entre 10 fs (10^{-14} s) y 10 ps (10^{-11} s). En la Figura 4 se esquematiza la fluctuación molecular que ha de ocurrir en la ruptura y formación de un enlace por puente de hidrógeno entre una molécula de agua y dos de sus vecinas. La situación A muestra, mediante flechas, los movimientos traslacionales de las moléculas O^aH_2 y O^bH_2 necesarios para que las distancias moleculares se adecuen a la ruptura y formación de un nuevo enlace. La situación B remarca el movimiento rotacional necesario en la molécula O^*H_2 para que se pueda originar el nuevo enlace. La situación C define el final del proceso con el nuevo enlace ya formado. La

¹³ S. Begley, *The Wall Street Journal*, Marzo 10, 2006. A. Fernández-Muerza, *El País*, Enero 03, 2006.

¹⁴ Ph. Wernet, D. Nordlund, U. Bergmann, M. Cavalleri, M. Odelius, H. Ogasawara, N.A. Naslund, T.K. Hirsch, L. Ojamae, P. Glatzel, L.G.M. Pettersson, A. Nilsson, *Science*, **2004**, *304*, 995-999.

¹⁵ T. Head-Gordon, M.E. Johnson, *PNAS*, **2006**, *103*, 7973-7977.

¹⁶ C.-Y. Ruan, V.A. Lobastov, F. Vigliotti, S. Chen, A.H. Zewail, *Science*, **2004**, *304*, 80.

secuencia $A \rightarrow B \rightarrow C$ muestra como las dinámicas (traslacional y rotacional) de las moléculas se encuentran íntimamente relacionadas. Según la teoría de tetracoordinación, en la situación definida como C la molécula de agua aceptora del enlace (O^bH_2) se encuentra sobrecoordinada (cinco enlaces por puentes de hidrógeno), mientras que la molécula que ha perdido el enlace (O^aH_2) queda tricoordinada. Según que la formación y ruptura de enlaces sea concertada o transcurra a través de pasos discretos, estos excesos y defectos en coordinación pueden, ser considerados como situaciones reales en la estructura del agua (intermedios en la transformación) o situaciones extremas irreales (estados de transición). La teoría de organización lineal y cíclica de moléculas de agua se reduce, en el esquema que se dibuja en la Figura 4, a considerar que el paso de A a C ocurre sin la participación del intermedio B y que las moléculas de agua son siempre dicoordinadas.

En cualquier caso y con independencia del dibujo estático que al final prevalezca, lo importante es la alteración estructural que provoca en el agua líquida la presencia de una entidad diferente. Las propiedades del agua derivan de su habilidad de formar entre ellas redes fluctuantes de puentes de hidrógeno.

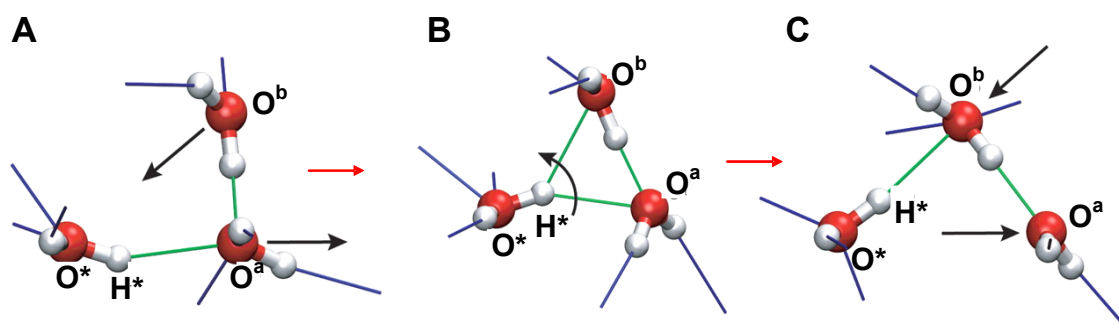


Figura 4. Representación esquemática de la formación y ruptura de enlaces por puentes de hidrógeno entre moléculas de agua.

El fuerte carácter director de estos enlaces permite que pequeñas agrupaciones de moléculas puedan existir en varias estructuras y formas isoméricas, con consecuencias importantes en los procesos de activación química. Así, influyen en los mecanismos de reacciones de hidrólisis en medio acuoso, donde la cooperatividad entre las moléculas de agua hace que induzcan diferentes

grados de activación química, según sea su situación en el agregado molecular.^{17,18} Un ejemplo de este fenómeno es el conocido efecto Grotthuss, que es un mecanismo de transporte de protón por “relevos” entre moléculas de agua a lo largo de cadenas de moléculas.¹⁹ La relación entre agrupamientos particulares de las moléculas de agua y la actividad química que transfieren es objeto de constante investigación. Esta investigación requiere, no sólo conocer el número de moléculas de agua que conforman el agregado sino la particularidad de cada forma isomérica involucrada en la solvatación. Un ejemplo es el anión bicarbonato, HCO_3^- , especie ubicua en la química del medio acuoso. Debido a que es una base débil, juega un papel primordial en los equilibrios ácido-base que ocurren cuando el CO_2 se disuelve en agua. Estas especies iónicas son importantes en procesos tales como el control homeostático del pH de los océanos²⁰, o la calcificación de esqueletos externos en muchas especies marinas²¹ (Esquema 1, izquierda). Las interacciones del disolvente con las especies que están a uno y otro lado de la ecuación de equilibrio, son muy importantes para comprender la cinética y termodinámica de la reacción en la fase acuosa. Se ha comprobado²² que la microsolvatación más favorable del anión bicarbonato, ocurre con cuatro moléculas de agua como dadoras de puentes de hidrógeno al fragmento estructural $-\text{CO}_2$, actuando cada uno de estos átomos de oxígeno como doble aceptor de puentes de hidrógeno, estando particularmente desfavorecido el enlace de las moléculas de agua a la función hidroxílica en HCO_3^- . La separación iónica se favorece por la deslocalización protónica en el medio acuoso. Esta estructura del solvato es la que configura la primera esfera de coordinación del anión y la que lo estabiliza en el entorno acuoso en que se encuentra.

¹⁷ M. Beyer, E.R. Williams, V.E. Bondybey, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 1565-1573.

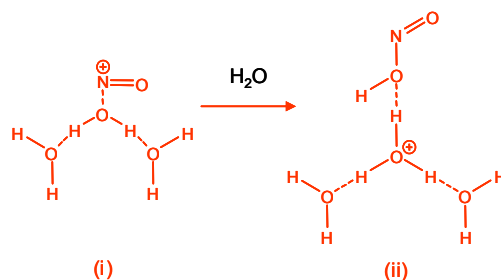
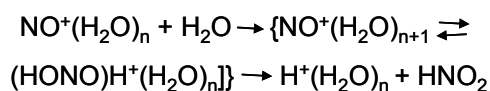
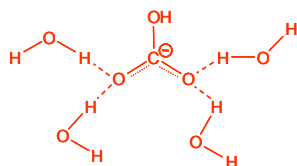
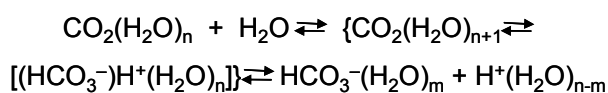
¹⁸ G. Niedner-Schatterburg, V.E. Bondybey, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4059-4086.

¹⁹ N. Agmon, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *244*, 456-462.

²⁰ K. Caldeira, M.E. Wickett, *Nature* **2003**, *425*, 365.

²¹ J.C. Orr, V.J. Fabri, O. Aumont, L. Bopp, S.C. Doney, R.A. Feely, A. Gnanadesikan, N. Gruber, A. Ishida, F. Joss, R.M. Key, K. Lindsay, E. Maier-Reimer, R. Matear, P. Monfray, A. Mouchet, R.G. Najjar, G.-K. Plattner, R.B. Rodgers, C.L. Sabine, J.L. Sarmiento, R. Scholitzer, R.D. Slater, I.J. Totterdell, M.-F. Weirig, Y. Yamanaka, A. Yool, *Nature*, **2005**, *437*, 681-686.

²² E. Garand, T. Wende, D.J. Goebbert, R. Bergmann, G. Meijer, D.M. Neumark, K.R. Asmis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 849-856.



Esquema 1. Efectos del agua en procesos de activación química. Izquierda: Equilibrio ácido-base del anión bicarbonato en medio acuoso. Estructura más favorable del solvato $\text{HCO}_3^- (\text{H}_2\text{O})_m$. Derecha: Transferencia de carga del ion solvatado $\text{NO}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ al agua generando el solvato del protón $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$. Estructuras más favorables (i) y (ii).

La química iónica en la región D de la ionosfera (a 70-85 Km de la superficie de la Tierra), es otro ejemplo en el que la estabilización protónica es paso clave en la formación de ácido nitroso (HONO), por transferencia de carga entre ion NO^+ y agua mediante solvatación de un protón (Esquema 1, Derecha). La especie iónica NO^+ se forma de la ionización de la especie neutra NO por emisión solar en el ultravioleta. La reacción de NO^+ con una molécula de agua requiere una cantidad sustancial de energía²³ (35 kcal/mol), barrera energética que se va reduciendo a medida que se adicionan más moléculas de agua, esta reacción es termoneutra en el tetrahidrato y puede llegar a ser exotérmica en solvatos mayores. Sin embargo, la posibilidad de que hidratos mayores del tetrahidrato se formen en condiciones atmosféricas es muy baja.²³ El complejo trihidrato es el más pequeño en el que ocurre la transferencia de carga, y sólo el de estructura (i) es capaz de transferir la carga positiva al agua (ii), mientras que ésta se mantiene en la especie NO^+ en cualquiera de los otros posibles isómeros.²⁴ Este resultado demuestra que, también en el estado de vapor, la reactividad es muy sensible a la disposición geométrica de las moléculas de agua.

La ralentización que ocurre en los movimientos de las moléculas de agua, cuando entran en contacto con entidades no polares, varía en función de la

²³ E. Hamman, E.P.F. Lee, J.M. Dyke, *J. Phys. Chem. A*, **2001**, *105*, 5528-5534.

²⁴ R.A. Relph, T.L. Guasko, M.B. Elliot, M.Z. Kamrath, A.B. MacCoy, R.P. Steele, D.P. Schofield, K.D. Jordan, A.A. Viggiano, E.E. Ferguson, M.A. Johnson, *Science*, **2010**, *327*, 308-312.

distancia, por lo que el agua en un organismo biológico está sometida a cambios estructurales constantes, que van desde la dinámica equivalente a la del agua líquida (posibles movimientos traslacionales y rotacionales) a la del hielo, donde sólo los movimientos rotacionales son permitidos. La dinámica del agua afecta al movimiento de las proteínas y la analogía con el agua líquida/hielo es fiel reflejo del comportamiento que tiene el agua en una célula, donde las moléculas de agua se encuentran alejadas pocos nanómetros de las proteínas y otros biopolímeros o bloqueadas entre ellos.

Muchos de los movimientos de las proteínas y biopolímeros están condicionados por los cambios estructurales del agua que los rodea.²⁵ Así, sólo si el agua actúa como efecto director se puede comprender que algunas proteínas, particularmente enzimas, sean capaces de atraer a otras moléculas hacia sus centros activos, pudiendo modificar sus estructuras. Son los cambios estructurales del agua los que ponen de manifiesto fenómenos como el efecto hidrofóbico o de hidratación hidrofóbica.

Hay innumerables ejemplos de procesos, tanto químicos como biológicos, que son consecuencia de los cambios estructurales del agua en la que se encuentran inmersos. Así, por ejemplo, consideremos la historia que conduce a la formación de un simple copo de nieve y de las causas que hacen que las moléculas de agua se vayan, poco a poco, agregando de forma ordenada a la estructura cristalina inicial. No hay anteproyecto o código genético que organice estas estructuras tan espectaculares y, sin embargo, en contraposición a la libertad en que se fundamentan los principios de la geometría fractal, existe un efecto director que le indica a cada nueva molécula de agua que se incorpora el sitio exacto donde se ha de localizar. La historia comienza en una nube, cuando una diminuta gota de agua de la nube cristaliza, inducida por una partícula de polvo y crea un pequeño cristal de hielo, el cual rápidamente moldea para formar un diminuto prisma hexagonal. El crecimiento del prisma ocurre por incorporación de moléculas de agua que chocan contra las superficies del prisma y, en mayor proporción, sobre los vértices como zonas donde existe

²⁵ P.W. Fenimore, H. Frauenfelder, B.H. McMahon, R.D. Young, *PNAS*, **2004**, *101*, 14408-14413.

mayor probabilidad de choques. Mientras crece, el cristal se mueve entre nubes por acción del viento y es sometido a condiciones variables de temperatura y de saturación de vapor de agua. La concentración de vapor de agua y la temperatura fijan la estructura del agua en cada instante, por tanto, la incorporación continuada de nuevas moléculas de agua al cristal ocurre dictada por la estructura del agua que le rodea en cada momento. Los vértices se desarrollan de manera independiente, sin embargo, el hecho de que la estructura local del agua que rodea al incipiente cristal de nieve sea "prácticamente" la misma, hace que el copo se desarrolle siguiendo una simetría "casi" hexagonal. También es la razón por la que dos copos que se generan desde entornos estructurales de agua distintos, sean diferentes. La Figura 5 se corresponde con microfotografías de copos de nieve, donde se puede observar la simetría hexagonal presente en cada uno de ellos y las diferencias entre los mismos al haberse creado desde entornos estructurales de agua diferentes.²⁶

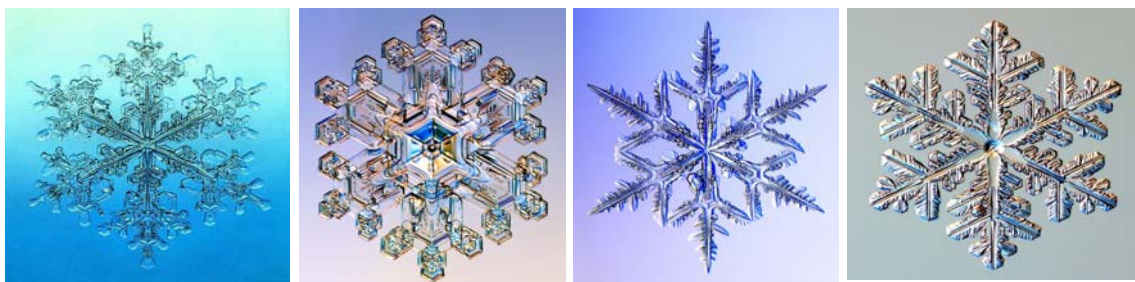


Figura 5. Diferentes formas de copos de nieve. La diversidad de sus estructuras y la simetría presente en cada una de ellos es consecuencia de la estructura del vapor de agua que los ha albergado en cada momento durante su formación.²⁶ La información sobre la arquitectura de cada copo de nieve está contenida en la estructura del agua que lo rodea en cada instante.

El efecto director que tiene el agua consigo misma se manifiesta también en los procesos biológicos, supeditando a sus movimientos los de las macromoléculas. Algunos ejemplos se muestran a continuación.

Ciertos organismos marinos generan estructuras sólidas complejas por depósito de minerales en matrices formadas por biomoléculas, siendo estas moléculas las que dirigen su orientación, textura y morfología, al tiempo que influyen

²⁶ K.G. Libbrecht, *Rep. Prog. Phys.* **2005**, *68*, 855-895.

sobre las propiedades mecánicas y estructurales del biomineral.²⁷ Así, por ejemplo, las púas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Figura 6, izquierda) a pesar de tener varios centímetros de longitud, están constituidas por un único cristal de calcita (CO_3Ca , sistema trigonal, grupo espacial $R\bar{3}c$) relleno de biopolímeros, polisacáridos y glicoproteínas, que se enhebran según un código específico que no altera la estructura del cristal.



Figura 6. Estructuras naturales de calcita. Izquierda: erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Cada espina se corresponde con un único cristal de calcita. Derecha: microfotografía coloreada artificialmente del plancton marino, *Acanthoica acanthifera*, donde se puede observar la disposición en hélice de placas de calcita.²⁸

De igual forma, en ciertas especies de plancton marino, como es el caso del *Acanthoica acanthifera* (Figura 6, derecha), aunque no hay macromoléculas que de forma apreciable ocupen la matriz en su corteza de calcita, sí son estas necesarias para el ordenamiento quiral en hélice que se observa.^{28,29} Las moléculas de agua son co-responsables tanto de la organización intracristalina de los biopolímeros, como de la transmisión de la quiralidad en la formación y moldeo de estas complejas estructuras cristalinas. Los biopolímeros hidratados quedan atrapados en las estructuras de calcita cuando la eliminación parcial de agua da lugar a la nucleación y cristalización del CO_3Ca .^{30,31}

Las endosporas de bacterias son formas de vida que subsisten inactivas bajo condiciones extremas, que pueden sobrevivir durante muchos años en estado latente y resistir altas temperaturas, radiaciones y la presencia de sustancias tóxicas. Las bases moleculares de esta inactividad no es bien conocida, pero el

²⁷ H.A. Lowenstam, S. Weiner. *On Biomineralization*; Oxford, University Press: New York, 1989.

²⁸ M.D. Hollingsworth, *Science*, **2009**, *326*, 1194-1195.

²⁹ H. Li, H.L. Xin, D.A. Muller, L.A. Estroff, *Science*, **2009**, *326*, 1244-1247.

³⁰ J. Aizenberg, J. Hanson, T.F. Koetzle, S. Weiner, L. Addadi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 881-886.

³¹ A.L. Kulak, P. Iddon, Y. Li, S.P. Armes, H. Cölfen, O. Paris, R.M. Wilson, F.C. Meldrum, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 3729-3736.

estado físico del agua en los distintos compartimentos de las esporas se sabe que juega un papel muy importante.³² Así, por ejemplo, cuando se les priva de nutrientes, las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* forman endosporas que pueden sobrevivir en un estado metabólico inactivo durante años y recuperar su forma celular activa en minutos, cuando se restauran las condiciones nutricionales adecuadas (Figura 7).

La cavidad central de la spora *B. subtilis* contiene el genoma, cerca de la mitad del contenido proteínico de la spora y una elevada concentración de calcio y otros cationes divalentes formando complejos con el ácido dipicolínico (DPA), que también se encuentra en elevada cantidad. Las proteínas, así como los iones, se encuentran inmovilizados en la cavidad central, el DPA está próximo al estado sólido y la concentración de agua es muy baja comparada a otros sistemas biológicos.

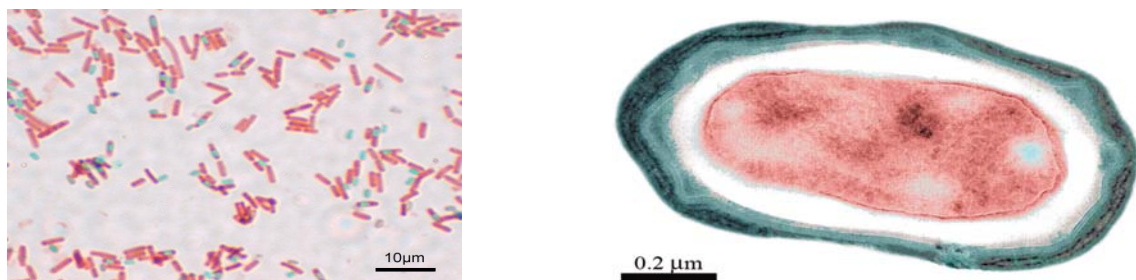


Figura 7. Izquierda: preparación del bacilo *Bacillus subtilis* en la que se puede diferenciar las endosporas teñidas, en color verde, de las células activas, teñidas de color rojo. Derecha: microfotografía electrónica de transmisión de una endospora de *B. subtilis*, en la que los distintos compartimentos de la spora se diferencian mediante colores: corazón o cavidad central en rojo, córtex en blanco, y membranas en diferentes tonalidades de verde.³²

A la cavidad central le rodea el cortex, el cual está constituido principalmente de glicopéptidos hidratados y es donde se localiza el mayor contenido de agua de la spora. La membrana interior aísla esta cavidad del cortex y está formada, esencialmente, de lípidos que se encuentran inmovilizados y mantienen una permeabilidad muy baja al agua, lo que evita la hidratación de la cavidad central y la difusión de especies iónicas así como de moléculas pequeñas, protegiendo el ADN de la cavidad central de ataques químicos. La membrana exterior, formada por proteínas entrecruzadas, protege las esporas de condiciones externas adversas.

³² G.W Gould, Water and the survival of bacterial spores. En *Membranes, Metablism, and Dry Organisms*. Ed. A.C. Leopold; Cornell University-Press, Ithaca, 1986, pgs. 143-156.

En las esporas, las macromoléculas, así como el resto de los componentes orgánicos e inorgánicos, se encuentran inmobilizados.³³ Sólo el agua mantiene una dinámica detectable que varía según sea el compartimiento de la spora en que se encuentre. El contenido en agua en la cavidad central del *B. subtilis* tiene un valor de $\sim 0.6h$,³⁴ lo que resulta menos de la mitad del valor estándar ($\sim 1.5h$) de otros sistemas biológicos. Esta concentración tan baja de agua genera una dinámica que se encuentra en la escala de tiempo de 50 ps, que no es suficiente para producir difusión y movilidad translacional y rotacional, susceptible de ser medida, en las proteínas y resto de los componentes orgánicos e inorgánicos.

La activación térmica aumenta la dinámica del agua y moviliza el metabolismo. Esto hace más permeable la membrana interior y permite el flujo de agua hacia la cavidad central. El cambio en hidratación ocasiona variación en la estructura del agua e incrementa su dinámica, lo que pone en movimiento todo el sistema metabólico que se encontraba en estado latente, recuperando la forma activa de la célula si el entorno nutricional es favorable. Las esporas de bacterias inhiben, de forma reversible, el metabolismo celular sin más que variar la estructura del agua, lo que ocurre por cambios de temperatura y concentración. Estos son sólo tres, de entre los innumerables ejemplos, que demuestran que las variaciones en la dinámica del agua condicionan las consecuencias químicas y biológicas. Vincular a cambios estructurales del agua las causas que hacen variar el auto-ensamblaje de las moléculas de agua, o los cambios en las propiedades físicas de biominerales marinos, o de la resistencia de formas de vida bajo condiciones extremas, es una investigación de interés general y no sólo una investigación de interés en ciencia básica. Conocer las causas que determinan el ordenamiento y ensamblaje de moléculas es una aportación importante en nanotecnología. Conocer las bases de las propiedades de los biominerales marinos, permitirá profundizar sobre el peligroso aumento de acidez en el mar debido al exceso de CO₂, lo que reduce la concentración del

³³ E. P. Sunde, P. Setlow, L. Hederstedt, B. Halle, *PNAS*, **2009**, *106*, 19334-19339.

³⁴ El nivel de hidratación se expresa de forma convencional en unidades h , definida como el cociente: gramos de H₂O/gramos de proteína seca. El valor medio de un sistema biológico es del orden $\sim 1.5h$.

anión carbonato y del nivel de saturación de carbonato cálcico en la superficie del mar. Esta reducción de CO_3Ca dificulta la calcificación de los esqueletos externos en corales, especies calcáreas de plancton y otros organismos marinos cuyos esqueletos y conchas lo necesiten, con el importante impacto ecológico que conlleva como es la destrucción paulatina de los arrecifes de coral y su hábitat.²¹ El control de la movilidad en los procesos biológicos influye en fenómenos biofísicos no comprendidos en su totalidad, tales como estabilidad y movilidad de proteínas, permeabilidad de membranas o control de la actividad enzimática. En último extremo, implica profundizar en el conocimiento de las causas que hacen posible la vida en este planeta.

El trabajo que se describe a continuación se reúne en cuatro capítulos. En los dos primeros se analiza el comportamiento del agua en modelos de poros que previamente fueron sintetizados en nuestro grupo de investigación. El primero recopila resultados en la investigación de conceptos estructurales básicos, relacionados con la permanencia de moléculas de agua en entornos no polares y se evalúan los parámetros que hacen posible la existencia de estos equilibrios. En el segundo se estudia el efecto director del agua en la construcción de las estructuras que se organizan en el estado sólido. Los dos capítulos siguientes se corresponden con la puesta a punto de un modelo biológico donde se investigue, a nivel molecular, la participación del agua en la inhibición del funcionamiento de un canal iónico por la actuación de un compuesto natural. Se ha elegido, por lo que tiene de particular y selectivo, la inhibición de canales de calcio por la intervención de la crambescidina-816. El primero de estos dos últimos capítulos está dedicado al aislamiento del medio marino del compuesto natural crambescidina-816, incluyendo su identificación espectroscópica. El último capítulo reúne resultados de una posible aproximación sintética. Si bien los dos primeros capítulos son continuación de un proyecto iniciado hace más de diez años, los dos últimos son el inicio de un proyecto que trata de ser modelo de investigación en bioorgánica a nivel molecular.

Capítulo 1

Efecto de la temperatura en la salida y entrada de agua en poros.

1.1 Introducción.

Aunque el transporte de agua en membranas a través de canales es un fenómeno de considerable importancia biológica, el mecanismo detallado por el que ocurre su difusión por estos canales naturales un tanto "hidrofóbicos" no está bien comprendido.³⁵ En este contexto el término hidrofóbico no significa "repelente al agua" sólo quiere decir que la atracción entre las moléculas de agua y la superficie interna del poro es menor que la de las moléculas de agua entre sí. Para comprender bien este fenómeno es necesario saber que estructuras son las que en cada instante gobiernan el equilibrio entre las moléculas de agua y la superficie interna de los poros. Conocer la estructura y comportamiento de las moléculas de agua en confinamientos no polares reducidos, es una oportunidad que nos acerca a la comprensión del funcionamiento de los canales naturales.^{36,37,38}

La estructura del agua en canales naturales se estudia usando simulaciones de dinámica molecular;³⁹ sin embargo, los sistemas biológicos se complican por ser química y estructuralmente complejos, lo que hace necesario la utilización de modelos más simples.^{40,41,42,43} Así, por ejemplo, los nanotubos de carbono han demostrado ser modelos simples específicamente válidos para entender el comportamiento del agua confinada en estructuras biológicas, tales como

³⁵ P. Agre, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 4278-4279.

³⁶ G.M. Preston, T.P. Carroll, W.B. Guggino, P. Agre *Science* **1992**, *256*, 385-387.

³⁷ K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J.B. Heymann, A. Engel, Y. Fujiyoshi, *Nature* **2000**, *407*, 599-605.

³⁸ G. Ren, V.S. Reddy, A. Cheng, P. Melnyk, A.K. Mitra, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 1398-1403.

³⁹ B.L. De Groot, H. Grubmüller, *Science* **2001**, *294*, 2353-2357.

⁴⁰ G. Hummer, J.C. Rasaiah, J.P. Noworyta, *Nature* **2001**, *414*, 188-190.

⁴¹ S. Andreev, D. Reichman, G. Hummer, *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 194502/1-9.

⁴² Y. Liu, Q. Wang, *Phys. Rev. B*, **2005**, *72*, 085420/1-4.

⁴³ G. Cicero, J.C. Grossman, E. Schwegler, F. Gygi, G. Galli, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1871-1878.

canales de membrana naturales de agua o acuoporinas^{44,45,46,47,48} y otros importantes nanofluidos.^{49,50,51,52}

Una limitación que tiene la aplicación de estos modelos, en el estudio de la estructura y dinámica de agregados moleculares de agua, es que no siempre es posible acomodar las conclusiones mecánicas determinadas *in silico* con las derivadas de experimentos específicos.^{53,54,55,56,57,58} Por ejemplo, una de las predicciones más importante obtenidas por simulaciones de dinámica molecular es que la estructura y dinámica del agua es específica para cada modelo de poro y que depende del diámetro interno^{59,60,61,62} y de la hidrofilia^{63,64} de las paredes del mismo. Esta importante conclusión teórica necesita ser sustentada en una evidencia experimental que aún está pendiente de ser obtenida. La comprensión final de problemas tan complejos requiere que los estudios computacionales se complementen con datos obtenidos de forma experimental.⁶⁵

Nuestra preocupación inicial para realizar experimentación explícita que verifique los resultados alcanzados en la simulación fue la de utilizar modelos

⁴⁴ M.J O'Connell, Carbon Nanotubes: Properties and Applications Boca Raton, FL, 2006.

⁴⁵ H. Sui, B.G. Han, J.K. Lee, P. Walian, B.K. Jap, *Nature* **2001**, *414*, 872-878.

⁴⁶ J.C. Rasaiah, S. Garde, G. Hummer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59*, 713-740.

⁴⁷ F. Zhu, K. Schulten, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 236-244.

⁴⁸ H. Fang, R. Wan, X. Gong, H. Lu, S. Li, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2008**, *41*, 1-16.

⁴⁹ A.I. Kolesnikov, J.M. Zanotti, C.K Loong, P. Thiyagarajan, A.P. Moravsky, R.O. Loutfy, C.J. Burnham, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 035503/1-4.

⁵⁰ C.C. Chou, H.Y. Hsiao, Q.S. Hong, C.H. Chen, Y.W. Peng, H. Chen, P.C. Yang, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 437-445.

⁵¹ E. Tajkhorshid, P. Nollert, M.O. Jensen, L.J. Miercke, J. O'Connell, R.M. Stroud, K. Schulten, *Science* **2002**, *296*, 525-530.

⁵² A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 674-679.

⁵³ A. Alexiadis, S. Kassinos, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 5014-5034.

⁵⁴ J. Köfinger, G. Hummer, C. Dellago, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 13218-13222.

⁵⁵ A. Waghe, J. Rasaiah, G. Hummer, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 10789-10795.

⁵⁶ C.Y. Won, N.R. Aluru, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2748-2749.

⁵⁷ R. Mashl, S. Joseph, N. Aluru, E. Jakobsson, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 589-592.

⁵⁸ T. Nanok, N. Artrith, P. Pantu, P. Bopp, J. Limtrakul, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 2103-2108.

⁵⁹ Y. Liu, Q. Wang, T. Wu, L. Zhang, *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 234701-234707.

⁶⁰ K. Koga, H. Tanaka, X.C. Zeng, *Nature* **2000**, *408*, 564-567.

⁶¹ Y. Liu, Q. Wang, *Phys. Rev. B* **2005**, *72*, 1-4.

⁶² Y. Liu, Q. Wang, L. Zhang, T. Wu, *Langmuir* **2005**, *21*, 12025-12030.

⁶³ S. Joseph, N.R. Aluru, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 452-458.

⁶⁴ C.Y. Won, N.R. Aluru, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 1812-1818.

⁶⁵ R. Hoffmann, P. v R. Schleyer, H.F. Schaefer III, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7164-7167.

de poros que se fundamentaran en los principios químico-físicos que concurren en el transporte del agua a nivel biológico. Se consideró que la utilización de modelos sustentados en los parámetros que conducen el ordenamiento de moléculas anfifílicas en la interfase agua/disolvente no polar⁶⁶ tienen la validez de seguir el principio termodinámico por el que ocurre, en la interfase agua/membrana, la asociación y plegamiento de las proteínas y formación de poros naturales.⁶⁷ Una vez se definen las características químico-físicas del proceso biológico, es racionalmente posible el diseño de la familia de moléculas a sintetizar mediante aplicación de un análisis retrosintético. Esto es, desde el comportamiento que ha de tener el todo, cuál ha de ser la estructura molecular de los componentes que lo forman para que se ejecute el proceso de manera experimental.

El diseño y síntesis de los compuestos modelo seguidos en el estudio que aquí presentamos, están descritos, en detalle, en tres tesis anteriores que sobre el tema se han realizado en nuestro grupo de investigación.⁶⁸⁻⁷⁰

La aproximación seguida conduce a los hidroxilactonas de estructura general **I**, que se prepararon siguiendo cualquiera de las dos rutas sintéticas que se describen en el Esquema 2. La elección de una u otra secuencia depende de los apéndices que se quieran introducir: saturados (Ruta A) o insaturados (Ruta B). Cuando se requieren saturados, no hay competencia en la formación de la iodolactona **IIIa**, que se prepara mediante iodación del ácido exo-metilénico **IVa**, el cual se genera por metalación del ácido **Va** y adición de la cetona correspondiente. Esta ruta sintética se optimizó en el trabajo de tesis doctoral del Dr. Hector Carrasco.⁶⁸

La hidroxilactona **IVb**, a la que se llega mediante cis-hidroxilación seguida de tratamiento ácido del precursor de diéster **Vb** produce, por adición de dos equivalentes del carbanión adecuado, la dihidroxilactona **IIIb**. La síntesis del hidroxilactónico **I** se completa a partir de **IIIa**, o del mesil-derivado de **IIIb**, mediante tratamiento con base seguido de apertura ácida del epóxido

⁶⁶ E. Fiscaro, C. Compari, A. Braibanti, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 4156-4166.

⁶⁷ P.W. Fenimore, H. Frauenfelder, B.H. McMahon, F.G. Parak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 16047-16051.

⁶⁸ Dr. Hector Carrasco Altamirano, Tesis Doctoral, 2001, Universidad de Sevilla.

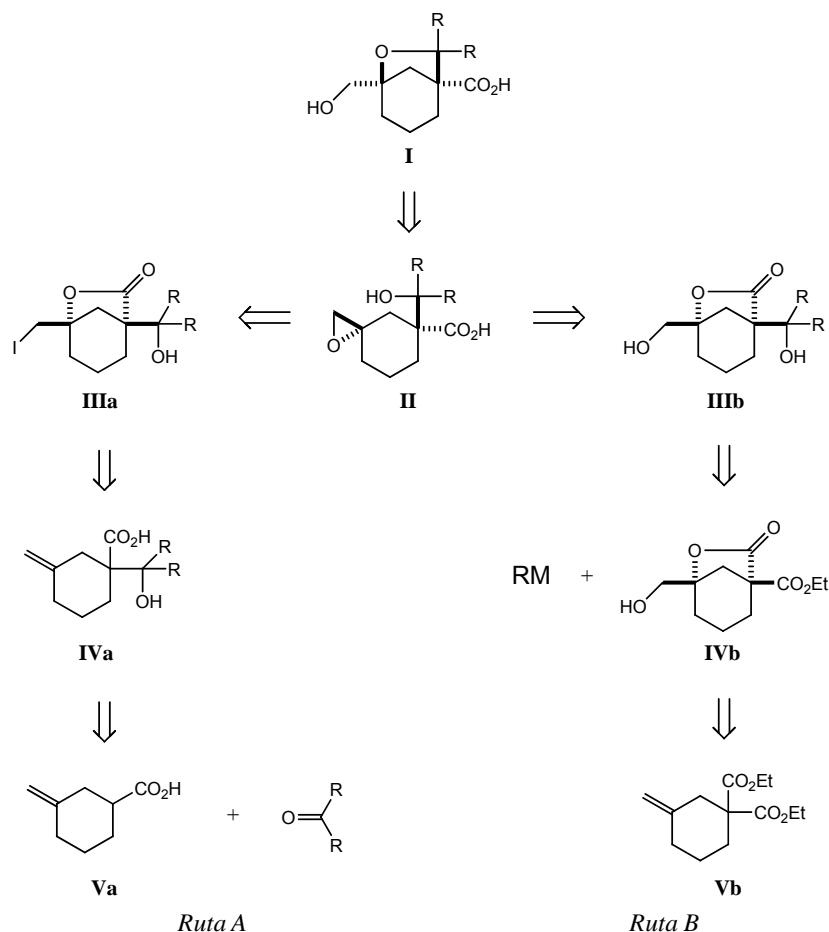
resultante **II** que no necesita ser aislado. La segunda ruta, definida como Ruta B, fué optimizada en el trabajo de tesis doctoral de la Dra. Natalia Pérez.⁶⁹

Las tablas 1-3 muestran la totalidad de las moléculas preparadas en este proyecto y que han sido recogidas en la tesis de doctorado del Dr. Martín Febles Barroso.⁷⁰ La totalidad de los compuestos preparados se cristalizaron bajo las mismas condiciones. Se usó tetracloruro de carbono y éter (etílico o isopropílico) hasta conseguir la disolución del sólido y se añadieron tres-cuatro gotas de agua. Después de agitar, se dejó evaporar lentamente el disolvente hasta la formación de cristales. Los empaquetamientos cristalinos se calcularon de los estudios de difracción de rayos-X en monocristal.

La Tabla 1 muestra las moléculas sintetizadas en las que los apéndices presentes en la estructura son cadenas lineales de átomos de carbono. Los compuestos **1-6**, **13-15** y **17** dan organizaciones estructurales anhidras. Las moléculas **16** y **18** están pendientes de estudio en estado sólido, ya que cristalizan formando agujas muy finas no válidas para estudios de difracción de rayos-X. Las moléculas **7-12** dan estructuras que incorporan agua en organizaciones que resultan ser pseudoisomorfos formando poros de diámetro variable. El interior de los poros se encuentra relleno de moléculas de agua desordenadas que no están conectadas mediante puentes de hidrógeno a la superficie interna de los poros.

⁶⁹ Dra. Natalia Pérez Hernández, Tesis Doctoral, 2005, Universidad de Sevilla.

⁷⁰ Dr. Martín Febles Barroso, Tesis Doctoral, 2007, Uniuersidad de La Laguna.



Esquema 2. Análisis retrosintético de las rutas A y B seguidas en la preparación de compuestos con apéndices alquílicos (Ruta A) o alquénicos y alquínicos (Ruta B).

El diámetro interior de los poros disminuye en la dirección $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ a $(\pm)12 \cdot 2H_2O$. La Figura 8 corresponde a la estructura y empaquetamiento del compuesto $(\pm)11 \cdot 2H_2O$, donde se muestran las moléculas de agua que forman parte del patrón de puentes de hidrógeno que estructura el poro y las moléculas de agua que se organizan en el interior del mismo.⁷¹

Las estructuras formadas por los compuestos $(\pm)2$, $(\pm)3$ ⁷² y $(\pm)4$,⁷³ forman cadenas sencillas en las que los monómeros se unen a través de la función ácido carboxílico para dar dímeros, los cuales se interconectan a través de la función OH del grupo alcohológico en **3**, o del oxígeno de la función éter en **2** y **4**.

⁷¹ M. Febles, N. Pérez-Hernández, C. Pérez, M. L. Rodríguez, C. Foces-Foces, M. V. Roux, E. Q. Morales, G. Buntkowsky, H.-H. Limbach, J. D. Martín *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *218*, 10008-10009.

⁷² H. Carrasco, C. Foces-Foces, C. Pérez, M. L. Rodríguez, J. D. Martín *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11970-11981.

⁷³ N. Pérez-Hernández, M. Febles, C. Pérez, R. Pérez, M. L. Rodríguez, C. Foces-Foces, J. D. Martín *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1139-1151.

En los compuestos **5** y **6** las uniones entre los monómeros ocurre por interacción entre el ácido carboxílico y el grupo hidroxilo del alcohol.⁷³ El oxígeno del éter no interviene y la organización resultante forma dobles cadenas en (\pm) **6** y estructura bidimensional en (\pm) **5**.

De la tercera línea de moléculas de la Tabla 1, sólo han sido estudiados los empaquetamientos correspondientes a las moléculas **13** y **17**. En ambos casos, las moléculas se estructuran formando dobles cadenas mediante interacción entre el ácido carboxílico y el alcohol.⁷⁴ Se estudiaron las estructuras correspondientes a las moléculas **14** y **15**, pero los empaquetamientos están aún pendientes de determinar.

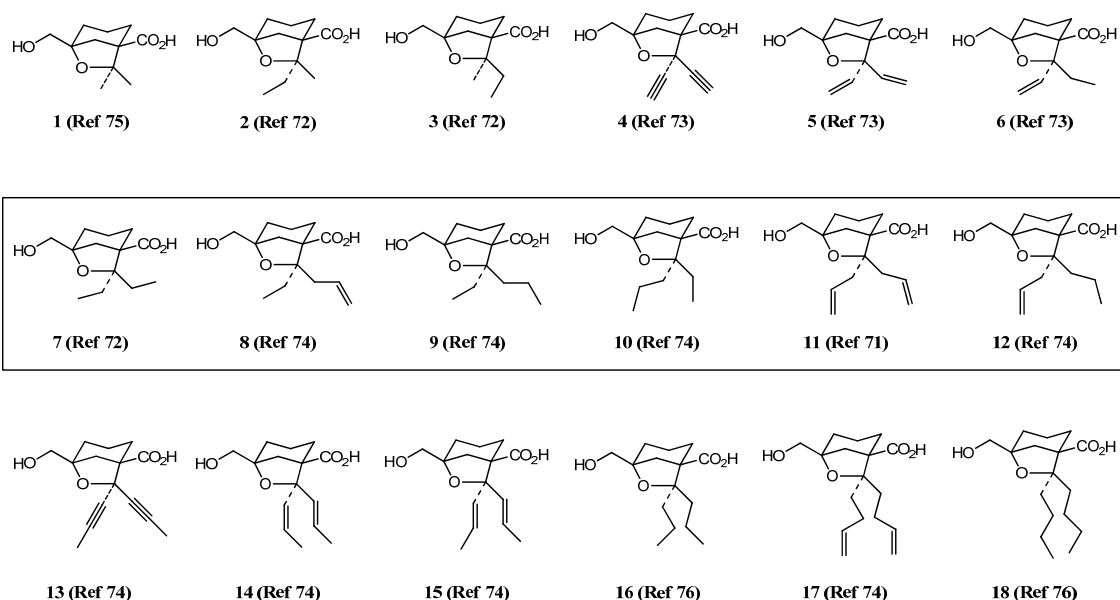


Tabla 1. Selección de hidroxi-ácidos que poseen apéndices lineales de carbono. Los compuestos enmarcados **7-12** forman, por hidratación, cristales pseudoisomorfos de estructura porosa.

Son dos las conclusiones de carácter general que pueden deducirse de los resultados obtenidos de las moléculas que se recogen en la Tabla 1. La primera es que a medida que crece el número de átomos de carbono que forman los apéndices, los monómeros, que forman las cadenas o los agrupamientos bidimensionales, tienden a unirse con participación de la función ácido carboxílico y el alcohol. Así, con la excepción del compuesto (\pm) **1**,⁷⁵ la unión

⁷⁴ C. Foces-Foces, M. L. Rodríguez, resultados no publicados.

⁷⁵ C. Ruiz-Pérez, M. L. Rodríguez, J. D. Martín, C. Pérez, P. Morales, J. L. Ravelo *Acta Crystallogr.* **1990**, *C46*, 1507-1509.

ácido carboxílico-ácido carboxílico, se presenta solo en las moléculas de apéndices más pequeños, compuestos $(\pm)\mathbf{2}$ - $(\pm)\mathbf{4}$, mientras que a partir de la molécula **5** las uniones observadas se corresponden con ácido carboxílico-alcohol. La segunda conclusión es que la incorporación de moléculas de agua a la estructura parece ocurrir solo en un grupo muy pequeño de moléculas [compuestos $(\pm)\mathbf{7}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al $(\pm)\mathbf{12}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$]. Es muy posible que la estructura formada $(\pm)\mathbf{12}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sea la de diámetro más pequeño susceptible de ser estudiado por difracción de rayos-X. Así, la estructura del homólogo hidrogenado $(\pm)\mathbf{16}$ y la de los que poseen un átomo de carbono más en los apéndices, compuestos **17** y **18**, o bien forman cadenas anhidras $(\pm)\mathbf{17}$ o cristalizan dando agujas muy finas no válidas para estudios de difracción de rayos-X en monocristal (**16** y **18**).⁷⁶

La movilidad conformacional de los apéndices parece ser también un motivo importante para que la hidratación y formación de poros tenga lugar. En la Tabla 2 se relacionan las moléculas que se han sintetizado y cuyo empaquetamiento se ha estudiado. Todas ellas tienen en común que los apéndices son carbonados y las conformaciones restringidas, por estar ramificadas o formar estructuras cíclicas. Con las únicas excepciones de los compuestos **24** y **28**, que se estructuran en cadenas formando, respectivamente, un monohidrato y un hemihidrato,⁷² el resto de los compuestos cristalizan dando organizaciones anhidras. El compuesto **19** forma cadenas de dímeros por unión de los ácidos carboxílicos.⁷⁷

⁷⁶ Cristales no apropiados para estudios de difracción de rayos-X en monocristal.

⁷⁷ C. Foces-Foces, M. L. Rodríguez, M. Febles, C. Pérez, J. D. Martín *Acta Crystallogr.* **2005**, *C61*, 339-342.

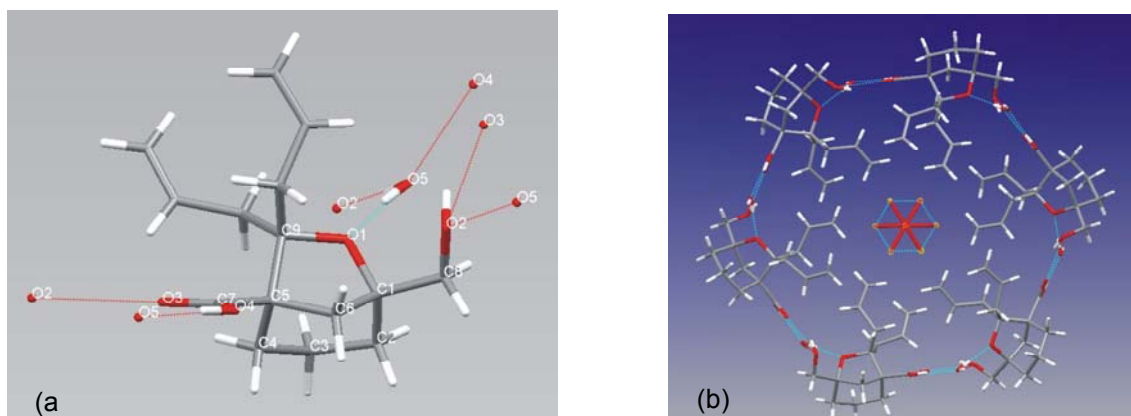


Figura 8. (a): Estructura molecular del compuesto **11** mostrando la molécula de agua contenida en el patrón de puentes de hidrógeno y que forma parte de la estructura del poro. (b) Contorno del poro formado por seis moléculas del compuesto **11** y seis de agua estructural. En el interior del macrociclo se observan las moléculas de agua que desordenadas rellena el interior del poro

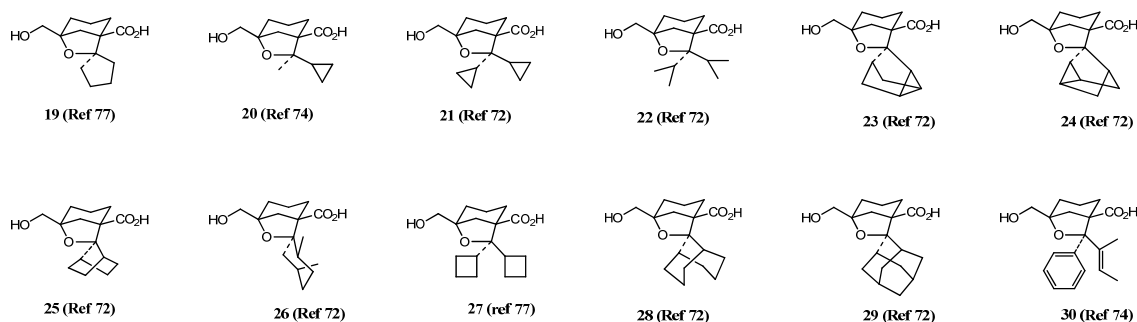


Tabla 2. Moléculas con apéndices ramificados y cíclicos que presentan rigidez conformacional.

El resto de los compuestos mostrados en la Tabla 2 forman cadenas por unión de las funciones ácido carboxílico y el alcohol. La molécula de mayor peso molecular, el compuesto **30**, incluye moléculas de tetracloruro de carbono en su estructura,⁷⁴ lo que probablemente sea debido a la contribución hidrofóbica de los anillos aromáticos. Los resultados obtenidos con las moléculas que se muestran en la Tabla 2 indican que, al igual que con las moléculas de la Tabla 1, la unión entre el ácido carboxílico y el alcohol se favorece al aumentar el número de átomos de carbono en los apéndices. Quizás la conclusión más relevante sea que la movilidad conformacional de los apéndices es muy importante para que la incorporación de moléculas de agua tenga lugar.

La presencia de heteroátomos en los apéndices no parece ser tampoco un factor que favorezca la hidratación. Así, se sintetizaron los compuestos que se

reúnen en la Tabla 3 y comprobado que, con la única excepción del compuesto **31** que no ha podido estudiarse al no ser cristalino, el resto de los compuestos generan estructuras anhidras, lo que demuestra que la polaridad y presencia de apéndices en estados altos de oxidación, no tiene efecto alguno en la incorporación de moléculas de agua en el empaquetamiento cristalino.

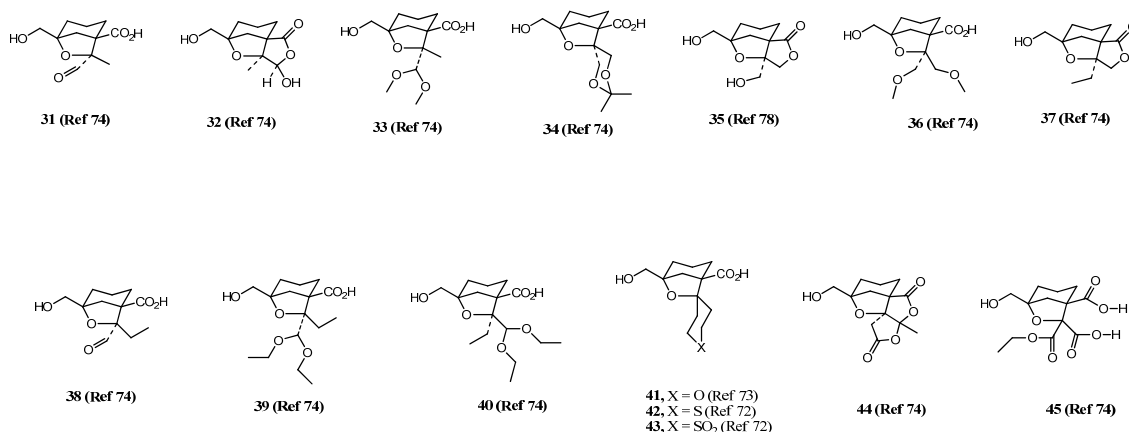


Tabla 3. Moléculas con apéndices que contienen heteroátomos en diversa funcionalidad.⁷⁸

Aunque las seis moléculas: **7-12**, referidas en la Tabla 1, forman estructuras porosas isomorfas en cuyo interior, los estudios de rayos-X, muestran densidad electrónica atribuible a moléculas de agua, en este capítulo nos referiremos al comportamiento del agua sólo en las estructuras que forman las moléculas **7** y **11**. En estos modelos es donde los estudios del estado sólido han ido más lejos. Además, las diferencias entre los diámetros de los poros: 5.9-9.4 Å en (\pm)**7**·2H₂O⁷² y 4.2-6.5 Å en (\pm)**11**·2H₂O⁷¹, es lo suficiente amplia como para establecer, sin ambigüedad y en base a los resultados obtenidos, las diferencias en el comportamiento del agua que se mueve en su interior. Los estudios estructurales y de dinámica que sustentan las conclusiones alcanzadas se realizaron utilizando tres técnicas diferentes de análisis: Difracción de rayos-X en monocristal, RMN en estado-sólido y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las moléculas **7** y **11**, las hemos sintetizado como racematos en cantidades de gramos y cristalizado bajo condiciones diversas seleccionando las muestras empleadas para cada estudio.

⁷⁸ M. L. Rodríguez, M. Febles, C. Pérez, N. Pérez-Hernández, J. D. Martín, C. Foces-Foces *Acta Crystallogr.* **2005**, *C61*, 138-142.

En este capítulo haremos un estudio paralelo de análisis termogravimétrico (TGA) y de difracción de rayos-X en polvo a temperatura variable (VT-PXRD), sobre las estructuras $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para demostrar que, en nuestros modelos, las moléculas de agua ya se muevan libres o se encuentren fijas por enlaces por puente de hidrógeno a la superficie del poro, son estables a temperaturas de hasta 25 °C, por encima de la cual tienden a salirse del poro de forma irreversible. Veremos que este resultado implica que la superficie interior del poro cambia de hidrofílica a hidrofóbica, lo que es una confirmación experimental de que la coexistencia entre los estados del poro lleno y vacío de agua y la sensibilidad de ambas situaciones a los cambios de temperatura son funcionalmente relevantes.⁷⁹ Discutiremos también las implicaciones de estos resultados experimentales en el funcionamiento de los sistemas naturales.

⁷⁹ O. Beckstein, M.S. Samsom, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, *100*, 7063-7068.

1.2 Antecedentes y objetivos.

Hemos seleccionado las estructuras que forman las moléculas racémicas **7** y **11** como modelos químicos donde experimentar mecanismos específicos en el transporte del agua. En ambos modelos de poros la proporción de agua es la misma en su estado inicial; no obstante, el contenido de agua en el poro puede hacerse variar dentro de un amplio rango de temperaturas por debajo de la de ambiente, sin que se altere por ello la estructura del patrón de puentes de hidrógeno que sostiene la arquitectura de los poros. Además, estos poros tienen un rango de diámetros internos que, al menos en el de diámetro menor de estructura $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, la entrada y salida de agua ha de ser en régimen lineal.⁷¹

Existe evidencia experimental sobre la ocupación continuada por agua de cavidades no polares en un régimen de estabilidad termodinámica.^{80,81} En nuestros modelos coexisten dos tipos aparentemente diferentes de moléculas de agua, las unidas por puentes de hidrógeno a las superficies interna de los poros y las que se mueven libremente en su interior sin vinculación aparente a la superficie interna de los mismos. Este último tipo de moléculas, por estudios de rayos-X pueden visualizarse en las estructuras que forman las moléculas **8-12**, no así en el poro de mayor diámetro $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.⁷¹ La Figura 9 muestra en la estructura $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, las distancias mínimas entre los máximos de densidad electrónica asociados a moléculas de agua en el poro y el monómero que lo forma. Estas distancias son entre las moléculas de agua y los apéndices no polares existentes en los monómeros. En la estructura $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, esta medición no es posible al encontrarse el agua más deslocalizada y no poder ser observada por estudios de difracción de rayos-X. No obstante, estas agrupaciones de moléculas responden a topologías susceptibles de ser detectadas en otros tipos de espectroscopias^{82,83,84,85,86,87,88,89} y son

⁸⁰ B. Yu, M. Blaber, A.M. Gronenborn, G.M. Clore, D.L. Caspar, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 103-108.

⁸¹ A.M. Buckle, P. Cramer, A.R. Fersht, *Biochemistry* **1996**, 4298- 4305.

⁸² K. Liu, J.D. Cruzan, R.J. Saykally, *Science* **1996**, *271*, 929-933.

⁸³ K. Liu, M.G. Brown, C. Carter, R.J. Saykally, *Nature* **1996**, *381*, 501-503.

⁸⁴ J.D. Cruzan, L.B. Braly, K. Liu, M.G. Brown, J.G. Loeser, R.J. Saykally, *Science* **1996**, *271*, 59-62.

responsables de la hidrofilia y permeabilidad que se observa en estos modelos de poros.⁷¹

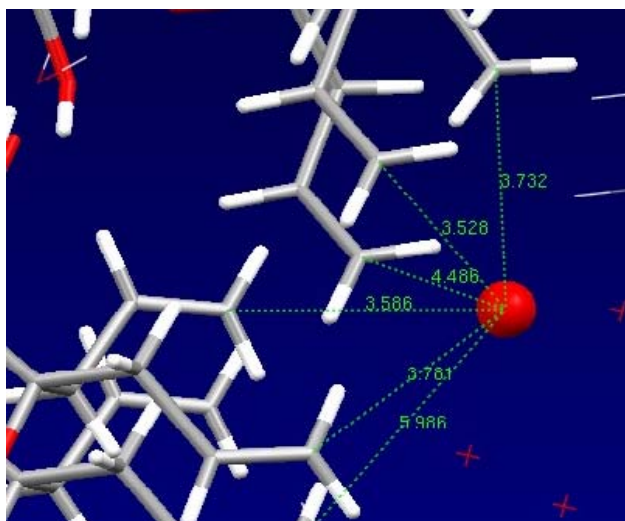


Figura 9. Estructura parcial del poro de referencia (\pm)**11**·2H₂O, en el que se muestran las distancias mínimas entre el agua que se localiza en su interior y los homólogos que constituyen el poro. Los contactos ocurren entre el agua y los apéndices no polares del compuesto orgánico.

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) fueron realizados para las dos estructuras bajo las mismas condiciones.^{71,90} Se sometieron a un rango de temperaturas: 283 K – 363 K y con velocidad de calentamiento de 10 K/min. Antes de someter las muestras a calentamiento se calibraron en el calorímetro a T = 283 K. Se observó, para los cristales del compuesto **7**, un solo pico en el rango 326 K – 364 K (T_{pico} = 350.1 K) correspondiente a una pérdida de masa del 13.6%. Con el fin de estudiar la reversibilidad del proceso, la muestra se sometió a enfriamiento y se realizó un segundo calentamiento, no observándose efecto térmico en ninguno de los experimentos realizados. Este hecho indica que el proceso es irreversible y que la disminución de la masa es causa de la pérdida irreversible de moléculas de agua. Los cálculos teóricos para la pérdida de dos moléculas de agua es del 13.0%, por lo que se concluye que la estructura cristalina se corresponde con un dihidrato: (\pm)**7**·2H₂O.

⁸⁵ K. Liu, M.G. Brown, J.D. Cruzan, R.J. Saykally, *Science* **1996**, *271*, 62-64.

⁸⁶ C.J. Gruenloh, J.R. Carney, C.A. Arrington, T.S. Zwieter, S.Y. Freedericks, K.D. Jordan, *Science* **1997**, *276*, 1678-1681.

⁸⁷ J. Kim, K.S. Kim, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 5886-5895.

⁸⁸ N. Keutsch, R.J. Saykally, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 10533-10540.

⁸⁹ K. Nauta, R.E. Miller, *Science* **2000**, *287*, 293-295.

⁹⁰ Los estudios de DSC fueron realizados por la Dra. M^a Victoria Roux, Instituto de Química-Física Rocasolano, Madrid.

El mismo experimento realizado para cristales del compuesto **11**, en el intervalo 283 K – 343 K, muestra que la endoterma de deshidratación ocurre en el rango de 310 K – 338 K ($T_{\text{pico}}=329.4$ K) y corresponde a una pérdida de masa del 11.7%. Como en el caso anterior, el proceso es irreversible y debido igualmente a la pérdida de dos moléculas de agua (el calculado teórico es del 11.9%). Esta estructura se corresponde pues con un dihidrato: $(\pm)\mathbf{11}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

La conclusión a que se llega por estos estudios, es que ambas estructuras son dihidratos y que, en correspondencia a los estudios de difracción, una de las moléculas de agua forma parte del patrón de puentes de hidrógeno que estructura el poro, mientras la otra, ha de estar deslocalizada en el interior del mismo. Esta segunda molécula de agua se observa por rayos-X en la estructura que forma $(\pm)\mathbf{11}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pero no se detecta en el caso de $(\pm)\mathbf{7}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.⁷¹

Los experimentos de DSC a bajas temperaturas se muestran en la Tabla 4 para $(\pm)\mathbf{7}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y en la Tabla 5 para $(\pm)\mathbf{11}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Para el poro que forma la molécula **7** (Tabla 4), se puede observar que la variación entálpica más importante, definida como modificación 1, ocurre en el intervalo de temperaturas: $T_{\text{pico}}= 232.4$ K - 246.4 K. El segundo cambio, modificación 2, se observa en el rango: $T_{\text{pico}}= 272.4$ K - 279.8 K.

En el poro correspondiente a la molécula **11**, los estudios de DSC muestran un comportamiento similar (Tabla 5). En este caso, la modificación 1 se observa en el rango de temperaturas: $T_{\text{pico}}= 201.6$ K - 207.4 K, y para la modificación 2, en el de: $T_{\text{pico}}= 267.3$ K - 270.6 K.

Proceso	velocidad K/min	modificación 1			modificación 2		
		Intervalo temp. T/K	T_{pico} K	ΔH° J/g	Intervalo Temp. T/K	T_{pico} K	ΔH° J/g
1 ^{er} enfriamiento	5						
1 ^{er} calentamiento	5	163→205	187.8	1.4	215→276	233.6	3.3
2 ^o enfriamiento	10						
2 ^o calentamiento	10	165→209	190	1.6	213→282	239.1	2.5
3 ^{er} enfriamiento	20						
3 ^{er} calentamiento	20	175→216	194	1.3	225→281	243.8	2.3

Tabla 4: Experimentos de DSC en una muestra del compuesto $(\pm)7 \cdot 2H_2O$.*

*Se observan dos modificaciones entálpicas en tres procesos de calentamiento a 10 K/min. Los enfriamientos se hicieron a velocidad creciente (5, 10 y 20 K/min). Se usó la misma muestra en todo el proceso.

El cambio entálpico correspondiente a la segunda modificación, puede ser asociado a la fusión/congelación del agua contenida en el interior del poro: alrededor de 0 °C para la estructura formada por $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ y en el entorno de -5 °C para el agua contenida en el poro más estrecho que forma la estructura $(\pm)11 \cdot 2H_2O$.⁹¹

⁹¹ Es bien conocido que el punto de fusión/congelación del agua confinada en poros, depende del diámetro de los mismos y disminuye a medida que el poro se hace más estrecho: G. W. H. Höhne, W. F. Hemminger, H.-J. Flammersheim "Differential Scanning Calorimetry", 2^a Ed., Springer, Berlín, 2003, p. 229.

proceso	velocidad K/min	modificación 1			modificación 2		
		Intervalo temp. T/K	T_{pico} K	ΔH° J/g	Intervalo temp. T/K	T_{pico} K	ΔH° J/g
1 ^{er} enfriamiento	5						
1 ^{er} calentamiento	10	196.8→226.1	201.6	2.6	257.7→286.1	267.36	1.6
2 ^o enfriamiento	10						
2 ^o calentamiento	10	196.5→224.2	201.6	2.76	251.8→295.7	274.0	3.8
3 ^{er} enfriamiento	20						
3 ^{er} calentamiento	10	202.2→223.3	207.4	0.5	257.6→292.9	270.6	2.7

Tabla 5: Experimentos de DSC en una muestra de $(\pm)11 \cdot 2H_2O$.*

*Se observan dos modificaciones entálpicas en tres procesos de calentamiento a 10 K/min. Los enfriamientos se realizaron a velocidad creciente (5, 10 y 20 K/min). Se usó la misma muestra para todo el proceso.

Los estudios de RMN en estado sólido para la estructura $(\pm)7 \cdot 2H_2O$, tanto en experimentos con giro en ángulo mágico (MAS) como de 2H en estático, se describen en detalle en la Tesis Doctoral de la Dra. Natalia Pérez Hernández y han sido ya publicados.⁷¹ Sólo diremos aquí, que tales estudios demostraron que el poro puede existir en dos situaciones: "lleno" y "vacío", entendiendo por esta última situación la que corresponde a una relación monómero orgánico/agua de $1/2$. Estos estudios demostraron también que el rango de temperaturas 232.4 K - 246.4 K, observados para esta estructura en los estudios de DSC y que se definieron como modificación 1 (Tabla 5), se corresponde a cambios en la dinámica del agua, lo que se manifiesta en los estudios de 2H -RMN estáticos en el rango de temperaturas 220 K – 250 K.⁷¹

La dinámica del agua que ocupa los poros se puede justificar en base al efecto hidrofóbico,⁹² que se sabe es muy sensible a cambios de la temperatura.⁹³ Los estudios realizados demuestran que el agua, dependiendo de la presión de vapor a que se someta, puede fluctuar entre tipo-vapor en el estado que definimos como vacío, a tipo-líquida en la situación de lleno (Figura 10).

⁹² S. Granick, S.C. Bae, *Science* **2008**, *322*, 1477-1478.

⁹³ H.J. Wang, X.K. Xi, A. Kleinhammes, Y. Wu, *Science* **2008**, *322*, 80-83.

Nuestro objetivo en el estudio que se describe a continuación es el de aportar resultados experimentales sobre el efecto que tiene la temperatura sobre el agua y la superficie interna de los poros, con el fin de obtener conclusiones del posible intercambio hidrofília/hidrofobia y de la reversibilidad del proceso.

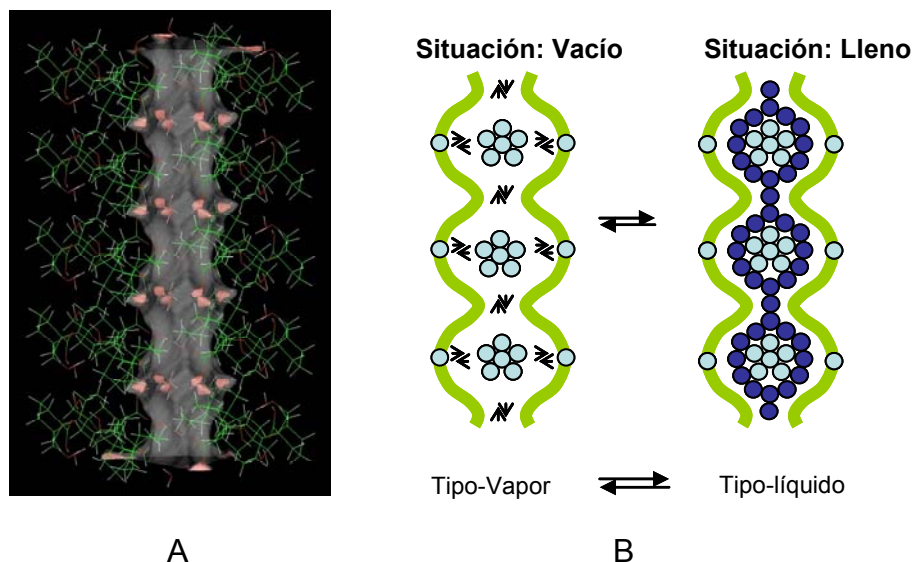


Figura 10. (A) Estructura del poro $(\pm)7 \cdot 2H_2O$. La molécula orgánica que lo forma esta minimizada con el fin de resaltar el perfil interior del poro. Los puntos sólidos de color rosa se corresponden con las moléculas de agua que estructuran el poro. El agua que se mueve libremente en el interior se muestra difuminada, en color gris, y sin resaltar sitios de mayor densidad electrónica. (B) Diagrama esquemático que representa los estados lleno y vacío del poro y los cambios en la dinámica del agua contenida en dependencia reversible con la presión de vapor exterior. La dinámica del agua en el estado vacío está en el rango, $10^{-12} \text{ s} - 10^{-9} \text{ s}$ (tipo-vapor) y en el estado lleno en el rango, $10^{-15} \text{ s} - 10^{-12} \text{ s}$ (tipo-líquida).

Pretendemos también profundizar cómo estos cambios afectan a la estabilidad de los poros y a la estructura del ensamblaje de los monómeros. Evidencias de tales efectos se ha comprobado que son muy difíciles de obtener;⁹⁴ no obstante, pretendemos averiguar en que medida las diferentes estructuras de agua que se puedan albergar en estos modelos de poros son afectadas por cambios en la temperatura. Nuestros modelos son especialmente válidos para esta investigación ya que, en estado de equilibrio y con independencia del diámetro del poro, el contenido de agua es el mismo, lo que hace que, en condiciones de estabilidad termodinámica, los equilibrios se sustenten sobre estructuras moleculares de agua diferentes.

⁹⁴ D. Chandler, *Nature* **2005**, 437, 640-647.

1.3 Materiales y métodos.

Las moléculas requeridas fueron sintetizadas y cristalizadas según procedimientos descritos en tesis doctorales anteriores.

1.3.1 Difracción de rayos-X.

Los espectros de difracción se recogieron en un difractómetro Nonius Kappa CCD (λ (MoKa) = 0.7107 Å). La reducción de datos y el refinamiento de las constantes reticulares se realizaron con los programas DENZO⁹⁵ y COLLECT.⁹⁶ Las estructuras se resolvieron por métodos directos⁹⁷ y el refinamiento se realizó en F2 (SHELXL97).⁹⁸ Todos los átomos de hidrógeno se localizaron en las correspondientes síntesis de diferencias de Fourier aunque se incluyeron en los últimos ciclos de refinamiento en posiciones geométricas. Los estudios de difracción de rayos-X fueron realizados en el Instituto de Bio-Orgánica "Antonio González" de la Universidad de La Laguna por el Dr. Matías López Rodríguez (Instituto de Bio-Orgánica, Universidad de La Laguna, La Laguna), y por la Dra. Concepción Foces-Foces (Departamento de Cristalografía, Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid).

1.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Para estos experimentos se utilizaron dos equipos diferentes. Para las medidas a baja temperatura (de 123 a 298 K), se empleó un Mettler DSC30. En el intervalo de 273 K a 359 K se utilizó un instrumento Pyris 1 de Perkin Elmer. En todos los experimentos, las muestras se introdujeron en cápsulas no herméticas en atmósfera de nitrógeno. Las muestras se pesaron antes y después de cada experimento en una microbalanza Mettler AT21, con sensibilidad de ± 0.000002 g. Los experimentos se realizaron en el Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC), de Madrid por la Dra. M^a Victoria Roux.

⁹⁵ Z. Otwinowsky, W. Minor, "Methods in Enzymology", Vol. 276, 9997, pgs. 307-326. Macromolecular Crystallography. Part A, Eds, C.E. Carter, R.M.S. Sweet, Academic Press, London. University of Texas, Southwestern Medical Centre en Dallas, HKL Denzo y Scalepack, USA.

⁹⁶ Nonius, **1998**. Kappa CCD Server Software. B. V. Nonius, Delft. The Netherland.

⁹⁷ A. Altomare.; M.C. Burla; M. Camalli; G. Cascarano; C. Giacovazzo; A. Guagliardi; A.G.G. Moliterni; G. Polidori; R. Spagna, SIR97. *J. Appl. Cryst.* **1999**, *32*, 115-119.

⁹⁸ G.M. Sheldrick, SHELXL97. University of Gottingen, Germany, 1997.

1.3.3 Termogravimetría (TG) y análisis térmico diferencial (DTA).

Los análisis termogravimétricos se realizaron con un analizador Mettler TGA/sDTA851e, bajo una mezcla de aire seco y nitrógeno. Aproximadamente 5.0 mg de muestra se usaron en cada medida y la temperatura en experimento tipo se aumenta a la velocidad de 1 °C/min. Adicionalmente, se hicieron experimentos donde las muestras fueron calentadas previamente, mantenidas a ciertas temperaturas por algún tiempo y luego calentadas otra vez.

1.3.4 Difracción de rayos-X en polvo a temperatura variable (VT-PXRD).

Para los experimentos XRD (VT-PXRD) se utilizó un equipo Bruker D8 con plataforma de platino Antón Parr. Se realizaron dos series de experimentos. En los primeros, cada muestra se calienta de forma continua desde 30 °C hasta 180 °C a una velocidad de 1 °C/min, recogiendo difractogramas cada 5 °C. Se eligió el rango 2θ entre 5° a 70°, con pasos de 0.025° y 28.8 s de tiempo de adquisición en cada paso. La segunda serie de experimentos incluye fijar las temperaturas de las muestras durante ciertos espacios de tiempo y realizar series de difractogramas a la misma temperatura, con el fin de ver los cambios que eventualmente pueden ocurrir. El rango total seguido de temperatura en cada uno de los experimentos es de 30 °C a 150 °C y la velocidad de calentamiento de 1 °C/min. En la adquisición de los datos de difracción se utilizaron los parámetros siguientes: 2θ rango de 5° a 50°, 0.025° o 0.028°/paso, y 28.8 s/paso. Ambas series de experimentos se realizaron al aire. Para cada medida se utilizó una "punta de espátula" de muestra.

La experimentación de TGA y VT-PXRD fue realizada por el Lcdo. D. Eduardo Falcao, en el Material Research Laboratory, Universidad de California en Santa Bárbara.

1.4 Discusión de resultados.

A pesar de que los estudios de difracción permiten distinguir entre los dos tipos de agua, todos los experimentos encaminados a diferenciar entre sus dinámicas han sido infructuosos. Los estudios de RMN ^1H y ^2H en estado sólido y experimentos de IR muestran que todos los protones lábiles (CO_2H , CH_2OH y H_2O) se deuteran cuando entran en contacto con vapor de D_2O , pero sin seguir un orden preferencial aparente.⁹⁹ Un caso similar se discutió con anterioridad en un estudio en estado sólido de porfirinas y se propuso un mecanismo por el que las moléculas de agua podían difundirse, ocasionando intercambios de protones y deuterones con agua atrapada en el interior del sólido, aprovechando defectos en la ocupación por agua en la red del cristal.^{100,101} La difusión de moléculas de agua en estructuras cristalinas no porosas se interpreta, bien suponiendo defectos en la estructura cristalina o que las moléculas en el cristal no tienen un comportamiento tan rígido como el que generalmente presupone.¹⁰²

¿Cuál sería entonces el mecanismo en este proceso de deuteración? Podría pensarse en un mecanismo por el que el orden molecular que establece el estado sólido decaiga, equilibrando situaciones próximas al estado líquido en las que la molécula orgánica y el agua adquieren mayor movilidad. En tales equilibrios, los protones lábiles presentes en el sistema serán rápidamente intercambiados. Se podría también discutir un mecanismo en el que, aún manteniéndose el orden que establece el estado sólido, la difusión del agua y las reorientaciones de las estructuras moleculares están minimizadas, pero no suprimidas.^{102,103}

En la izquierda de la Figura 11 se esquematiza el proceso de deuteración general del patrón de puentes de hidrógeno $R_3^3(11)$ presente en cualquiera de las estructuras que forman las moléculas **7** – **12**. De hecho consiste en la

⁹⁹ N. Pérez, J.D. Martín, H. Limbach, resultados no publicados.

¹⁰⁰ D. Gerritzen, H. H. Limbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 869-879.

¹⁰¹ H. H. Limbach, W. Seiffert, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 538-542.

¹⁰² P.K. Thallapally, G.O. Lloyd, J.L. Atwood, L.J. Barbour, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3848-3851.

¹⁰³ R. Banarjee, P.M. Bhatt, M.T. Kirchner, G.R. Desiraju, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2515-2520.

secuencia de tres situaciones que incluyen los siguientes pasos diferenciados: (i) Entrada de D_2O en estado de gas, y sustitución de H_2O en el sólido por D_2O ; (ii) intercambio de hidrógeno (protón y/o deuterón) entre el agua y los grupos carboxílicos; (iii) intercambio protón/deuterón entre los grupos carboxílicos y los grupos alcohólicos. El intercambio entre las funciones CO_2H y OH ha sido bien establecido que procede a través de un intermedio cíclico.^{100,101} Por el contrario, el intercambio protón/deuterón entre funciones de alcohol, no pueden ocurrir directamente sino que necesitan la presencia de impurezas ácidas o básicas.¹⁰⁴ La figura 11 (derecha) incluye los intermedios que se proponen para la secuencia $i \leftrightarrow ik \rightarrow iii$ que son respectivamente, las estructuras enmarcadas en amarillo: $R_2^2(9)$, $R_2^2(6)$ y $R_2^2(6)$.

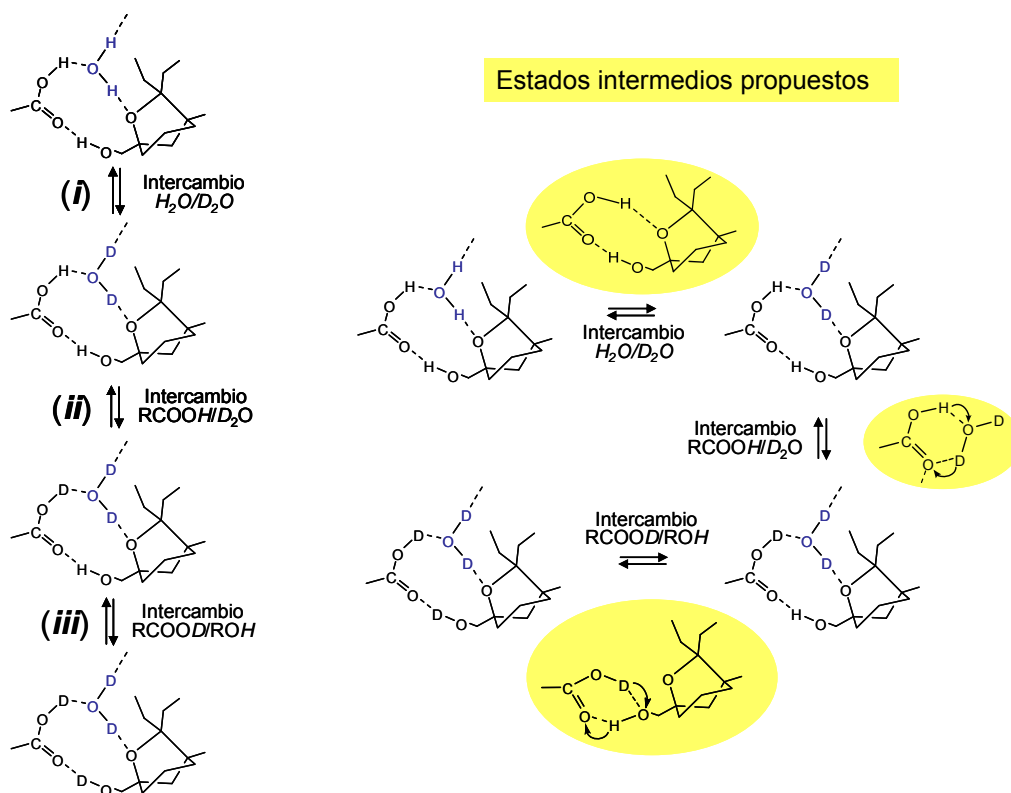


Figura 11. Izquierda: Propuesta de la secuencia de deuteración en nuestro modelo de poro. Derecha: Supuestos Intermedios: $R_2^2(9)$, $R_2^2(6)$ y $R_2^2(6)$ (sombreados en amarillo).

El patrón de puentes de hidrógeno que se propone como estabilizador del defecto que genera la pérdida de una molécula de agua, conecta el hidroxilo del ácido como dador al oxígeno del éter de la molécula adyacente y el

¹⁰⁴ D. Gerritzen, H. H. Limbach, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 527-535.

carbonilo del ácido, como aceptor del hidrógeno del hidroxilo de la función alcohólica. El sistema $R_2^2(9)$ está presente en algunos de los empaquetamientos anhidros de estos hidroxí-ácidos, por ejemplo, en las estructuras que forman los monómeros (\pm)**33** o (\pm)**40** (Figura 12).⁷⁴

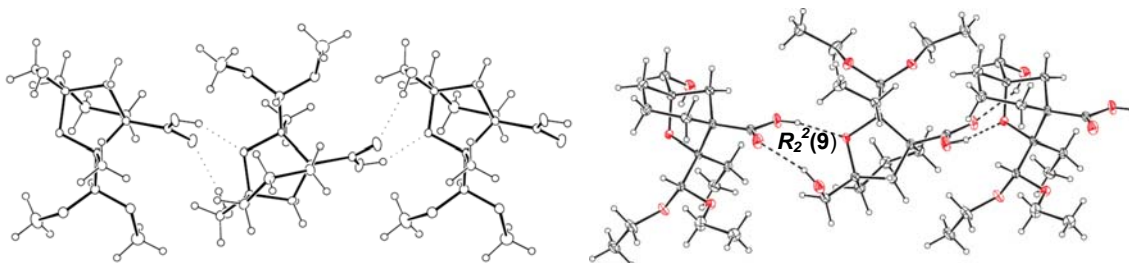


Figura 12. Empaquetamiento cristalino de los compuestos (\pm)**33** (Izq.) y (\pm)**40** (Der.). Ambos disponen del mismo patrón $R_2^2(9)$ de puentes de hidrógeno.⁷⁴

Las Figuras 13-15 ilustran en mayor detalle los movimientos asociados a la propuesta de intercambio H/D. Para el intercambio definido como (*i*), Figura 13, lo primero que ha de ocurrir es que una molécula de agua deje su lugar vacante. Como el patrón de puentes de hidrógeno queda alterado, es concebible que las dos moléculas orgánicas adyacentes se acerquen y estabilicen su situación por formación de enlaces por puentes de hidrógeno entre el ácido carboxílico de una con el oxígeno del éter de la otra. El patrón de puentes de hidrógeno inicial se recupera por inclusión en este intermedio de una molécula de D₂O.

En el proceso de intercambio (*ii*), una de las moléculas ha de romper dos de sus enlaces, uno con el agua y otro con la molécula orgánica adyacente (Figura 14). Resulta difícil saber si esta interrupción del patrón de puentes de hidrógeno genera o no defecto en el cristal, ya que no se produce vacante, sólo alteración en los enlaces que conforman la estructura.

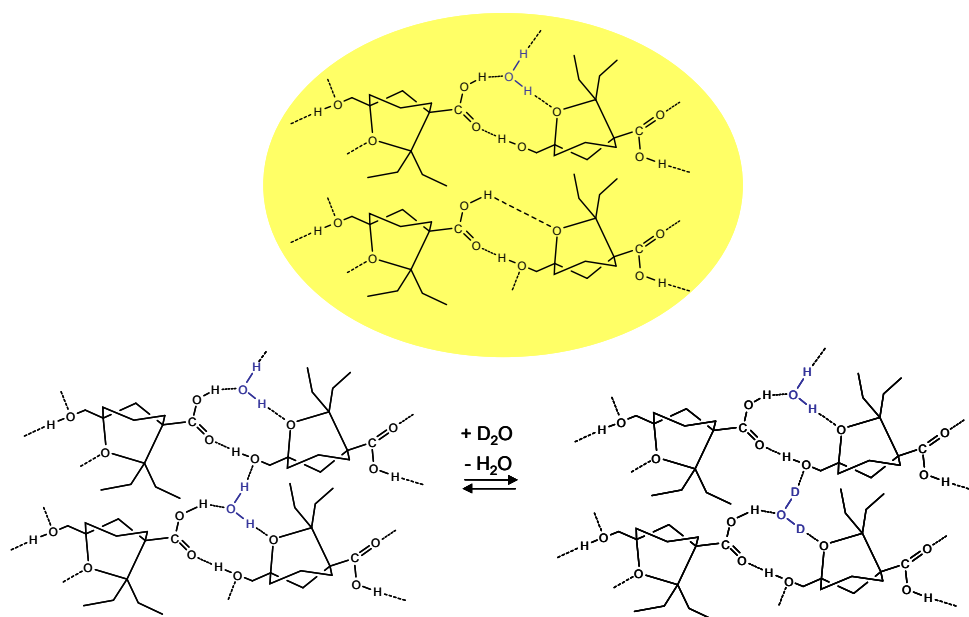


Figura 13. Intermedio propuesto en el intercambio H_2O/D_2O .

En cualquier caso será un proceso lento, ya que es bien conocido que la presencia de defectos y movimientos moleculares de moléculas orgánicas en el estado sólido son procesos lentos.¹⁰⁵ En cualquier caso, el intercambio y deuteración de la función carboxílica ocurre a través del complejo 1:1 formado por el ácido carboxílico y una molécula de agua deuterada. En tal complejo, tiene lugar una doble y rápida transferencia H/D .

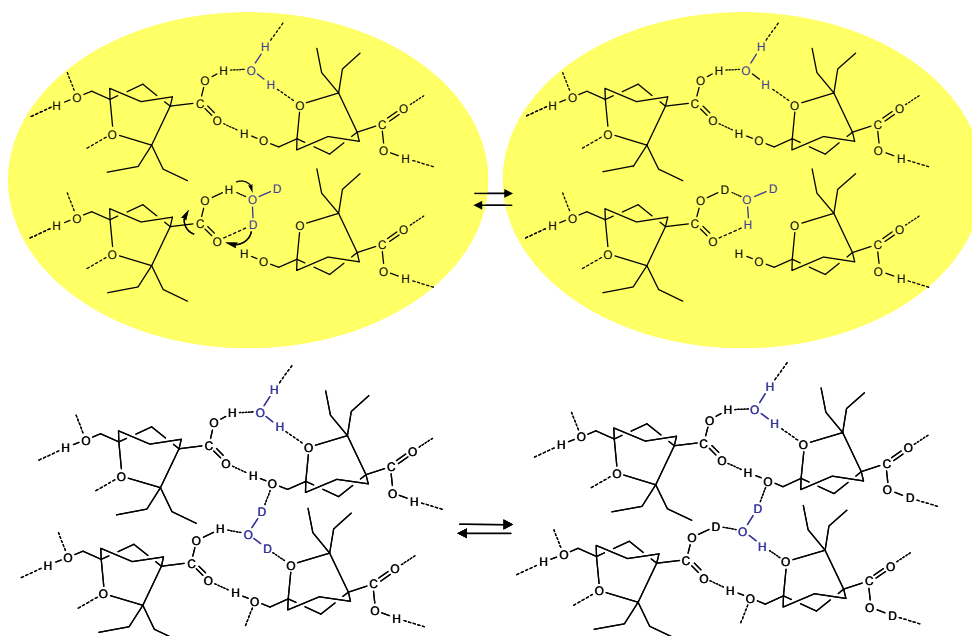


Figura 14. Intermedios propuestos en el intercambio $-CO_2H/D_2O$.

¹⁰⁵ J. J. Titman, Z. Luz, H. W. Spiess *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 3756–3765.

La situación original se recupera por un giro rápido de 180° del plano que contiene las funciones COOD/DHO.^{100,101} Intercambios rápidos similares se han observado por ^{17}O -RMN en estado sólido de complejos cíclicos $(\text{COOH})_2$ en el ácido dimetil malónico.¹⁰⁶

Después de recuperar el patrón original y repetir intercambios consecutivos (i) y (ii), todas las moléculas de agua y funciones de ácido carboxílico se encontrarán deuteradas ($-\text{CO}_2\text{D}/\text{D}_2\text{O}$), no así los hidrógenos de la función alcohol ($-\text{CH}_2\text{OH}$). La deuteración de la función de alcohol puede ocurrir según el intercambio (iii) (Figura 15). Para que el proceso ocurra según este protocolo, en primer lugar se ha de crear una vacante de agua entre dos moléculas orgánicas adyacentes. Estas dos moléculas formarán un complejo cíclico 1:1 entre la función carboxílica de una y el hidroxilo del alcohol de la otra, lo que permitiría la rápida transferencia H/D. Esto requiere reorganizaciones importantes entre las moléculas involucradas; dos de las posibilidades que se pueden barajar se dibujan en la Figura 15. Sucesivos intercambios (i) y (ii) permitirán completar el proceso de deuteración.

Los resultados experimentales no verifican que todos los hidrógenos lábiles se intercambien por deuterio, cuando las estructuras dihidratadas de estos hidroxí-ácidos se ponen en atmósfera de D_2O ; sin embargo, si son concluyentes en que los intercambios tienen lugar en las funciones presentes a velocidades que resultan equiparables.⁷¹ Esto es consistente con que cuanto mayor sea el número de defectos presentes en el sólido, más homogénea resultará la deuteración, ya ocurra ésta de manera secuencial o simultaneada en el tiempo.

¹⁰⁶ B. Filsinger, H. Zimmermann, U. Haeberlen *Mol. Phys.* **1992**, *76*, 157-172.

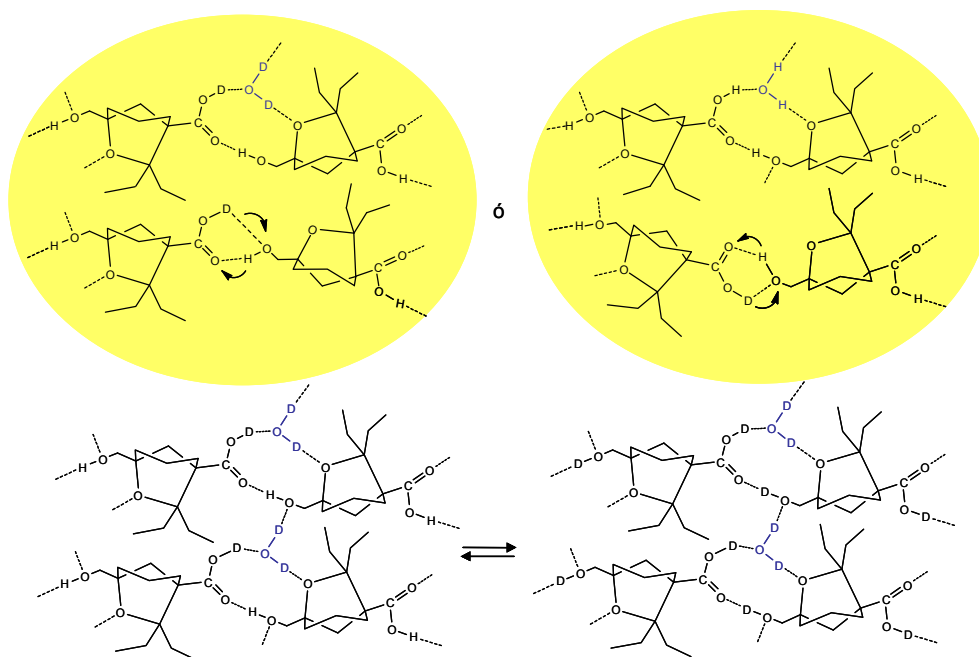


Figura 15. Intermedios propuestos en el intercambio $-\text{CO}_2\text{D}/-\text{CH}_2\text{OH}$.

No puede excluirse el intercambio simultáneo $\text{COOH}/\text{D}_2\text{O}$ y COOD/ROH mediante los intermedios cíclicos $R_2^2(6)$ y $R_3^3(8)$ (Figura 16). El patrón $R_3^3(8)$ se encuentra presente en el empaquetamiento cristalino del monómero (\pm)**22**.⁷² En cualquier caso, el proceso global será lento y dirigido por la movilidad de los intermedios propuestos.

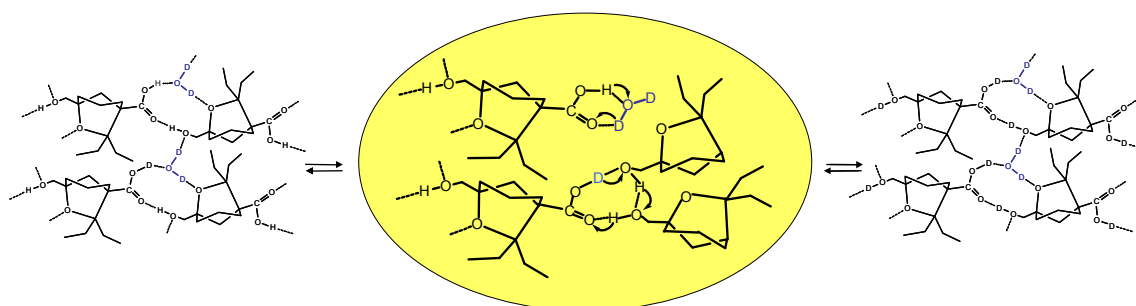


Figura 16. Posible intercambio simultáneo $\text{COOH}/\text{D}_2\text{O}$ y COOD/ROH .

La viabilidad de esta propuesta se sustenta en la posibilidad de que las moléculas de agua se puedan intercambiar y crear situaciones vacantes sin que ello afecte a la estructura del cristal. Los resultados obtenidos de deshidratación, tanto de datos de termogravimetría como de calorimetría diferencial de barrido, muestran una única dinámica para los dos tipos

aparentes de agua;⁷¹ sin embargo, no ha sido posible hasta la fecha eliminar el agua sin la consecuente destrucción del poro.

Con el fin de estudiar el efecto que la eliminación parcial de las moléculas de agua tiene en la estructura del poro, muestras recién cristalizadas de los compuestos $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (que forma el poro más ancho) y $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (que forma el poro más estrecho) se sometieron a estudios paralelos de análisis termogravimétricos (TGA) y medidas de difracción de rayos-X en polvo (VT-PXRD) a temperatura variable.

En la primera serie de experimentos de VT-PXRD, la temperatura se incrementó desde 30 °C hasta 150 °C, a una velocidad de 1 °C/min. Los resultados indican claramente que los sólidos permanecen cristalinos hasta cerca de 100 °C (Figura 17). Bajo estas condiciones se observó una transición de fase cuando $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ alcanzó una temperatura entre 65 °C y 70 °C.

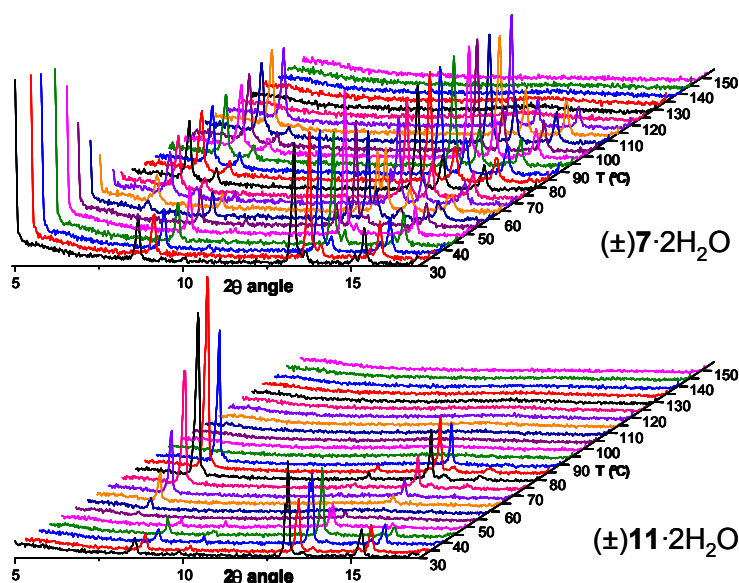


Figura 17. Difractogramas de VT-PXRD correspondientes a los patrones de difracción de los compuestos $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (superior) y $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (inferior), obtenidos en el rango de temperaturas 30 °C a 150 °C a una velocidad de 1 °C/min.

Esta nueva fase permanece hasta una temperatura cercana a 120 °C, después de la cual la muestra descompone. El difractograma VT-PXRD de la estructura $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, muestra un transición de fase análoga pero que ocurre a una temperatura inferior, en el rango 50 °C a 55 °C. También esta nueva fase cristalina se mantiene hasta una temperatura más baja, ~90 °C. En el rango 50-55 °C, la estructura $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ muestra una pérdida casi total de

cristalinidad, situación más difícil de observar en el experimento sobre $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ (Figura 17, superior). Esta transición de fase, que ocurre en ambos compuestos, probablemente se corresponde a una reorganización irreversible en la estructura de los poros.

La deshidratación de ambas estructuras se estudió por análisis termogravimétrico a una velocidad de incremento de la temperatura de 1 °C/min (Figura 18). La pérdida de agua desde $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ ocurre en dos pasos bien definidos: el primero entre aproximadamente 28 °C y 48 °C, y el segundo inmediatamente después, entre 50 °C y 85 °C. La pérdida de peso asociada a cada paso es, respectivamente, de 4.3% y 8.0%, lo que en total está de acuerdo con el valor teórico de 12.9% que corresponde a la pérdida total del agua de la muestra.

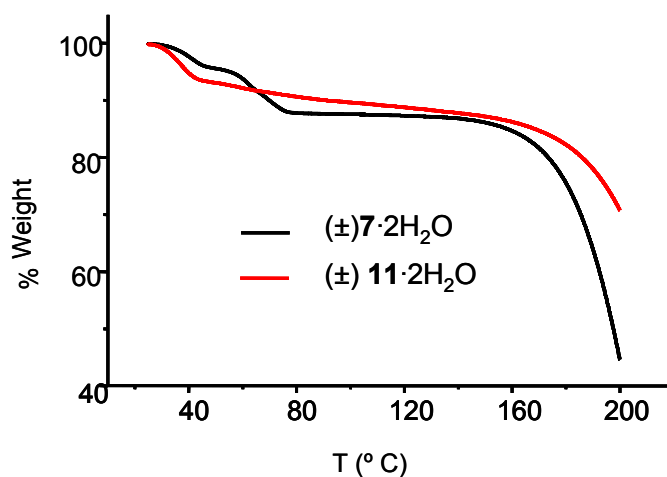


Figura 18. Curvas de TGA de $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ (en trazo negro) y $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ (en trazo rojo), obtenidos calentando las muestras a 1 °C/min.

Los resultados obtenidos en TGA y VT-PXRD para la estructura $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ permiten llegar a las conclusiones siguientes: La estructura del poro se mantiene hasta un cierto grado de deshidratación. La coincidencia entre el cambio de fase y la pérdida de agua hace pensar en un cambio en la estructura cristalina de hidratada a anhidra.

El análisis de la curva de TGA para el compuesto $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ revela un paso de deshidratación inicial entre aproximadamente 28 °C y 54 °C que corresponde con una pérdida de 6.9% de agua. El agua continúa perdiéndose hasta que se inicia el proceso de descomposición. Una pérdida de 4.4% se calcula entre 55

°C y 125 °C, lo que resulta una pérdida total del 11.9% que equivale al calculado teórico. La conclusión a que se llega es similar a la que se obtiene para $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; esto es, que la estructura de $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ permanece estable hasta cierto grado de deshidratación. En esta muestra, sin embargo, no parece tan claro que la fase de transición conduzca a una estructura completamente anhidra, ya que aparentemente colapsa a 90 °C, antes de que la totalidad del agua se haya eliminado.

Estos resultados iniciales permitieron diseñar nuevos experimentos con el propósito de contestar a las cuestiones siguientes: ¿Es posible mantener la estructura inicial del poro intacta después de la deshidratación total o parcial de agua, a pesar de que estas estructuras se forman por la incorporación de agua?; ¿Se pierde el agua en ambas muestras con la misma facilidad?; ¿Es posible eliminar cierta cantidad de agua y rehidratar la muestra con posterioridad? Como quiera que a la transición de fase se llega aumentando la temperatura de forma uniforme, los difractogramas siguientes se hicieron manteniendo ciertas temperaturas fijas durante algún tiempo.

Las medidas de TGA de $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se hicieron aumentando la temperatura a 1 °C/min, manteniendo la temperatura constante a 40 °C y a 65 °C durante media hora cada vez. En el caso de la muestra $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se sigue el mismo protocolo pero las temperaturas se mantuvieron constantes a 35 °C y 45 °C (Figura 19). En ambas muestras, la primera temperatura que se mantiene constante se corresponde con la estructura inicial de los poros y, en estas condiciones, se observa que se puede evacuar aproximadamente la mitad del agua presente en $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y cerca de dos tercios del agua presente en $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

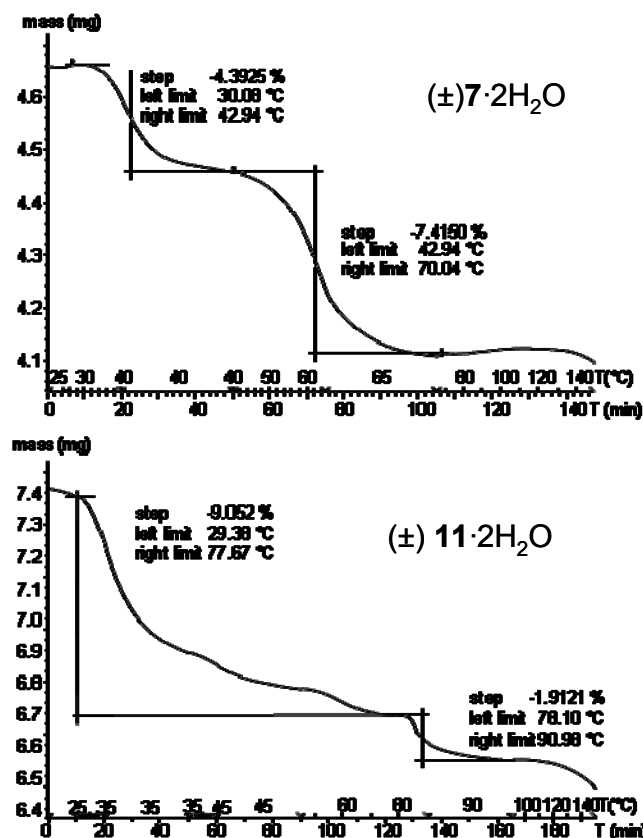


Figura 19. Curvas TGA obtenidas para $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ (superior) y $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ (inferior), mostrando las pérdidas de agua a temperaturas fijas.

La deshidratación en $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ coincide con la que se observa para este compuesto en los difractogramas VT-PXRD, aunque los dos pasos consecutivos de deshidratación se corresponden con temperaturas un poco más bajas (Figura 19, superior). En cambio, la pérdida de masa en $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ no ocurre según pasos discretos sino de forma continuada. Aún cuando el mayor porcentaje de agua se elimina entre 25 y 35 °C, la deshidratación completa no ocurre hasta que se llega a los 90 °C. Estos resultados confirman que, efectivamente, la estructura inicial del poro se mantiene durante parte de la deshidratación en un caso y hasta la pérdida de la mayoría del agua en el otro. Con el fin de comprobar que el compuesto $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ pierde gran parte del contenido de su agua a una temperatura muy próxima a la de ambiente, se hizo seguimiento de la pérdida de agua por TGA manteniendo la temperatura constante a 30 °C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo la temperatura se fue elevando lentamente hasta 140 °C a una velocidad de 1 °C/min. Bajo estas condiciones la muestra $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ pierde más del 80% del agua. Sin

embargo, la deshidratación completa no ocurre hasta que la temperatura alcanza casi los 100 °C (Figura 20).

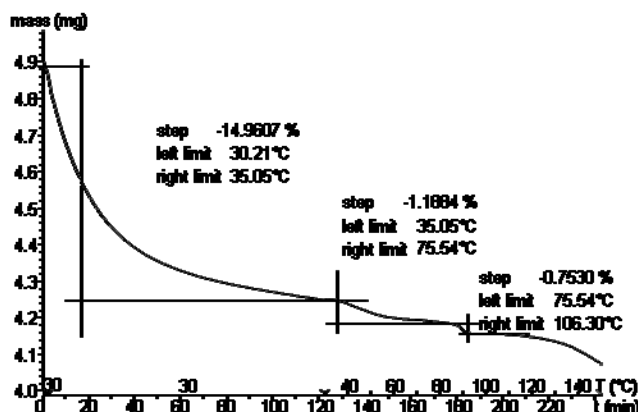


Figura 20. Curva de TGA obtenida para el compuesto $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ en el que se muestra la eliminación suave del agua (~80% del contenido total) manteniendo la temperatura a 30 °C durante 2 horas.

En el caso de $(\pm)7 \cdot 2H_2O$, la deshidratación total ocurre a una temperatura bastante inferior, cerca de 65 °C, lo que coincide con la temperatura en la que la transición de fase tiene lugar según los difractogramas de VT-PXRD (Figura 15). La diferencia de temperatura entre la deshidratación de uno y otro poro es aproximadamente de 30 °C, lo que se puede atribuir a que la atracción entre el agua y la superficie es mayor en el poro que forma la molécula **11**, es decir el de menor diámetro.

Los experimentos de VT-PXRD descritos no repiten las condiciones de cambios de temperatura que se describen en los estudios de TGA, por lo que se adquirieron una nueva serie de difractogramas con nuevas muestras donde estas condiciones se repiten con exactitud. En el caso de $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ la temperatura se mantuvo constante a 45 °C y 65 °C y se incrementó con posterioridad a una velocidad de 1°C/min, hasta alcanzar la temperatura de descomposición de las muestras. En el caso de $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ la temperatura se mantuvo constante a 30 °C durante 2 horas, seguido de un incremento de temperatura a la velocidad de 1 °C/min hasta descomposición de la muestra (Figura 21).

La transición de fase ocurre en ambas muestras en el mismo rango de temperaturas que anteriormente, aunque la descomposición térmica de las mismas ocurre a temperaturas ligeramente inferiores. Estos resultados

conducen a dos importantes conclusiones: la transición de fase es independiente de la cantidad de agua presente en el poro y probable como consecuencia de esto, la estructura inicial es estable hasta situaciones que están muy próximas a la completa deshidratación. Esta conclusión se puede ver de forma muy clara en el caso de la última serie de experimentos que hemos hecho para el poro de estructura $(\pm)11 \cdot 2H_2O$.

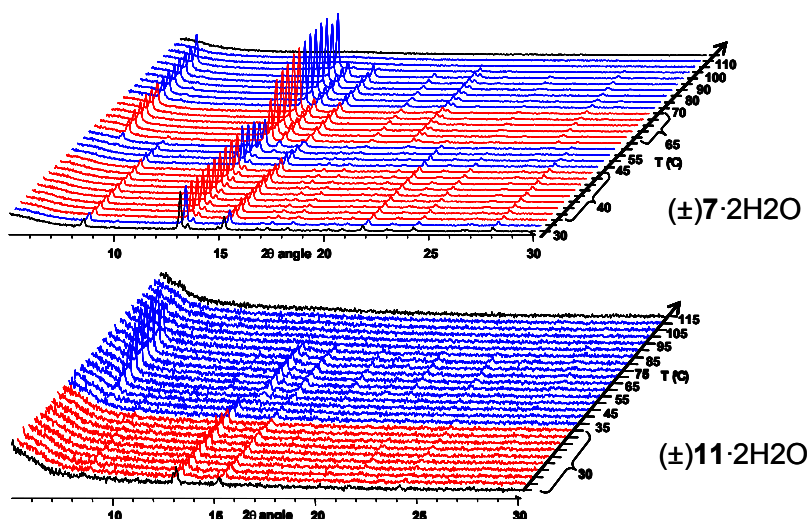


Figura 21. Patrones de difracción VT-PXRD de $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ (arriba) y $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ (abajo), obtenidos por incremento de la temperatura desde 30 °C hasta 150 °C; en negro, los espectros de difracción iniciales y finales a 30 °C y 150 °C, respectivamente; en azul, espectros obtenidos en intervalos de 5 °C con aumento de la temperatura a una velocidad de calentamiento de 1°C/min.; en rojo, datos obtenidos a temperaturas constantes de 40 °C y 65 °C en $(\pm)7 \cdot 2H_2O$ (arriba) y a 30 °C en $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ (abajo).

Aunque resulte inevitable al hablar de las distintas estructuras de agregados moleculares de agua, referirnos a ellos como próximos a estados “sólido”, “líquido” o “vapor” según sea la dinámica que se observe, es necesario tener en mente que grupos pequeños de moléculas de agua no exhiben transiciones de fase de primer orden como congelación, fusión o vaporización, al ser estos conceptos sólo aplicables al mundo macroscópico.

Quizás la conclusión experimental más importante que hemos conseguido es que la estructura inicial de ambos cristales que forman poros de diámetros distintos, se mantiene durante los procesos de deshidratación parcial. Estos resultados implican que las características de las superficies internas de los poros permanecen inalteradas, lo que permite estudiar el efecto de la

temperatura sobre el fenómeno de deshidratación de forma independiente de otros posibles parámetros.

Aproximadamente la mitad de las moléculas de agua pueden evacuarse del poro cuando la temperatura se fija en 40 °C durante 40 min (ver Figura 22, B). No ocurre la rehidratación por exposición durante 24 horas de la muestra parcialmente deshidratada en atmósfera húmeda y sólo tiene lugar, en un posterior experimento de TGA, la eliminación del agua que no lo había sido con anterioridad (Figura 22, C).

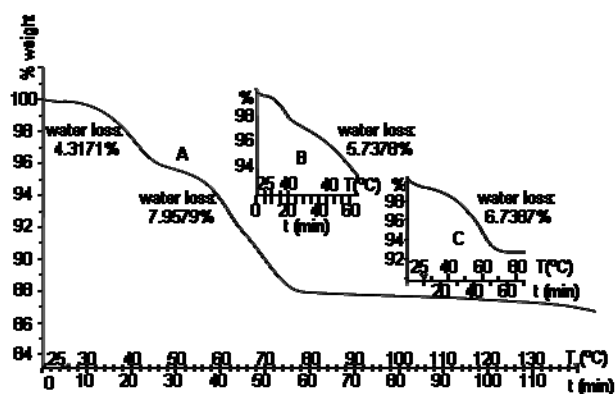


Figura 22. Superposición de espectros de TGA correspondientes al poro (\pm) $7 \cdot 2H_2O$. (A): Experimento idéntico al descrito en la Figura 15 para este compuesto. (B): Experimento de deshidratación parcial con pérdida del 5.74% del agua. (C): Experimento de deshidratación total de la muestra usada en B y que previamente se colocó en atmósfera húmeda por más de 24 horas a temperatura ambiente. El porcentaje de pérdida de agua fue de 6.74%. El total de B y C (12.48%) es equivalente al total que ocurre en A (12.28%), lo que demuestra que la muestra no se rehidrata.

Esta observación demuestra que el comportamiento cooperativo de las moléculas de agua atrapadas en el poro es crucial en el proceso de hidratación, y que su ausencia da lugar a un sistema que es esencialmente hidrofóbico. Estos resultados, no sólo muestran los diferentes papeles que juegan los dos tipos de moléculas, sino la necesidad de que exista, al menos, una concentración mínima de agua moviéndose en el interior del poro para que este se comporte como hidrofílico. Finalmente, nuestro modelo abre la puerta a la planificación de otros experimentos donde investigar sobre los principios químico-físicos que hacen que el agua sea tan especial en la comprensión de los fenómenos químico/biológicos.¹⁰⁷

¹⁰⁷ T. Ohba, H. Kanoh, K. Kaneko, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4890-4894.

1.5 Conclusiones.

Existen cada vez más evidencias acerca de que las moléculas de agua pueden ocupar de forma permanente entornos no polares.¹⁰⁸ En este trabajo damos apoyo experimental a esta idea, al tiempo que comprobamos que la hidrofobia de la superficie interna de un poro, al igual que la hidrofília, no es una propiedad absoluta que se pueda valorar de forma independiente, sino que se relaciona con la estructura del agua que la ocupa. En un poro hidrofílico, el equilibrio reversible entre hidratación-deshidratación depende de las energías de interacción de las moléculas de agua entre sí y con la superficie que las contiene, lo que en termodinámica se explica en términos del principio de compensación entalpía/entropía.¹⁰⁹ Así pues, la capacidad del agua de "mojar" una superficie está relacionada con el tamaño de la cavidad y con la capacidad de las moléculas de agua de interactuar con la superficie.¹¹⁰ Bajo ciertas condiciones, por ejemplo con el cambio de temperatura, el equilibrio se puede romper y el poro se puede "secar"; esto es, la eliminación total o parcial de manera irreversible del agua del interior, lo que significa en termodinámica clásica que el agua deja de "mojar" la superficie interna del poro y éste se convierte en hidrofóbico. Explicar las diferencias en la temperatura de deshidratación exhibidos por los poros de estructuras $(\pm)7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $(\pm)11 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, hace necesario conocer la estructura del agua en cada momento, lo que significa saber los detalles íntimos sobre la dinámica de las interacciones de las moléculas de agua entre sí y con la superficie que las rodea.¹¹¹ Sin entrar en esos detalles si podemos afirmar que el poro de diámetro menor es "más hidrofílico" que el de diámetro mayor, lo que se manifiesta en la mayor dificultad de eliminar el agua de su interior. Esta conclusión está en consonancia con otras diferencias estudiadas en anterioridad, como es la menor movilidad del agua, mayor "estructuración", a medida que el diámetro del poro disminuye.⁷¹

¹⁰⁸ N. Giovambattista, P.G. Debenedetti, P.J. Rossky, *J. Phys. Chem. C*, **2007**, *111*, 1323-1332.

¹⁰⁹ D.H. Leung, R.G. Bergman, K.N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2798-2805.

¹¹⁰ P. Ball, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 74-108.

¹¹¹ S. Vaitheeswaran, H. Yin, J.C. Rasaiah, G. Hummer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 17002-17005.

Desde el punto de vista de los intermedios propuestos para el intercambio de hidrógenos lábiles (H/D), el hecho de que el agua pueda dejar vacantes sin que por ello se altere la estructura del poro, resulta también ser una confirmación experimental de que tales intermedios existen y que son causa de los equilibrios lentos que ocurren entre los dos tipos de agua.

Capítulo 2
Efecto del agua en la formación de estructuras cristalinas tubulares.

2.1 Introducción.

Desde hace algunos años, nuestro grupo de investigación trabaja en la idea de que una organización cristalina sustentada por enlaces por puentes de hidrógeno, puede servir de modelo donde investigar el fenómeno biológico del transporte.¹¹² Puede demostrarse, en estos modelos, que las moléculas de agua ocupan los poros de manera permanente y que se puede obtener mayor grado de hidratación sin alterar por ello el patrón de enlaces por puentes de hidrógeno y, por tanto, sin desestabilizar la estructura del poro que las habilita.⁷¹

El diseño sintético seguido para la construcción de los modelos se esquematiza en la Figura 23, donde se interpreta la formación de los poros naturales como una consecuencia termodinámica susceptible de ser modelizada en la interfase agua/disolvente no-polar siguiendo un plan de ordenamiento molecular preconcebido.¹¹³

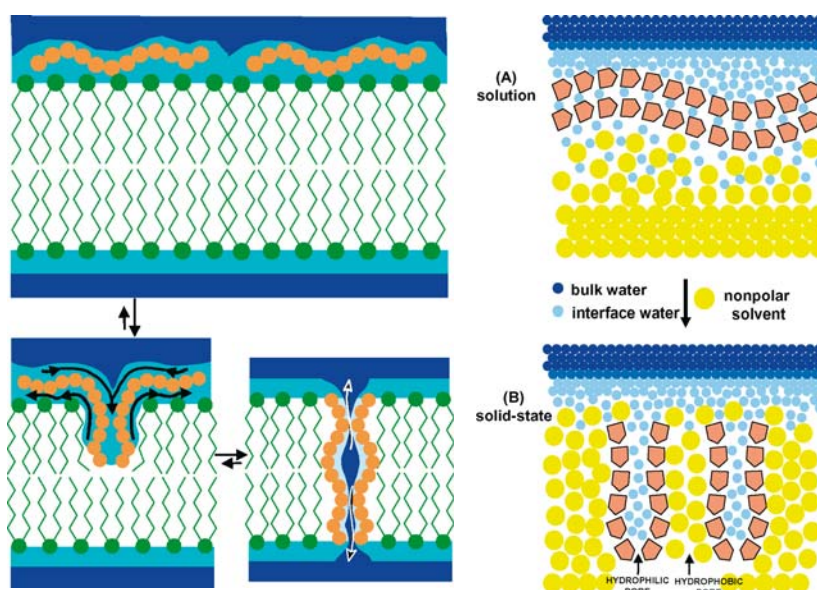
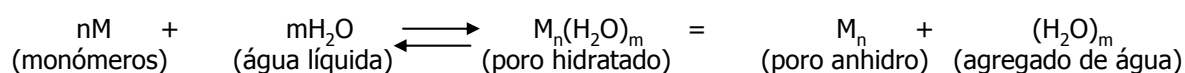


Figura 23. (Izquierda) Representación esquemática de la formación de un poro natural. La incorporación de la proteína en la membrana es causa del favorable efecto hidrofóbico que estabiliza las interacciones entre los lípidos de la membrana y la proteína, así como el resultado de hidratación hidrofóbica en el compacto proteínico. (Derecha) La organización en la interfase de moléculas anfifílicas conduce a cadenas que, cuando cumplen los requerimientos estructurales necesarios, se pliegan cumpliendo los mismos principios termodinámicos que conduce a la organización de los poros naturales.¹¹³

¹¹² N. Pérez-Hernández, C. Pérez, M.L. Rodríguez, C. Foces-Foces, P.M. Tolstoy, H.H. Limbach, E.Q. Morales, R. Pérez, J.D. Martín, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1305-1314.

¹¹³ N. Pérez-Hernández, M. V. Roux, M. Febles, E.Q. Morales, C. Pérez, D. Fort, J.D. Martín, *Z. Phys. Chem.* **2008**, *222*, 1105-1116.

Resultado de estos estudios es el conjunto de poros hidrofílicos que forman las moléculas **7-12** relacionadas en la Tabla 1 del capítulo anterior, donde la superestructura molecular del poro se sostiene en una relación estequiométrica entre las moléculas orgánicas y las de agua igual para todos ellos (Ec. 1). Esta ecuación representa, formalmente, un método general de síntesis de agrupamientos moleculares que se auto-ensamblan siguiendo una información concreta que se modula en disolución; esto es, antes que la nucleación a sólido tenga lugar. El resultado experimental se puede valorar también, como la síntesis de agrupaciones moleculares de agua a partir de agua líquida. Aunque estas dos conclusiones se pueden estudiar de forma independiente, se ha visto, y el capítulo anterior es un ejemplo, que las moléculas orgánicas y el agua forman un todo y son, en su conjunto, la respuesta a los requerimientos químico-físicos de la consecuencia termodinámica de compensación entalpía/entropía que hace operativa esta ecuación.



Ecuación 1

La Ec. 1 es general y no se circunscribe sólo al modelo objeto de nuestro estudio. Puede ser la simplificación de un proceso biológico, por ejemplo, el plegamiento de una enzima o el reconocimiento entre biomoléculas. En estos casos, no se puede tampoco cometer el error de explicar el resultado analizando el comportamiento del material orgánico de forma independiente del agua que lo causa. Las agrupaciones de biomoléculas son datos de biología estructural que resultan incapaces, por si solos, de explicar las causas que dieron lugar a tales agrupamientos. Hemos publicado un modelo de síntesis de poros basados en estos conceptos.¹¹³

Una ventaja interesante de nuestros modelos es que, con independencia de cuál sea el monómero que estructure el poro, la relación monómero/agua es la misma y en la serie de estructuras $(\pm)\mathbf{7}\cdot 2H_2O$ - $(\pm)\mathbf{12}\cdot 2H_2O$, esta relación es 1/2, siempre que nos situemos entre los parámetros que limitan el equilibrio representado en la ecuación anterior. Puesto que el número de moléculas de agua es idéntico en todos los poros y los diámetros de los mismo son distintos,

la estructura del agua confinada difiere de un poro a otro y la dinámica que relaciona las interacciones de las moléculas de agua entre sí y con las paredes de poro, también es diferente.

Se calcula que el número promedio de enlaces por puentes de hidrógeno de las moléculas de agua con sus vecinas en agua líquida a 25 °C es de 3.5.¹¹⁰ Estos enlaces están continuamente sometidos a procesos de ruptura y formación de otros nuevos, en una escala de tiempo que se mide en subpicosegundos. El movimiento promedio asociado a los reagrupamientos de los enlaces de moléculas en agua líquida se calcula entre 0.1-10 ps.¹¹⁴ Cuando las moléculas de agua entran en contacto con macromoléculas tales como las proteínas, el movimiento de las moléculas de agua se ralentiza en más de un orden de magnitud con respecto al que ocurre en agua líquida.¹¹⁵ Un caso similar ha de ocurrir en nuestros poros ya que la dinámica del agua contenida en cada uno de ellos depende de las interacciones de las moléculas de agua entre sí y con la superficie interna de cada poro,¹¹⁶ por lo que podrían evaluarse, en el infrarrojo-lejano, de forma análoga a como se hace el estudio de la dinámica de moléculas de agua en proteínas.^{117,118,119,120} La comprobación experimental de las diferentes dinámicas que ocurren en los poros sintetizados, es el antecedente de la investigación que recopilamos para este capítulo relativo, al efecto director que tiene el agua en la construcción de estructuras en estado sólido y de la enorme influencia que tienen las estructuras locales del agua en el desarrollo de las distintas superestructuras que se sintetizan.

¹¹⁴ I. Ohmine, S. Saito, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 741-749.

¹¹⁵ S. K. Pal, J. Peon, B. Bagchi, A. H. Zewail, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 12376-12395.

¹¹⁶ K. Schröck, F. Schröder, M. Heyden, R. A. Fischer, M. Havenith, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2008**, *10*, 4732-4739.

¹¹⁷ B. Born, S. J. Kim, S. Ebbinghaus, M. Gruebele, M. Havenith, *Faraday Discuss.*, **2009**, *141*, 161-173.

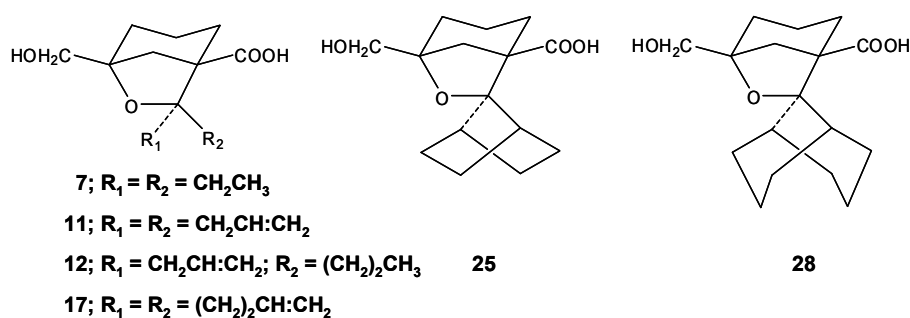
¹¹⁸ S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, M. Gruebele, D. M. Leitner, M. Havenith, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2374-2375.

¹¹⁹ U. Heugen, G. Schwaab, E. Bruendermann, M. Heyden, X. Yu, D. M. Leitner, M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2006**, *103*, 12301-12306.

¹²⁰ S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, U. Heugen, M. Gruebele, D. M. Leitner, M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, *104*, 20749-20752.

2.2 Antecedentes y objetivos.

En un estudio precedente, cuyos resultados han sido objeto de una reciente publicación,¹²¹ se comparan las absorciones en el infrarrojo lejano (FIR) de los dos poros hidratados de menor diámetro, (\pm)**11**·2H₂O y (\pm)**12**·2H₂O (4.2-6.5 Å), y el de diámetro mayor (\pm)**7**·2H₂O (5.9-9.4 Å), con una estructura que aunque hidratada no forma poro (\pm)**28**·1/2H₂O y las estructuras anhidras (\pm)**17** y (\pm)**25** (Esquema 3).



Esquema 3. Selección de moléculas de las Tablas 1 y 2 utilizadas en este estudio.

La Figura 24 (superior) compara los espectros de transmisión de FIR en la región entre 50 y 670 cm⁻¹ de las estructuras formadas por los poros (\pm)**7**·2H₂O, (\pm)**11**·2H₂O y (\pm)**12**·2H₂O con la anhidra (\pm)**17**. Por debajo de los 400 cm⁻¹ las estructuras hidratadas que forman poros, en promedio absorben más que la estructura anhidra pero no con diferencias tan notables como para sostener un estudio diferenciador claro. Entre las hidratadas, las que exhiben un mayor confinamiento del agua (poros de diámetro más pequeño) absorben más que la que dispone de más espacio en el interior del poro (poro de mayor diámetro). Estas observaciones están muy de acuerdo con estudios publicados¹¹⁹ en espectroscopia THz, que demuestran que el agua que solvata a la molécula de lactosa tiene un coeficiente de absorción mayor que el agua líquida, en el rango de frecuencias entre 75 y 90 cm⁻¹. El mismo efecto se observa también en el agua de solvatación de proteínas.^{117,120} El agua de hidratación restringe su dinámica de forma igual que los agregados de agua que se mueven en los poros más estrechos. En la región entre 400 y 570 cm⁻¹,

¹²¹ N. Pérez-Hernández, T.Q. Luong, C. Pérez, J.D. Martín, M. Havenith, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*, 6928-6932.

hay una notable diferencia entre los poros hidratados y la estructura anhidra. Los primeros absorben aproximadamente un 16-24% más que el último. Además, si se compara el espectro de $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ con los de estructuras que no forman poro, $(\pm)17$, $(\pm)25$ y $28 \cdot 1/2H_2O$, se ve también que la absorción de estos últimos es sensiblemente menor que la del poro hidratado $(\pm)11 \cdot 2H_2O$ (Figura 24, inferior). Esto indica y sin lugar a dudas, que la mayor absorbanza de éste en la región entre 400 y 570 cm^{-1} es debida al agua de solvatación que se encuentra en el interior de los poros.

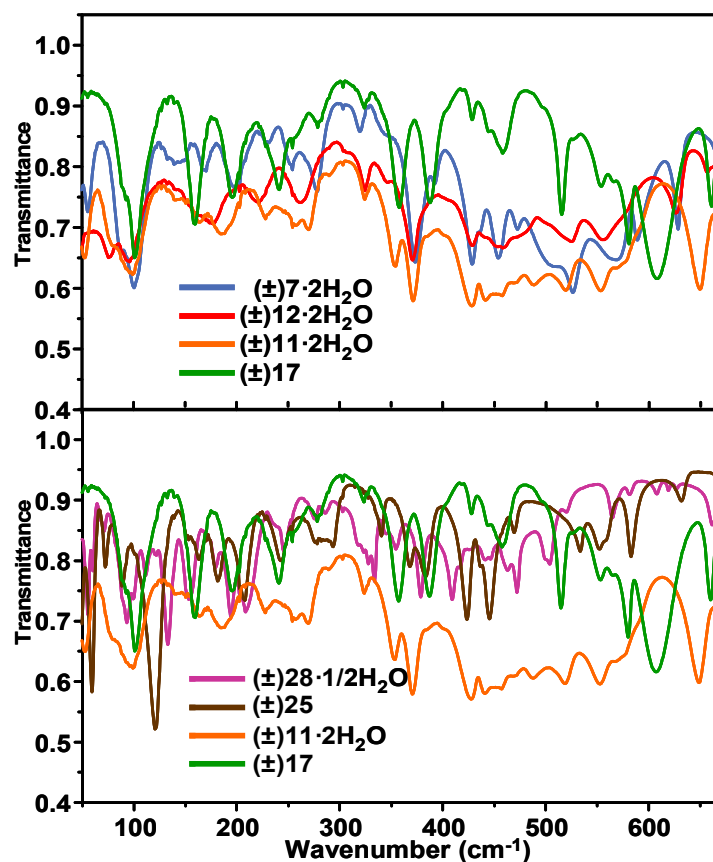


Figura 24. Espectros de transmisión FIR, Terahertzios (THz), entre $50\text{-}670 \text{ cm}^{-1} \sim 1.5\text{-}20.3 \text{ THz}$, donde se comparan: (espectro superior) tres poros hidratados y una estructura anhidra y (espectro inferior) un poro hidratado y tres estructuras, una de ellas hidratada, que no forman poros.

La Figura 25 compara los espectros de absorción medidos en FIR de los seis compuestos utilizados en este trabajo.¹²¹ Los espectros de todos ellos exhiben absorbanza relativamente pequeña, salvo en la región $400\text{-}570 \text{ cm}^{-1}$, donde los que forman poros hidratados tienen una absorbanza significativamente mayor que el resto.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con los del agua y el hielo, se midieron las absorbancias del hielo (a -5°C) y del agua líquida a diferentes temperaturas en el mismo rango de frecuencias. Los resultados se muestran en la Figura 26. La absorbancia del hielo muestra su característico máximo de absorción a 200 cm^{-1} y un amplio mínimo entre 300 y 500 cm^{-1} . En frecuencias por encima de 500 cm^{-1} ocurre un incremento muy rápido en la absorción del hielo. Las gráficas mostradas en la Figura 26 coinciden con las publicadas¹²² para el espectro de absorción del hielo a 100 K en el mismo rango de frecuencias. La absorbancia del agua líquida muestra un pequeño máximo a 150 cm^{-1} acompañado de un amplio máximo en el rango 400 y 570 cm^{-1} . Una simulación del espectro de absorción FIR¹²³ y datos experimentales usando espectroscopía de transmisión¹²⁴ predicen similares valores de absorbancia para el rango en estudio.

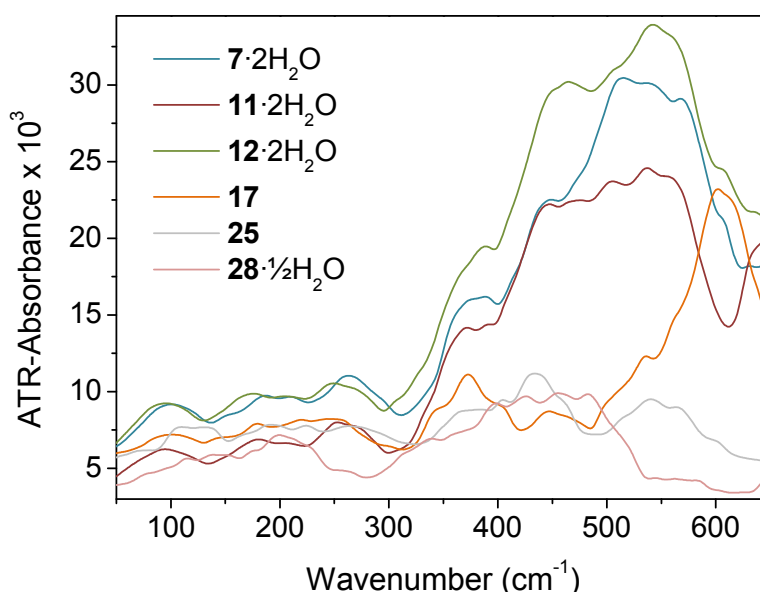


Figura 25. Espectros de absorción a 20°C , en la región FIR comprendida entre 50 y 650 cm^{-1} , de todos los compuestos utilizados en este estudio.

¹²² J. E. Bertie, H. J. Labbe, E. J. Whalley, *J. Chem. Phys.*, **1969**, *50*, 4501-4520.

¹²³ J. T. Kindt, C. A. Schmuttenmaer, *J. Chem. Phys.*, **1997**, *106*, 4389-4400.

¹²⁴ C. Robertson, B. Curnutte, D. Williams, *Mol. Phys.*, **1973**, *26*, 183-191.

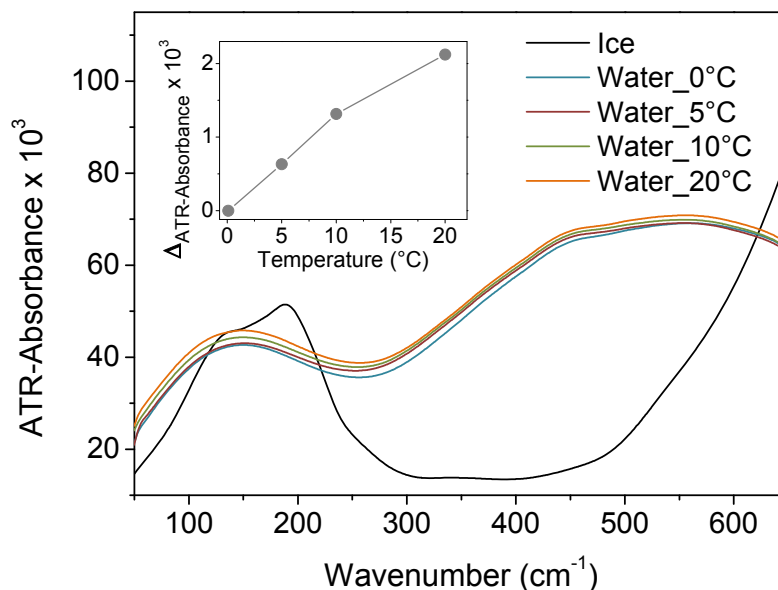


Figura 26. Espectro que mide la absorbancia del hielo y la dependencia del agua líquida con la temperatura en el rango de temperaturas 0 a 20 °C. Se resalta, dentro de la figura, el cambio de absorbancia para el agua líquida en el rango 400 a 570 cm^{-1} a distintas temperaturas (0, 5, 10, 20 °C), comparada con la correspondiente a 0 °C. La absorbancia del agua líquida crece de forma casi lineal cuando la temperatura se incrementa.

Una comparación con las medidas obtenidas en nuestros poros, demuestra que la causa de la absorbancia que se observa, en el rango de frecuencias referido, es debida al agua que se encuentra atrapada en los poros. Además, tal y como se muestra en la gráfica que se incluye en el interior de la Figura 26, la absorbancia del agua líquida aumenta cuando lo hace la temperatura, de acuerdo con datos experimentales previos que se obtienen haciendo medidas de transmisión.¹²⁵ El incremento es prácticamente lineal y del orden 1.1×10^{-4} por cada grado centígrado.

Con el fin de comparar las similitudes y diferencias del agua confinada en los poros con el agua líquida, se midieron en el mismo rango de temperaturas, entre -5 °C y 20 °C, los espectros de las seis estructuras del estudio. La Figura 27 muestra los espectros del poro hidratado (\pm)**11**·2H₂O y el compuesto anhidro(\pm)**17**. Las estructuras, a pesar de que las moléculas son similares tienen un comportamiento muy diferente. Mientras que la absorbancia del compuesto anhidro (\pm)**17** no cambia con la temperatura (Figura 27, inferior), la absorbancia del compuesto (\pm)**11**·2H₂O aumenta de forma constante con la

¹²⁵ H. R. Zelsmann, *J. Mol. Struct.*, **1995**, 350, 95-114.

temperatura, especialmente en el rango de frecuencias entre 400 y 570 cm^{-1} , exactamente lo mismo que en el agua líquida.

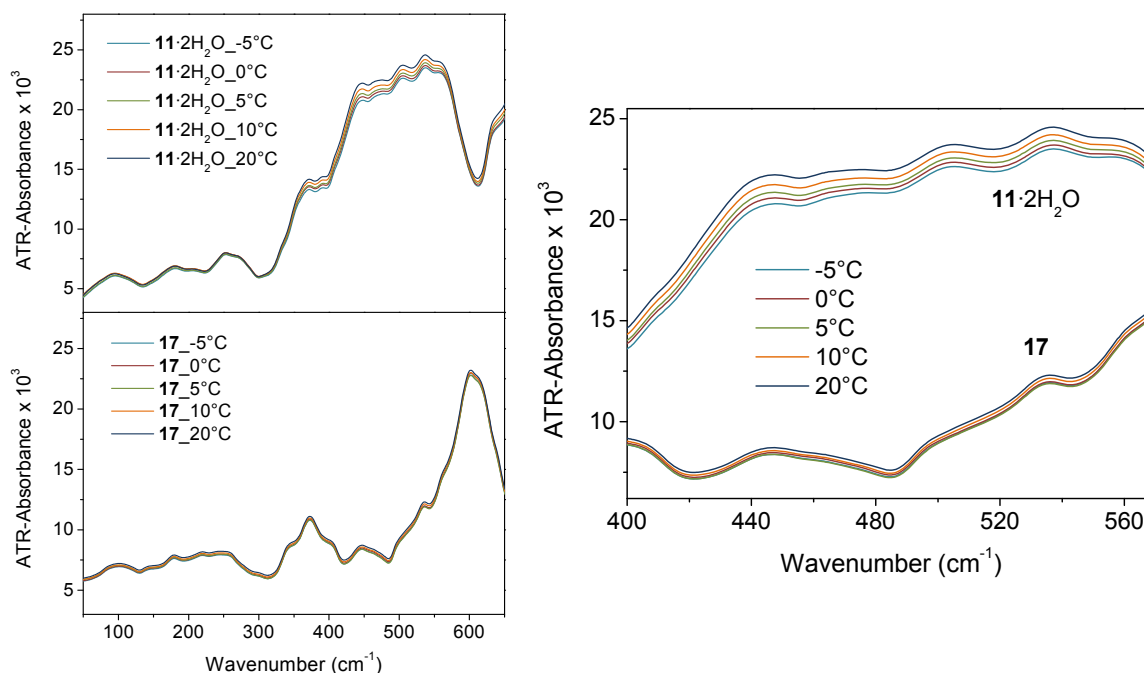


Figura 27. (Izquierda) Dependencia del espectro de absorción del hidrato (\pm)**11**· $2\text{H}_2\text{O}$ con la temperatura, en el rango entre $-5\text{ }^\circ\text{C}$ y $20\text{ }^\circ\text{C}$ (espectro superior), y un estudio equivalente para la estructura anhidra no porosa (\pm)**17** (espectro inferior). Se observa, para la estructura hidratada, un incremento característico similar al encontrado para el agua en el rango de frecuencias entre 400 y 570 cm^{-1} . Mientras que la absorbancia en (\pm)**11**· $2\text{H}_2\text{O}$ se incrementa de manera uniforme con la temperatura, el compuesto (\pm)**17** se mantiene independiente de los cambios de temperatura en el rango estudiado. (Derecha) Ampliación de los espectros en la zona de frecuencias: 400 - 570 cm^{-1} .

Esta observación es un fenómeno general que ocurre en todos los modelos que se estudiaron; esto es, independencia de la absorbancia con la temperatura en los compuestos que no mantienen estructura porosa y dependencia de la absorbancia con la temperatura cuando la estructura es de poro hidratado. Estos resultados reafirman la asignación hecha de que la absorbancia en el rango 400-570 cm^{-1} se debe al agua enclaustrada.

La Figura 28 muestra un estudio comparativo entre los compuestos (\pm)**7**· $2\text{H}_2\text{O}$, (\pm)**11**· $2\text{H}_2\text{O}$ y (\pm)**17** con el agua líquida, en el rango de frecuencias entre 400 y 570 cm^{-1} . El cambio en absorbancia del poro (\pm)**7**· $2\text{H}_2\text{O}$ (de diámetro 5.9-9.4 Å) es muy similar al que se observa para el agua líquida. El cambio es también mayor al observado para (\pm)**11**· $2\text{H}_2\text{O}$ (de diámetro 4.2-6.5 Å). Esta

observación no es particular para estas dos estructuras, sino que se observa de forma general el mismo efecto en todas las muestras estudiadas.

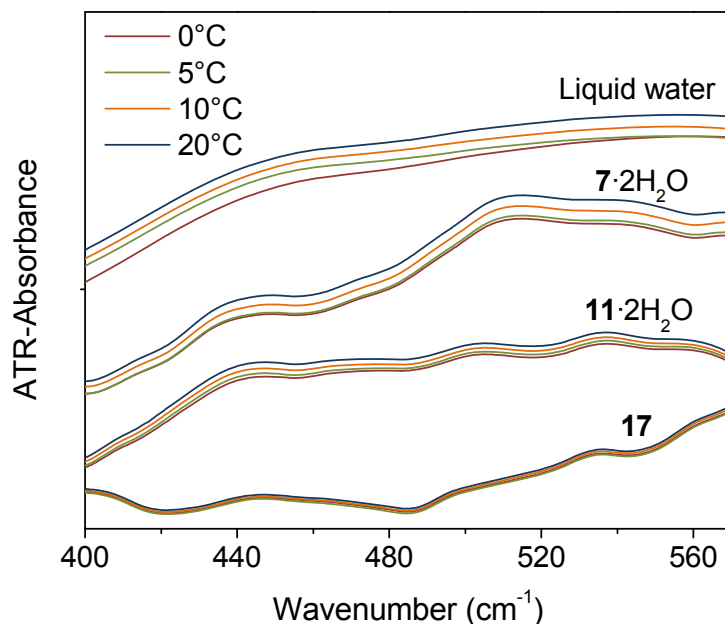


Figura 28. Comparación con el agua líquida de la variación de la absorbancia con la temperatura de los compuestos con estructura de poros hidratados, (\pm) $7 \cdot 2H_2O$ y (\pm) $11 \cdot 2H_2O$, y la estructura anhidra (\pm) 17 . El estudio demuestra que cuanto menor es el confinamiento del agua, poro de diámetro más largo, mayor es el parecido con el agua líquida de la ganancia en absorbancia con la temperatura.

Esta investigación permite hacer, de manera experimental, una valoración cualitativa de la dinámica del agua y su dependencia con el diámetro del poro. Demuestra también la sensibilidad de la espectroscopía FIR como metodología para medir agua en el interior de estructuras a nivel de sub-nanoporos.

La conclusión de este estudio experimental se resume en las gráficas que se muestran en la Figura 29, donde se comparan las variaciones de la absorbancia con la temperatura en todos los modelos elegidos para el estudio. En el caso de (\pm) $7 \cdot 2H_2O$ se obtiene un incremento lineal aproximado a 1.0×10^{-4} por $1^\circ C$. Es muy similar al que se obtiene para el agua líquida. Cuando los poros son más estrechos, (\pm) $11 \cdot 2H_2O$ y (\pm) $12 \cdot 2H_2O$, el incremento en absorbancia que exhiben es menor. Las moléculas de agua en estos poros mantienen una "dinámica" superior a la de las moléculas de agua en el hielo, pero inferior a la del agua líquida y a la contenida en el poro (\pm) $7 \cdot 2H_2O$. Por tanto, su absorbancia es menos dependiente de la temperatura que la del agua líquida.

Aquí la "dinámica" se refiere a la absorción en espectroscopia THz, lo que está ligado a la dinámica de solvatación.

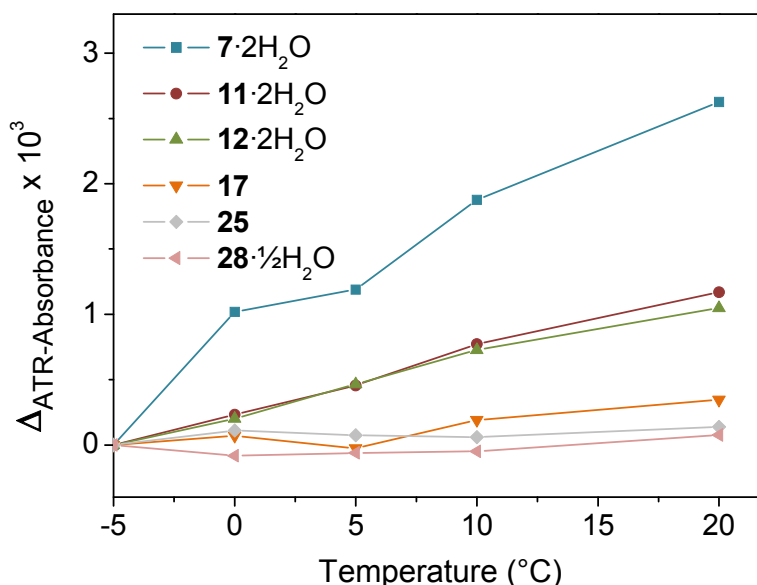
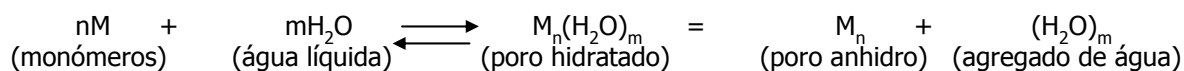


Figura 29. Cambios en la absorción comparada con la observada a -5 °C, en el rango de frecuencias entre 400 y 570 cm⁻¹. Para la estructura que no forma poro, aunque hidratada, (±)28·1/2H₂O, y los compuestos anhidros (±)17 y (±)25, la absorción es independiente de la temperatura. Los poros hidratados (±)11·2H₂O y (±)12·2H₂O, observan un incremento lineal con la temperatura. El incremento en absorción en el poro hidratado (±)7·2H₂O es el mayor de todos, similar al del agua líquida y casi el doble de sus homólogos de menor diámetro.

El espectro de absorción en THz está relacionado con las fluctuaciones rápidas de los momentos dipolares de las moléculas de agua.¹²¹ La absorción en esta región del espectro describe las fluctuaciones del patrón de puentes de hidrógeno en el agregado de moléculas de agua, lo que se debe en parte a la constante ruptura y formación de nuevos enlaces de las moléculas de agua entre sí. Nos referimos a que esta ruptura y reformación de enlaces por puentes de hidrógeno tiene lugar en un tiempo de escala de picosegundos, cuando se describe que el agua es más o menos "dinámica".



Ecuación 1

Si analizamos estos resultados en el contexto de la Ec. 1, encontramos que la estructura de los agregados de agua depende de la molécula orgánica que habilita el poro y es consecuencia del proceso termodinámico que permite que

el ensamblaje molecular tenga lugar. Diseñar y construir estructuras moleculares se sustenta en dos necesidades: (i) conocer el mecanismo que opera en el ensamblaje y (ii) evaluar los parámetros energéticos por los que opera el mecanismo. Sólo así se posibilita la discriminación de otras alternativas que, en un proceso abierto, pueden ser posibles en un marco de geometría fractal.¹²⁶

El agua, tanto en formas ordenadas como desordenadas, juega un papel estabilizador en los compactos de las moléculas orgánicas, por lo que han de considerarse como un aspecto integral del sistema.^{127,128} Este es un punto de referencia muy importante en nuestro proyecto, que trata de entender el efecto “director” que el agua tiene en los empaquetamientos de las moléculas orgánicas.^{112,113,129} Queremos, como objetivo, entender como el agua dirige las moléculas orgánicas en la construcción de estructuras predeterminadas, al tiempo que desestabiliza el resto de alternativas. En el trabajo que se describe a continuación se quiere probar que, desde las bases que permitieron la construcción de poros a escala subnanométrica, es posible construir estructuras tubulares a escala micro y macro bajo el efecto director de las moléculas de agua.

¹²⁶ M. D. Eddleston, W. Jones, *Crys. Growth Des.* DOI: 10.1021/cg900969n.

¹²⁷ G. Li, L. Li, J. Boerio-Goates, B. H. Woodfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8659-8666.

¹²⁸ E. C. Spencer, A. A. Levchenko, N. L. Ross, I. Kolesnicov, J. Boerio-Goates, B. F. Woodfield, A. Navrotsky, G. Li, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 2796- 2800.

¹²⁹ P. W. Fenimore, P. H. Frauenfelder, B. H. McMahon, F. G. Parak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, *99*, 16047-16051.

2.3 Materiales y métodos.

Los cristales estudiados se prepararon según el siguiente protocolo: A una solución agitada vigorosamente de la molécula racémica **11** en tetracloruro de carbono (promedio de concentración 2×10^{-3} - 8×10^{-3} M, 30 mL), se adiciona lentamente agua (1.0 ml). Después de la adición de agua, la muestra se dejó reposar en un desecador que mantiene humedad. Con el tiempo, la solución deposita, en alto rendimiento ($\sim 95\%$) y en una relación variable que depende de la concentración de la disolución, cristales constituidos por tubos total o parcialmente huecos en su interior. El resto del material que cristaliza ($\sim 5\%$) forma columnas sólidas de estructura poligonal, normalmente en forma de prismas hexagonales. La aplicación de este protocolo a las moléculas racémicas **7** – **12** (Tabla 1) conduce a resultados equivalentes.

2.3.1 Microscopía óptica.

Las fotografías que aparecen en el texto como Figura 30, fueron realizadas con una cámara digital Nikon D300, Nikon Macro 105 mm, lentes VR con sistema de adaptación Nikon R1. Las fotografías fueron realizadas por el Prof. Carlos Herrera, Estación Biológica de Doñana, CSIC, Sevilla.

Las microfotografías incluidas en la Figuras 33 y 34, se obtuvieron con un microscópico óptico Olympus BX61, en luz de transmisión (Fig. 33E-F, Fig. 34A-C) y en epifluorescencia (Fig. 33A-D, Fig. 34D-F) usando luz ultravioleta (excitación BP360-370) y filtro para emisión (BA420). Este trabajo se realizó en el Servicio General de Investigación en Microscopía, CITIUS, Universidad de Sevilla.

2.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido SEM-FEG se obtuvieron de un instrumento Hitachi S-4800 a 2.0 Kv y de un JEOL JSM-540 a 1.0 Kv. Las muestras se montaron sobre carbono en una cápsula y fueron metalizadas con oro para reducir el deterioro durante el análisis (Figuras 31 y 32). Estas

medidas fueron realizadas por la Dra. M. Carmen Jiménez, Instituto de Materiales, CSIC, Sevilla.

2.3.3 Difracción de rayos-X en polvo (PXRD).

El espectro de difracción de rayos -X en polvo se realizó en un difractómetro Siemens Kristalloflex D500 con radiación Cu K α , longitud de onda 1.5406 Å, y contador de centelleo. Los datos se recogieron entre 3° y 30° 2 θ a temperatura ambiente. El experimento fue realizado por el Dr. Angel Justo, Servicio de Difracción de Rayos-X, Instituto de Materiales, CSIC, Sevilla.

2.4 Discusión de resultados.

La cristalización de cualquiera de las moléculas que por estudios de difracción de Rayos X en monocristal, muestran que estructuran a escala subnanométrica formando poros hidratados (\pm)**7**·2H₂O-(\pm)**12**·2H₂O (Tabla 1), conduce a resultados similares de formación de tubos huecos, semi-huecos y columnas poligonales sólidas, en proporciones que son, sobre todo, dependientes de las concentraciones de la disolución. El resto de las moléculas que se describen en las Tablas 1-3 no producen cristales bajo ninguna de las formas que aquí se especifican. El trabajo que se comenta a continuación se refiere al estudio realizado sobre la molécula **11**, por ser de la que se dispone mayor cantidad, por lo que las conclusiones que se extraen resultan generalizables a cualquiera de las moléculas racémicas **7** – **12**, así como a sus diastereoisómeros que también se han sintetizado.¹³⁰

La formación de estas estructuras tubulares ocurre sin afectar la estructura cristalina del monocristal, lo que se confirma por el difractograma de rayos-X en polvo obtenido de los tubos, que demuestra mantener el mismo patrón de difracción discutido en el capítulo anterior para el compuesto (\pm)**11**·2H₂O. El examen por microscopía óptica y electrónica de las estructuras tubulares indica que sus dimensiones son muy variables. Desde ~100 nm a ~100 μ m de

¹³⁰ Cirilo Pérez, Matías López, Ezequiel Quintana, Julio Delgado, resultados no publicados.

diámetro y desde 500 nm hasta casi 2 cm de longitud. Los tubos mayores obtenidos fueron de más de 1.0 mm de ancho y más de 1 cm de longitud.

La Figura 30(A) muestra una selección de cristales que pueden ser observados a simple vista. Debido a su gran transparencia, se puede diferenciar los tubos completamente formados de los semi-tubos. Los semi-tubos son muy simétricos y muestran las oquedades sobre ambas bases de la estructura prismática sin llegarla a perforar totalmente.

La Figura 30(B) corresponde a una muestra representativa, sin selección previa, de cristales recién preparados. Cuando son pequeños, la mayoría son columnas sólidas, no huecas, en forma de prisma hexagonal. La ampliación que se muestra en la esquina inferior derecha de la Figura 30(B) revela la gran variedad de diámetros, formas y tamaños de estructuras tubulares que se pueden obtener. Todos fueron crecidos bajo las mismas condiciones, aunque algunos de ellos han tenido más tiempo de cristalización que otros, antes de ser separados de la disolución. En tiempo, la diferencia mayor entre unos y otros fue de 48 horas. A pesar de que todos ellos son resultados de las mismas condiciones de temperatura y saturación, la variedad es muy grande, lo que demuestra que el tamaño y forma de cada cristal es muy sensible a los parámetros de crecimiento "locales", que les afectan de forma individualizada. Parece como si la estructura tubular se formara con el crecimiento: los más pequeños son sólidos, le siguen en dimensión los semi-tubos, y finalmente las estructuras tubulares. Esto podría interpretarse como que las caras externas del prisma tienen un crecimiento mayor que las bases, lo que se traduce en la formación de un hueco durante el crecimiento del cristal. Cualquier material puede cristalizar formando estructuras tubulares siempre y cuando se dé esa circunstancia; sin embargo, como veremos más adelante, este régimen de crecimiento nada tiene que ver con el modelo en estudio ya que, entre otras cosas, no explicaría la formación íntegra de los tubos.

El agua es muy importante para mantener la estructura tubular. Bajo corriente de nitrógeno o argón, la estructura del cristal pierde transparencia y cristalinidad y gradualmente se colapsa. Sin embargo, no experimentan

cambios cuando se someten a una corriente de aire húmedo, o se sumergen en agua durante meses a temperatura ambiente (25-30 °C).

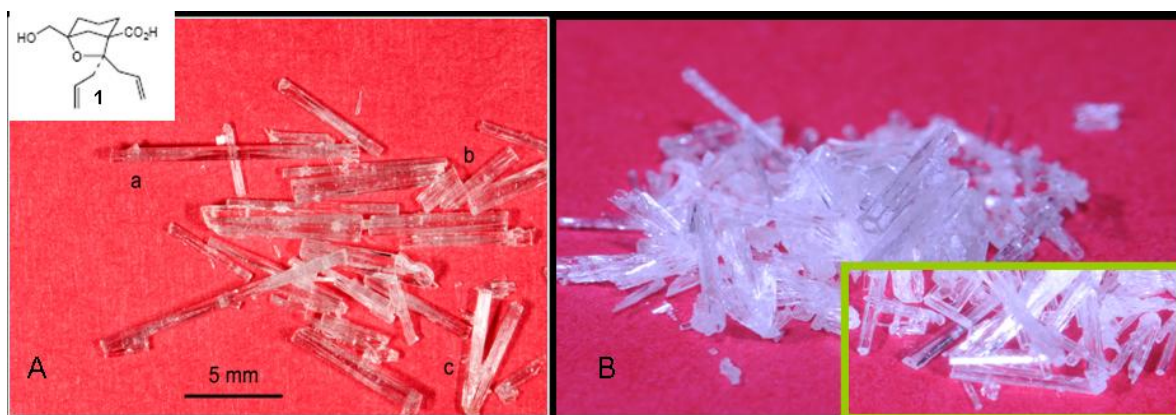


Figura 30. Imágenes de tubos formados por cristalización de la molécula racémica **11**. Las fotografías fueron hechas con una cámara digital y los cristales se depositaron sobre un papel de color rojo. (A) Los cristales fueron seleccionados y esparcidos sobre el papel para mostrar el alto grado de transparencia de los mismos. Se puede distinguir: tubos (b), semitubos (a) y tubos unidos por la base (c). (B) Conjunto de cristales amontonados según se sintetizan y sin selección previa. Se puede observar la perfecta estructura de prisma hexagonal de la mayoría de ellos, y la gran variedad de diámetros y formas que simultanean en el proceso de cristalización. Los cristales son muy transparentes e incoloros. Como ocurre con los cristales de nieve, amontonados parecen de color azul claro debido a que la radiación roja se absorbe de forma más rápida que la azul.

El examen en microscopía electrónica de barrido (SEM) revela que los tubos son muy sensibles a la radiación electrónica (Figura 31). Aunque los estudios SEM son de baja radiación, las imágenes muestran lo frágiles que son y la variedad de sus dimensiones (promedio de diámetros 300-500 μm y longitud 5.0-10 mm, con un grosor de paredes muy amplia 250-400 μm). Las pequeñas roturas que aparecen en la superficie son probablemente debidas a la pérdida de agua al hacerse el vacío durante el análisis SEM. Durante el crecimiento de los cristales puede que ocurra la inserción de unos tubos en otros. Otra posible explicación es que, variedades laminares del cristal se enrollen una sobre otras, creando los acoplamientos coaxiales que se observan en la Figura 32. Con independencia de cuál sea el mecanismo preciso que opere,¹³¹ este fenómeno de empaquetamiento hidrofóbico podría ser una versión experimental de los

¹³¹ D. Yan, Y. Zhou, J. Hou, *Science* **2004**, *303*, 65-67.

simulados reversibles de ensamblaje de nanotubos de carbono de diámetros diferentes en agua.¹³²

Durante la preparación de las muestras para los estudios de SEM, resultó muy difícil orientar los tubos de forma que quedaran los más perpendicular posible y en la dirección en que se efectúa la visión, por lo que es difícil saber por esta técnica si los huecos se extienden totalmente o no a través de los poros.

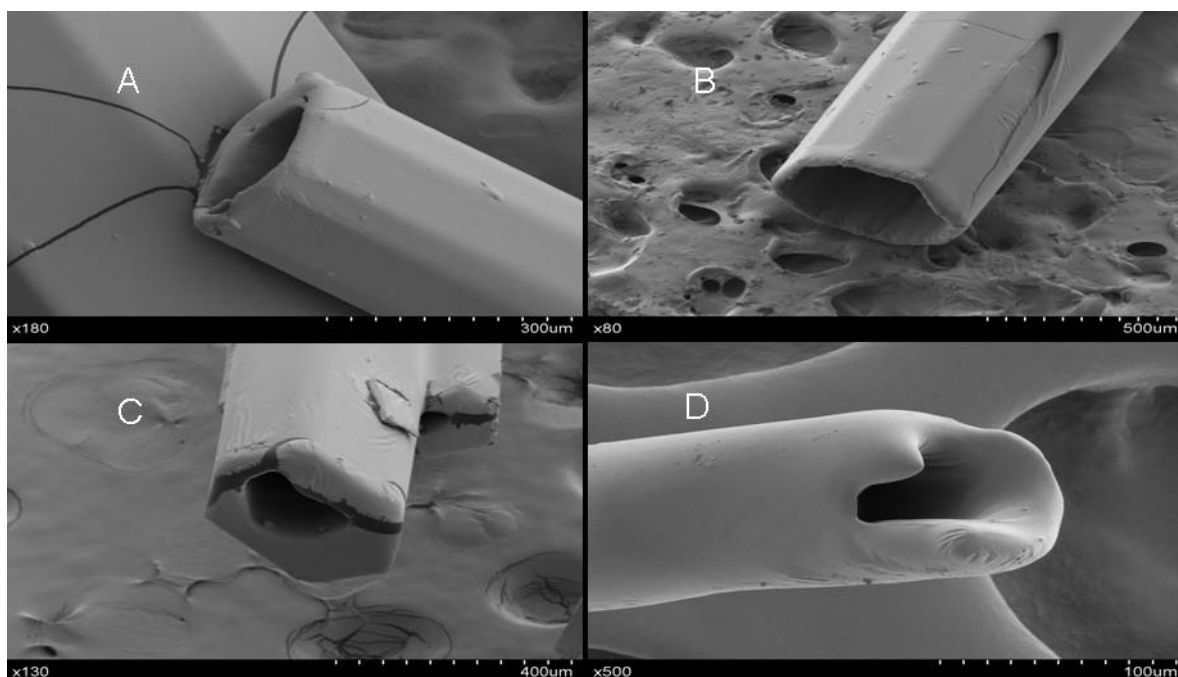
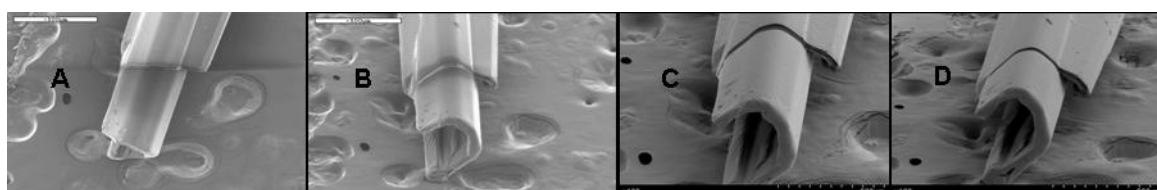


Figura 31. Imágenes SEM de baja resolución de tubos preparados de $(\pm)11$ mostrando la destrucción parcial que produce la técnica. (A) Poro poligonal, (B) poro octogonal, (C) poros hexagonales, (D) poro altamente destruido por excesiva exposición al bombardeo electrónico.

Las imágenes en microscopía óptica de los tubos colocados en orientación vertical, confirman, plenamente, las estructuras tubulares de las muestras, al tiempo que muestran la muy pobre definición y elevada irregularidad en las formas de los huecos (Figura 33).



¹³² J. Zou, B. Ji, X. Q. Feng, H. Gao, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 430-434.

Figura 32. Imágenes SEM de baja resolución de tubos formados por (\pm)**11** que muestran la inserción de un poro de menor diámetro en otro de diámetro mayor.

La formación espontánea de cristales de moléculas orgánicas formando tubos, es poco usual pero no desconocida, y son varios los mecanismos descritos para justificar su formación.^{133,134,135}

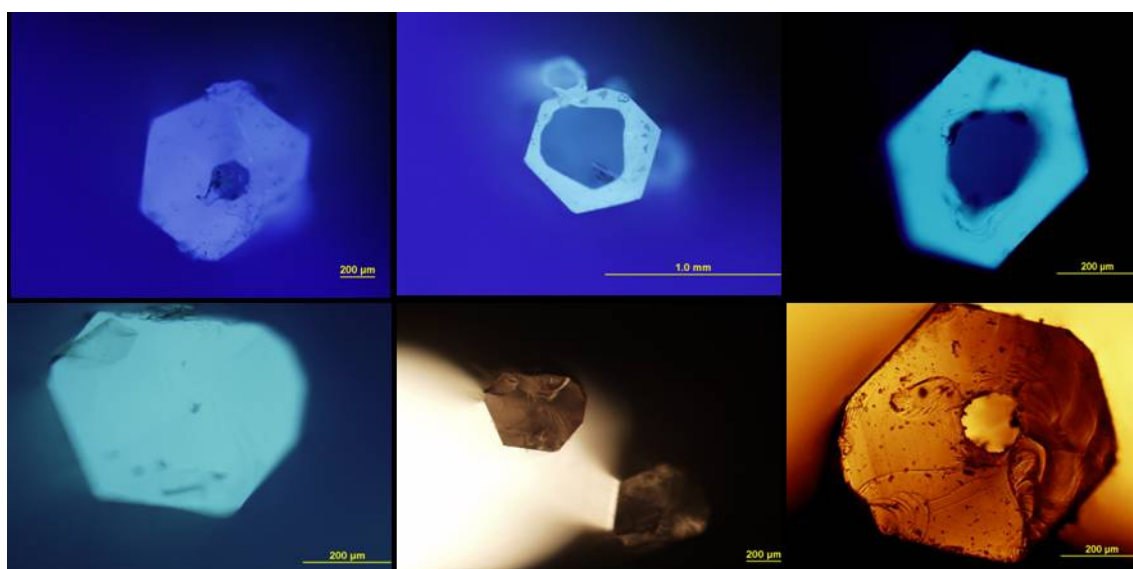


Figura 33. Microscopía óptica de imágenes de tubos de (\pm)**11** de diferentes diámetros vistas desde una posición vertical. Las imágenes (A-C) muestran la base hexagonal de la mayoría de las estructuras tubulares. El tamaño de los huecos interiores varía de un cristal a otro y la forma es muy irregular. (D) Visión superior de un cristal sólido donde se puede observar, justo en el centro de la base, la formación incipiente del poro. (E y F) Visión con luz de transmisión donde se puede apreciar el alto grado de desorden y falta de cristalinidad que existe en las bases de los prismas y poros.

Cada uno de los mecanismos propuestos se basan en las particularidades de las estructuras químicas de las moléculas que forman los tubos. Así, la mayoría de los tubos que se forman desde estructuras orgánicas disponen de poro interior con una perfecta geometría circular como la de los nanotubos de carbono; por ejemplo, los tubos de péptidos amiloides,^{136,137} lípidos,^{138,139,140,141} ácidos

¹³³ Y. Yin, R. M. Rioux, C. K. Erdonmez, S. Hughes, G. A. Somorjai, A. P. Alivisatos, *Science* **2004**, *304*, 711-714.

¹³⁴ X. Zhang, X. Zhang, W. Shi, X. Meng, C. Lee, S. Lee, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1525-1528.

¹³⁵ J. Park, H. Zheng, Y.-w. Jun, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13943-13945.

¹³⁶ K. Lu, J. Jacob, P. Thiyagarajan, V. P. Conticello, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6391-6393.

¹³⁷ H. Yokoi, T. Kinoshita, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 8414-8419.

¹³⁸ J. M. Schnur, *Science* **1993**, *262*, 1669-1676

biliares,¹⁴² o derivados de glutamato,¹⁴³ lo que sugiere características intrínsecas comunes de estas moléculas, todas ellas de naturaleza anfifílica, que operan en la organización de sus auto-ensamblajes.

Cuando se siembra una solución de $\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$ saturada de (\pm)**11** con un cristal pequeño de forma tubular, el crecimiento lineal del cristal continúa aunque muy lentamente. Con el fin de estudiar el proceso de formación del tubo y de la evolución de su morfología con el tiempo, se hizo un estudio detallado que se siguió por microscopía óptica. La alta transparencia de los cristales permite observar el crecimiento de las oquedades mediante visión lateral de los mismos (Figura 34).

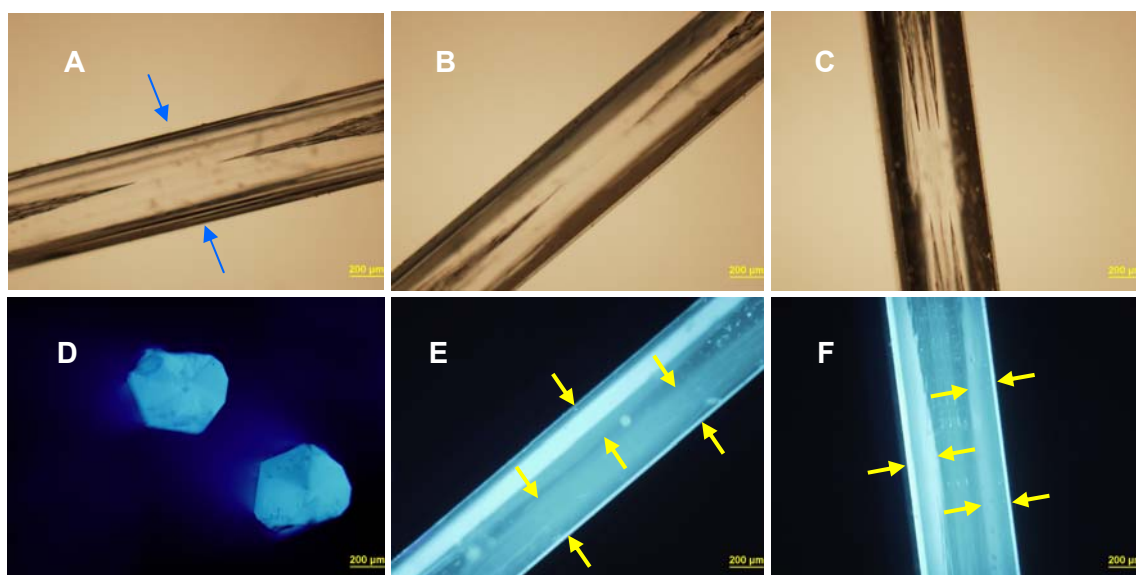


Figura 34. Evolución temporal de la morfología de cristales de (\pm)**11** en disolución: Las imágenes son de microscopía óptica y la visión es lateral. (A-C) muestras diferentes de semi-tubos obtenidas después de un crecimiento de 6-12 horas. Interesante observar la simetría de los semi-tubos en su etapa de formación. (D) Visión vertical de los fragmentos de ruptura del cristal de la microfotografía (A) sobre el lugar indicado por las flechas azules que muestra que el poro aún no se ha formado en la zona donde se produce el corte. (E) Semi-tubo de la microfotografía (B) después de 1-2 días de ser repuesto en la disolución. (F) La misma operación del cristal de la microfotografía (C) recolocado en la disolución y mantenido por un tiempo extra de una semana. En (E) y (F) el hueco de los poros los marca el color azul más intenso, las flechas amarilla señalan, en ambos casos, el grosor de las paredes de los poros.

¹³⁹ J. Fuhrhop, W. Helfric *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1565-1582.

¹⁴⁰ M. S. Spector, K. R. K. Easwaran, G. Jyothi, J. V. Selinger, A. Singh, J. M. P. Schnur, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 12943-12946.

¹⁴¹ Y. Zhao, N. Mahajan, R. Lu, J. Fang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 7438-7442.

¹⁴² D. S. Chung, G. B. Benedek, F. M. Konikoff, J. M. Donovan *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 11341-11345.

¹⁴³ N. Nakashima, S. Asakuma, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 509- 510.

Figura 34(A-C), semi-tubos obtenidos después de 6-12 horas. Es importante hacer resaltar la simetría, marcada por el color más intenso en las zonas perforadas de los cristales que forman semi-tubos. Es posible que estos tipos de cristales se hayan obtenido con anterioridad, aunque sin ser reconocidos, debido a la dificultad de distinguir, en cristales pequeños, los tubos de los prismas sólidos. La micro-fotografía 34(D) muestra en orientación vertical los fragmentos producto de cortar el semi-tubo 34(A) en la zona indicada por las flechas azules. Se puede observar la ausencia de poro en la sección del corte. La Figura 34(E) muestra al semi-tubo 34(B) después de dos días más en la disolución. La Figura 34(F) se corresponde con el cristal 34(C) después de una semana más en disolución.

Desde un punto de vista teórico,¹⁴⁴ el mecanismo de formación de estos cristales implica el conocimiento previo de las situaciones que limitan el equilibrio. Sin embargo, sobre las bases de la información experimental acumulada, proponemos una aproximación mecanística basada en la propuesta^{145,146,147,148} "disolver y crecer", que acredita la formación de estructuras porosas en especies iónicas por intercambio de contra-ión. La "disolución" comienza en los centros de las superficies de ambas bases del prisma y continúa hacia el interior a lo largo del eje del prisma, lo que gradualmente, convierte, al "crecer", los prismas sólidos en semi-tubos y finalmente en tubos (Figura 35). La naturaleza hexagonal del prisma proviene de la simetría del monocristal formado por apilamiento de anillos hexaméricos de las moléculas orgánicas que configuran el cristal de estructura $(\pm)\mathbf{11}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Figura 35(A)]. La hidratación y el empaquetamiento cristalino presente en $(\pm)\mathbf{11}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no se altera en la formación de los tubos, lo que se confirma en los difractogramas de difracción de rayos-X en polvo.

¹⁴⁴ Y. Saito, 1996, *Statistical Physics of Crystal Growth*, Oxford: Oxford University Press. M. Ohara, R. C. Reed, 1973, *Modelling Crystal Growth Rates from Solution*, Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

¹⁴⁵ F. Li, Y. Ding, P. Gao, X. Xin, Z. L. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5238-5242.

¹⁴⁶ Ch.-J. Jia, L. D. Sun, Z.-G. Yan, L.-P. You, F. Luo, X.-D. Han, Y.-Ch. Pang, Z. Zhang, Ch.-H. Yan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4328-4333.

¹⁴⁷ A. Wei, X. W. Sun, C. X. Xu, Z. L. Dong, Y. Yang, S. T. Tan, W. Huang, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 1740-1744.

¹⁴⁸ Y. S. Zhao, J. Xu, A. Peng, H. Fu, Y. Ma, L. Jiang, J. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7301-7305.

Los defectos que mayormente se observan en el centro de las superficies basales, son consecuencia de la pérdida de cristalinidad que ocurre por difusión de moléculas de agua desde estas superficies. Como ocurre en la interfase hielo-aire, en la interfase sólido-disolución las moléculas de agua sólo están en la superficie del sólido parcialmente coordinadas a las moléculas orgánicas, lo que facilita su difusión. La pérdida de las moléculas de agua de las superficies basales del sólido deja en mayor libertad las moléculas orgánicas que tienden a "redisolverse" en la disolución, al tiempo que generan pérdida de cristalinidad y defectos en las superficies que forman las bases de los prismas. Como consecuencia se crea mayor concentración de moléculas orgánicas, que se localiza sobre las superficies desde donde se han disuelto y recrystalizan sobre zonas que ofrezcan mayor cristalinidad, esto es, los bordes de la superficie basal, o dan lugar a la generación de nuevas estructuras sobre la superficie exterior del prisma [Figura 35(B)]. Este proceso de "disolución-recrystalización" da lugar a la formación de los huecos, que se inician desde ambas bases del prisma, y al crecimiento de las paredes laterales o creación de anillos exteriores, que conducen a un aumento del diámetro externo del cristal [Figura 35(B-D)]. Pero ¿qué es lo que sincroniza el crecimiento simétrico en las dos direcciones? La respuesta es, nada. El crecimiento viene conducido por las concentraciones locales que se organizan sobre las bases de los prismas, por lo que el desarrollo de ambos terminales resulta idéntico en cada cristal y diferente entre cristales distintos. Este mecanismo explica varias de las particularidades que se observan, por ejemplo, la formación de tubos concéntricos donde el tubo interior moldea la formación del exterior (Figura 32), o la gran diversidad de cristales que se originan en cada cristalización debido a que los cristales crecen según concentraciones particulares a cada uno de ellos. La agitación esporádica de la disolución conduce a la homogeneidad de los cristales debido a la eliminación de concentraciones locales.

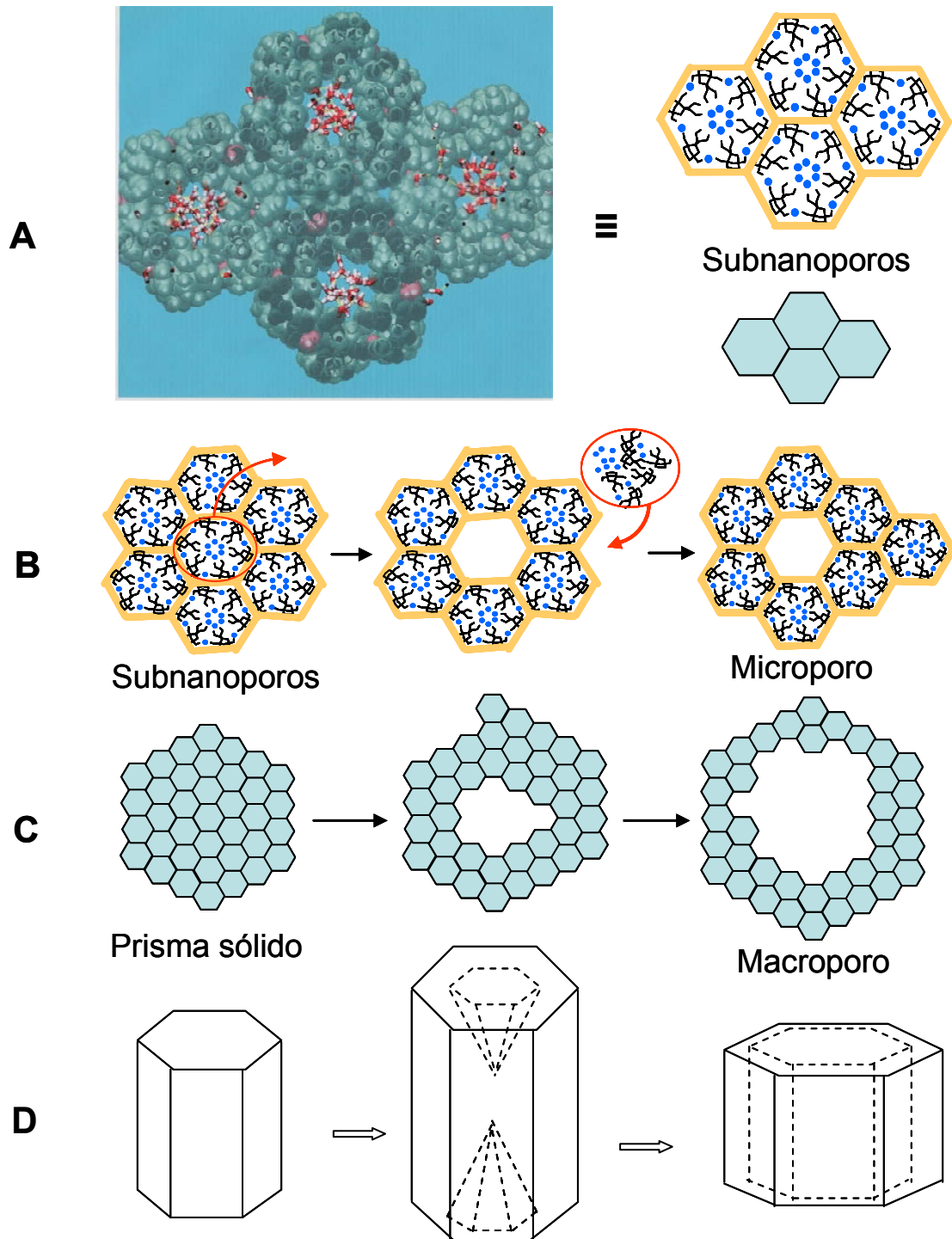


Figura 35. (A) (Izquierda) Empaquetamiento estructural de $(\pm)11 \cdot 2H_2O$, se selecciona el apilamiento de cuatro anillos formados por hexámeros moleculares. (Derecha) Representación esquemática del ensamblaje de cuatro anillos. (B) Ilustración esquemática del proceso de "disolución-cristalización". (C y D) Representaciones esquemáticas que muestran visión superior y lateral del crecimiento: prisma \rightarrow semi-tubo \rightarrow tubo.

El "crecimiento" en la dirección del eje del prisma ocurre durante la primera etapa de construcción de los semi-tubos. Hay un momento en que las longitudes de las superficies laterales comienzan a disminuir y las nuevas

cristalizaciones ocurren sobre estas superficies, produciendo un ensanche del tubo [(Figura 35(D))]. Los cristales más largos se corresponden siempre con semi-tubos [Figura 30(A)].

2.5 Material complementario

A continuación se adjuntan las Figuras C1-C5 que visualizan en mayor detalle los aspectos estructurales que se resaltan en las Figuras 30-34 del texto.



Figura C1. Imágenes fotográficas de cristales formados por crecimiento de $(\pm)\mathbf{11}\cdot\mathbf{2H}_2\mathbf{O}$. La naturaleza de los tubos y semitubos se puede distinguir con claridad a simple vista



Figura C2. Cristales separados sin selección previa. Se puede observar la gran variedad de estructuras tubulares presentes en una cristalización y la transparencia de los cristales

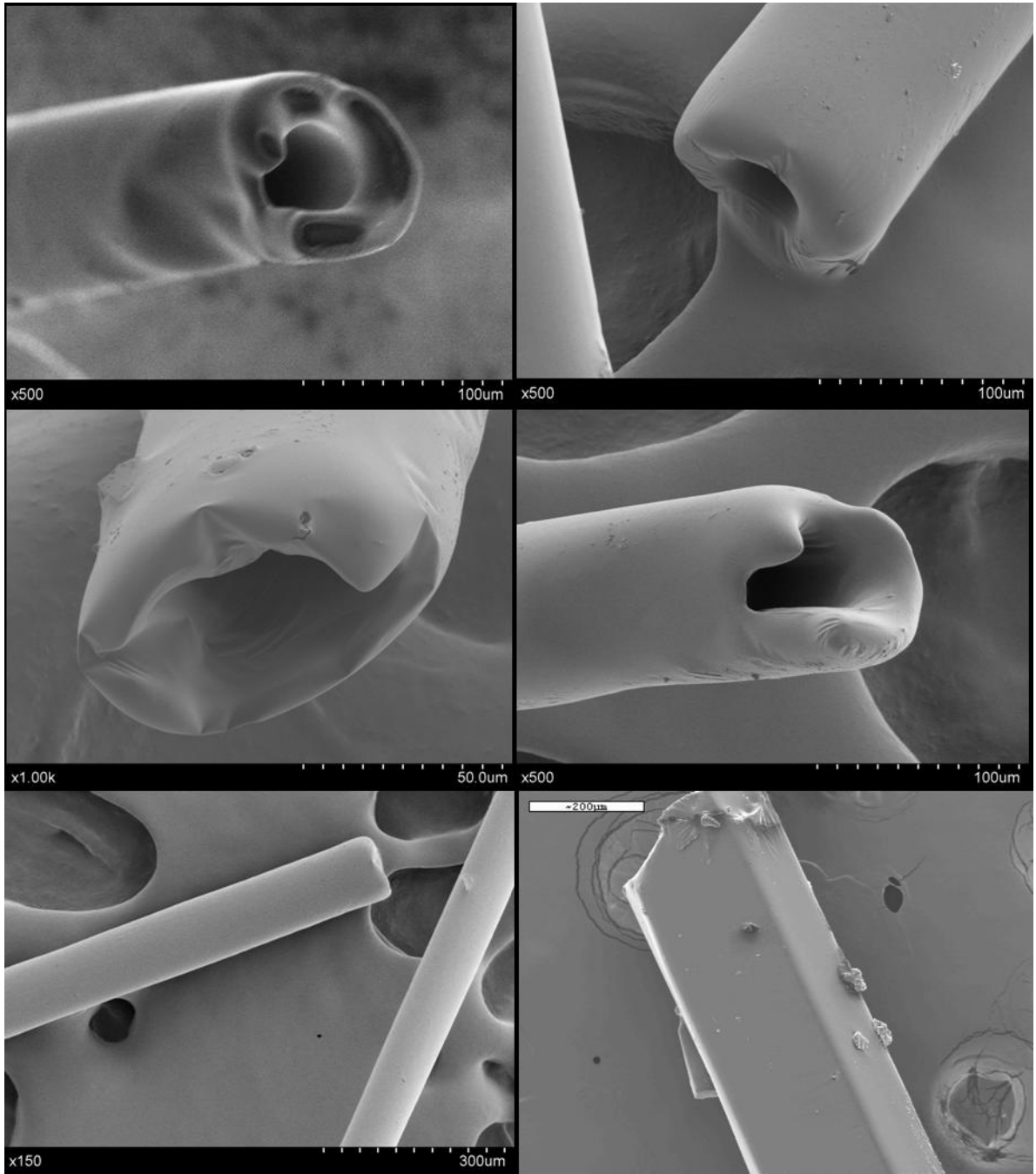


Figura C3. Imágenes SEM en baja resolución de las estructuras tubulares sin la protección previa de las muestras con una capa de oro. Se puede observar el alto deterioro que ocasiona el someter las muestras al bombardeo electrónico.

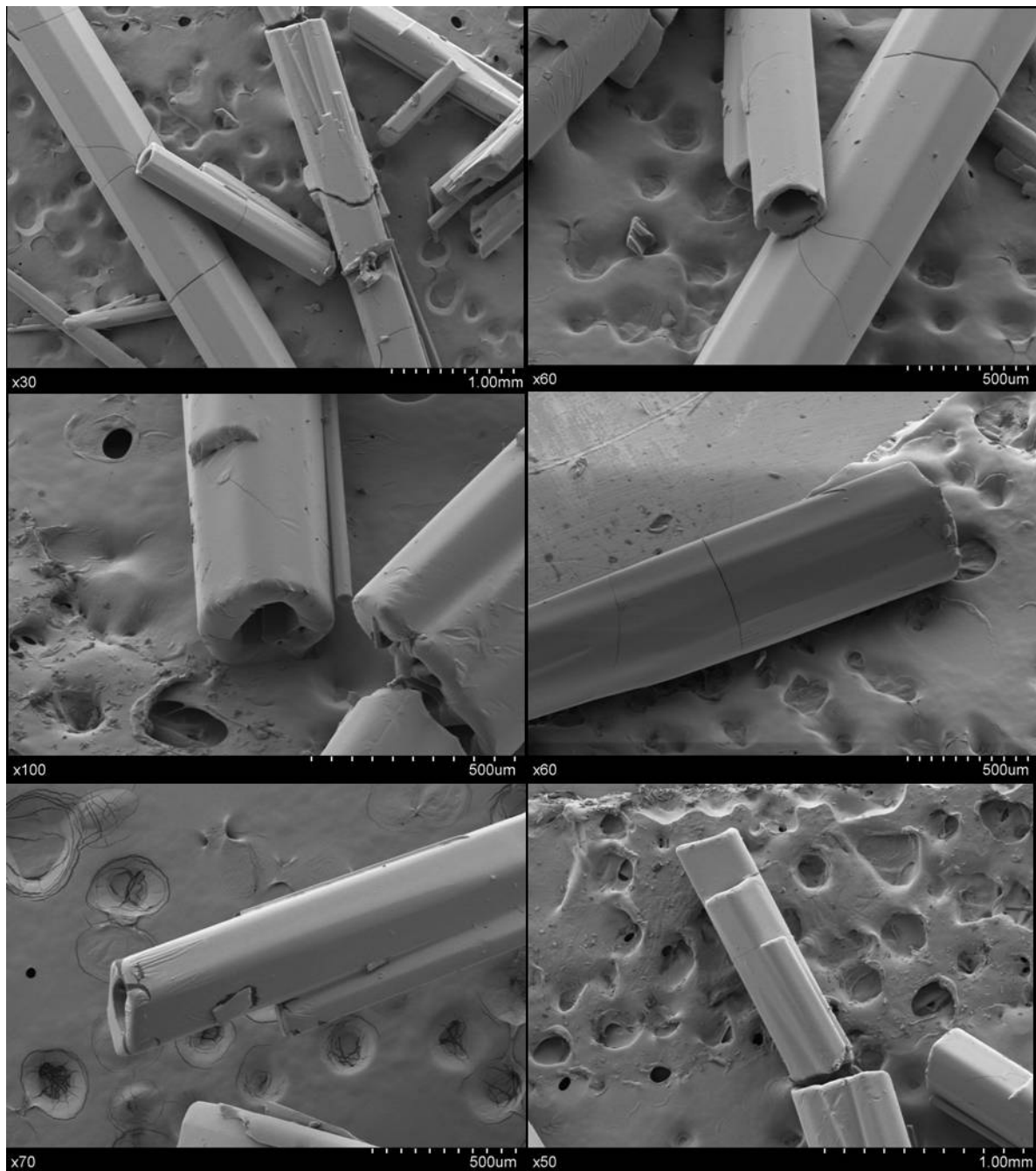


Figura C4. Imágenes SEM en baja resolución de muestras previamente metalizadas con una fina capa de oro. Las características prismáticas de los tubos se puede observar bien, sin embargo, estos se fragmentan con facilidad en el tratamiento.

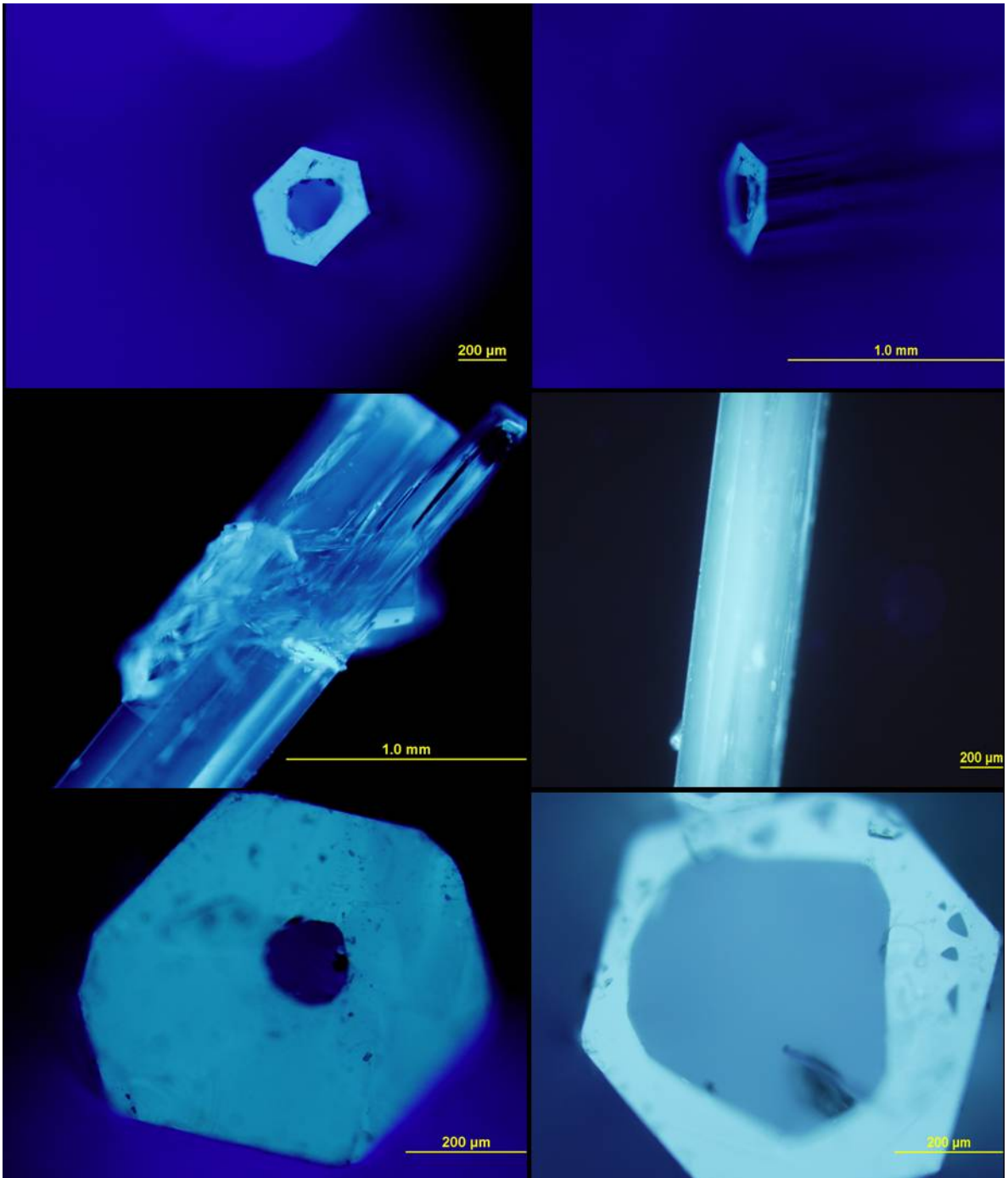


Figura C5. Microfotografías de los tubos bajo luz ultravioleta. Visiones laterales y de tubos colocados en posición vertical. Es de notar la irregularidad y las variaciones tan grandes en los diámetros internos de los de los poros.

2.6 Conclusiones.

Como resumen, se han preparado tubos de estructura poligonal de diámetros diferentes. A pesar de que es difícil justificar la estructura del prisma que constituye el poro,¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ en este caso parece ser resultado del efecto director del agua. El origen está en la conducción de la nucleación por la formación de anillos hexaméricos, donde se alternan los enantiómeros en la interfase entre el agua y el disolvente no polar usado en la cristalización. Dirigidos por el agua, los anillos se apilan formando columnas uni-dimensionales, que se agrupan formando prismas sólidos de base preferentemente hexagonal. Estas estructuras, cuando se mantienen en disolución, continúan su crecimiento para terminar formando cristales tubulares de diversos diámetros mediante un proceso de "disolución-cristalización". El crecimiento depende exactamente de cómo las moléculas de agua y del compuesto orgánico se reincorporan al cristal. El mecanismo es conceptualmente muy simple y no tiene más dificultad que el del auto-ensamblaje de las moléculas de agua, en la formación de los cristales de nieve o el de la formación de cristales de calcita, por depósito de CO_3Ca en el crecimiento de las púas en erizos. En ambos casos la evolución del crecimiento depende de la información contenida en los entornos del sólido. Sin embargo, a pesar de la aparente sencillez, la física detrás de estos procesos está muy lejos de ser entendida.

Podemos concluir que el denominado efecto "director" del agua es resultado, como es toda la biología, de la selección. No es que el agua y el compuesto orgánico lleguen al compromiso "inteligente" de actuar siguiendo un protocolo que se ha fijado de antemano. Lo que sí parece ser, es que en el equilibrio inicial están desestabilizadas otras posibles alternativas, que sí se manifiestan en otros homólogos del compuesto orgánico. Las moléculas orgánicas, **7-12** (Tabla 1), que conducen a la formación final de estructuras tubulares, son el resultado de una selección que incluye, al menos, el resto de las moléculas que se reúnen en la Tablas 1-3.

Capítulo 3

Aislamiento, purificación y caracterización de extractos de esponja

CRAMBE CRAMBE.

3.1 Introducción.

El presente capítulo trata sobre el aislamiento, purificación y caracterización de una mezcla de crambescidina-816 y crambescidina-800 con una proporción aproximada de 3:1. Esta mezcla de compuestos se obtiene de la esponja mediterránea *Crambe crambe* (Figuras 36 y 37).



Figura 36. Esponja *Crambe crambe* en su medio natural.



Figura 37. Resto de la esponja *Crambe crambe* después de la extracción.

3.2 Aislamiento y Purificación

La recolección de esponja *Crambe crambe* se realizó en el Parque Natural del Estrecho en junio de 2008, en la Punta de Tarifa, buceando a 30-40 metros de la costa y a una profundidad de 12-15 m. La esponja se colocó en acetona, en el mismo barco, y conservó a baja temperatura en el laboratorio (4 °C). Después de maceración con acetona (48 horas por 3 veces, hasta agotamiento) se realizó una disolución/suspensión en agua y se extrajo con *n*-butanol. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtró a través de placa filtrante y se llevó a sequedad. Se obtuvo un residuo seco de 102 g. El residuo se purificó por sucesivas cromatografías que se esquematizan a continuación. Todas las fracciones obtenidas se siguieron por TLC en sílica, desarrolladas con *n*-butanol:ácido acético:agua (6:1.5:2.5; v/v/v) y reveladas por inmersión en solución de fosfomolibdico al 10% en etanol, y posterior calentamiento. El producto buscado tiene un Rf de 0.45.

(1) Columna Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich)

- Características de la columna

Longitud:	66 cm
Diámetro interno:	4 cm
Vol. Total:	829 mL
Vol. Elución (60% VT):	498 mL
Vol. Frac.:	20 mL
Vol. muestra:	20 mL
Flujo:	3 mL/m
Extracto:	2.1 g
Eluyente:	MeOH
Vol. muerto:	300 mL

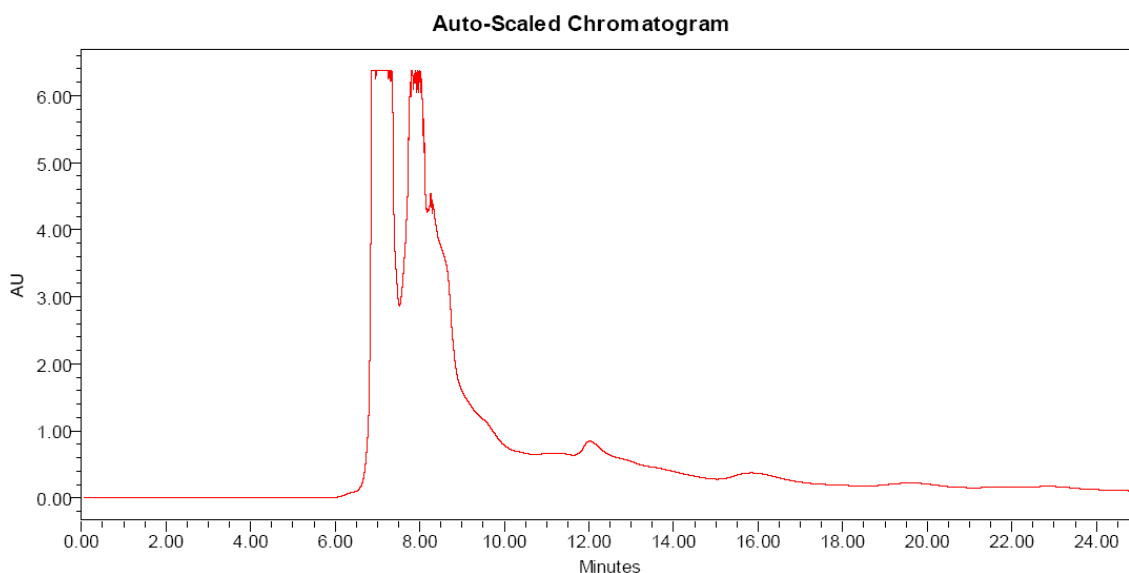
Se reunieron las fracciones que, según la TLC correspondiente, contenían el producto deseado.

(2) Columna semipreparativa μ -Bondapak RP18 (Waters)

- Características de la columna

Partícula:	10 μm (diámetro medio de partícula)
Dimensiones:	(7,8 x 300 mm)
Flujo:	1,55 mL/min
Detección:	UV a 230 nm
Eluyente:	MeOH : NaCl (0,1M); (9 : 1)
Muestra:	184 mg disuelta en 1,5 mL de MeOH
Inyección:	100 μL

Se obtuvo el siguiente cromatograma para cada inyección:



Cromatograma 1. Cromatograma obtenido luego de las 2 primeras columnas.

Recolectamos a partir del minuto 5 hasta el minuto 15, tomando fracciones cada 30 seg. Cada fracción fue llevada a sequedad en rotavapor, con lo cual aparece un precipitado de color blanco, debido al NaCl. Se le añaden 2 mL de CHCl_3 y se filtra a través de un ACRODISC GHP de 25 mm y 0.2 μm de luz (Waters) a un vial de 2 mL, que se lleva a sequedad en corriente de nitrógeno. Se reunieron las fracciones que, según la TLC correspondiente, contenían el producto deseado.

(3) Columna Xbridge RP 18 (Waters)

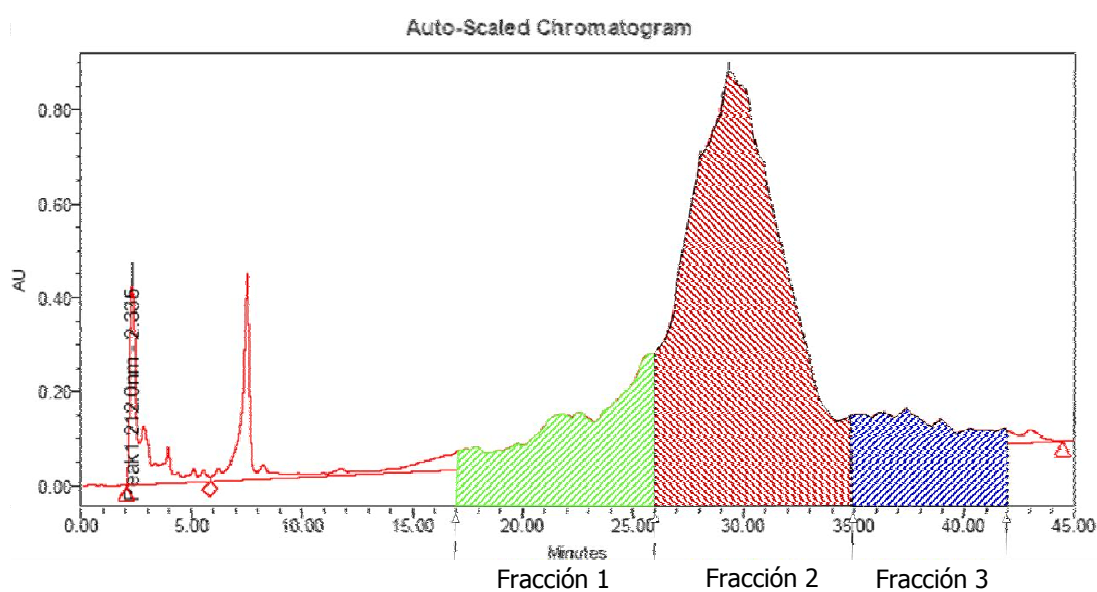
- Características de la columna

Partícula:	5 µm (diámetro medio de partícula)
Dimensiones:	10 x 250 mm
Flujo:	5 mL/min
Detección:	UV a 212 nm
Eluyente:	Gradiente de MeOH : NaCl 0,1M
Muestra:	100 mg disuelta en 2 mL de MeOH
Inyección:	100 µL

Gradiente:

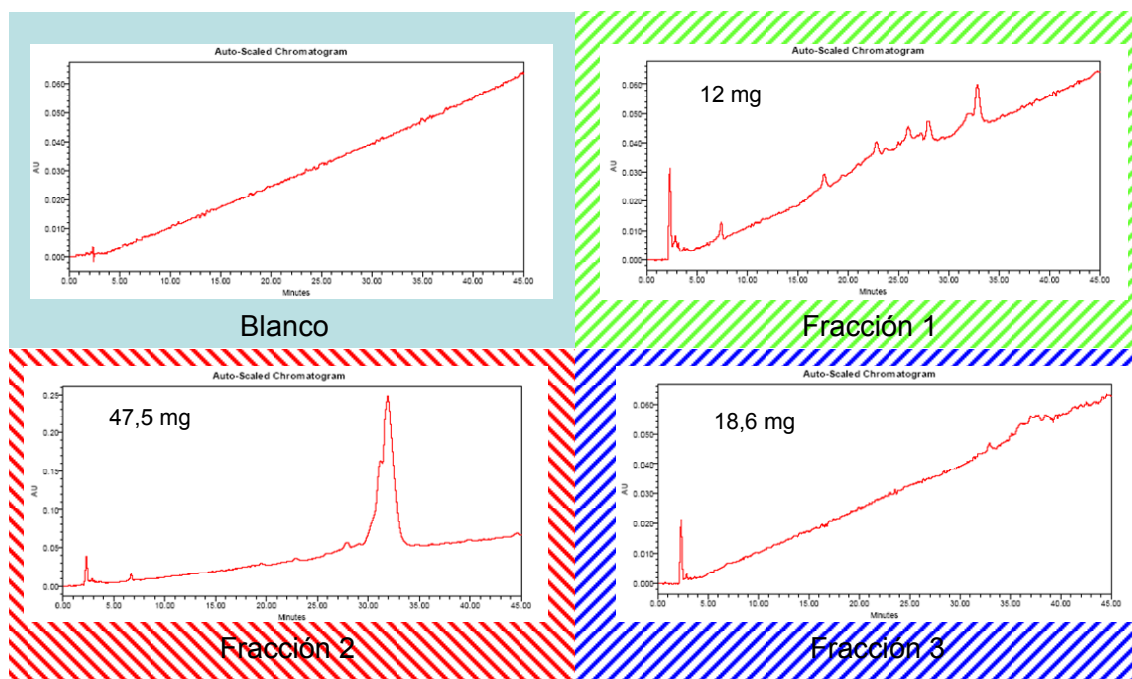
Tiempo	Flujo	%A	%B	%C	%D	Curva
---	5	60	0	40	0	---
1	5	60	0	40	0	6
45	5	75	0	25	0	6
45.10	5	60	0	40	0	6
60	5	60	0	40	0	6

Se obtuvo el siguiente cromatograma para cada inyección:



Cromatograma 2. Cromatograma obtenido luego de la 3^{er} columna.

Se obtuvieron tres fracciones cuyos cromatogramas se muestran a continuación. Cada fracción se sometió al mismo procedimiento de concentración, disolución en CHCl_3 y filtrado que el descrito anteriormente para las fracciones obtenidas en la columna semipreparativa. Los cromatogramas que siguen se realizaron en una columna Xbridge pero de dimensiones analíticas (3,5 x 150 mm) y en las mismas condiciones que las de la semipreparativa indicada anteriormente, inyectando en este caso 5 μL .



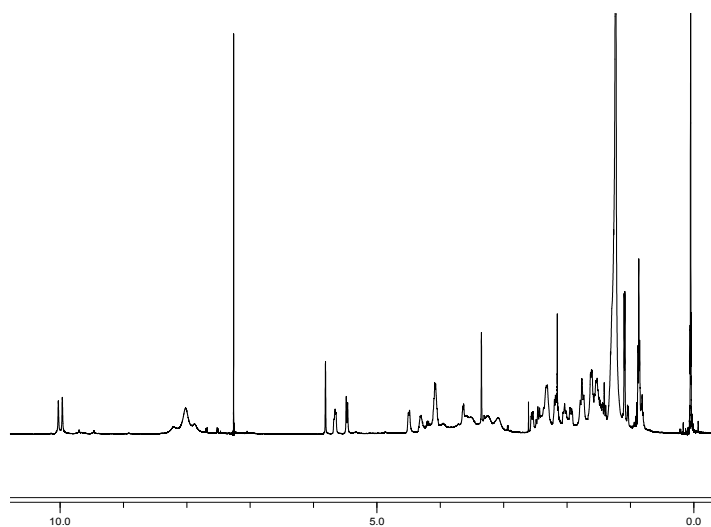
Cromatograma 3. Cromatograma de cada fracción obtenida.

En la Fracción 2 se obtuvieron 57 mg de muestra que fueron utilizados para los experimentos que se describen a continuación.

3.2.1 Estabilidad de la muestra

La muestra obtenida, seca y guardada a temperatura ambiente, permanece inalterada con el tiempo. A continuación se muestran dos espectros de RMN de protón de la misma muestra realizados el 22 de abril de 2009 y el 4 de diciembre de 2009 (Figura 38):

22-04-2009



04-12-2009

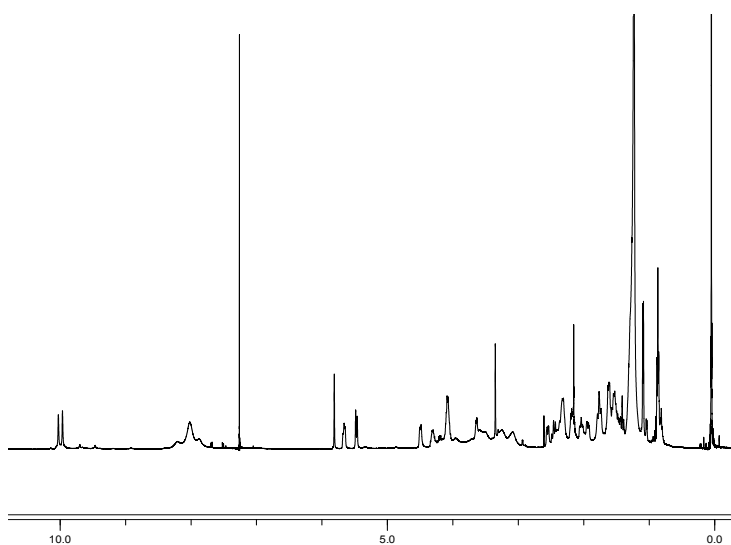


Figura 38. Espectros de RMN de protón de la muestra.

3.3 Caracterización

Las crambescidinas 816 y 800 presentan un núcleo de guanidina pentacíclica unido por una cadena lineal de ω -hidroxi ácido a una unidad de hidroxiespermidina. La crambescidina 816 contiene un oxígeno adicional, que forma un alcohol sobre el carbono 13, respecto de la crambescidina 800. Extensos estudios de RMN han demostrado que la configuración relativa de los núcleos pentacíclicos de las crambescidinas 816 y 800 son idénticos.¹⁴⁹ La configuración absoluta del núcleo pentacíclico de la crambescidina-816 se determinó por degradación oxidante,¹⁵⁰ mientras que la configuración absoluta del carbono 43 de la cadena de espermidina fue asignada mediante el método de Mosher.^{149b}

3.3.1 Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C

Las señales de ^1H y ^{13}C correspondientes a las posiciones 1-34, 38, los protones guanidínicos y el protón hidroxílico sobre el carbono 13 (ver Figura 39) de la crambescidina-816 se asignaron en base a experimentos de RMN mono- y bidimensional de la muestra. Las señales restantes no se pudieron asignar. Estas asignaciones realizadas concuerdan con los datos presentes en la bibliografía,^{149a,151} excepto para la posición 16 (Tabla 6).

3.3.1.1 Experimentos monodimensionales:

- **^1H -RMN** Secuencia utilizada: *zg30*, con *30° flip angle* (ángulo de aleteo).
- **^{13}C -RMN** Secuencia utilizada: *zgpg30*, desacoplado (*power-gated*) con *30° flip angle* (ángulo de aleteo).
- **DEPT135** Secuencia de transferencia de polarización desacoplando durante la adquisición.

¹⁴⁹ (a) E. A. Jares-Erijman, R. Sakai, K. L. Rinehart, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5712–5715. (b) R. G. S. Berlinck, J. C. Braekman, D. Dalozze, I. Bruno, R. Riccio, S. Ferri, S. Spampinato, E. Speroni, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1007–1015.

¹⁵⁰ E. A. Jares-Erijman, A. L. Ingram, J. R. Carney, K. L. Rinehart, R. Sakai, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4805–4808.

¹⁵¹ K. J. Rinehart, E. A. Jares-Erijman, US Patent 5,576,734.

3.3.1.2 Experimentos bidimensionales:

- **COSY** Secuencia utilizada: *cosygpmfph*, de correlación homonuclear, sensible a la fase que utiliza gradientes para la selección de caminos de transferencia de coherencia.
- **HSQC** Secuencia utilizada: *hmqcgpqf*, de correlación heteronuclear; desacopla durante la adquisición y utiliza gradientes para la selección de caminos de transferencia de c
- oherencia.
- **HMBC** Secuencia utilizada: *hmbcgpndqf*, de correlación heteronuclear optimizada para acoplamiento a larga distancia; no desacopla durante la adquisición y utiliza gradientes para la selección de caminos de transferencia de coherencia.
- **NOESY** Secuencia utilizada: *noesygpqh*, de correlación homonuclear a través de acoplamiento dipolar, sensible a la fase y que utiliza gradientes durante el tiempo de mezcla.
- **TOCSY** Secuencia utilizada: *mlevph*, de correlación homonuclear (*Hartman-Hahn*) con *bloqueo de spin* y sensible a la fase.

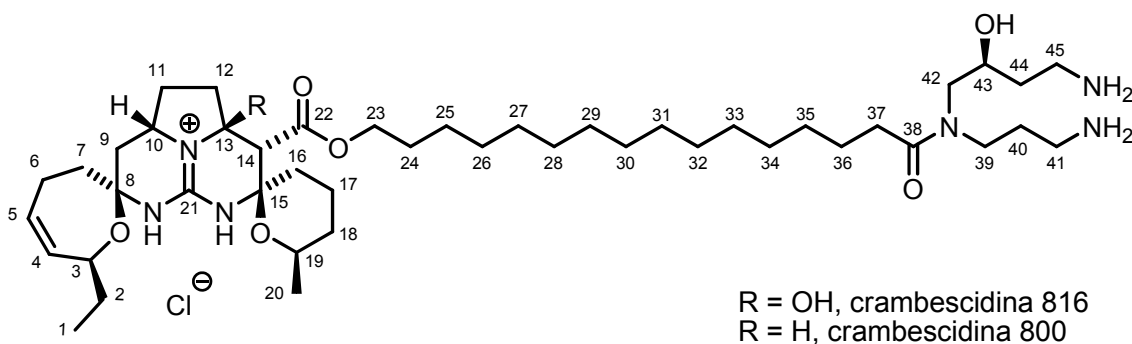


Figura 39: Estructura y numeración de las crambescidinas 816 y 800.

Una simple observación de la estructura del "núcleo" nos permite diferenciar tres sistemas de *spin* (cadenas azul, roja y verde) (Figura 40).

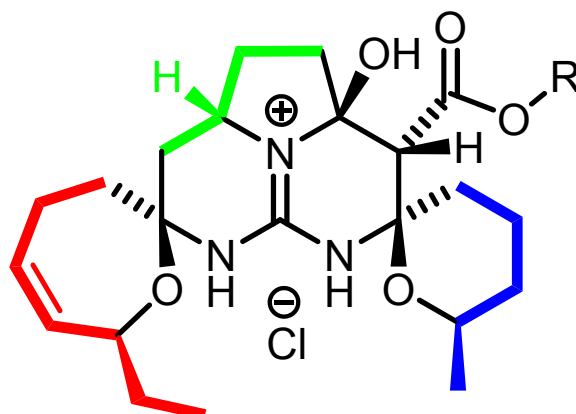


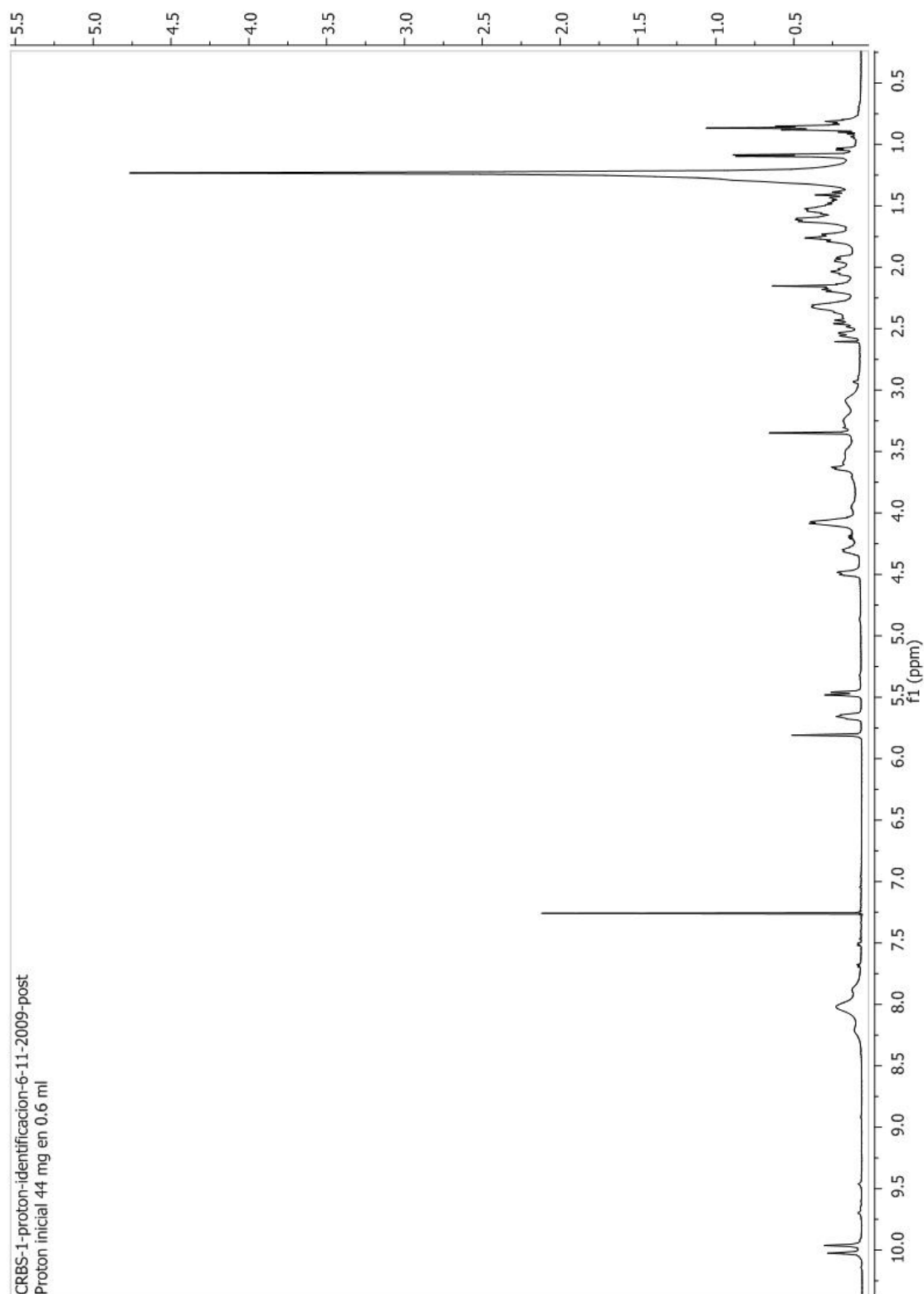
Figura 40. Tres sistemas de *spin* en el "núcleo" de crambescidina-816.

En dicho sistema se observan cuatro protones aislados (singletes). La estrategia aplicada es la selección de una señal característica para el comienzo de la asignación y, en base a los espectros mono y bidimensionales, asignar señales de ¹H y ¹³C de cada sistema de *spin*. Luego se correlacionan los sistemas de *spin* mediante experimentos de HMBC y NOESY.

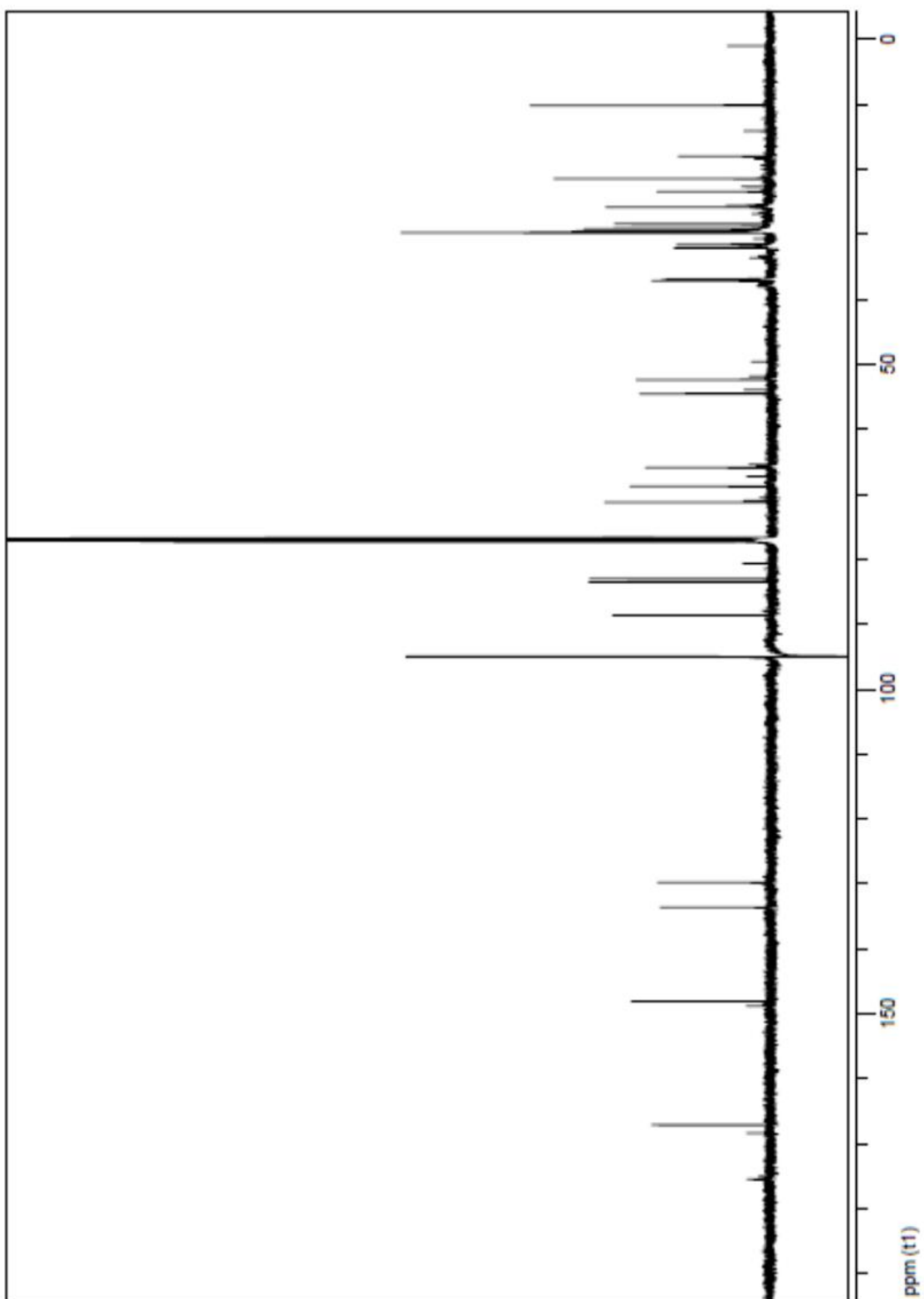
Aplicando la estrategia anteriormente descrita se realizó una asignación de la crambescidina-816. En la Tabla 6 se detallan los valores asignados y se comparan con los valores reportados en la literatura.

Asignación propuesta				<i>J. Org. Chem.</i> 1991 , <i>56</i> , 5712–5715			
	δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)
H-1	0.87 (t, 7.2 Hz)	C-1	10.1	H-1	0.88 (t, 7.0 Hz)	C-1	10.1
H-2a	1.58–1.50 (m)	C-2	29.0	H-2a	1.65 (m)	C-2	29.0
H-2b	1.50–1.43 (m)			H-2b	1.45 (ddq)		
H-3	4.53–4.46 (m)	C-3	71.2	H-3	4.47 (br d, 10.0 Hz)	C-3	71.2
H-4	5.51–5.44 (d, 11.0 Hz)	C-4	133.6	H-4	5.50 (br d, 11.0 Hz)	C-4	133.6
H-5	5.71–5.63 (t, 8.6 Hz)	C-5	129.8	H-5	5.72 (br t)	C-5	129.7
H-6a	2.39–2.26 (m)	C-6	23.4	H-6a	2.37 (m)	C-6	25.8
H-6b	2.23–2.18 (m)			H-6b	2.19 (m)		
H-7a	1.98–1.90 (m)	C-7	37.0	H-7a	1.95 (m)	C-7	36.8
H-7b	2.51–2.40 (m)			H-7b	2.40 (m)		
–	–	C-8	83.5	–	–	C-8	83.5
H-9a	2.59–2.52 (m)	C-9	36.9	H-9a	2.65 (dd, 13.0, 4.5 Hz)	C-9	36.8
H-9b	1.48–1.38 (m)			H-9b	1.44 (t, 13.0 Hz)		
H-10	4.36–4.24 (m)	C-10	52.4	H-10	4.29 (m)	C-10	52.4
H-11a	2.39–2.26 (m)	C-11	29.5	H-11a	2.41 (m)	C-11	29.7
H-11b	1.58–1.50 (m)			H-11b	1.60 (m)		
H-12a	2.20–2.11 (m)	C-12	37.2	H-12a	2.20 (m)	C-12	36.8
H-12b	2.09–1.99 (m)			H-12b	2.00 (m)		
OH	5.82 (s)	C-13	88.6	OH	–	C-13	88.6
H-14	3.36 (s)	C-14	54.5	H-14	3.46 (s)	C-14	54.4
–	–	C-15	83.0	–	–	C-15	83.0
H-16a	2.39–2.26 (m)	C-16	29.1	H-16a	1.87 (m)	C-16	41.5
H-16b	1.35–1.19 (m)			H-16b	1.65 (m)		
H-17a	1.83–1.71 (m)	C-17	18.1	H-17a	1.70 (m)	C-17	18.0
H-17b				H-17b	2.00 (m)		
H-18a	1.67–1.58 (m)	C-18	32.1	H-18a	1.35 (m)	C-18	32.0
H-18b				H-18b	1.72 (m)		
H-19	4.15–4.02 (m)	C-19	68.8	H-19	3.96 (m)	C-19	68.7
H-20	1.10 (d, 6.0 Hz)	C-20	21.4	H-20	1.12 (d, 6.5 Hz)	C-20	21.4
–	–	C-21	148.1	–	–	C-21	148.0
–	–	C-22	167.1	–	–	C-22	167.1
H-23	4.15–4.02 (m)	C-23	65.9	H-23	4.15 (t, 6.5 Hz)	C-23	65.9
H-24	1.67–1.60 (m)	C-24	28.4	H-24	1.62 (m)	C-24	28.4
H-25	1.37–1.28 (m)	C-25	25.8	H-25	–	C-25	25.8
H-26–	1.28–1.20 (m)	C-26–		–	–	–	–
H-34		C-34		–	–	C-38	175.4
–	–	C-38	175.5				

Tabla 6 Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de crambescidina-816.



Espectro 1. ^1H RMN de la muestra de *Crambe crambe*.



Espectro 2. ^{13}C RMN de la muestra de *Crambe crambe*.

En la siguiente figura se representa el núcleo de la crambescidina-816 y la asignación de los protones realizada, que se indica en color azul.

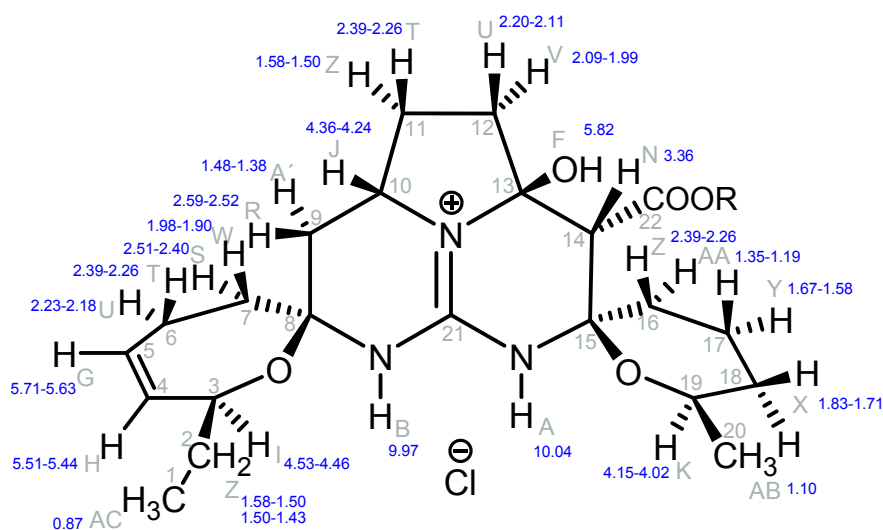


Figura 41. Asignación de las señales del espectro ^1H -RMN correspondientes al núcleo de la Crambescidina-816 (en CDCl_3).

Análogamente, se presenta la asignación de los desplazamientos químicos en ppm (δ) de los carbonos, que se indican en color rojo.

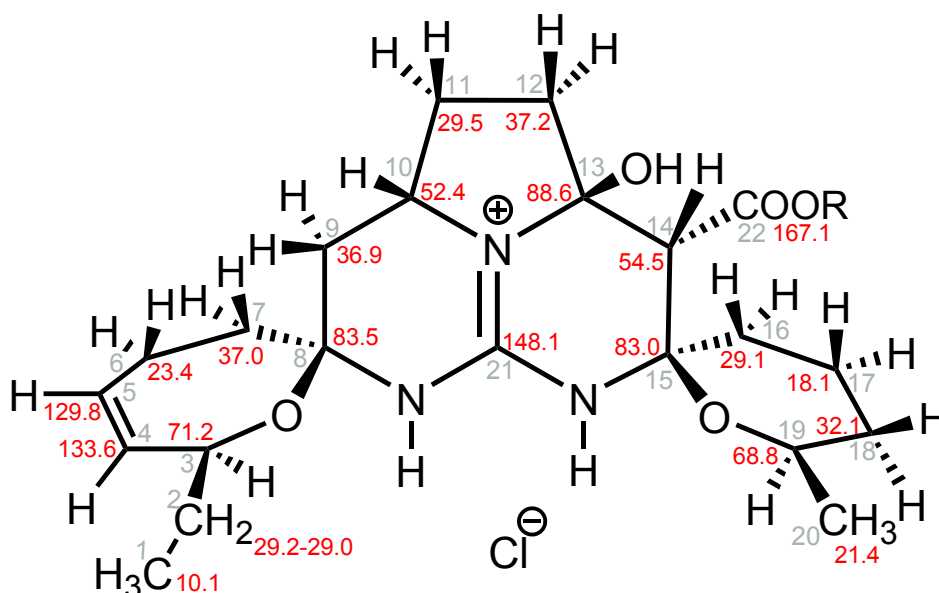


Figura 42. Asignación de las señales del espectro ^{13}C -RMN correspondientes al core de la Crambescidina-816 (en CDCl_3).

En los espectros de ^1H y ^{13}C de la muestra, además de las señales de la crambescidina 816, se observan señales asignables a la crambescidina-800 (Tabla 7).¹⁴⁹

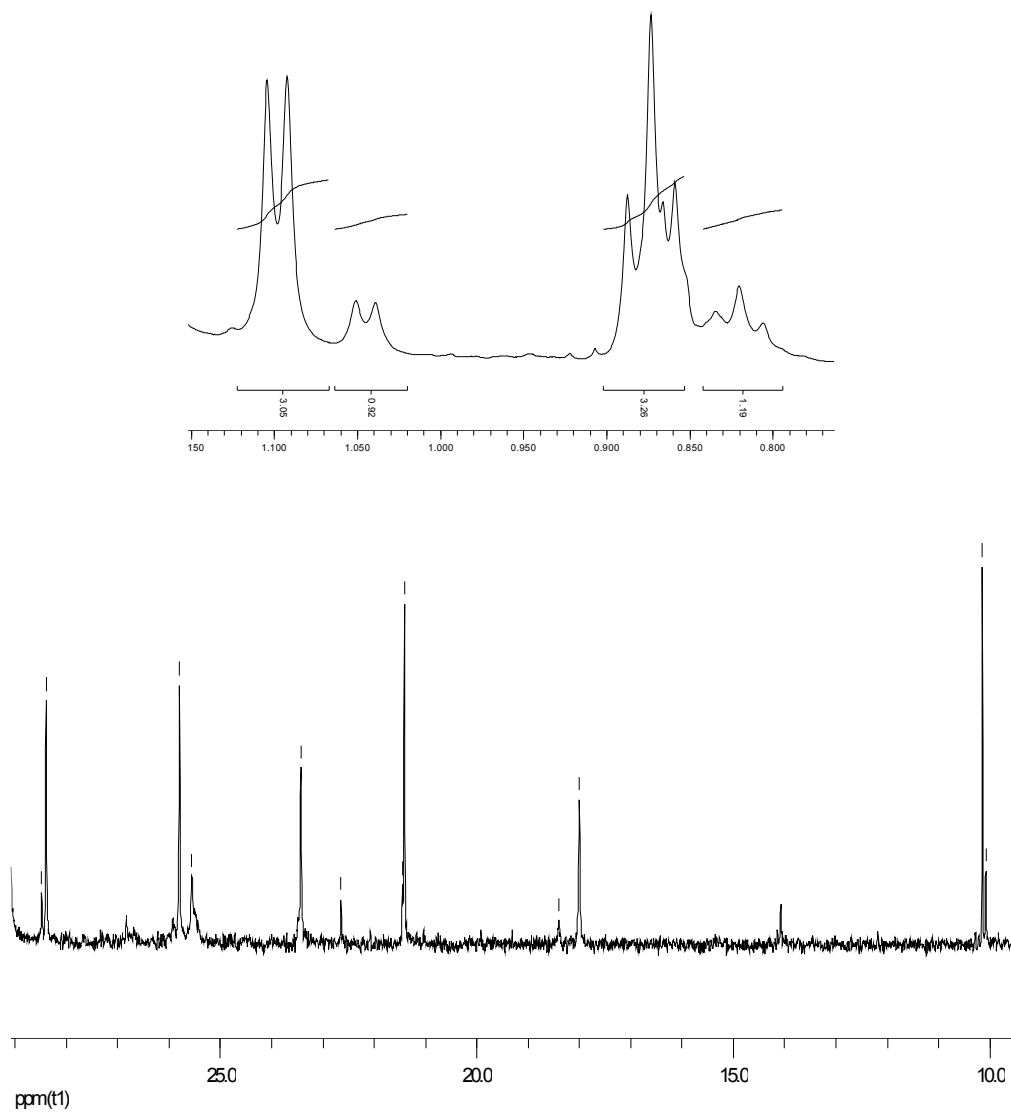


Figura 43. Ampliaciones del espectro de ^1H y ^{13}C de la muestra.

La asignación propuesta para la crambescidina-800 y la asignación realizada en la bibliografía se presentan en la siguiente tabla.

Asignación propuesta				Asignación bibliografía¹⁴⁹			
	Δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)
H-1	0.82 (t, 7.2 Hz)	C-1	10.1	H-1	0.83 (t, 7.2 Hz)	C-1	10.1
-	-	C-3	71.0	-	-	C-3	71.0
-	-	C-5	129.8	-	-	C-5	129.9
-	-	C-10	53.9	-	-	C-10	53.9
-	-	C-11	30.6	-	-	C-11	30.7
-	-	C-13	51.9	-	-	C-13	51.8
H-14	2.94 (d, 4.4 Hz)	C-14	48.9	H-14	2.94 (d, 4.8 Hz)	C-14	49.6
-	-	C-15	80.7	-	-	C-15	80.7
-	-	C-19	67.2	-	-	C-19	67.2
H-20	1.04 (d, 6.1 Hz)	C-20	21.4	H-20	1.05 (d, 6.5 Hz)	C-20	21.4
-	-	C-21	148.8	-	-	C-21	148.8
-	-	C-22	168.8	-	-	C-22	168.3
-	-	C-23	65.5	-	-	C-23	65.4
-	-	C-24	28.5	-	-	C-24	28.5

Tabla 7. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de crambescidina-800.

3.3.2 Resonancia magnética nuclear de ^{15}N

Utilizando experimentos de detección inversa de ^{15}N - ^1H fue posible asignar los desplazamientos químicos de -262.1 ppm para N^1 , -242.8 ppm para N^2 y -271.4 para N^3 en base a los (HSQC y HMBC; Figura 44 y Tabla 8).

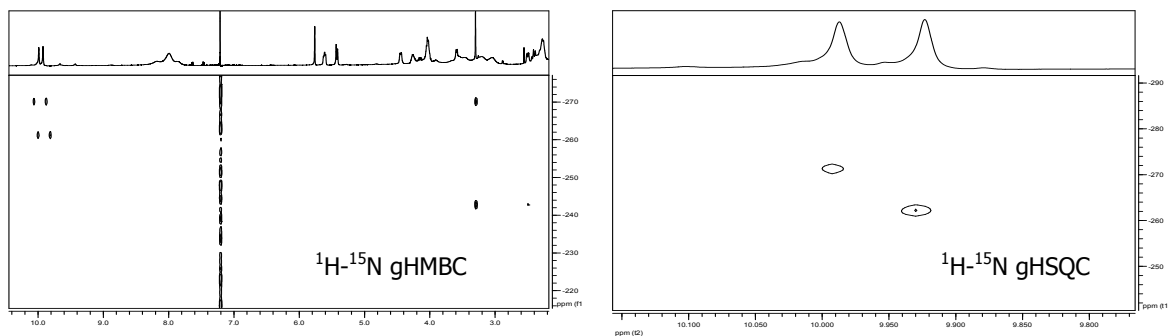


Figura 44. ^{15}N - ^1H HSQC y HMBC de crambescidina 816.

	δ (ppm)
N^1	-262.1
N^2	-242.8
N^3	-271.4

$J^1(\text{N}^1\text{-H}) = J^1(\text{N}^2\text{-H}) = 93.9$ Hz

Tabla 8. Desplazamientos químicos de ^{15}N de crambescidina 816.

3.3.3 Espectrometría de masas

La medición de la masa exacta de la muestra obtenida de la esponja proporcionó los siguientes valores (Figura 45):

Valores obtenidos	Valores publicados ^{149a}
HRMS [ESI (m/z) para (C ₄₅ H ₈₀ N ₆ O ₇ + H) ⁺ Obtenido: 817.6184 Calculado: 817.6161 Δ = 2.73 ppm	HRFABMS para (C ₄₅ H ₈₀ N ₆ O ₇ + H) ⁺ Obtenido: 817.6151 Calculado: 817.6161 Δ = 1.60 ppm
HRMS [ESI (m/z) para (C ₄₅ H ₇₉ N ₆ O ₅ + H) ⁺ Obtenido: 801.6221 Calculado: 801.6212 Δ = 0.1 ppm	HRMS [ESI (m/z) para (C ₄₅ H ₇₉ N ₆ O ₅ + H) ⁺ Obtenido: 801.6205 Calculado: 801.6212 Δ = 1.3 ppm

Compound Table

Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 1: C45 H81 N6 O7	0.28	817.6189	C45 H81 N6 O7	-2.73

Compound Label	m/z	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C45 H81 N6 O7	817.6184	0.28	Targeted MS/MS	817.6189

MS Zoomed Spectrum

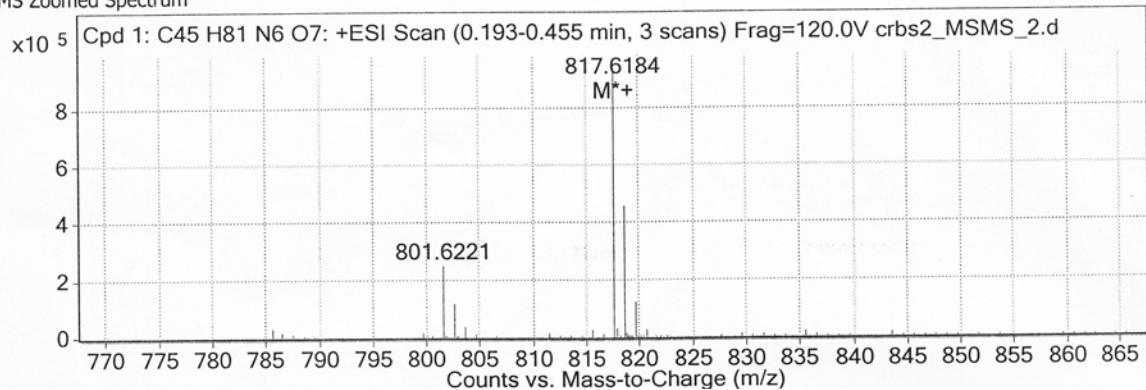


Figura 45. Espectro de masas de la muestra.

3.3.4 Espectroscopía de infrarrojo

IR [$\bar{\nu}$ (cm^{-1}), neat]: 3450–3050 (s, N–H, O–H), 2967 (s, ν_{as} CH₃), 2926 (s, ν_{as} CH₂), 2854 (s, ν_{s} CH₂), 2050 (w), 1735 [s, C(=O)–O], 1646 [s, C(=N)–N, C(=O)–N], 1615 [s, C(=N)–N], 1464 (s, ν_{s} CH₂), 1261 [s, ν_{as} C–C(=O)–O], 1089 (s, C–O), 1015 (s, C–O), 801 (s), 758 (s).

s = strong, w = weak, ν_{as} = asymmetric stretching, ν_{s} = symmetric stretching, ν^{\cdot} = scissoring.

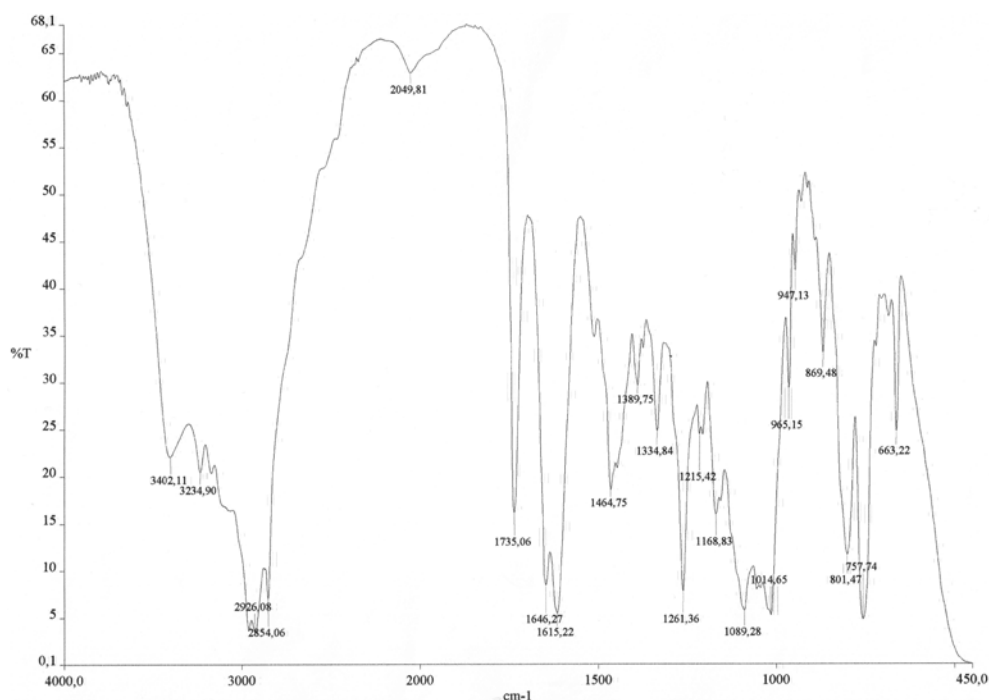


Figura 46. Espectro de infrarrojo de la muestra.

En la siguiente tabla se indican las señales del espectro de infrarrojo para la crambescidina-816, y para el ester metílico del núcleo de crambescidina-800.

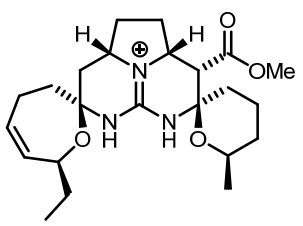
Compuesto	ν (cm^{-1})	Referencia
Crambescidina 816	3350–3250, 1734, 1644–1616	<i>J. Nat. Prod.</i> 1993 , <i>56</i> , 1007–1015
	3230, 3106, 2968, 2934, 2872, 1735, 1659, 1614, 1437, 1204, 1165, 1089, 1016, 924, 728	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> 1994 , <i>116</i> , 549–557

Tabla 9. Valores de infrarrojo citados en bibliografía

3.4 Conclusiones

Se aislaron los compuestos crambescidina-816 y crambescidina-800 de la esponja *Crambe crambe*. Dicho aislamiento proporcionó 57 mg de una muestra que es una mezcla 3:1 de ambos compuestos, como se corroboró por resonancia magnética nuclear de protón.

La caracterización, utilizando las técnicas espectroscópicas indicadas anteriormente, permitió observar diferencias a nivel de 2 carbonos en el núcleo de crambescidina-816. Por comparación con los valores asignados para ptillomycalina-A, podemos decir que nuestros valores se asemejan más que los reportados por Jares-Erijman.¹⁴⁹

Capítulo 4
Planteamiento sintético de la crambescidina 816 y compuestos
relacionados.

4.1 Introducción

En años recientes se han aislado de esponjas marinas un elevado número de metabolitos con estructuras de alcaloides.^{152,153} Entre estos metabolitos se encuentran los que poseen un núcleo de guanidinio y que son denominados crambescidinas. La Figura 1 muestra algunos ejemplos; la ptilomycalina-A (**1**)¹⁵⁴ y la crambescidina-800 (**2**)¹⁵⁵, se diferencian en los distintos grados de oxidación de la cadena lateral en C-14. Por su parte, la 13,14,15-isocrambescidina-800 (**3**)¹⁵⁶ y la crambescidina-816 (**4**)^{155,157} son ejemplos que se diferencian en el grado de oxidación y en la estereoquímica de los centros carbonados del núcleo pentacíclico. La crambescina-A (**5**)¹⁵⁸ y las batzelladinas-B (**6**)¹⁵⁹ y -F (**7**)¹⁶⁰, también incluidas en la Figura 47, presentan más de un núcleo de guanidinio.

¹⁵² M. G. König, D. A. Wright, *Planta Med.* **1996**, *62*, 193–211.

¹⁵³ (a) R. G. S. Berlinck, A. C. B. Burtoloso, M. H. Kossuga, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 919–954. (b) R. G. S. Berlinck, M. H. Kossuga, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 516–550. (c) R. G. S. Berlinck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 617–649. (d) R. G. S. Berlinck, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 339–365. (e) R. G. S. Berlinck, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 377–409. (f) R. G. S. Berlinck, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1995**, *66*, 119–295.

¹⁵⁴ (a) I. Ohtani, T. Kusumi, H. Kakisawa, Y. Kashman, S. Hirst, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8472–8479. (b) I. Ohtani, T. Kusumi, H. Kakisawa, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2525–2528. (c) Y. Kashman, S. Hirsh, O. J. McConnell, I. Ohtani, T. Kasumi, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8925–8926.

¹⁵⁵ E. A. Jares-Erijman, R. Sakay, K. L. Rinehart, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5712–5715.

¹⁵⁶ E. A. Jares-Erijman, A. L. Ingrum, J. R. Carney, K. L. Rinehart, R. Sakai, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4805–4808.

¹⁵⁷ R. G. S. Berlinck, J. C. Braekman, D. Dalozze, I. Bruno, R. Riccio, S. Ferri, S. Stampinato, E. Speroni, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1007–1015.

¹⁵⁸ R. G. S. Berlinck, J. C. Braekman, D. Dalozze, K. Hallenga, R. Ottinger, I. Bruno, R. Riccio, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6531–6534.

¹⁵⁹ A. D. Patil, N. V. Kumar, W. C. Kokke, M. F. Bean, A. J. Freyer, C. De Brosse, S. Mai, A. Truneh, D. J. Faulkner, B. Carte, A. L. Breen, R. P. Hertzberg, R. K. Johnson, J. W. Westley, B. C. M. Potts, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1182–1188.

¹⁶⁰ A. D. Patil, A. J. Freyer, P. B. Taylor, B. Canté, G. Zuber, R. K. Johnson, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1814–1819.

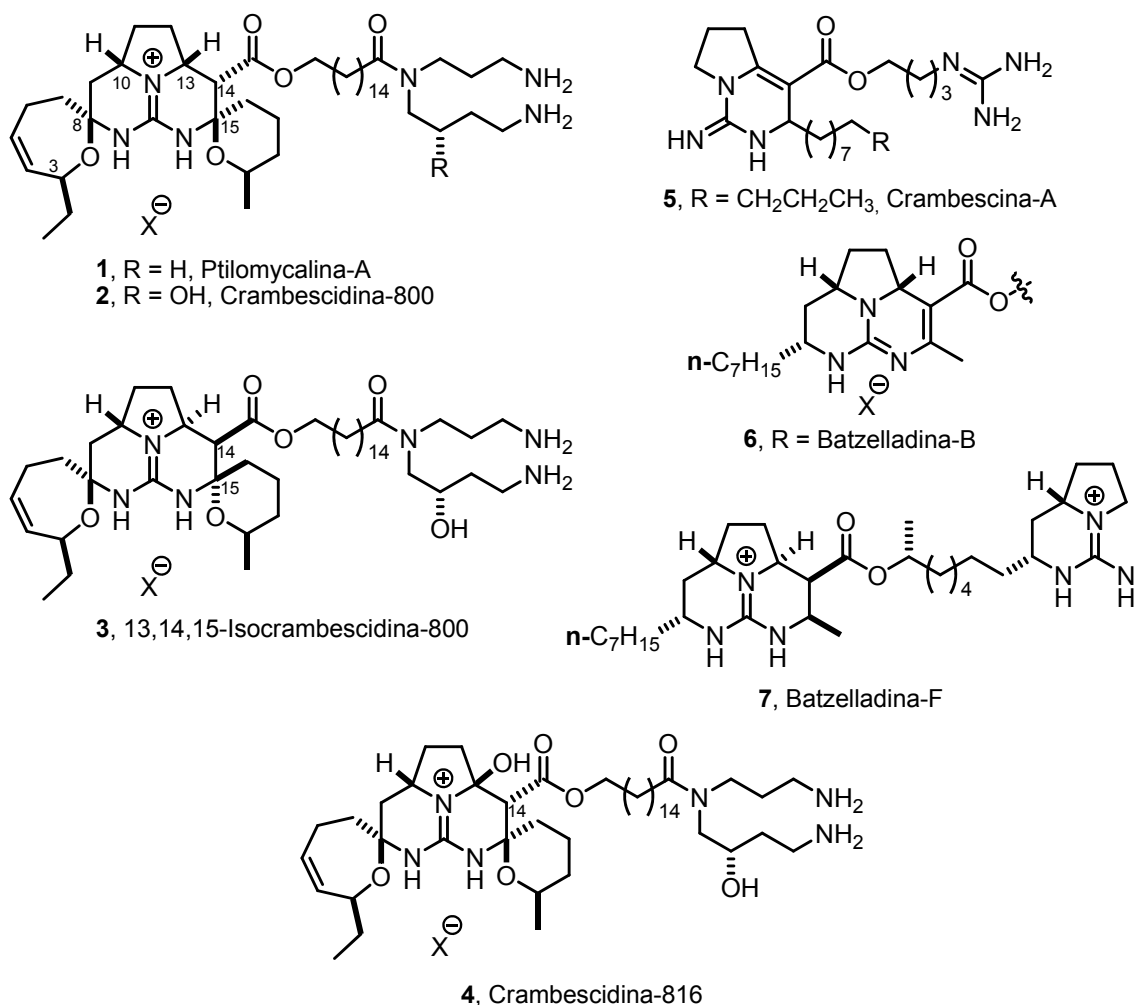


Figura 47. Alcaloides, aislados de esponjas marinas, con uno (1–4) o varios (5–7) núcleos de guanidinio.

En las moléculas que contienen la funcionalidad de guanidina se observa que ésta tiene una gran incidencia en la actividad biológica de las mismas, lo que se atribuye a las diversas formas en las que el ion guanidinio puede participar en interacciones no covalentes.¹⁶¹ La crambescidina-800 (2), y varios otros alcaloides de la misma familia, presentan baja y media actividad en líneas celulares de cáncer en humanos y se investigan como agentes antineoplásicos.^{154,155,162,163,164} Las batzelladinas-A y -B (6), son los primeros compuestos de origen natural que inhiben la infección en humanos (CD4) por el

¹⁶¹ J. V. Greenhill, P. Lue, *Prog. Med. Chem.* **1993**, 30, 203–326.

¹⁶² (a) J.-G. Shi, F. Sun, K. L. Rinehart, WO Pat. 9846575, October 22, 1998; CAN 129:288014
(b) K. L. Rinehart, E. A. Jares-Erijman, U.S. Patent 5,756,734, May 26, 1998; CAN 129:38964.

¹⁶³ R. Tavares, D. Daloz, J. C. Braekman, E. Hajdu, G. Muricy, R. W. M. van Soest, *Biochem. Syst. Ecol.* **1994**, 22, 645–646.

¹⁶⁴ Z. D. Aron, H. Pietraszkiewicz, L. E. Overman, F. Valeriote, C. Cuevas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3445–3449.

HIVgp-120, que es un paso crítico en el ciclo del virus de SIDA.¹⁵⁹ Los alcaloides con estructuras de batzelladinas son también referencias como inhibidores de otras interacciones entre proteínas. Así, por ejemplo, las batzelladinas F (**7**) y G inducen la disociación de la proteína tirosina quinasa p56 en sus complejos con el CD4.¹⁶⁰

A pesar del amplio rango de actividades que presentan los alcaloides con estructuras de crambescidina, hay un conocimiento muy limitado sobre las relaciones estructura/actividad de estas moléculas naturales. Ha quedado bien establecido que la presencia de la cadena lateral es muy importante para que desarrolle actividad anticancerígena.^{164,165} Sin embargo, las amidas sencillas de ácidos ω -hidroxicarboxílicos, y en ausencia de funciones de guanidinio, muestran tener una actividad significativamente inferior.^{154b,166} Se conoce muy poco de la medida en que la cadena en C-14 influye en la bioactividad de estas moléculas. Una de las razones es la ausencia de estudios sistemáticos, debido a la dificultad de eliminar la cadena sin afectar el sistema pentacíclico que incluye el fragmento guanidínico. Así, Kashman y col. muestran en la ptilomycalina-A,^{154b} que la hidrólisis ácida o básica, o la reducción con hidruros metálicos, o la hidrogenación/oxidación, da siempre lugar a una mezcla intratable de productos. La dificultad de acceder al núcleo pentacíclico de la ptilomycalina-A (**1**) por degradación, se mitiga por ser el único de la familia que se ha podido aislar de fuente natural.¹⁶⁷ Por todo ello, la síntesis química es, en la práctica, la única posibilidad de acceso a los diferentes núcleos pentacíclicos presentes en los alcaloides de crambescidinas y análogos.

¹⁶⁵ (a) C. G. Moore, P. J. Murphy, H. L. Williams, A. T. McGown, N. K. Smith, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 251–254. (b) A. Georgieva, M. Hirai, Y. Hashimoto, T. Nakata, Y. Ohizumi, K. Nagasawa, *Synthesis* **2003**, 1427–1432. (c) G. P. Black, S. J. Coles, A. Hizi, A. G. Howard-Jones, M. B. Hursthouse, A. T. McGown, S. Loya, C. G. Moore, P. J. Murphy, N. K. Smith, N. D. A. Walshe, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3377–3381. (d) B. B. Snider, Z. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 549–557

¹⁶⁶ E. Palagiano, S. De Marino, L. Minale, R. Riccio, F. Zollo, M. Iorizzi, J. B. Carré, C. Debitus, L. Lucarain, J. Provost, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3675–3682.

¹⁶⁷ K. M. Meragelman, T. C. McKee, J. B. McMahon, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1165–1167.

Además de la general y significativa bioactividad antitumoral, antiviral y antifúngica^{154,166,168,169,170,171} o la inhibitoria a Na⁺, K⁺, y Ca²⁺-ATPasas¹⁵⁹ que presentan los alcaloides crambescidínicos, se identifican otras actividades más específicas en estructuras particulares de estas moléculas. Una de ellas, la crambescidina-816 (**4**) tiene un efecto antagonista al Ca²⁺ (IC₅₀ 1.5 × 10⁻⁴ μM) más potente que la nifedipina (IC₅₀ 1.2 μM), bloqueador selectivo de canales de Ca²⁺ del tipo L,^{156,157} actividad que no ha sido encontrada en ningún otro miembro de la familia. Este alcaloide se aísla de la esponja *Crambe crambe* que habita incrustada en zonas rocosas y a escasa profundidad en el litoral mediterráneo.

El trabajo que se describe a continuación se ha desarrollado dentro de un proyecto multidisciplinar de investigación en el marco del Eje C de referencia CTQ 2007-61024. Tiene entre sus objetivos, el aislamiento del medio natural de la crambescidina-816 y el valorar esquemas de síntesis que permitan preparar el núcleo pentacíclico del compuesto crambescidina-816, siguiendo una simplificación que permita el estudio de las relaciones de estructura/actividad en modelos más simples. Estos estudios, procurarán las bases donde desarrollar protocolos que faciliten profundizar en las singularidades de los canales de Ca²⁺ dependiente de voltaje, frente a los canales de Na⁺ y K⁺. El modelo farmacológico seguido es similar al publicado por nuestro grupo de investigación sobre poliéteres naturales (brevetoxinas), en comparación con modelos de diseño no naturales generados por síntesis química, evaluando los efectos que causan sobre canales de Na⁺ dependientes de voltaje.¹⁷²

¹⁶⁸ J. E. H. Lázaro, J. Nitchou, N. Mahmoudi, J. A. Ibane, G. C. Mangalindan, G. P. Black, A. G. Howard-Jones, C. G. Moore, D. A. Thomas, D. Mazier, C. M. Ireland, G. P. Concepcion, P. J. Murphy, B. Diquet, *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 583–590.

¹⁶⁹ M. Laille, F. Gerald, C. Debilús, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 167–170.

¹⁷⁰ A. Olszewski, K. Sato, Z. D. Aron, F. Cohen, A. Harris, B. R. McDougall, W. E. Robinson, Jr., L. E. Overman, G. A. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14079–14084.

¹⁷¹ S. Aoki, *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 2325–2330.

¹⁷² M. L. Candenás, F. M. Pinto, C. G. Cintado, E. Q. Morales, I. Brouard, M. T. Díaz, M. Rico, E. Rodríguez, R. M. Rodríguez, R. Pérez, R. L. Pérez, J. D. Martín, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1921–1942.

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje pertenecen a la superfamilia de canales estructuralmente homólogos, que también incluye a los de Na^+ y K^+ .¹⁷³ En condiciones fisiológicas, los canales de Ca^{2+} tipo-L²² son permeables a cationes divalentes (p. ej. Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+}) e impiden la difusión de cationes monovalentes en una relación $\sim 1000:1$.¹⁷⁴ Aunque los centros de recepción externa de los cationes y la interna de selectividad, en estos tres tipos de canales, han de ser diferentes, el conocimiento de la estructura del canal bacteriano de K^+ (KcsA)¹⁷⁵ permite hacer estudios de modelización en el resto de sus homólogos estructurales. Así, la combinación del conocimiento estructural del KcsA y la alta afinidad de los canales de Na^+ con las toxinas naturales¹⁷⁶ tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX), ha permitido definir, en estos canales, el centro receptor del catión guanidinio y modelizar la estructura del vestíbulo de recepción catiónica exterior del poro.^{177,178} Tal situación no ocurre en los canales de Ca^{2+} tipo L, a pesar de ser alta su selectividad. En ausencia de cationes de Ca^{2+} , el canal muestra ser muy permeable a cationes monovalentes inorgánicos (Na^+ , Li^+) y orgánicos (metilamonio, di-, tri- y tetrametilamonio [TMA]), lo que hace suponer la existencia de un diámetro interno de, al menos, 6 Å para poder acomodar al ion TMA.¹⁷⁹ Los canales de Ca^{2+} tipo L son moderadamente sensibles a dihidropiridinas (DHP; p. ej., nifedipina), fenilalquilaminas (p. ej., verapamil), benzotiazepinas (p. ej., diltiazem), por lo que se les refiere normalmente como receptores dihidropiridínicos. La alta afinidad observada por canales de Ca^{2+} tipo L al alcaloide marino crambescidina-816, demuestra la existencia de un centro receptor específico, lo que, en combinación con el conocimiento estructural que se dispone, podría dar una visión de la estructura del lugar de recepción

¹⁷³ Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se clasifican según los tiempos de activación/inactivación en transitorios (tipo T) o duraderos (tipo L).

¹⁷⁴ B. Hille, "Ionic Channels of Excitable Membranes", 2nd ed., **1992**, Sinauer, Sunderland, MA.

¹⁷⁵ D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon *Science* **1998**, *280*, 69–77.

¹⁷⁶ W. A. Catterall, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, *20*, 15–43.

¹⁷⁷ G. M. Lipkind, H. A. Fozzard, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1–13.

¹⁷⁸ W. A. Catterall, *Neuron* **2000**, *26*, 13–25.

¹⁷⁹ G. M. Lipkind, H. A. Fozzard, *Biochem.* **2001**, *40*, 6786–6794.

catiónica y, quizás también, de las causas estructurales de la nula selectividad en ausencia del catión Ca^{2+} .

La comprensión de las peculiaridades de los canales de Ca^{2+} tipo L y la relación estructura/actividad de la elevada actividad antagonista publicada del compuesto natural crambescidina-816,^{156,157} estarán basados en los resultados que se alcancen relacionados con: (i) de los estudios conformacionales del compuesto natural en presencia de diferentes fuentes de Ca^{2+} y para diferentes contraiones, y (ii), los estudios de bioactividad sobre modelos sintéticos de crambescidina-816 de estructuras más simples.

4.2 Antecedentes sintéticos de crambescidinas.

Se han publicado las síntesis de muchos de los componentes naturales de la familia de las crambescidinas.^{165a,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190} Entre los trabajos publicados, los del grupo de Snider^{165a} y Overman³³⁻³⁸ son los únicos que implican las síntesis completas de los núcleos pentacíclicos de las crambescidinas, incluyendo los apéndices que se localizan en C-14. La síntesis de Snider (Esquema 4) se desarrolla a partir de un precursor acíclico (**12**) en el que se encuentra presente la totalidad del esqueleto carbonado. El sistema cíclico se genera de forma simultánea al ion guanidinio. El desarrollo del esquema sintético lo aplicó a la síntesis del esqueleto pentacíclico de la ptilomycalina-A (**8**).^{165a} El fragmento tricíclico contiene el ion guanidinio de estructura 2a¹,5,6-triazaacenaftileno, que es casi planar, con una orientación *cis* en los hidrógenos angulares que flanquean en el sistema al nitrógeno pirrolidínico. La naturaleza axial de los oxígenos en los dos fragmentos espiránicos, permite construir con posterioridad los anillos de oxano y oxepano, debido a que sus configuraciones coinciden con las de mayor estabilidad termodinámica. Desde esta racionalidad, las primeras desconexiones se hacen sobre los espirocetros en C-8 y C-15, lo que directamente genera el intermedio tricíclico *cis*-hexahidro-2a¹,5,6-triazaacenaftileno **10** (Esquema 4). La síntesis del intermedio tricíclico **10** la realiza Snider desde el precursor acíclico de bisenona **12**, por condensación de *O*-metilisotiourea formando, en primer lugar, el biciclo **11** seguido de ciclación al triciclo **10** mediante posterior tratamiento con

¹⁸⁰ S. Louwrier, M. Ostendorf, A. Tuynman, H. Hiemstra, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 905-908.

¹⁸¹ A. V. Rama Rao, M. K. Gurjar, J. Vasudevan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1369-1370.

¹⁸² L. Heys, C. G. Moore, P. J. Murphy, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 57-67.

¹⁸³ K. Nagasawa, A. Georgieva, H. Koshino, T. Nakata, T. Kita, Y. Hashimoto, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 177-180.

¹⁸⁴ D. S. Coffey, A. I. McDonald, L. E. Overman, M. H. Rabinowitz, P. A. Renhowe, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4893-4903.

¹⁸⁵ D. S. Coffey, L. E. Overman, F. Stappenbeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4904-4914.

¹⁸⁶ D. S. Coffey, A. I. McDonald, L. E. Overman, F. Stappenbeck, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6944-6945.

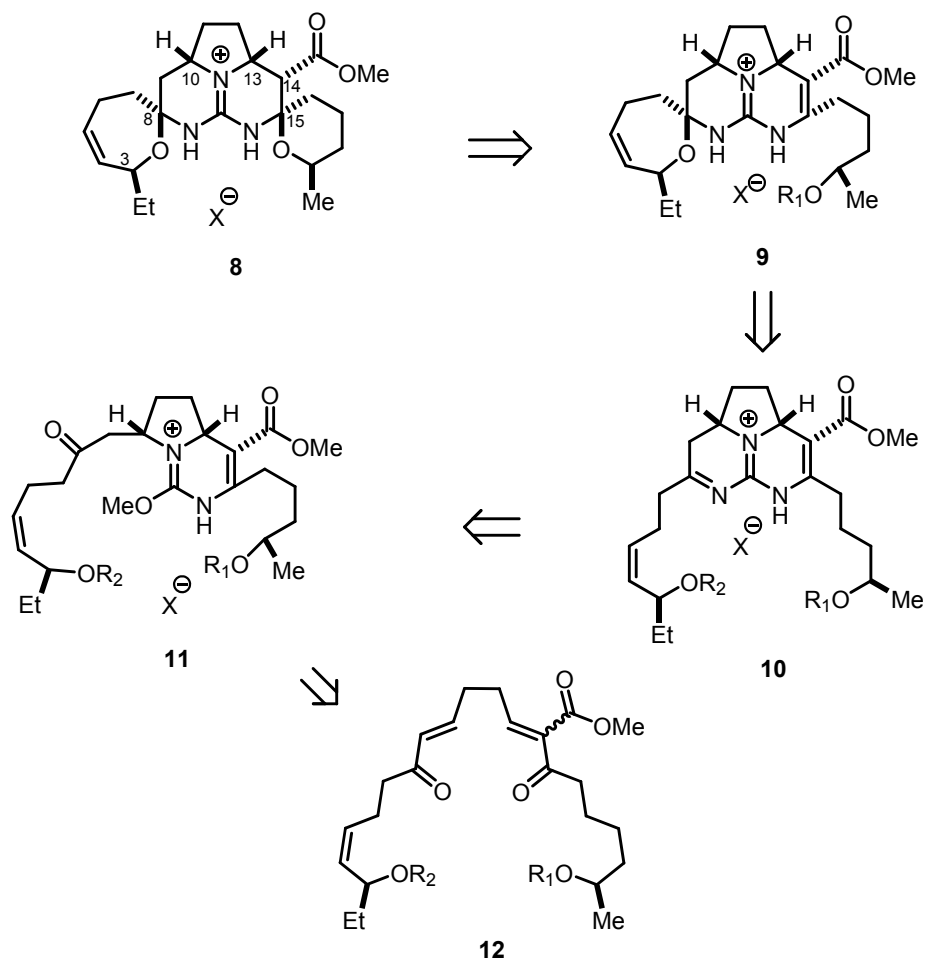
¹⁸⁷ L. E. Overman, M. H. Rabinowitz, P. A. Renhowe, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2657-2658.

¹⁸⁸ Z. D. Aron, L. E. Overman, *Chem. Commun.* **2004**, 253-265.

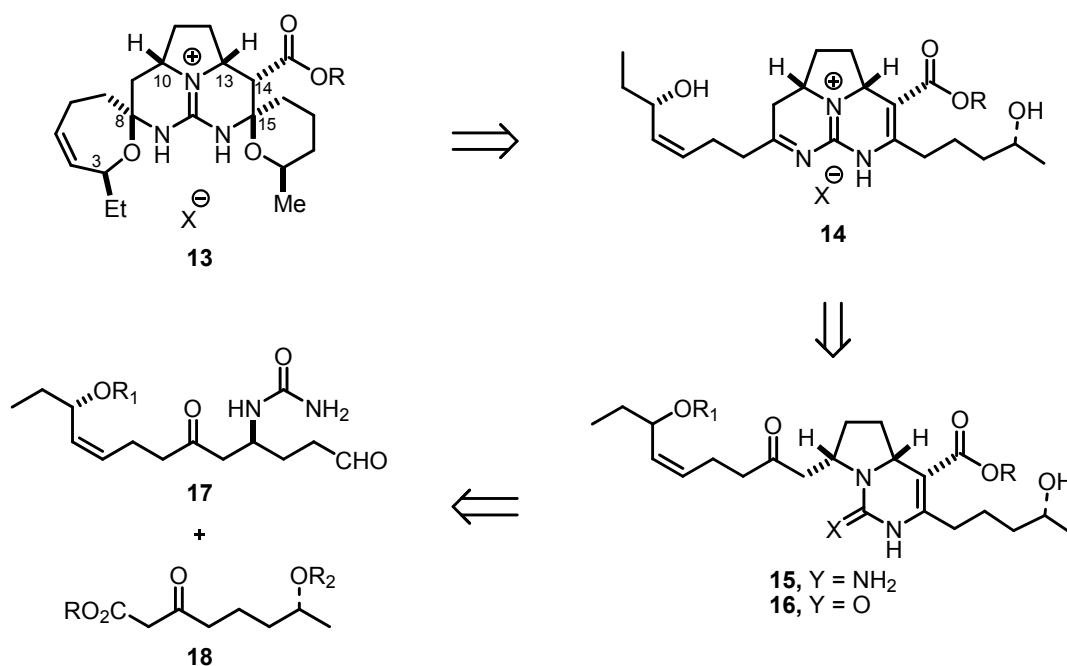
¹⁸⁹ Z. D. Aron, L. E. Overman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3380-3390.

¹⁹⁰ C. G. Moore, P. J. Murphy, H. L. Williams, A. T. McGown, N. K. Smith, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11771-11780.

amoniaco en metanol.^{165a} La primera ciclación genera, preferentemente, el compuesto con los hidrógenos pirrolidínicos con disposición *cis*. En fechas recientes, el grupo de Murphy¹⁹⁰ hace la síntesis total de la crambescidina-359, compuesto natural que no dispone de apéndice de éster carboxílico en C-14,¹⁵³ siguiendo una metodología parecida, por doble adición tipo Michael de guanidina a una bis-enona convenientemente funcionalizada, que contiene la totalidad del esqueleto carbonado presente en el compuesto natural.



Esquema 4. Aproximación retrosintética de Snider en la síntesis del esqueleto pentacíclico de la ptilomycalina-A (**1**).^{165a}



Esquema 5. Aproximación retrosintética de Overman en la síntesis del esqueleto pentacíclico de la ptilomycalina-A (**1**)¹⁸⁷ y crambescidina-800 (**2**).¹⁸⁴

En la preparación de las crambescidinas, la interconversión del núcleo pentacíclico a uno tricíclico, que mantiene la función guanidinio, es una simplificación sintética que ha tenido una valoración muy positiva por los diversos investigadores que han trabajado en la síntesis de estos compuestos. Así, Overman realizó las síntesis totales de los compuestos ptilomycalina-A (**1**)¹⁸⁷ y crambescidina-800 (**2**)¹⁸⁴ siguiendo el esquema retrosintético representado en el Esquema 5. La desconexión del enlace C-N en el intermedio tricíclico **14**, producto de la desconexión de los oxígenos en las unidades espiroaminales presentes en los carbonos C-8 y C-15, conduce al intermedio bicíclico de éster carboxílico con la funcionalidad 1-iminohexahidropirrolo[1,2-c]pirimidina y su equivalente sintético derivado de la urea **16**. La síntesis de los intermedios tipo **16** la realiza Overman^{191,192} siguiendo una metodología que es variante de la desarrollada por Biginelli, un siglo atrás,¹⁹³ en la síntesis de dihidropirimidonas. La mayor estabilidad termodinámica del estereoisómero *cis*, permitió generalizar esta metodología en la preparación de ésteres carboxílicos de *cis*- y *trans*-hidro-pirrolopirimidonas, mediante condensación del derivado acíclico de

¹⁹¹ L. E. Overman, M. H. Rabinowitz, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3235–3237.

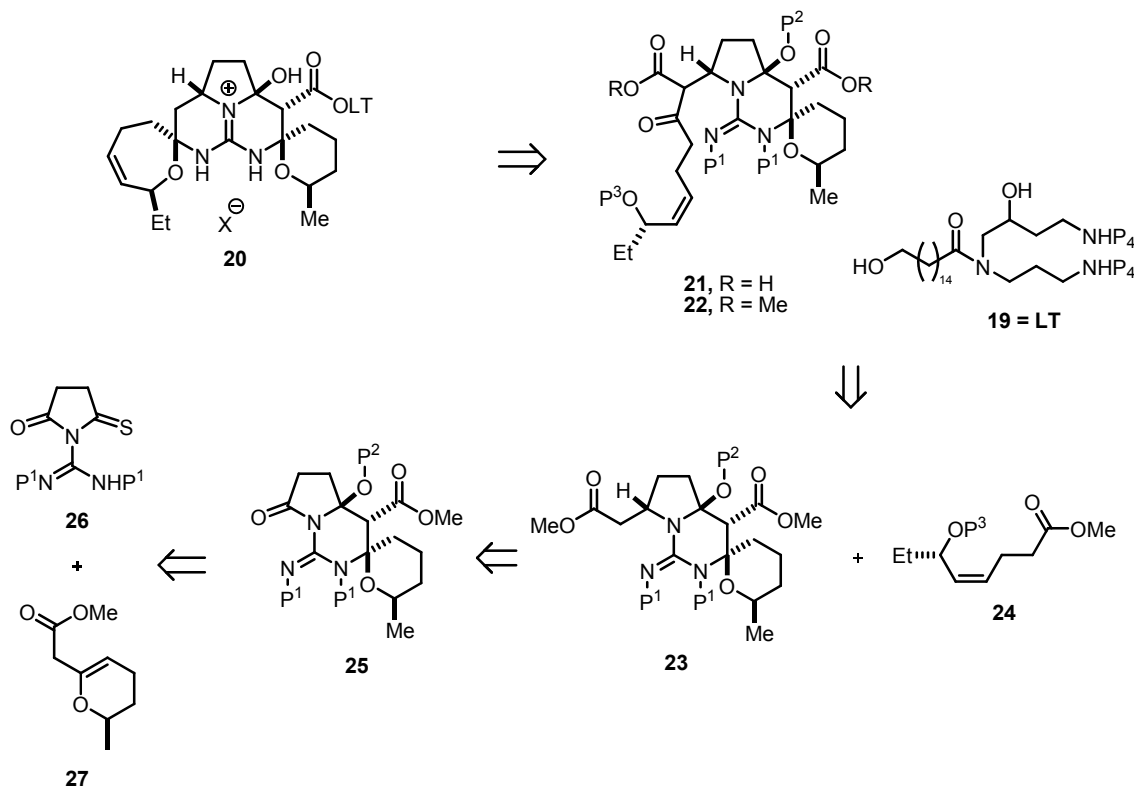
¹⁹² A. I. McDonald, L. E. Overman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1520–1528.

¹⁹³ P. Biginelli, *Gazz. Chim. Ital.* **1883**, *23*, 360.

la urea **17** con el correspondiente acetoacetato **18**. Uno de los atractivos de esta síntesis es la convergencia del proceso, lo que permite distribuir el esqueleto carbonado de las crambescidinas en dos fragmentos de complejidad equivalente. Siguiendo esta metodología, Overman y col. cumplieron con la síntesis total enantioselectiva de la crambescidina-800 (**2**)¹⁸⁴, la de 13,14,15-isocrambescidina-800.^{185,186} y la ptilomycalina-A (**1**),¹⁸⁷ En esta serie de compuestos, de los cuatro posibles estereoisómeros en C-14 y C-15, el termodinámicamente más favorable coincide con el natural.

4.3 Plan de síntesis de la Crambescidina-816 (4).

La estrategia seguida se fundamenta en el esquema retrosintético que propone el Dr. Pedro Noheda en el proyecto de referencia CTQ2007-61024 (Esquema 6). El desarrollo en sentido sintético muestra el plan de trabajo que se sigue en el proyecto.



Esquema 6. Aproximación retrosintética del Dr. Noheda para la síntesis del núcleo de crambescidina-816 (4).

La síntesis total se inicia con la preparación de estructuras tipo **26**, que sirven como elemento central para la posterior elaboración de la guanidina pentacíclica, empleando la siguiente secuencia: a) reacción de la succinimida y reactivo de Lawesson,¹⁹⁴ y b) reacción de la tioamida cíclica obtenida con una carbodiimida o una isotiourea adecuada. Las estructuras tipo **27**, pueden sintetizarse, en forma rracémica o enantioméricamente puras, de acuerdo con la metodología desarrollada por el grupo del Dr. Ley.¹⁹⁵

¹⁹⁴ J. E. Bishop, S. A. Dagam, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1876–1883.

¹⁹⁵ (a) S. V. Ley, B. Lygo, H. Molines, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1984**, 2403–2405. (b) S. V. Ley, P. J. Murray, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1252–1253 (c) S. V. Ley, G. J. Boons,

La preparación de las estructuras tipo **25** se proyecta según un acoplamiento de Eschenmoser¹⁹⁶ de las estructuras **26** y los correspondientes α -bromo ésteres derivados de las estructuras **27**, seguido por las siguientes dos etapas: a) tratamiento con ácido *p*-toluenosulfónico, para así inducir la formación intramolecular de la estructura de guanidina tricíclica y b) introducción del resto oxigenado de la futura posición C-13 presente en la crambescidina-816, mediante una adición intermolecular tipo Michael con control estereoquímico de sustrato. La posterior hidrogenación del producto de acoplamiento da acceso a derivados de la familia de la ptilomycalina-A (Figura 47). Los cálculos de Mecánica Molecular de las correspondientes ureas tricíclicas indican, de manera inequívoca, suponiendo control termodinámico para los procesos, que los transcurso estereoquímicos de las reacciones propuestas conducirán a productos de configuraciones correspondientes a las determinadas para estos productos naturales.¹⁹⁷

La formación de un éster α,β -insaturado se preparará siguiendo la metodología sintética desarrollada por el grupo el Dr. Kishi¹⁹⁸ en la síntesis de la guanidina natural saxitoxina. Una posterior reducción, mediante hidrogenación catalítica o tratamiento con tri-acetoxiborohidruro sódico en presencia de ácido acético,¹⁹⁹ generarán las estructuras tipo **23**. La síntesis proseguirá con el acoplamiento de **23** con el éster **24**, mediante la formación del correspondiente enolato de Li a baja temperatura. La síntesis propuesta para el éster (en el que P³ es un grupo protector de silicio) estará basada en la adición enantioselectiva de dietilzinc a aldehídos, desarrollada por el grupo del Dr. Seebach.²⁰⁰ Tratamiento posterior con base (LiOH) conllevará la formación de los correspondientes ácidos de los ésteres metílicos **22**. La adición de ácido clorhídrico en metanol debería inducir simultáneamente la descarboxilación del β -cetoácido **21**, la desprotección del alcohol secundario con protección de silicio (P³) y la formación de la estructura

R. Downham, K. S. Kim, M. Woods, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7157–7176. (d) G. J. Boons, D. A. Entwistle, S. V. Ley, M. Woods, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5649–5652.

¹⁹⁶ O. David, J. Blot, C. Bellec, M.-C. Fargeau-Bellassoued, G. Haviari, J.-P. Célerier, G. Lhommet, J.-C. Gramain, D. Gardette, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3122–3131.

¹⁹⁷ Estudios realizados en el grupo del Dr. Pedro Noheda.

¹⁹⁸ R. Fujimoto, Y. Kishi, J. F. Blount, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7154–7156.

¹⁹⁹ C. Cimarelli, G. Palmieri, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5557–5563.

²⁰⁰ B. Weber, D. Seebach, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7473–7484.

de guanidina pentacíclica **20**. Dependiendo del ácido a emplear los productos resultantes presentarán diferentes contraiones (X^- en Esquema 6). Finalmente, la crambescidina-816 se preparará mediante reacciones de esterificación del ácido presente en la estructura **20** y un derivado de espermidina **19**. Los análogos de espermidina **19** serán preparados siguiendo la metodología de Hart y colaboradores.²⁰¹

La síntesis se plantea siguiendo criterios de máxima simplificación con el objetivo de que sea eficaz como tecnología de aplicación en investigación farmacéutica.

Los resultados que se describen a continuación son mi aportación en el desarrollo de este proyecto de síntesis.

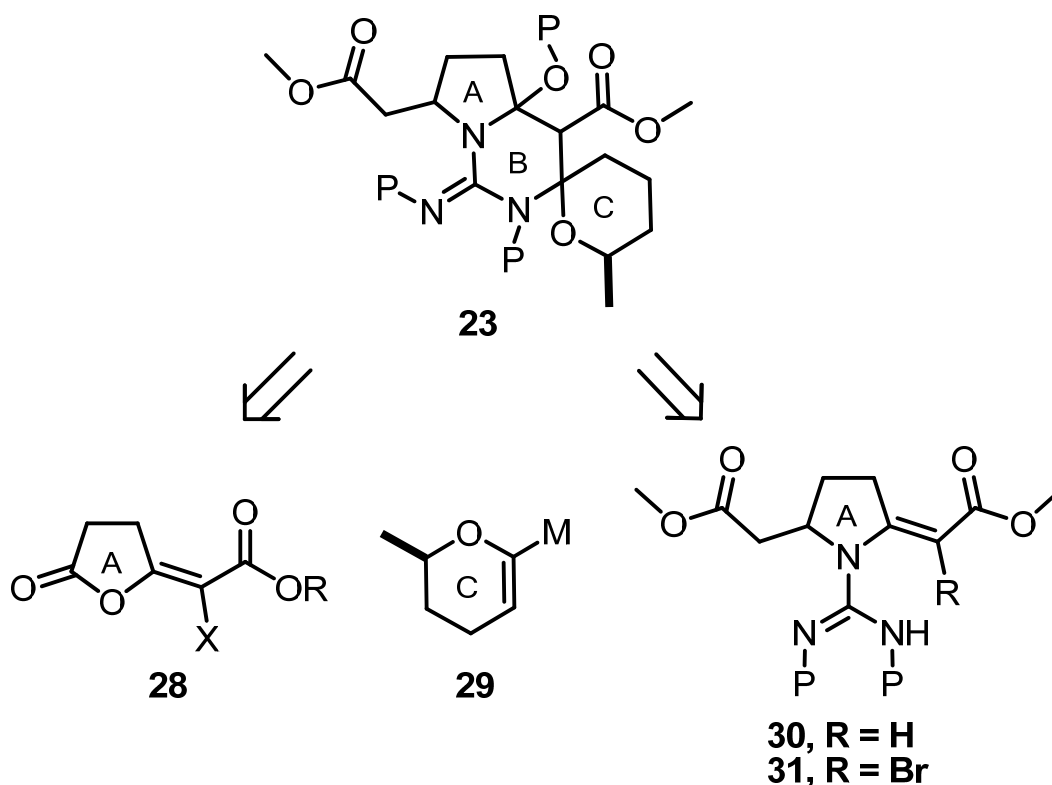
²⁰¹ A-L. Grillot, D. J. Hart, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11377-11392.

4.4 Plan de síntesis del núcleo de Crambescidina-816

4.4.1 Síntesis de posibles compuestos de partida para la construcción del núcleo de crambescidina-816

Siguiendo la propuesta retrosintética planteada, nos centramos inicialmente en la búsqueda de posibles compuestos de partida sobre los que trabajar en la construcción del núcleo pentacíclico de la crambescidina-816 (Esquema 6).

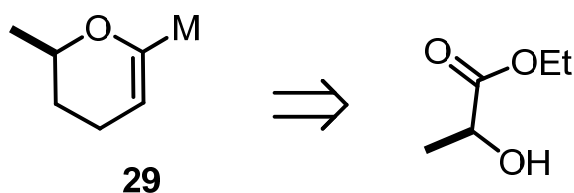
Para la construcción del intermedio sintético **23**, se siguen las alternativas que se exponen en el Esquema 7. Implican la síntesis de **28**, **30-31** y **29**, modelos que disponen respectivamente de los anillos A y C, presentes en el núcleo pentacíclico de las crambescidinas.



Esquema 7. Moléculas de partida a preparar.

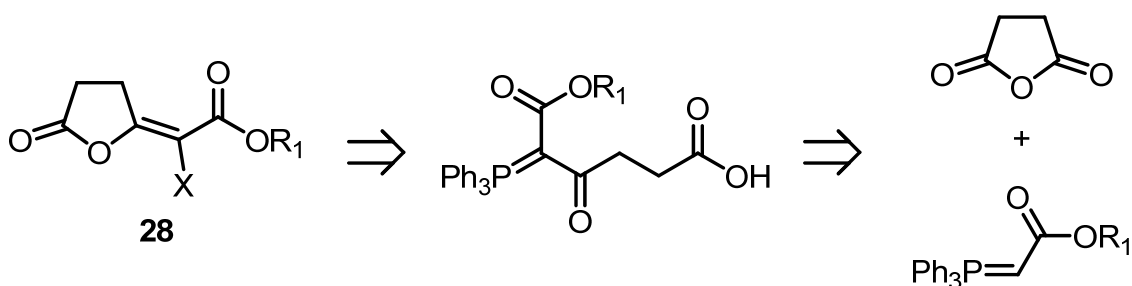
En ambas alternativas se plantea una reacción de acoplamiento tipo Stille entre un haloderivado (**28** o **31**) y el stannano **29** (M = SnBu₃).

Para la preparación de compuestos de estructura **29** se sigue la metodología enantioconservativa desarrollada por el Prof. Steve Ley,¹⁹⁵ que utiliza el ester etílico del ácido láctico como sustancia de partida (Esquema8).



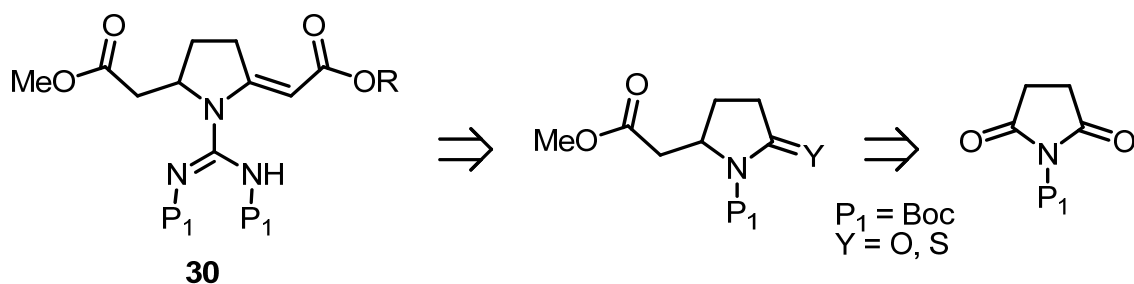
Esquema 8. Retrosíntesis propuesta para el compuesto **29**.

Los compuestos de estructura **28** se sintetizan según el Esquema retrosintético 9. Esto es, tratamiento del anhídrido succínico con trifenilfosforaniliden acetato de metilo o etilo y posterior ciclación del producto de condensación con una base y una fuente de halógeno (bromo o yodo), para obtener las correspondientes ester halo lactonas tipo **28**.



Esquema 9. Retrosíntesis propuesta para **28**.

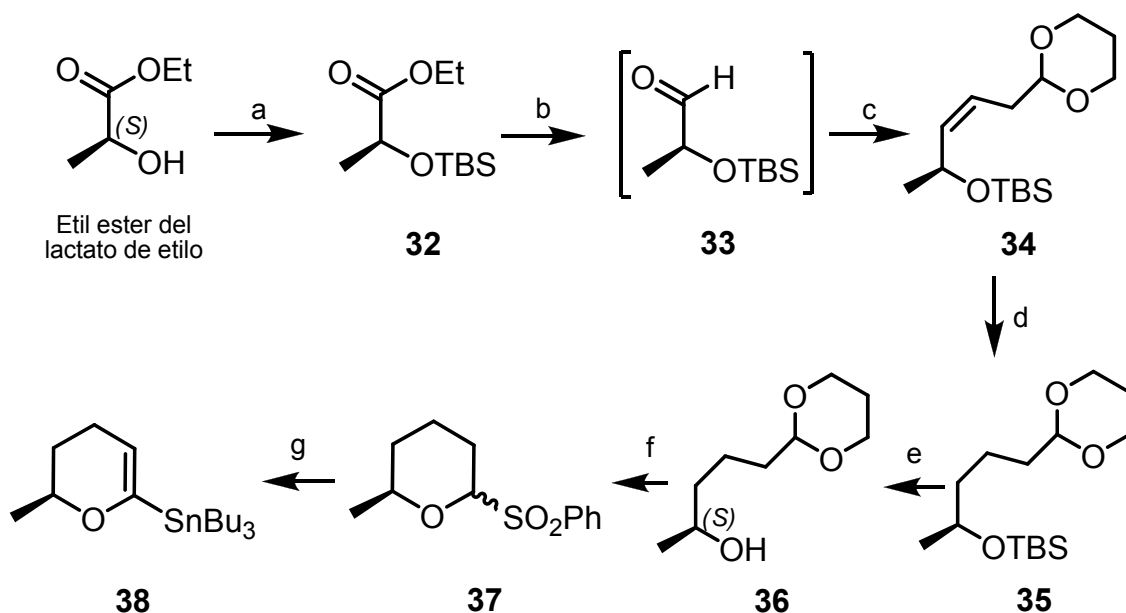
Las estructuras del tipo **30** (Esquema 10) se sintetizan mediante protección de la succinimida a nivel del NH, y posterior desimetrización por acoplamiento de Wittig, seguido de reducción del doble enlace y de un segundo acoplamiento de Wittig (o tioWittig si no fuera suficientemente reactivo). La posterior desprotección y guanilación con una tiourea protegida da lugar a los precursores sintéticos deseados tipo **30**, con sustitución diferenciada en las posiciones C-2 y C-5.



Esquema 10. Restrosíntesis propuesta para el compuesto **30**.

4.4.1.1 Preparación del vinilstannano **38**

La preparación del compuesto **38** se realizó siguiendo el esquema sintético que se muestra a continuación (Esquema 11).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) TBDMSCl (1.1 eq), imidazol (1.1 eq), DMF, t.a., 48 h; 85 %. (b) DIBAL-H (1.1 eq), CH_2Cl_2 , -78°C , 1 h. (c) 2-(1,3-dioxan-2-il)etiltrifenilfosforano (1.1 eq), KHMDS (1.1 eq), THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 36 h; 60 %. (d) H_2 (1 atm), PtO_2 (0.04 eq), AcOEt, t.a., 3 h; 89 %. (e) TBAF (1.4 eq), THF, t.a., 10 h; 92 % (f) PhSO_2 (1.1 eq), CaCl_2 , CH_2Cl_2 , t.a., 3 h; 48 %. (g) i) 1.1 eq n-BuLi, 1.1 eq SnBu_3Cl , THF, -78°C , 3 h; ii) 5 eq DIEA, CHCl_3 , reflujo, 12 h; 79 %.

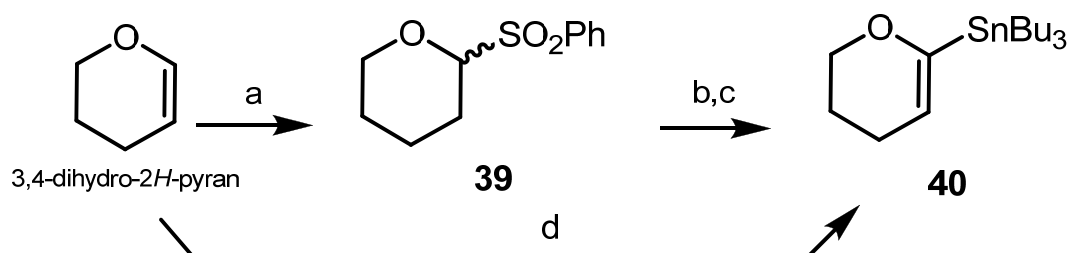
Esquema 11. Preparación del compuesto **38**

Se inicia la síntesis partiendo del enantiómero comercial (S)-lactato de etilo mediante protección del alcohol con TBS con excelente rendimientos (85%). Luego se realiza una reducción del grupo carboxilato a aldehído (**33**) con DIBAL-H y el producto de reducción se utiliza directamente, sin purificar, en la siguiente reacción con el fin de evitar procesos de racemización. El acoplamiento por reacción de Wittig con 2-(1,3-dioxan-2-il)etiltrifenilfosforano

comercialmente disponible, utilizando KHMDS como base, da lugar al cis-alqueno **34** con un rendimiento global del 60% para las dos reacciones. La hidrogenación del doble enlace, utilizando dióxido de platino como catalizador, produce el producto hidrogenado **35** con un 89% de rendimiento. Sobre este producto se realiza la desprotección del alcohol, con fluoruro de tetrabutilamonio, que conduce al alcohol **36** con un rendimiento del 92%. La reacción del compuesto **36** con ácido bencensulfínico (preparado previo a su uso) produce la sulfona cíclica **37**, como una mezcla de isómeros (R = 48%). El tratamiento de la sulfona **37** con *n*-BuLi y la adición de cloruro de tributil estaño permite obtener el estaño derivado **38** (R = 79%). El rendimiento global de esta secuencia es de 16%.

La metalación del dihidropirano se realizó en tres pasos de reacción. Mediante tratamiento con el ácido bencensulfínico conduce, en primer lugar, a la tetrahidropiranyl sulfona **39** en 80% de rendimiento. La eliminación del grupo bencenosulfónico, con *n*-Buli a baja temperatura, da lugar al intermedio de vinil-litio que se convierte en el correspondiente vinil estannano **40**, por tratamiento con cloruro de tributil estaño (R = 79%) (Esquema 12).

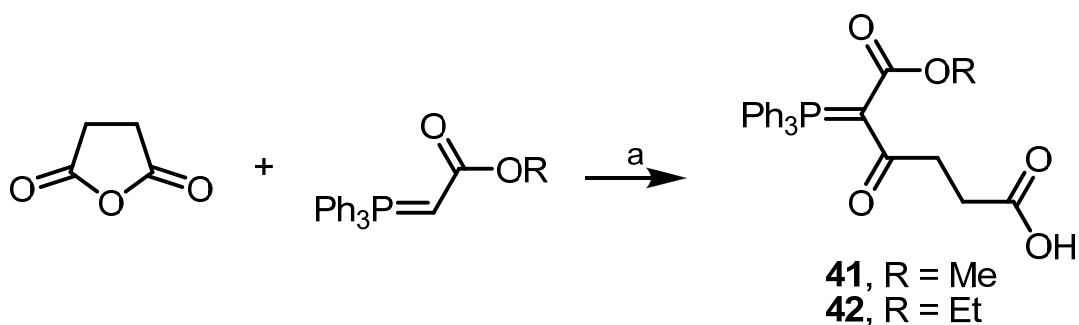
También es posible preparar este compuesto (**40**) directamente, con un 49% de rendimiento, en un paso de reacción por tratamiento, a baja temperatura, con *tert*-butil litio y posterior conversión al estannano con cloruro de tributil estaño.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) 1 eq BZA (1 eq), CH₂Cl₂, t.a, 3 h; 80 %. (b) *n*-BuLi (1.1 eq), SnBu₃Cl (1.1 eq), THF, -78 °C, 3 h. (c) 5 eq DIEA (5 eq), CHCl₃, reflujo, 12 h; 79 %. (d) *t*-BuLi (1.2 eq), SnBu₃Cl (2.5 eq), -78 °C → -20 °C, 3 h; 49 %.

Esquema 12. Preparación de la normetil sulfona de Ley **40**.

4.4.1.2 Preparación de las ester halo lactonas **28**

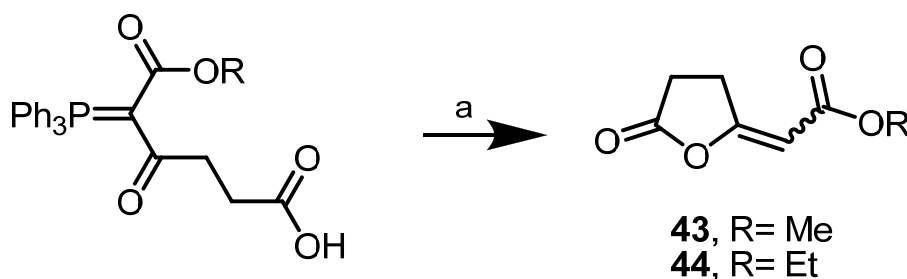


Reactivos y condiciones de reacción: (a) CHCl₃, - 5 °C, 12 h; 83-97 %.

Esquema 13. Apertura de anhídrido succínico.

Para la construcción de las ester halo lactonas **28** (Esquema 9) se plantea una serie de reacciones partiendo de anhídrido succínico, que por tratamiento a - 5 °C de su solución en cloroformo y adición de trifenilfosforaniliden acetato de etilo o metilo, se obtienen los derivados de cadena abierta **41** y **42** con rendimientos superiores a 83 %. (Esquema 13)

Si este derivado se calienta en THF durante 4 horas se obtiene el producto ciclado correspondiente (**43** y **44**), como una mezcla E:Z (3:1), según se confirma por RMN.

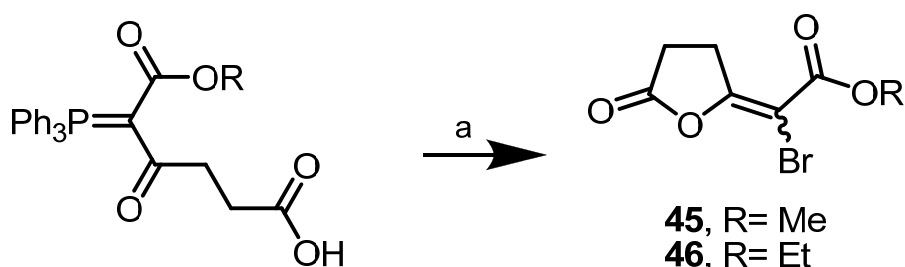


Reactivos y condiciones de reacción: (a) THF, reflujo, 6 h; 89 y 93 %.

Esquema 14. Preparación de ester lactonas **43** y **44**.

Si se adiciona una base (triethylamina en este caso), y una fuente de bromo (Br₂) se obtienen las ester bromo lactonas **45** y **46**, con rendimientos mayores a 86%, tanto para el éster metílico como etílico (Esquema 15). Los productos se obtienen como una mezcla E:Z aproximadamente de 3:1, según se confirma por RMN de protón. La purificación de estos compuestos es tediosa, siendo necesaria una primera purificación por cromatografía en columna con diclorometano, en la cual se separan ambos estereoisómeros del óxido de

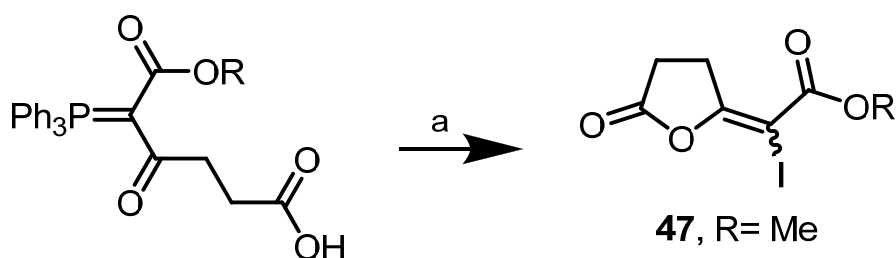
trifenilfosfina y una segunda purificación cromatográfica, utilizando una mezcla de hexano y acetato de etilo, lo que nos permite obtener los productos de interés con rendimientos superiores a 86%.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) Br₂ (1.1 eq), TEA (1.1 eq), CH₂Cl₂, 0 °C, 30 m; 88 y 86 %.

Esquema 15. Preparación de ester bromo lactonas **45** y **46**.

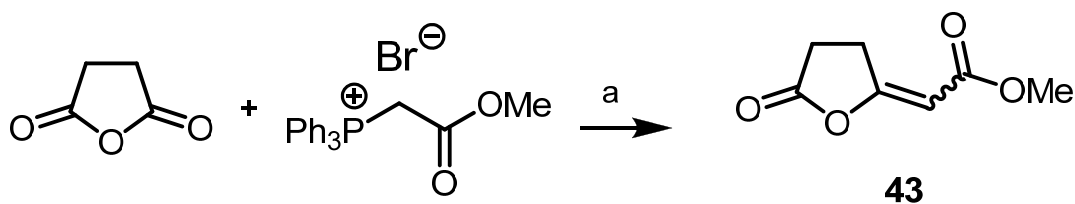
Para obtener el yododerivado **47** se ensayó la reacción utilizando yodo como fuente de halógeno, pero se obtuvo el producto de interés, por lo que esta reacción se realizó utilizando N-iodosuccinimida. El rendimiento de esta reacción es del 87%, aunque no es posible separar ambos estereoisómeros (Esquema 16).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) NIS (1.1 eq), TEA (1.1 eq), CH₂Cl₂, t.a., 1 h; 87 %.

Esquema 16. Preparación de la metil ester yodo lactona **47**.

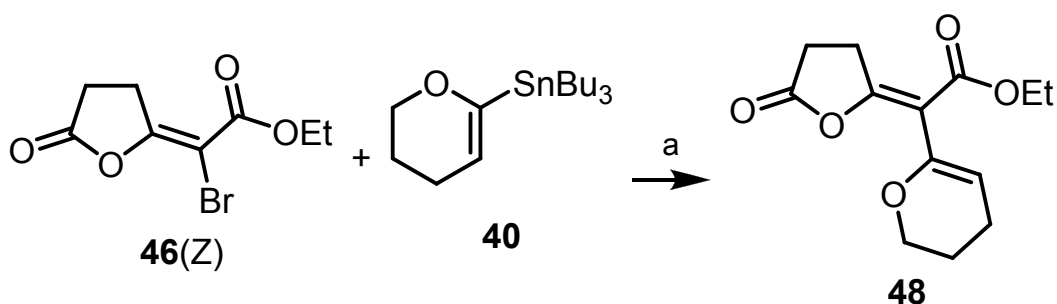
El compuesto **43** también se preparó por reacción de Wittig de anhídrido succínico con la sal de bromonio del fosfonoacetato de metilo, utilizando bromuro de litio y carbonato de potasio como base, THF como disolvente y agitando a temperatura ambiente durante 12 horas. Se obtiene la mezcla de estereoisómeros como en el caso anterior, pero con un rendimiento inferior (63%) (Esquema 17).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) K_2CO_3 (5 eq), LiBr (2 eq), THF, t.a., 10 h; 63 %.

Esquema 17. Alternativa para la preparación de **43**.

Una vez purificado el bromoderivado **46(Z)**, se ensaya la reacción de acoplamiento de Stille con el derivado de estaño modelo, **40**, preparado según se describió anteriormente (Esquema 18).



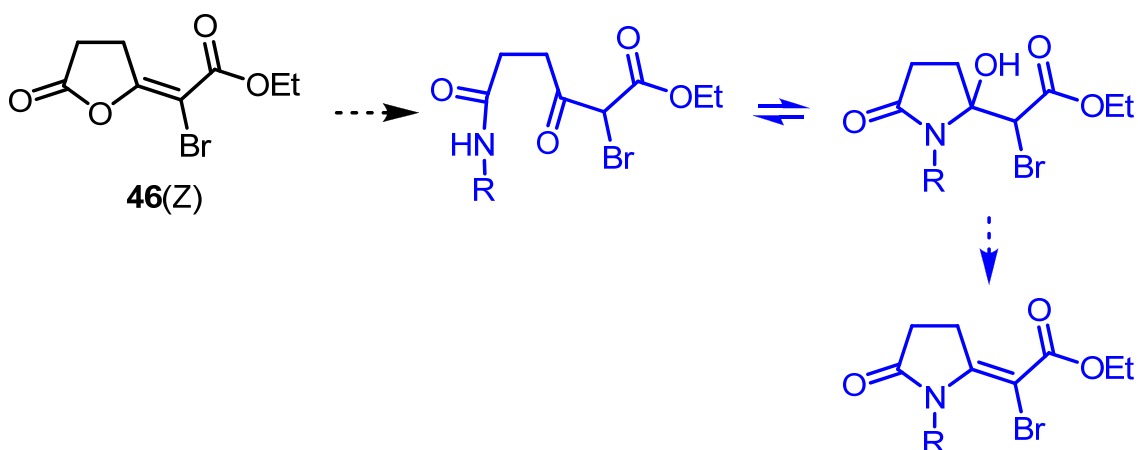
Reactivos y condiciones de reacción: (a) $Pd(PPh_3)_4$, acetonitrilo, reflujo, 4 h.

Esquema 18. acoplamiento de Stille de los compuestos **46(Z)** y **40**.

Para esta reacción se utilizó una modificación de las condiciones descritas por Stille y colaboradores²⁰², utilizando tetrakis de trifenilfosfina paladio (0) como catalizador y acetonitrilo como disolvente. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 4 horas. La purificación por cromatografía permite obtener el compuesto de interés, pero éste se descompone incluso bajo atmósfera de argón.

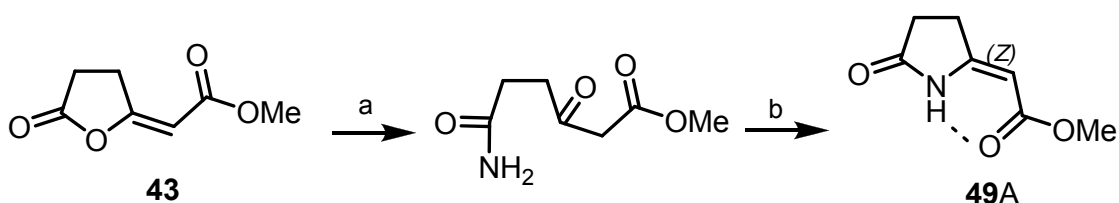
Una posible alternativa sería realizar la conversión lactona/lactama en **46(Z)** mediante apertura con un compuesto nitrogenado, y posterior ciclación para obtener el haloderivado correspondiente de pirrolidona con el que ensayar la reacción de acoplamiento de Stille.

²⁰² (a) A. M. Echavarren y J. K. Stille; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5478-5486. (b) H. B. Kwon, B. H. McKee y J. K. Stille; *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3114-3118.



Esquema 19. Posible apertura y ciclación del compuesto **46(Z)**.

Seguindo la referencia de Abell y colaboradores²⁰³, se realiza la apertura y ciclación con amoníaco en metanol. Sobre el compuesto **43** la reacción es exitosa, y se consigue el producto **49A** con un 73% de rendimiento, con la configuración *Z* del doble enlace debido a la estabilización por puente de hidrógeno, según se indica en el Eesquema 17. El primer paso es la apertura con amoníaco, para una posterior ciclación y deshidratación para obtener el producto de interés.

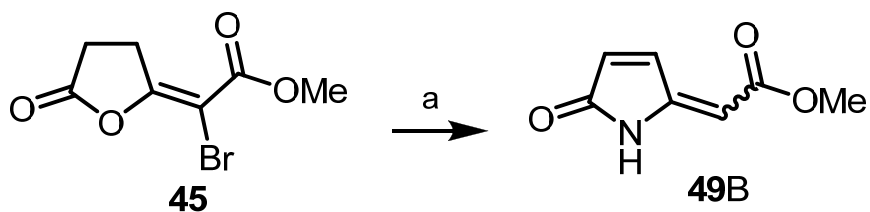


Reactivos y condiciones de reacción: (a) $\text{NH}_3\text{-MeOH}$ (10 eq), CH_2Cl_2 , t.a. 1 h. quant. (b) 1,2-dicloroetano, reflujo, 3 d; 73 %.

Esquema 20. Apertura y ciclación del ester lactona derivado **43**.

²⁰³ A. D. Abell, M. D. Oldham y J. M. Taylor; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1214-1220.

La misma reacción de intercambio lactona -> lactama realizada sobre la mezcla de bromo enol lactona **45** conduce, con un 60 % de rendimiento, al compuesto **49B** en el que el intercambio lactona -> lactama ocurre pero con la inevitable eliminación del átomo de bromo, probablemente según se describe en el Esquema 21.

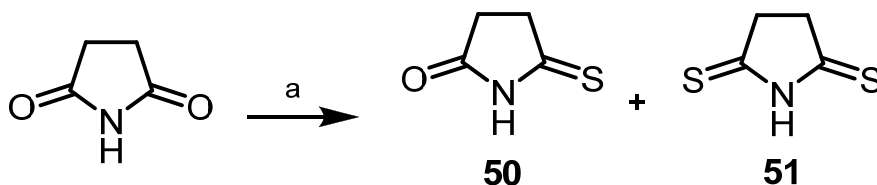


Reactivos y condiciones de reacción: (a) NH_3 -MeOH (10 eq), CH_2Cl_2 , t.a. 1 h.

Esquema 21. Apertura y ciclación del compuesto **45**.

4.4.1.2.1 Modelos de lactonas tipo 28 a partir del anhídrido maleico

Como primera aproximación se intentó la formación de compuestos guanidínicos a partir de derivados de la succinimida, según se muestra a continuación (Esquema 22). Al hacer reaccionar succinimida con reactivo de Lawesson se obtienen dos productos, monotiosuccinimida **50** y ditiosuccinimida **51**, con rendimientos de 70% y 30%, respectivamente. La ditiosuccinimida es un compuesto muy inestable, y se descompone fácilmente para dar compuestos de polimerización, debido a la acidez que presentan los protones metilénicos en este tipo de compuestos favorecidos por la presencia de azufre. Se pensó, inicialmente, trabajar a este nivel para obtener análogos simétricos a los cuales utilizar posteriormente, pero no fue posible.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) R. Lawesson (1 eq), THF, 65 °C, 90 m, 70 % y 30 %.

Esquema 22. Reacción de succinimida con reactivo de Lawesson.

La monotiosuccinimida **50** es más estable y es posible realizar reacciones a nivel del NH sin problemas de polimerización.

A continuación se ensayaron reacciones de guanilación directa. El agente guanilante normalmente utilizado es el cloruro de mercurio/ bis-boc-tiourea, pero debido a la alta toxicidad del reactivo y a lo tedioso que resulta el proceso de purificación de los productos de reacción, en los últimos años se han desarrollado una serie de reactivos alternativos, entre los que se encuentra el reactivo de Mukaiyama (ioduro de 2-cloro-1-metil piridinio).

Las principales condiciones de guanilación que se utilizan se describen en la siguiente figura (Figura 48).

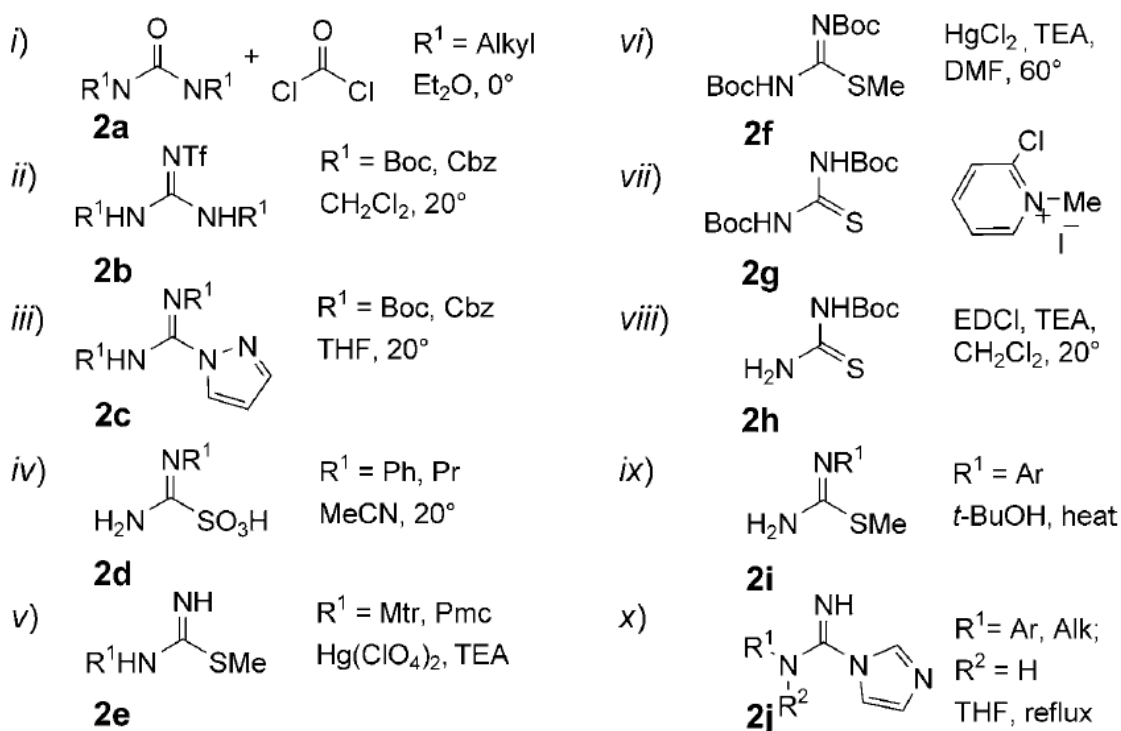
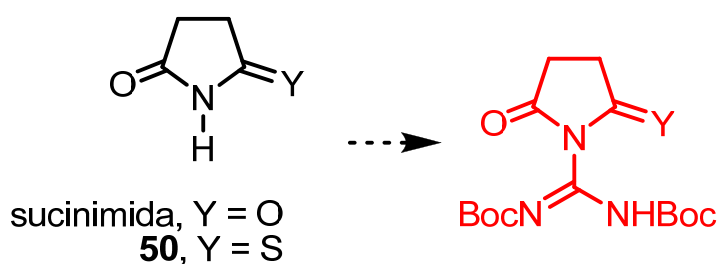


Figura 48. Métodos tradicionales de guanilación.²⁰⁴

Los intentos de guanilación de las succinimidas en condiciones clásicas, utilizando cloruro de mercurio y bis-boc-tiourea, no dieron resultados y se recuperaba el producto de partida inalterado. Al utilizar otras condiciones de reacción, como la utilización de reactivo de Mukaiyama, o la sustitución de bis-boc-tiourea por *N,N'*-Bis(terc-butoxicarbonil)-*S*-metilisotiourea, tampoco se obtuvieron productos de guanilación.



Esquema 23. Intentos de guanilación sobre succinimida y tiosuccinimida **50**.

²⁰⁴ A. R. Katritzky, N. M. Khashab, S. Bobrov; *Helvetica Chimica acta* **2005**, *88*, 1664-1675.

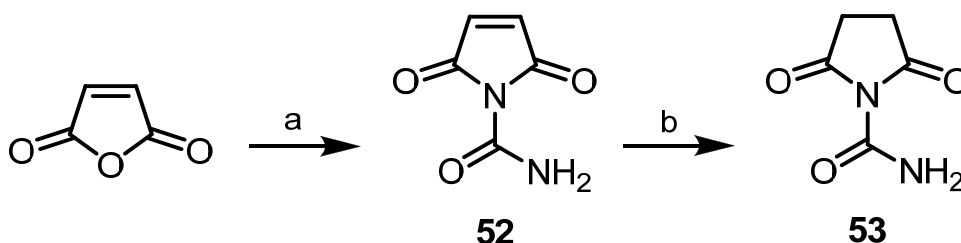
Condiciones ensayadas:

- bis-Boc-tiourea/ reactivo Mukaiyama / TEA/ DMF / t.a.
- bis-Boc-metil-tiourea/ HgCl₂ / TEA/ DMF / t.a.
- bis-Boc-tiourea/ HgCl₂ / TEA/ DMF / t.a.
- bis-Boc-tiourea/ EDCI/ TBAI / KOH/ CH₂Cl₂ / t.a.

Al consultar la literatura²⁰⁴ se encuentra que este tipo de reacciones han sido publicadas para aminas (primarias principalmente, pero también secundarias), pero nunca para grupos amidas, por lo que intentamos otras alternativas.

La conversión de anhídrido maleico a la ureasuccinimida **53** se realizó según el esquema siguiente (Esquema 24).

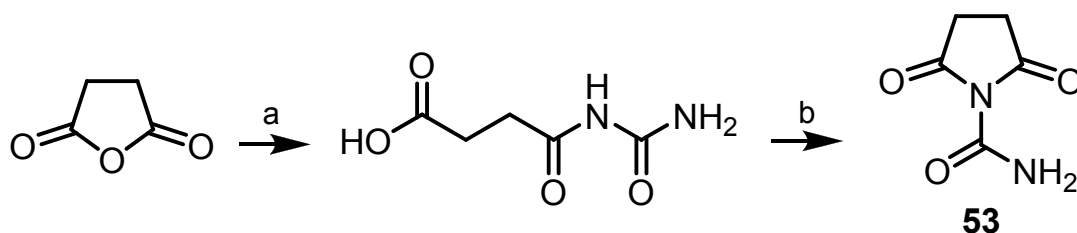
Al tratar el anhídrido maléico con urea en ácido acético glacial se obtiene un intermedio de cadena abierta, el cual se disuelve en anhídrido acético para inducir la ciclación y se obtiene la urea-maleimida **52** con un rendimiento del 66%. La posterior hidrogenación sobre paladio/carbono permite obtener la urea-succinimida **53** con un rendimiento del 96%. Tanto la urea-maleimida **52** como la urea-succinimida **53** son compuestos muy insolubles en solventes orgánicos convencionales, por lo que se pensó que una protección a nivel del NH₂ serviría para mejorar estos problemas de solubilidad y además limitaría la reactividad del grupo nitrógeno.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) i) urea (1.0 eq), ácido acético, 95 °C, 12 h; ii) Ac₂O, 50 °C, 30 m; 66 % (b) H₂, 10 % wt Pd/C (0.1 eq), AcOEt, t.a., 3 h; 96 %.

Esquema 24. Preparación de ureasuccinimida **53**.

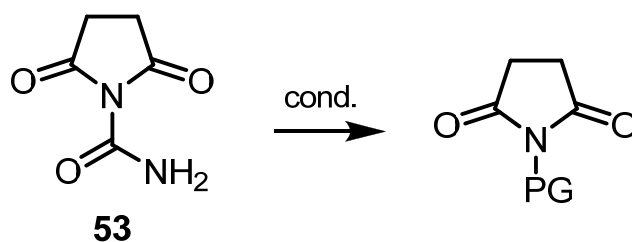
También se preparó el compuesto **53** partiendo del anhídrido succínico, utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente. Se obtiene el producto ciclado pero el rendimiento de la reacción es inferior (45%), posiblemente porque el intermedio de cadena abierta sea más difícil de ciclar.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) urea (1.0 eq), ácido acético, 95 °C, 12 h; b) Ac₂O, 50 °C, 30 m; 45 %.

Esquema 25. Alternativa para la síntesis del compuesto **53**.

Al intentar la protección de la ureasuccinimida **53**, se observó que la protección se realiza a nivel del nitrógeno del anillo y no sobre el grupo urea. Esto se comprobó para diversos grupos protectores.



Esquema 26. intentos de protección de la ureasuccinimida **53**.

PG	Condiciones	Número de compuesto
Boc	BOC ₂ O (1.1 eq), 4-DMAP (0.15 eq), Acetonitrilo, t.a., 30 m	54
Bn	Bromuro de bencilo (1.1 eq), THF, reflujo, 2 h	55
PMB	PMBCl (1.1 eq), NaH (1.1 eq), DMF, t.a., 24 h.	57
TBDMS	TBDSMCl (1.5 eq), TEA (2.5 eq), 4-DMAP (cat.) CH ₂ Cl ₂ , t.a., 24 h.	58

En este punto decidimos preparar diversas succinimidias protegidas, para estudiar la reactividad de estos compuestos, y seleccionar un grupo protector para la secuencia de reacciones planteadas inicialmente.

Con el objetivo de estudiar la protección de succinimidas y su reactividad, se eligieron grupos protectores con características de dadores de electrones (OBn), atractores de electrones (BOC) y grupos neutros (Bn), así como también PMB y TBDMS.

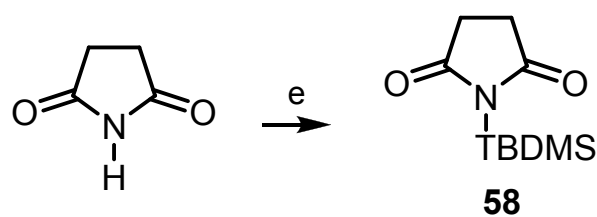
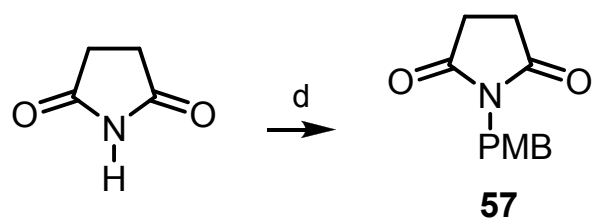
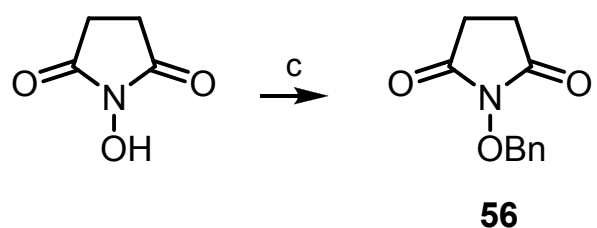
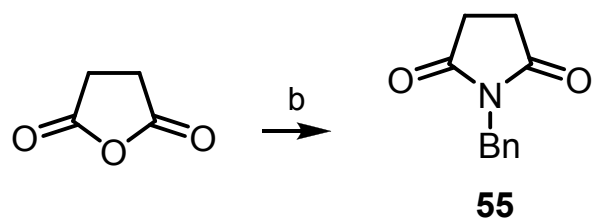
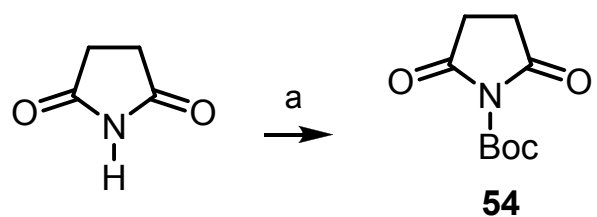
En el caso del grupo BOC fue posible la obtención del compuesto de interés; partiendo de succinimida, mediante la utilización de BOC₂O y utilizando acetonitrilo como disolvente y 4-DMAP como catalizador, se obtiene el producto **54** con un rendimiento del 91%.

La reacción de formación de bencilsuccinimida, **55**, utilizando bromuro de bencilo e hidruro de potasio como base, a temperatura ambiente, permitió obtener el producto de interés pero con un rendimiento del 30%, por lo cual se prepara partiendo de anhídrido succínico y bencilamina en THF a reflujo, con un rendimiento del 86%.

En el caso de la oxibencilsuccinimida, **56**, se obtiene a partir de N-hidroxisuccinimida y bromuro de bencilo, utilizando carbonato de calcio y éter corona en acetona y en condiciones de reflujo, con un rendimiento del 86%.

El PMB derivado **57** fue preparado por tratamiento de succinimida con carbonato de potasio como base y cloruro de parametoxibencilo, en condiciones de reflujo durante 12 horas, con un rendimiento del 89%.

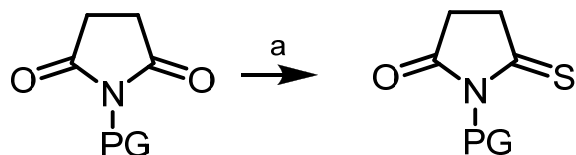
El TBDMS **58** derivado fue preparado por tratamiento de succinimida con cloruro de TBDMS y TEA y 4-DMAP como base, agitando a temperatura ambiente durante 12 horas. Se obtuvo el producto con un 70% de rendimiento.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) Boc₂O (1 eq), 4-DMAP (0.15 eq), ACN, r.t., 30 m; 91 %. (b) bencilamina (1 eq), THF, refluxo, 2h; 86 %. (c) bromuro de bencilo (1.1 eq), CaCO₃ (1 eq), 18c6 (0.05 eq), acetona, refluxo, 16 h; 86 %. (d) PMBCl (1.1 eq), K₂CO₃ (3 eq), ACN, refluxo, 24 h; 83 %. (e) TBDMSCl (1.5 eq), TEA (2.5 eq), 4-DMAP (cat.), CH₂Cl₂, t.a. 12 h; 70 %.

Esquema 27. Modelos de protección de succinimidias.

Luego se ensayó la reacción de las succinimidias protegidas con reactivo de Lawesson. Inicialmente se utilizaron 3 equivalentes del reactivo, pero ajustando las condiciones de reacción se observó que se consiguen los mismos resultados usando solo 1 equivalente.



54, PG= Boc

55, PG= Bn

56, PG= OBn

59, PG= Boc

60, PG= Bn

61, PG= OBn

Reactivos y condiciones de reacción:

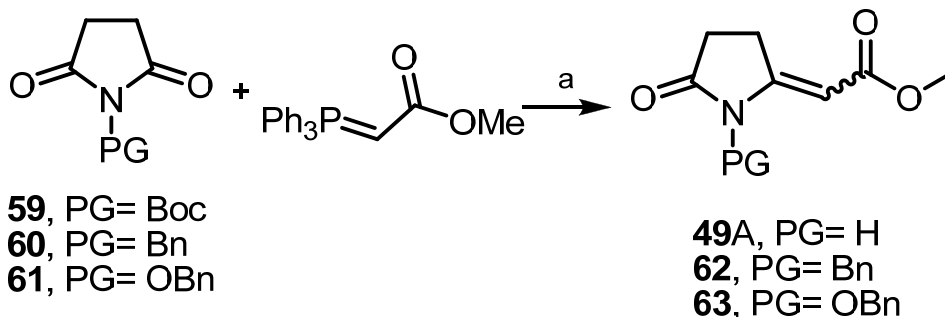
(a) Reactivo de Lawesson (1 eq), THF, 60 °C, 90 m.

Esquema 28. Reacción de succinimidias protegidas con reactivo de Lawesson.

Si bien es posible obtener los compuestos deseados, los rendimientos no son buenos (22%, 14% y 18% para **59**, **60** y **61**, respectivamente).

4.4.1.2.1.1 Modelos de acoples tipo Wittig sobre succinimidias protegidas

Como una aproximación a las reacciones de acoplamiento que serán necesarias hacer, se utilizaron los derivados de succinimidias protegidas **59**, **60** y **61** para hacer la reacción de acoplamiento de Wittig (Esquema 29).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) 175 °C, 20 h.

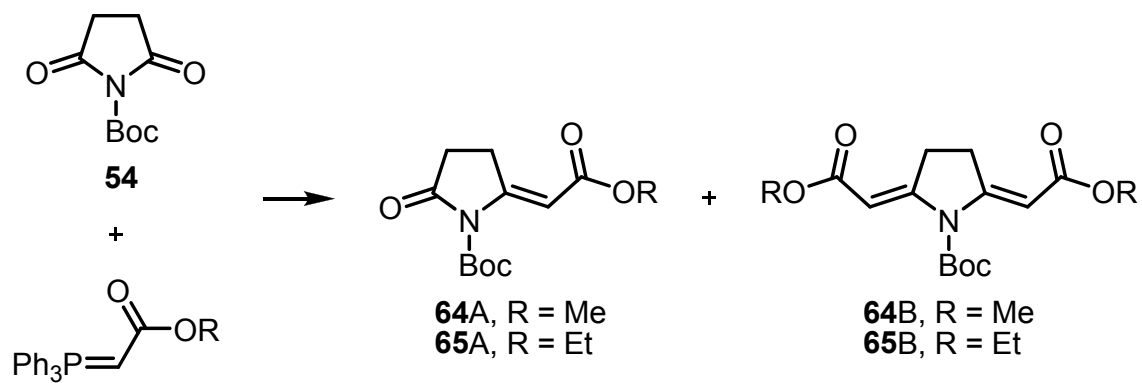
Esquema 29. acoplamientos tipo Wittig sobre succinimidias protegidas

La reacción se lleva a cabo sin disolvente y calentando en un baño de arena a 175 °C durante 20 horas. Se observa que los productos funden para formar una masa de color oscuro que, luego de completado el tiempo de reacción, se disuelve en una mezcla de n-hexano-acetato de etilo y purifica por columna cromatográfica.

Cuando se utiliza un grupo bencilo u oxibencilo para la reacción de acoplamiento, se obtienen los productos deseados, **62** y **63**, con buenos rendimientos (86% en ambos casos) y solo uno de los esteroisómeros, asignado en ambos casos como el isómero *E*.

Cuando el grupo protector es Boc se obtiene el producto de acoplamiento pero se elimina el grupo Boc, obteniéndose la succinimida sin proteger **49A** y como una mezcla de ambos isómeros E:Z (~2:1), según se confirma por RMN.

Ajustando las condiciones de reacción, utilizando tolueno como disolvente y calentando durante 20 horas a 90 °C, fue posible obtener el compuesto de acoplamiento con el grupo protector Boc, **64A**, con un rendimiento del 73%. También se obtuvo el compuesto de doble acoplamiento de Wittig, **64B**, como producto secundario (5%) (Esquema 30).



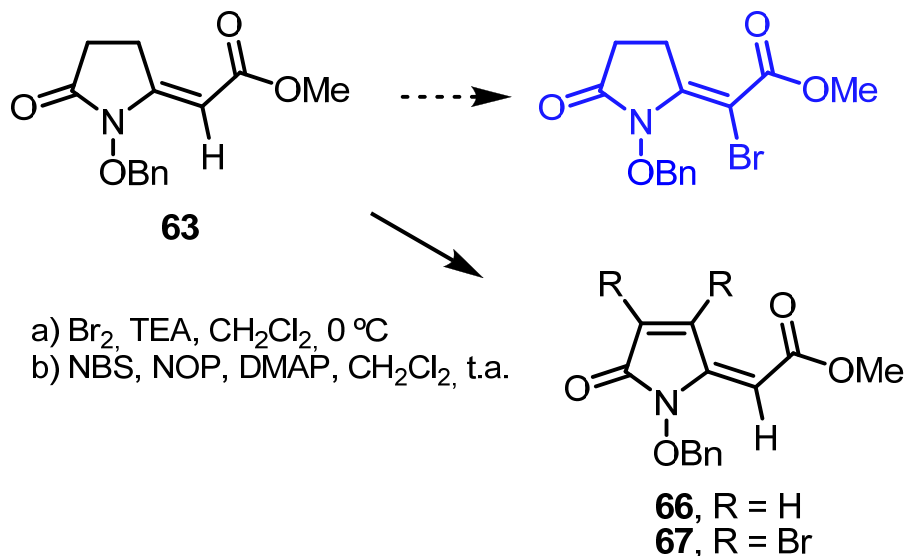
Reactivos y condiciones de reacción: tolueno, 90 °C, 20 h.

Esquema 30. Acoplamiento tipo Wittig sobre BOC-succinimida.

Esta reacción también se realizó con el éster etoxicarbonilmetileno trifenilfosforano, y los rendimientos para la obtención de **65A** y **65B** fueron de 61 y 20%, respectivamente.

Una vez ajustadas las condiciones para la preparación de los productos de acoplamiento mediante reacciones de Wittig, se intentó realizar bromaciones sobre el alqueno, para utilizar junto con compuestos de estructura **29** en acoplamientos de tipo Stille.

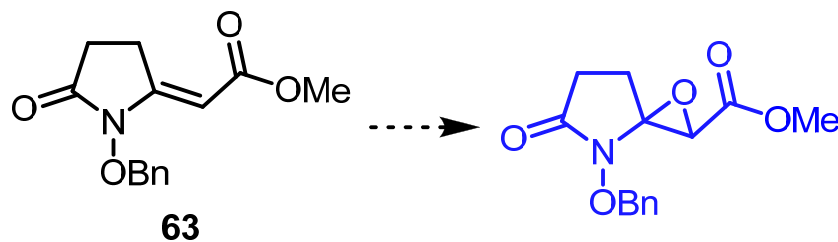
Las condiciones ensayadas fueron: tratamiento del alqueno con bromo y trietilamina como base a baja temperatura, y tratamiento con *n*-bromosuccinimida y DMAP como base a temperatura ambiente (Esquema 31).



Esquema 31. Intentos de bromación a nivel del alqueno.

En ninguna de las condiciones ensayadas se obtuvo el producto deseado ya que, posiblemente, la acidez de los protones metilénicos hace que la halogenación se de en los carbonos 2 y 3 del anillo, y una posterior eliminación da lugar al producto insaturado a este nivel.

También se ensayaron reacciones de epoxidación y los resultados fueron negativos para todas las condiciones ensayadas (Esquema 32).

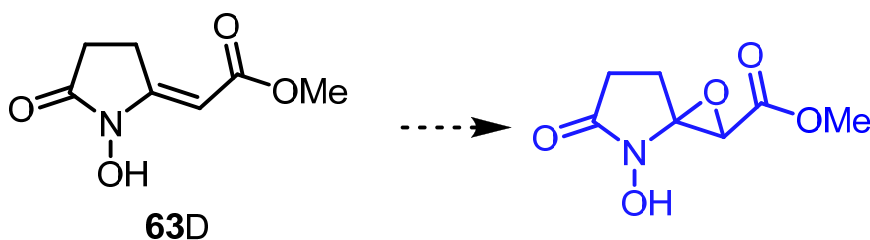


Esquema 32. Intentos de epoxidación.

Condiciones de reacción ensayadas:

- mCPBA (1.2 eq), CH₂Cl₂, temperatura ambiente, 3 horas.²⁰⁵
- TBHP (1.5 eq), n-BuLi (1.1 eq) THF, -78 °C, 12 horas.²⁰⁶
- TBHP (1.5 eq), VO (acac)₂ (0.1 eq), benceno, temperatura ambiente, 24 horas.²⁰⁷

Se intentó la epoxidación asistida por ácido fenil borónico sobre el compuesto acoplado de N-hidroxisuccinimida **63D**, pero la reacción tampoco dio resultado.



Esquema 33. Intento de epoxidación sobre el compuesto **63D**.

Condiciones de reacción ensayadas:

- NMO (1.2 eq), OsO₄ (cat.), ácido feniborónico (1.2 eq), CH₂Cl₂, temperatura ambiente, 12 horas.²⁰⁸

²⁰⁵ R. S. Porto, M. L. A. A. Vasconcellos, E. Ventura, F. Coelho, *Synthesis*, **2005**, 2297-230.

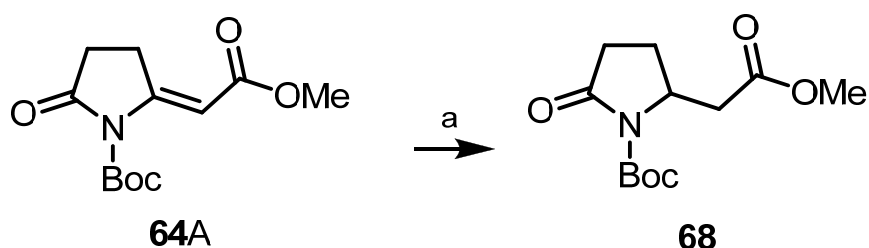
²⁰⁶ Tesis Doctoral Dácil Zurita Espinosa, La Laguna, 1991.

²⁰⁷ K. B. Sharpless, R. C. Michaelson *J. Am. Chem.Soc.* **1973**, *95*, 6136-6137.

²⁰⁸ A. Gypser, D. Michel, D. S. Nirschl, K. B. Sharpless *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7322-7327.

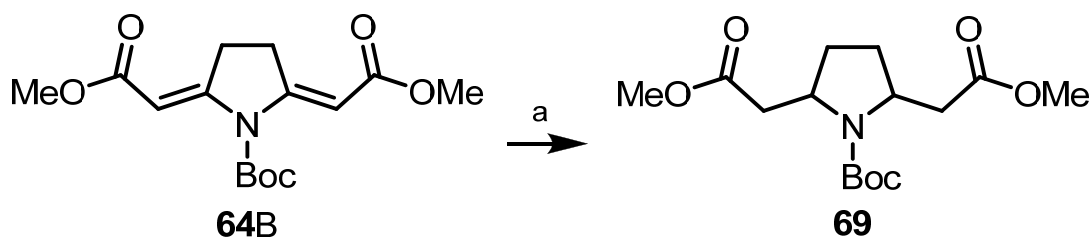
4.4.1.2.1.2 Diferenciación C₂-C₅ en succinimidias protegidas

Con el fin de eliminar el grupo carbonilo remanente y, de igual manera, conseguir diferenciar las posiciones C-2 y C-5 del heterociclo, estudiamos en primer lugar reacciones de hidrogenación del sistema carbonílico α,β -insaturado. La hidrogenación se consigue a 4 atmósferas de presión, utilizando Pd sobre carbono como catalizador y acetato de etilo como disolvente. Después de 24 horas de reacción se obtuvo el producto hidrogenado, tanto para el caso del producto de Wittig **64A** (Esquema 34) como para el de doble acoplamiento de Wittig **64B** (Esquema 35). Las transformaciones fueron cuantitativas.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) H₂ (4 atm), Pd/C (10 %), AcOEt, 24 h., quant.

Esquema 34. Hidrogenación del compuesto **64^a**.

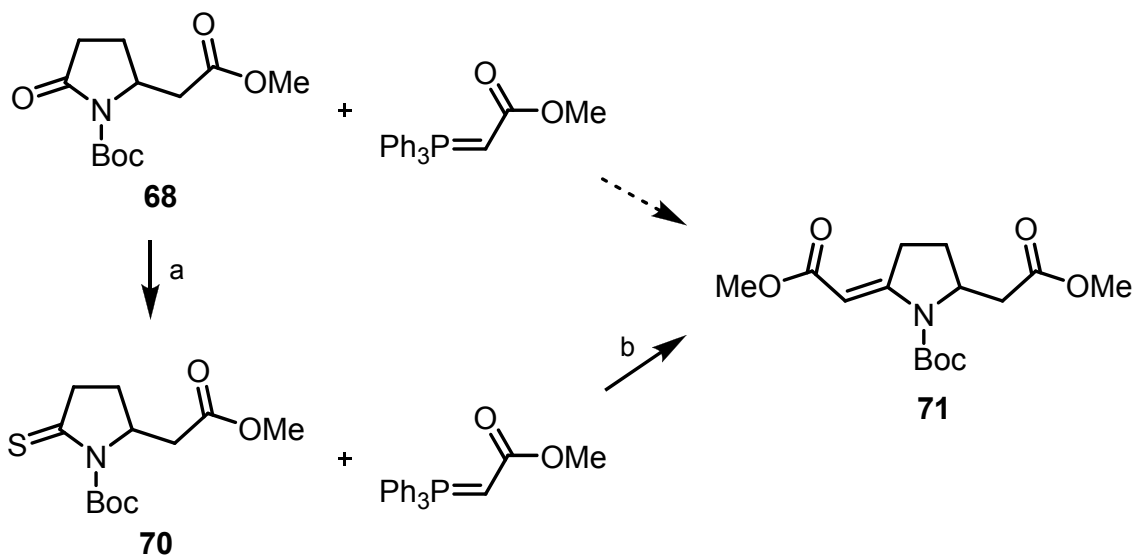


Reactivos y condiciones de reacción: (a) H₂ (4 atm), Pd/C (10 %), AcOEt, 24 h; quant.

Esquema 35. Hidrogenación del compuesto **64B**.

Una vez obtenido el producto reducido, intentamos sobre el compuesto **68** un nuevo acoplamiento de tipo Wittig con las condiciones puestas a punto para el grupo protector Boc calentando a 90 °C una solución del alqueno en tolueno durante 24 horas. Dado que dicha transformación directa no fue posible, por lo que se realizó una activación para obtener el tioderivado **70**, utilizando el reactivo de Lawesson como se describió anteriormente, seguido de una reacción de tioWittig (Esquema 36).

Esta reacción fue exitosa, si bien requiere 48 horas de reacción y la utilización de 3 equivalentes del trifenilfosforaniliden acetato de metilo. De esta manera, se obtiene un compuesto diferenciado en C₂ y C₅ (**71**).

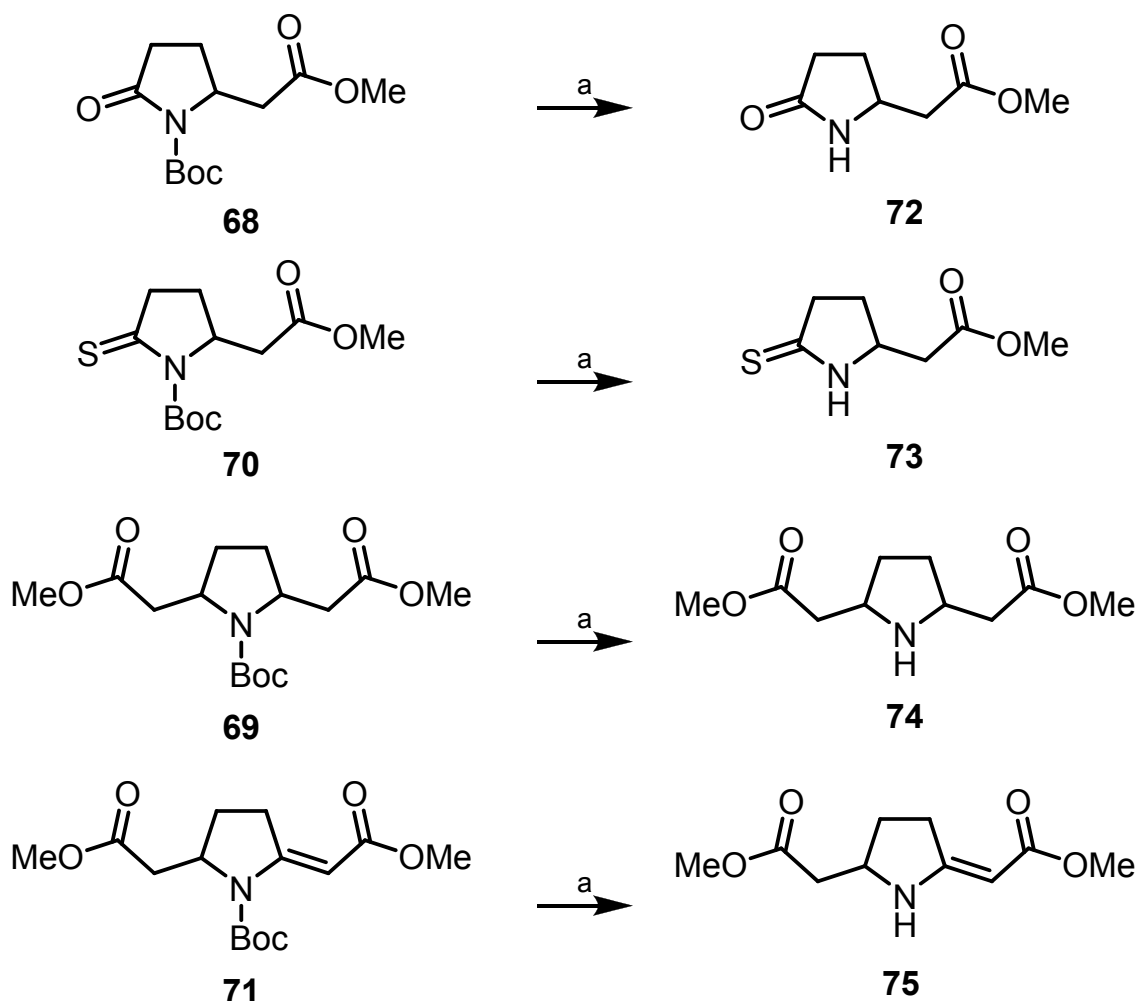


Reactivos y condiciones de reacción: (a) R. Lawesson (0.55 eq), THF, 65 °C, 90 m; 63 %. b) tolueno, 90 °C, 48 h; 83 %.

Esquema 36. Preparación del compuesto **71**.

Posteriormente ensayamos reacciones de desprotección del grupo Boc. Las condiciones óptimas se obtuvieron utilizando 6 equivalentes de ácido trifluoroacético en diclorometano anhidro y a temperatura ambiente, agregando 3 equivalentes al inicio de la reacción y luego 3 equivalentes más a las 2 horas.

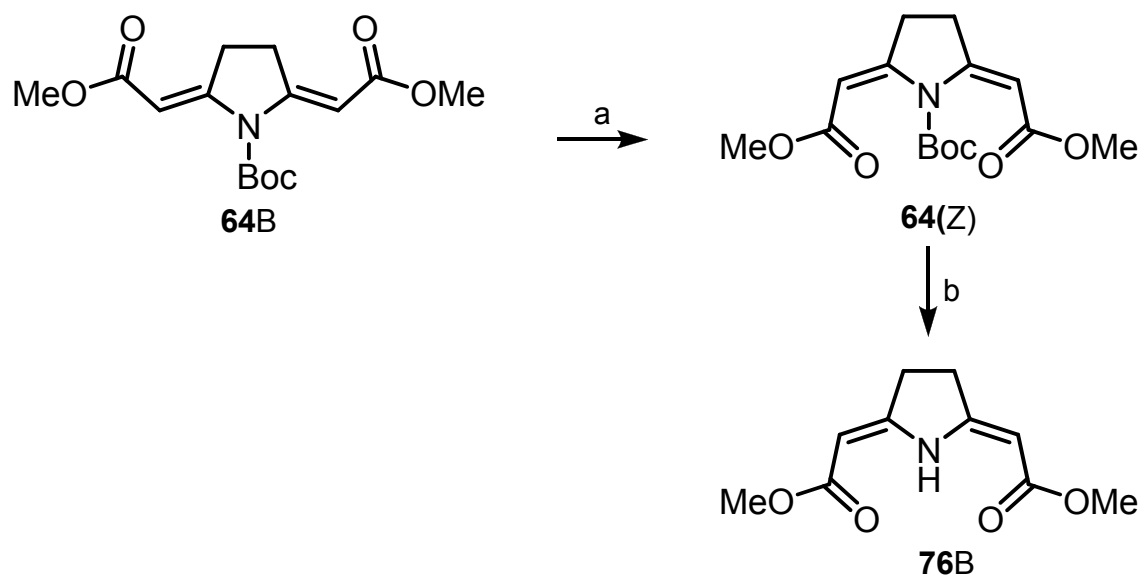
De esta manera se obtuvieron los diferentes derivados desprotegidos **72-75** (Esquema 37):



Reactivos y condiciones de reacción: (a) TFA (6 eq), CH₂Cl₂, t.a., 3-5 h.

Esquema 37. Desprotección de los derivados **68-71** utilizando TFA.

La desprotección se consigue, en todos los casos, en las condiciones antes mencionadas, a excepción del producto de doble acoplamiento de Wittig, **64B**, en el que se produce la doble interconversión E -> Z antes de que la eliminación del grupo protector tenga lugar. No obstante, manteniendo la reacción con 10 equivalentes de TFA se consigue la desprotección y obtención exclusiva del isómero Z,Z (Esquema 38).

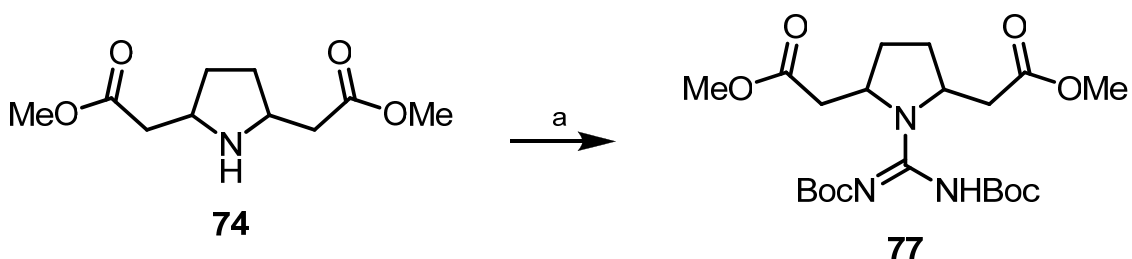


Reactivos y condiciones de reacción: (a) TFA (6 eq), CH₂Cl₂, t.a., 3 h (b) TFA (10 eq), CH₂Cl₂, t.a., 12 h.

Esquema 38. Desprotección con TFA del compuesto **64B**.

Una vez obtenidos los derivados desprotegidos se realizaron reacciones de guanilación sobre aquellos en los cuales teníamos una amina y no una amida o tioamida.

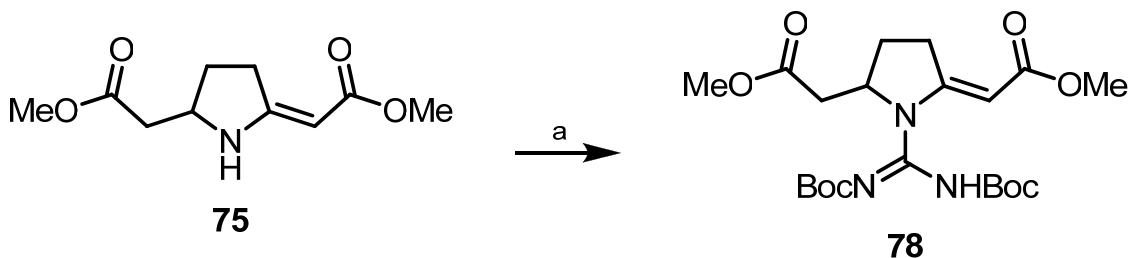
Las condiciones de reacción fueron igual que las descritas previamente en este capítulo, utilizando *N,N*-Bis(*tert*-butoxicarbonil)-*S*-metilisotiurea, cloruro de mercurio como agente guanilante y trietilamina como base. Para el compuesto **77** el rendimiento de la reacción es de 85%, y se obtiene como una mezcla de diastereoisómeros, que se separan por cromatografía.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) HgCl₂ (1.1 eq), SMBBIT (1.1 eq), TEA (3 eq), DMF, t.a., 12 h; 85 %.

Esquema 39. Guanilación del compuesto **74**.

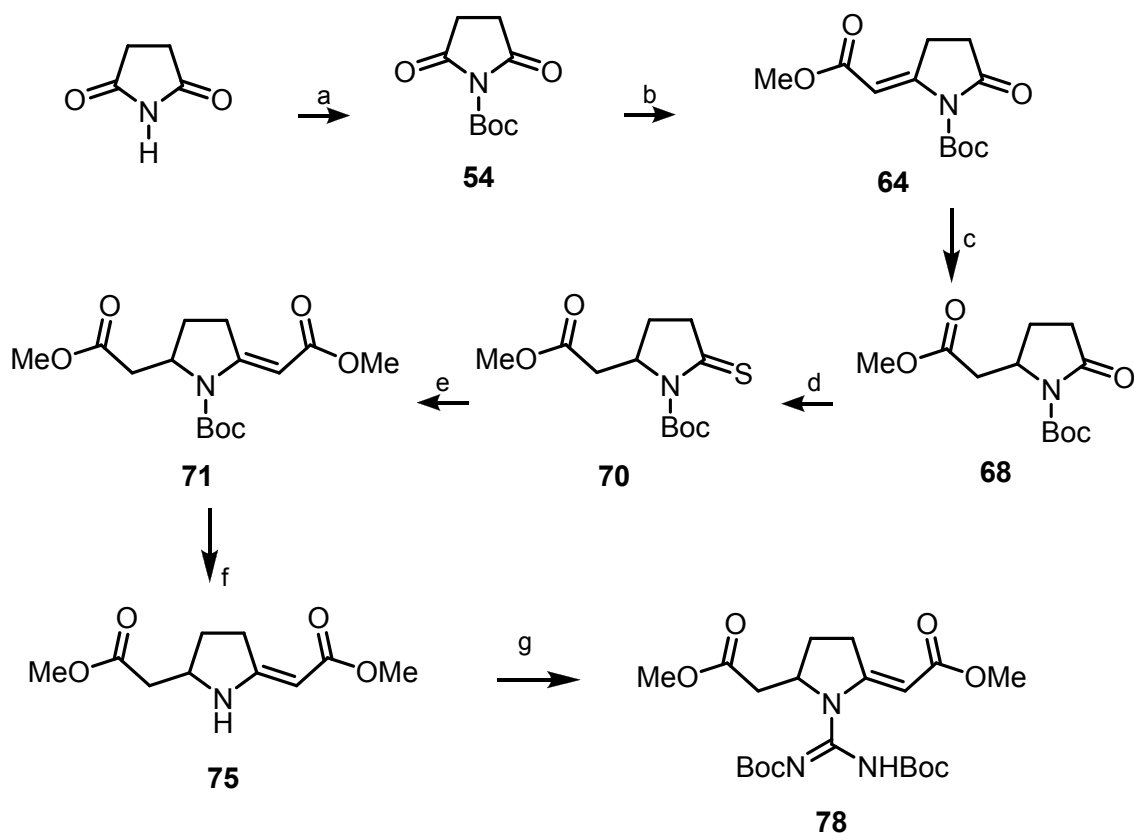
La guanilación del compuesto **75** se realiza también utilizando *N,N*-Bis(*tert*-butoxicarbonil)-*S*-metilisotiurea, y agitando a temperatura ambiente durante 12 horas, obteniéndose el producto **78** con un rendimiento del 89%.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) HgCl₂ (1.1 eq), SMBBIT (1.1 eq), TEA (3 eq), DMF, t.a., 12 h; 85 %

Esquema 40. Guanilación del compuesto **75**.

De esta manera, fue posible diseñar una ruta para el compuesto **78**, según se describe a continuación.

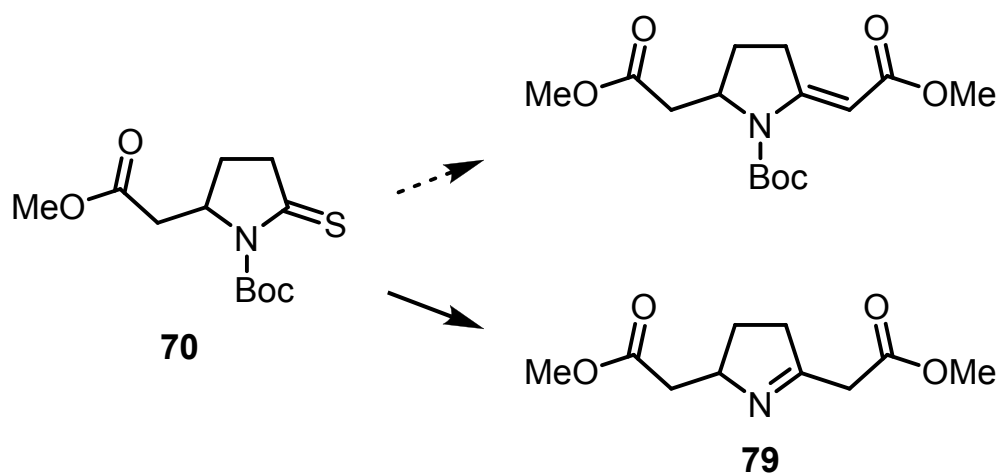


Ractivos y condiciones de reacción:(a) Boc_2O (1 eq), 4-DMAP (0.15 eq), ACN, 30 m, t.a.; 91 % (b) (metoxicarbonilme-tilen)trifenilfosforano (1.5 eq), tolueno, 90 °C, 20 h; 73 % (c) Pd/C (10 %) AcOEt (30 mL), H_2 (4 atm), t.a., 24 h; quant. (d) R. Lawesson (1.1 eq), THF, 60 °C, 90 m; 70 % (e) (metoxicarbonilmetilen) trifenilfosforano (2 eq) tolueno, 90 °C, 20 h; 69 % (f) TFA (3 eq), CH_2Cl_2 , t.a., 4 h; quant (g) HgCl_2 (1.1 eq), SMBBIT (1.1 eq), TEA (3 eq), DMF, r.t., 12 h; 85 %.

Esquema 41. Aproximación sintética de **78**.

El rendimiento global para esta secuencia de reacciones es del 27% y se obtiene el producto **78** después de 7 pasos de síntesis.

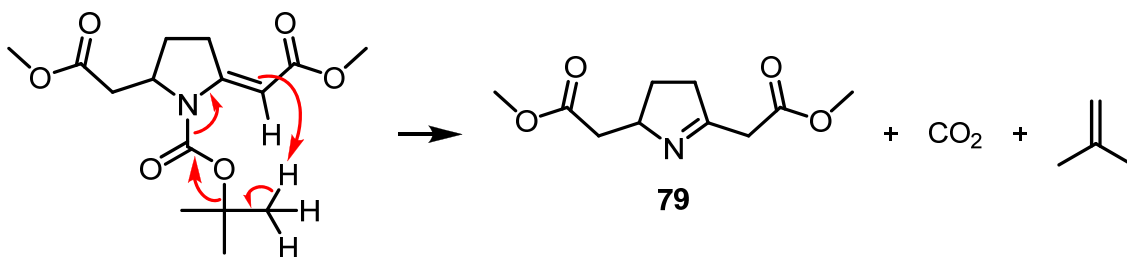
El acoplamiento de Eschenmoser sobre la tiolactama protegida **70** conduce a la eliminación del grupo protector y la formación de la imina **79**.



Reactivos y condiciones de reacción: NaI (0.5 eq), bromoacetato de metilo (3 eq) PPh₃ (2 eq), TEA (2 eq), acetonitrilo, reflujo, 3 h.

Esquema 42. Reacción de Eschenmoser sobre la tiolactama **70**.

El mecanismo propuesto para la formación de este producto es el siguiente:



Esquema 43. Mecanismo propuesto para la formación de la imina **79**.

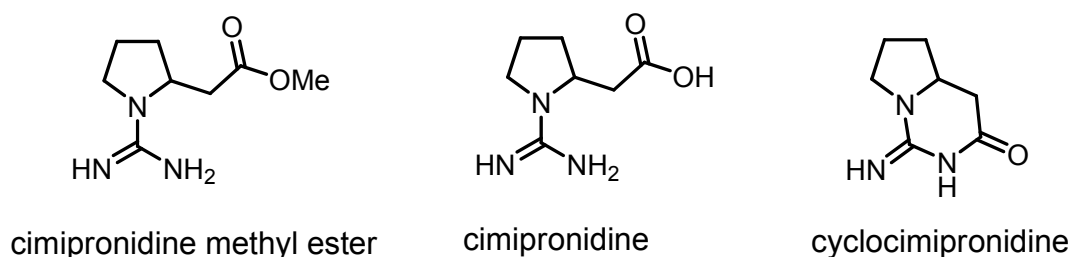
4.5 Aproximación hacia la síntesis de Cimipronidine

En el transcurso de esta tesis doctoral, observamos que la química desarrollada podría ser aplicada en la síntesis de compuestos naturales aislados de las raíces de Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*) en 2005 (Figura 49).²⁰⁹



Figura 49. Raíces de Cohosh Negro (*Cimicifuga racemosa*)

Los principales productos aislados de estas raíces se presentan en el Esquema 44.

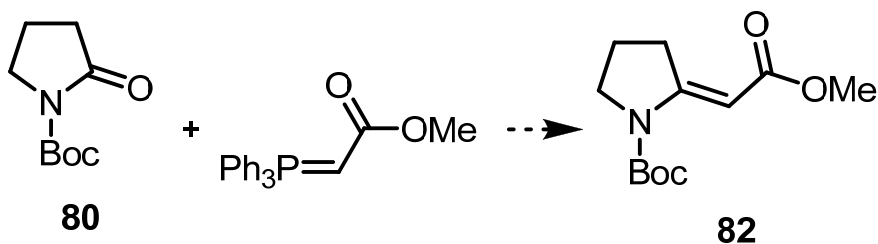


Esquema 44. Productos aislados de Cohosh Negro (*Cimicifuga racemosa*)

²⁰⁹ (a) T. Godecke, D. C. Lankin, D. Nikolic, S-N. Chen, R. B. van Breemen, N. Farnsworth, G. Pauli, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 433-437. (b) D. S. Fabricant, D. Nikolic, Dejan, D. C. Lankin, S-N. Chen, B. U. Jaki, A. Krunic, R. B. van Breemen, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, G. F. Pauli, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1266-1270.

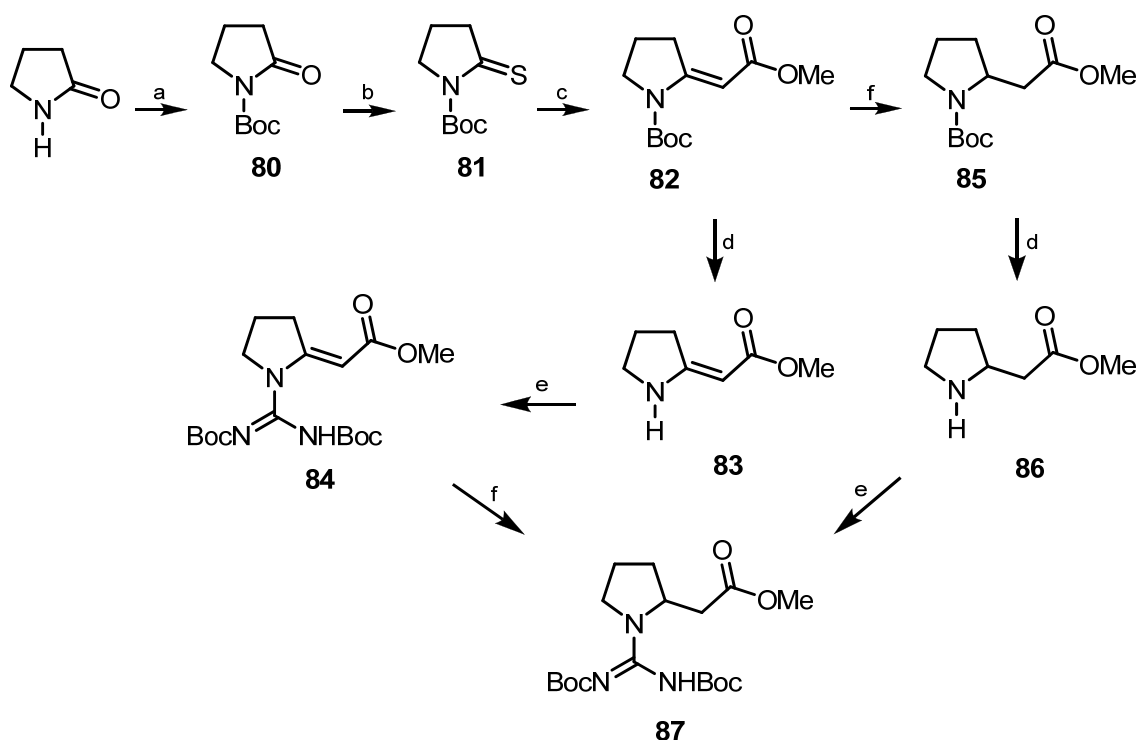
Como modelo para aplicar la química desarrollada se pensó en la síntesis del metil éster de cimprónidina.

La reacción directa sobre la pirrolidinona protegida **80** con el trifenilfosforaniliden acetato de metilo comercial, realizada en condiciones similares a las ya descritas (reacción directa con el fosforano), no fue exitosa, por lo que fue necesario preparar el tioderivado **81**.



Esquema 45. Intento de preparación de producto de acoplamiento **82**.

La secuencia de reacciones para obtener el éster metílico de cimprónidina protegido a nivel del guanidinio (**87**) se muestra a continuación (Esquema 46).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) Boc_2O (1 eq), 4-DMAP (0.15 eq), ACN, 30 m, t.a.; 93%. (b) R. Lawesson (1.1 eq), THF, 60 °C, 90 m; 70%. (c) (metoxicarbonilmetileno)trifenilfosforano (3 eq), tolueno, 90 °C, 20 h; 77%. (d) TFA (3 eq), CH_2Cl_2 , t.a., 4 h; quant. (e) HgCl_2 (1.1 eq), SMBBIT (1.1 eq), TEA (3 eq), DMF, r.t., 12 h; 73% y 75%. (f) Pd/C (10%) AcOEt, H_2 (4 atm), t.a., 24 h; quant.

Esquema 46. Preparación del compuesto **87**.

Se realiza la protección con Boc_2O de la 2-pirrolidinona comercial, con muy buen rendimiento, obteniéndose **80**. A continuación se realiza una activación con

reactivo de Lawesson, y sobre el tioderivado, **81**, se hace el acoplamiento con trifenilfosforaniliden acetato de metilo, obteniéndose el producto de acoplamiento de reacción de Wittig, **82**, luego de 48 horas de reacción y con buen rendimiento.

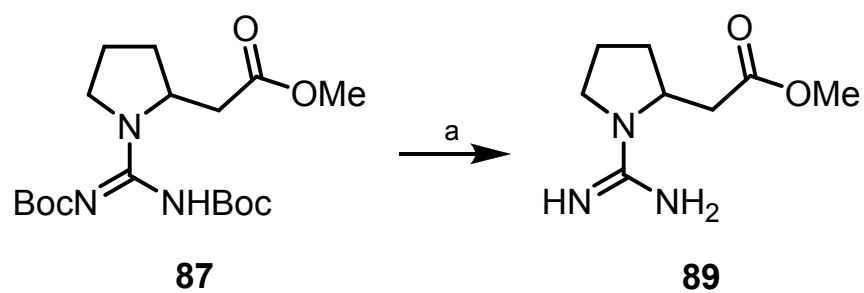
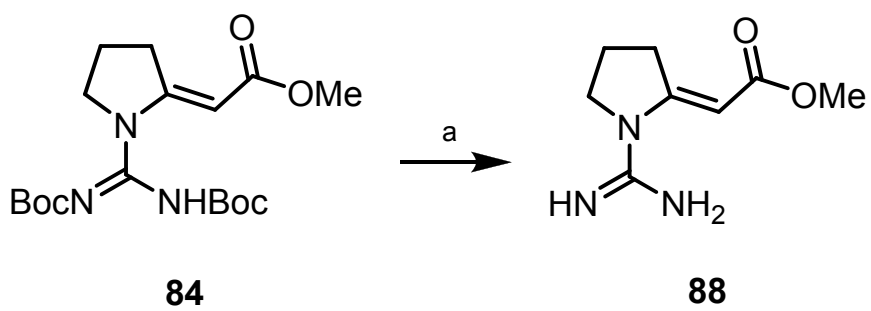
En este punto caben dos alternativas. Una, continuar con la desprotección con ácido trifluoroacético (TFA) para obtener **83**, que tras la posterior guanilación daría lugar el derivado **84**, que al ser reducido en las condiciones descritas anteriormente (Pd sobre carbono durante 24 horas a 4 atmósferas de presión de hidrógeno) permite obtener el compuesto **87**.

La otra alternativa es, si sobre el compuesto de acoplamiento de reacción de Wittig, **82**, se realiza la reducción con hidrógeno a 4 atmósferas de presión, seguido de la desprotección con TFA y de guanilación en las condiciones habituales, se obtiene el producto final protegido **87**.

Los rendimientos globales de esta secuencia de reacciones son de 36.5% para **84** y 37.5% para **87**.

Las reacciones de desprotección del guanidinio se ensayaron utilizando tetracloruro de estaño (SnCl_4) en acetato de etilo a temperatura ambiente y durante 4 horas²¹⁰. Se obtiene el guanidinio libre con rendimientos superiores a 70 % (Esquema 47). La purificación de los compuestos desprotegidos es tediosa y debido a la insolubilidad en solventes orgánicos tradicionales, se realiza cristalización utilizando metanol para disolver el compuesto y precipitación con éter etílico.

²¹⁰ H. Miel, S. Rault, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 7865-7866.



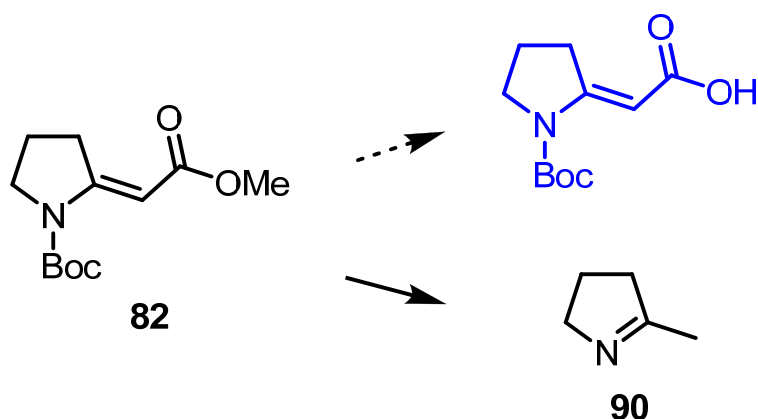
Reactivos y condiciones de reacción: (a) SnCl₄ (4 eq), AcOEt, t.a., 4 h.

Esquema 47. Preparación de los guanidinos libres **88** y **89**.

4.6 Reacciones de hidrólisis de modelos de ésteres α,β -insaturados

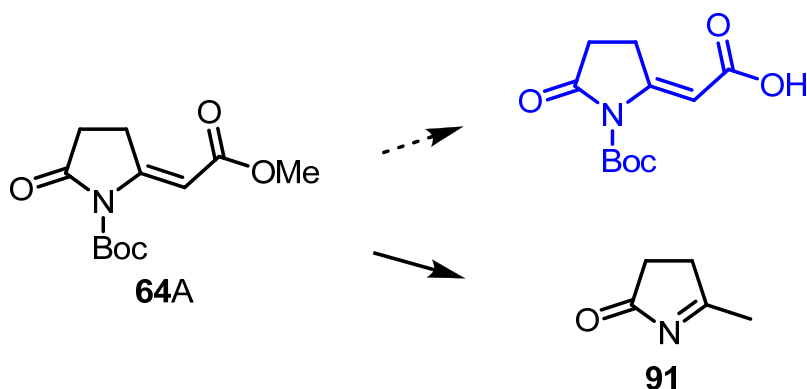
Sobre los modelos de éster metílico α,β -insaturados **82** y **64A**, se intentaron hacer reacciones de hidrólisis con el propósito de disponer de los ácidos libres, con el objetivo posterior de producir reacciones de esterificación con análogos de la cadena lateral presente sobre el C-14 en las crambescidinas. El fin de estas reacciones de transesterificación es el de obtener modelos sencillos válidos donde hacer estudios de bioactividad. Con este objetivo se intentó la hidrólisis del éster metílico **82**, utilizando para ello tanto condiciones ácidas como básicas.

Al realizar ensayos preliminares de hidrólisis ácida del éster metílico **82**, calentando a reflujo una solución de los derivados insaturados en ácido clorhídrico 2M, durante 4 horas, lo que se obtiene es la descarboxilación y formación de la imina **90**, según se muestra a continuación.



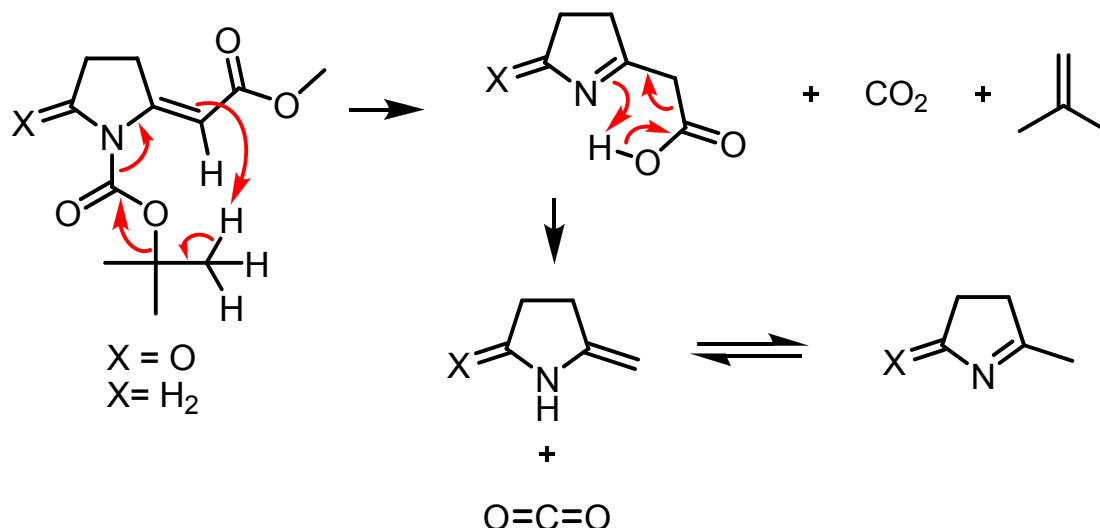
Esquema 48. Intento de hidrólisis del compuesto **82**.

En el caso del derivado de la reacción de Wittig **64A**, con un grupo carbonilo en el carbono 2, el resultado es el mismo, se obtiene la imina descarboxilada **91** en lugar del ácido libre.



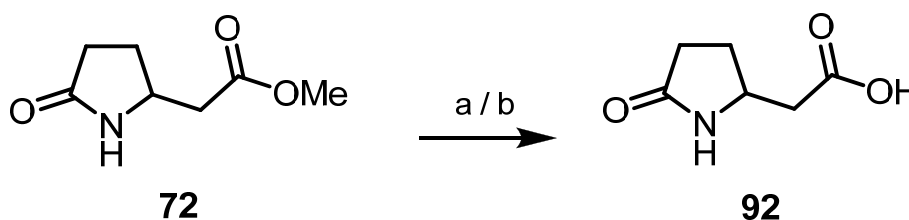
Esquema 49. Intento de hidrólisis del compuesto **64A**.

El mecanismo propuesto para la formación de estas iminas (**90** y **91**), se describe a continuación. En una primera etapa se produciría la hidrólisis del éster con formación de la imina, como en el caso en que realizábamos la reacción de Eschenmoser, y en una segunda etapa se produciría la descarboxilación, favorecida por la presencia de la imina.



Esquema 50. Mecanismo propuesto para la obtención de las iminas **90** y **91**.

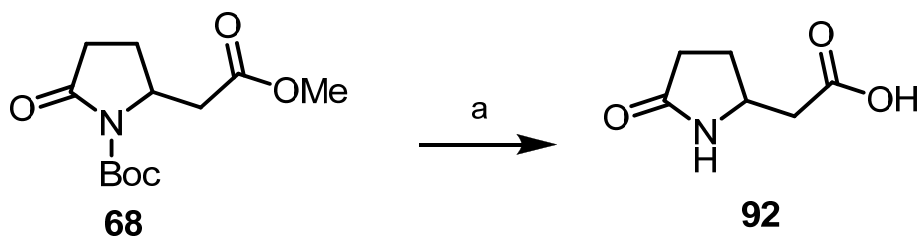
La hidrólisis básica de los ésteres **82** y **64A** conduce a una mezcla muy compleja de productos. Por el contrario, los compuestos homólogos con el doble enlace hidrogenado, como es el compuesto **72**, la reacción de hidrólisis se consigue utilizando tanto un medio básico como un medio ácido, y se obtiene el compuesto **92** con un 64 % o 68% de rendimiento (condiciones a o b respectivamente).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) HCl (2M), reflujo, 4 h, 68 %. (b) i) NaOH (3N), MeOH, 18 h, t.a. ii) Dowex 50W, 2 h, t.a, 64 %.

Esquema 51. Preparación del compuesto **92**.

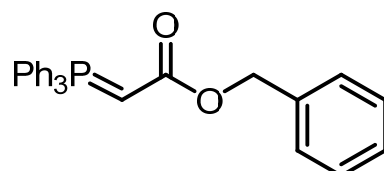
Si se utiliza el compuesto **68**, en el que además de estar hidrogenado el doble enlace se encuentra protegido el nitrógeno, la reacción con ácido clorhídrico 2M, produce la hidrólisis del éster y la desprotección simultánea del nitrógeno en un mismo paso de reacción, dando lugar al ácido **92** en un 49% de rendimiento.



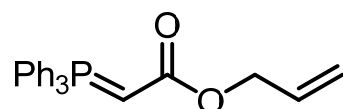
Reactivos y condiciones de reacción: (a) HCl (2M), reflujo, 4 h, 49 %.

Esquema 52. Preparación de **92** a partir del compuesto **68**.

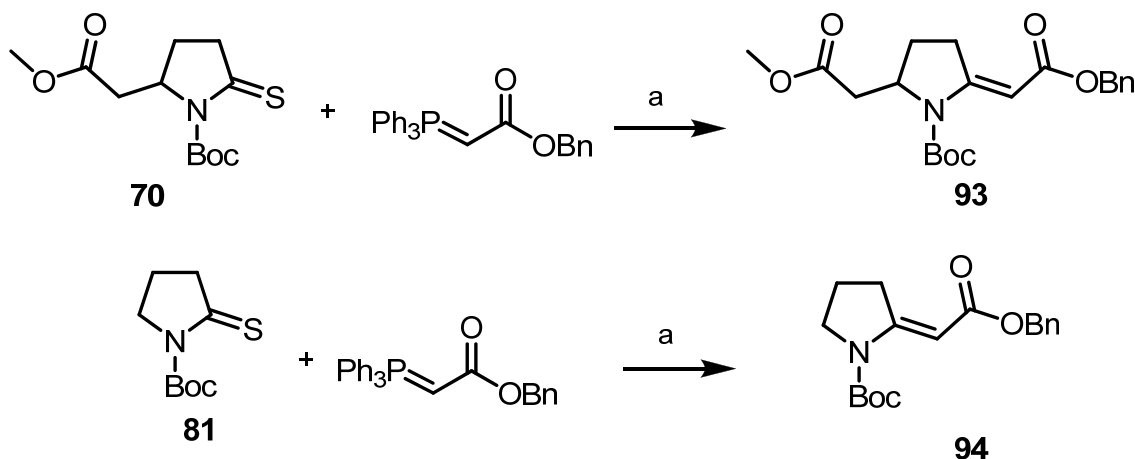
Con el fin de poder aplicar condiciones de hidrólisis más suaves, preparamos modelos de sistemas α,β -insaturados esterificados con grupos bencilo. La reacción de desprotección por hidrogenación del protector de bencilo puede afectar al doble enlace, dependiendo del tiempo de reacción y la presión de hidrógeno aplicada.



También se podría utilizar el éster alílico, en cuyo caso la desprotección se realizaría en condiciones suaves, utilizando tetrakis de paladio (0) y morfolina.



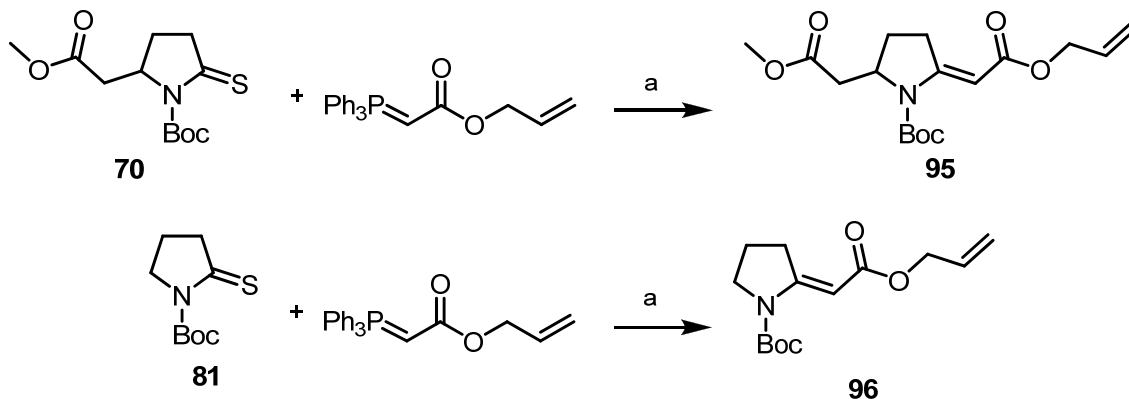
En el siguiente esquema se describe la obtención del compuesto de reacción de Wittig con bencilo. La reacción requiere 72 horas para completarse, y los productos de acoplamiento **93**, y **94**, se obtienen con buenos rendimientos (75% y 68% respectivamente).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) tolueno, 90 °C, 72 h,

Esquema 53. Preparación de los bencil derivados **93** y **94**.

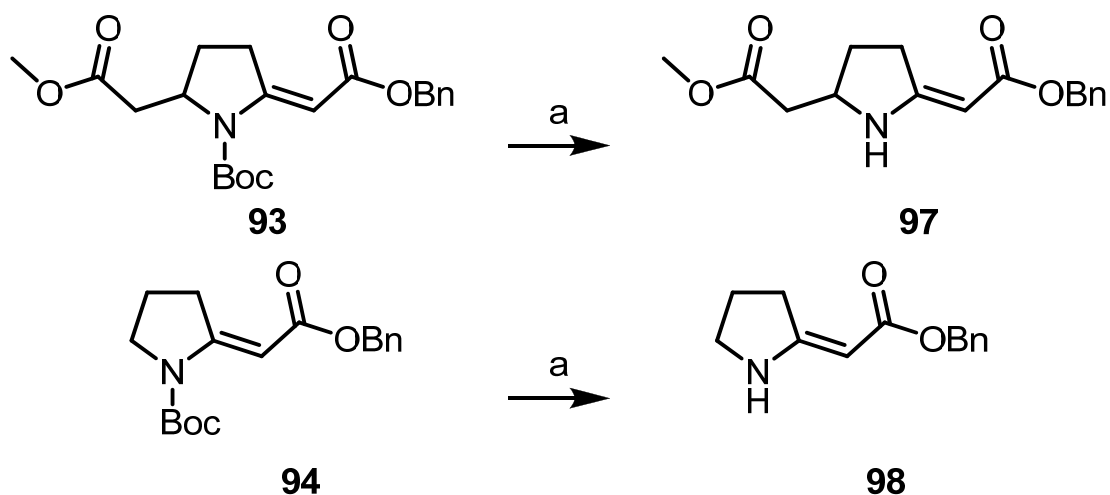
La preparación de los alil derivados se lleva a cabo en las mismas condiciones, pero el tiempo de reacción, en estos casos, es de 48 horas, y los rendimientos para la preparación de **95** y **96** son algo menores (53% y 52%, respectivamente).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) tolueno, 90 °C, 48 h,

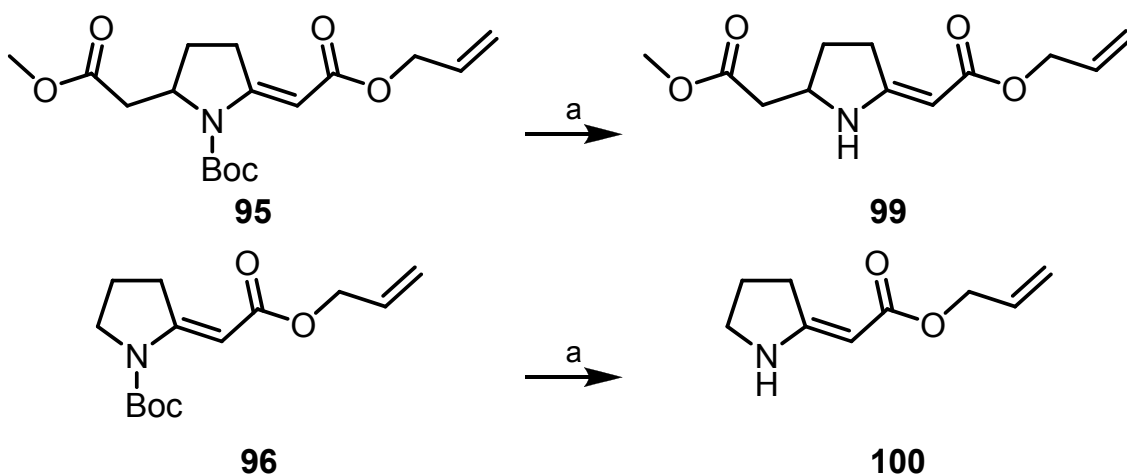
Esquema 54. Preparación de los alil derivados **95** y **96**.

Una vez obtenidos los productos de acoplamiento, se realiza la desprotección del grupo Boc utilizando para ello ácido trifluoroacético, como en los casos anteriores (6 equivalentes).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) TFA (6 eq), CH_2Cl_2 , t.a., 3 h

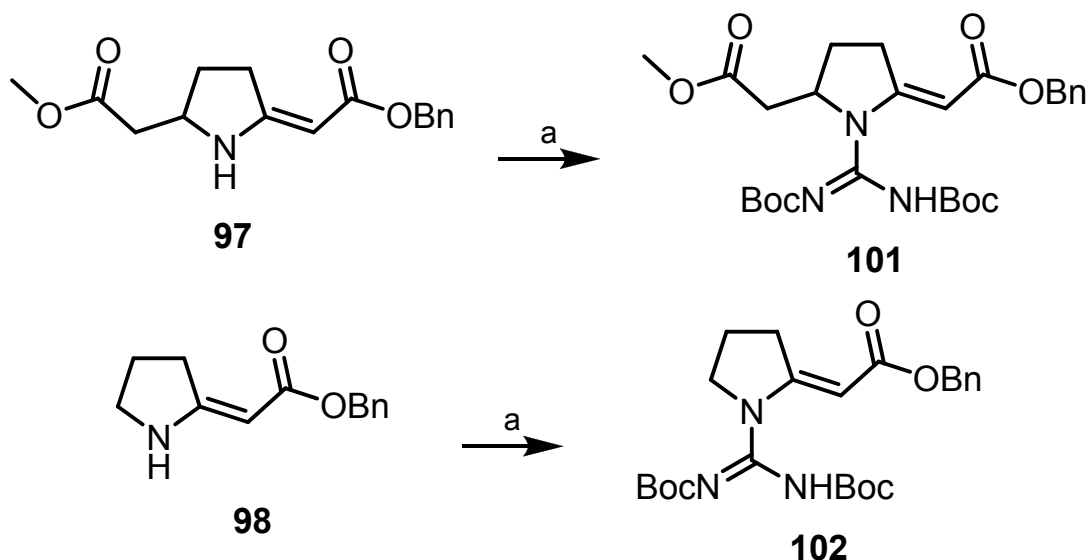
Esquema 55. Desprotección con TFA para obtener **97** y **98**.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) TFA, CH₂Cl₂, t.a., 3 h.

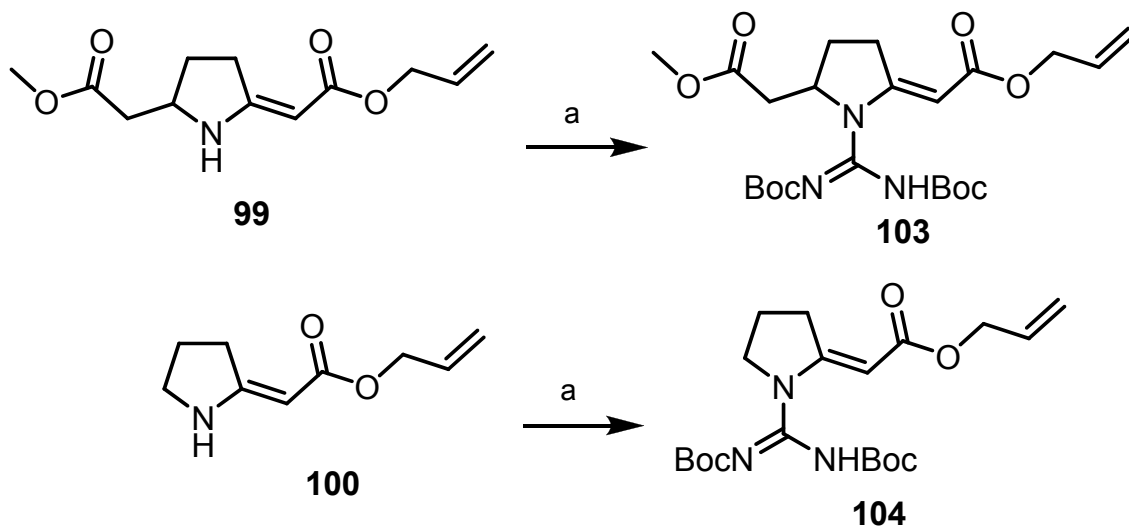
Esquema 56. Desprotección con TFA para obtener **99** y **100**.

Sobre los productos desprotegidos se realiza la reacción de guanilación, con el fin de obtener derivados guanilados. Las condiciones de reacción usadas son metilisotiurea (SMBBIT) y cloruro de mercurio (HgCl₂) como agente guanilante.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) SMBBIT (1.1 eq), HgCl₂ (1.1 eq), TEA (3 eq), DMF, t.a., 4 h.

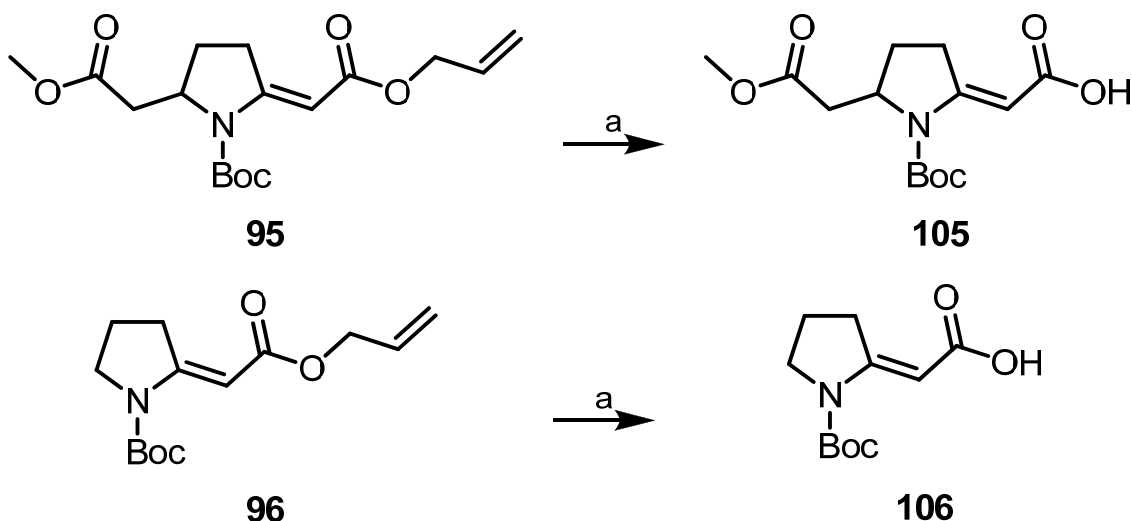
Esquema 57. Guanilación para obtener los compuestos **101** y **102**.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) SMBBIT (1.1 eq), HgCl₂ (1.1 eq), TEA (3 eq), DMF, t.a., 4 h.

Esquema 58. Guanilación para obtener los compuestos **103** y **104**.

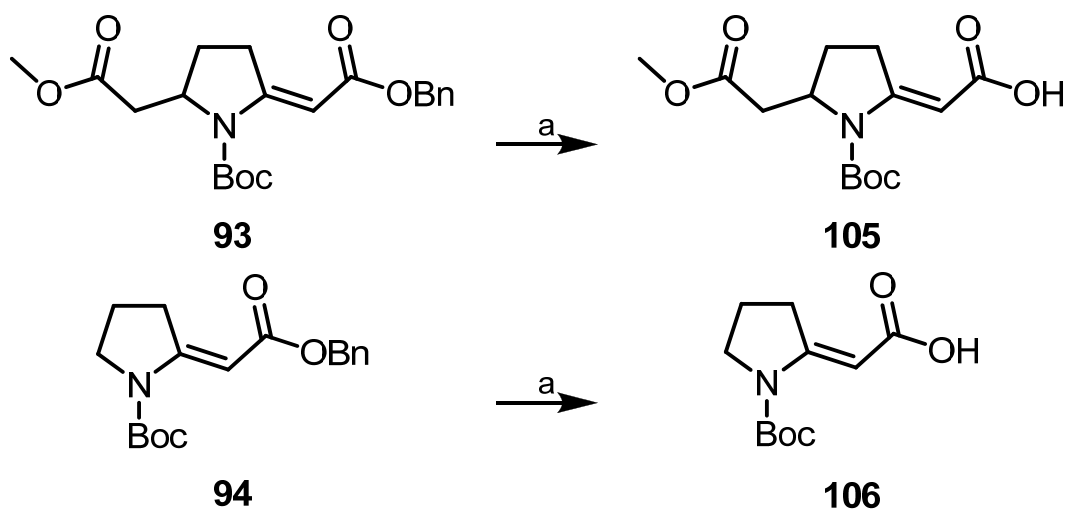
La liberación del ácido de estos derivados se lleva a cabo de manera sencilla, utilizando condiciones suaves de reacción, lo que nos permite obtener los productos con el ácido libre, **105** y **106**, por tratamiento del derivado de alilo correspondiente con tetrakis de paladio y morfolina como base, con rendimientos superiores al 70 % en dos horas de reacción.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) Pd(PPh₃)₄, morfolina, acetonitrilo, t.a., 2h.

Esquema 59. Preparación de los compuestos **105** y **106**.

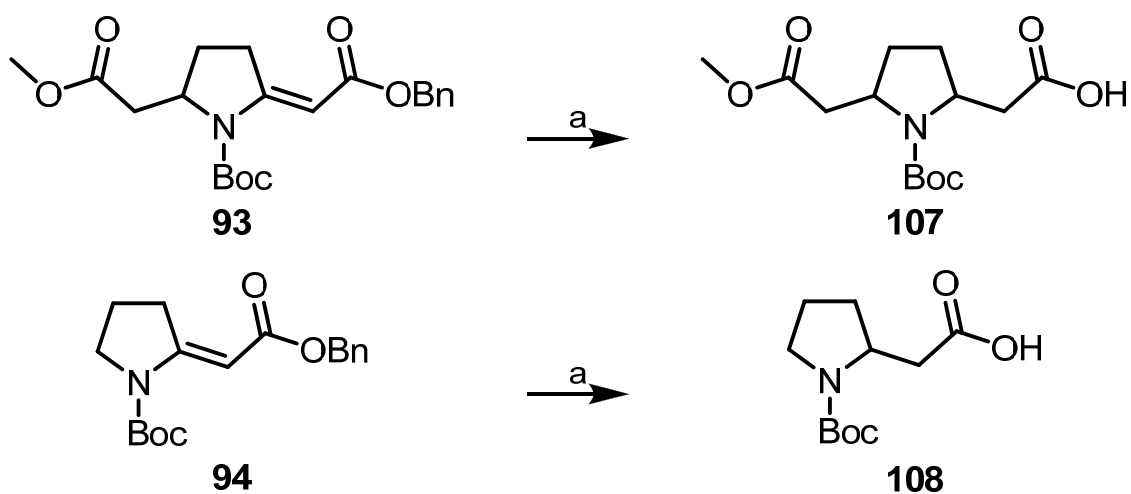
Para los derivados del bencilo, la desprotección se lleva a cabo mediante hidrogenación a 1 atmósfera de presión en acetato de etilo y con paladio al 10% sobre carbono. La reacción se completa a las 24 horas sin afectar el carácter insaturado del ácido carboxílico.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) H₂ (1 atm), AcOEt, t.a., 24 h.

Esquema 60. Hidrogenaciones a 1 atm para obtener **105** y **106**.

Si la hidrogenación se lleva a cabo a 4 atmósferas de presión, se obtienen los productos con el doble enlace reducido **107** y **108**, como se muestra en el siguiente esquema.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) H₂ (4 atm), AcOEt, t.a., 24 h.

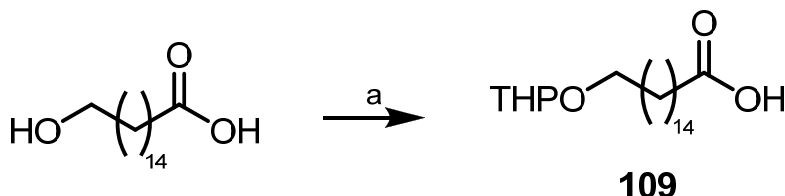
Esquema 61. Hidrogenaciones a 1 atm para obtener **107** y **108**.

Sobre estos derivados con el ácido libre, se ensayan las reacciones de esterificación con análogos de la cadena lateral de ptilomycalina-A, como se discutirá a continuación.

4.7 Síntesis de la cadena lateral de la Ptilomicalina A

Para la preparación de análogos de espermidina **19** se sigue la metodología reportada por Hart *y colaboradores*.²⁰¹

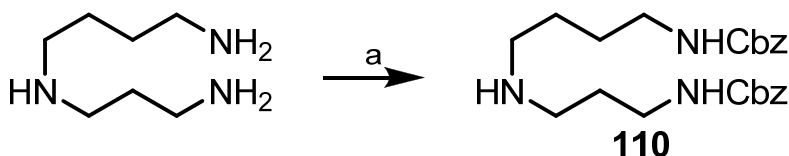
Se parte del hidroxiaácido 16-hidroxi-decanoico y se realiza la protección con THP, para obtener el compuesto **109** con un 80 % de rendimiento.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) DHP (1.5 eq), pTsOH (cat.), THF, 0 °C, 5 h; 80 %.

Esquema 62. Preparación del compuesto **109**.

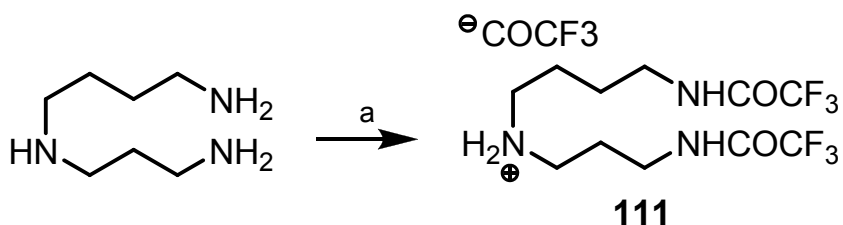
Para la protección de espermidina comercial se eligieron 2 grupos protectores, carboxibenzoilo (Cbz) y trifluoroacetato (COCF₃). En el caso del Cbz, por tratamiento de espermidina comercial con cianoformato de bencilo, se obtiene el compuesto de interés **110**, con excelentes rendimientos (95%).



Reactivos y condiciones de reacción: BnCO₂CN (2 eq), CH₂Cl₂, 0 °C, 2 h; 95 %.

Esquema 63. Protección de espermidina con Cbz.

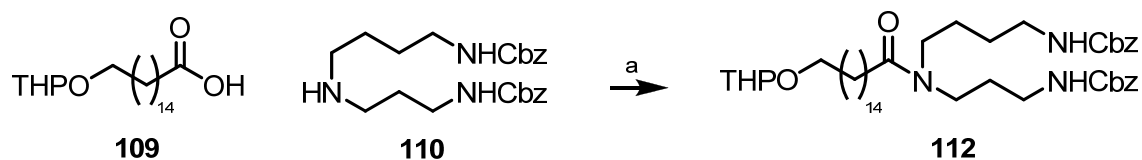
La protección con el COCF₃ se realiza utilizando trifluoroacetato de etilo en una disolución de agua:acetonitrilo. Se obtiene el producto protegido **111**, con un rendimiento del 91 %.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) CF₃CO₂Et (3 eq), acetonitrilo, agua, reflujo, 4 h, 91 %.

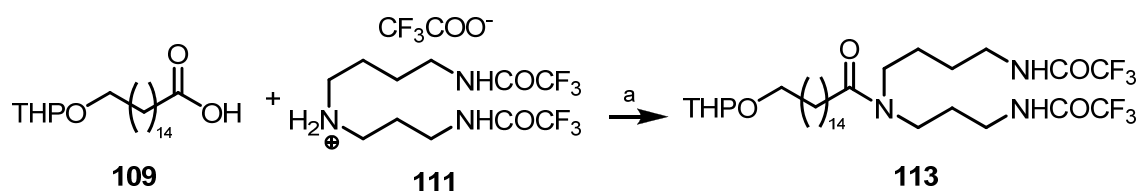
Esquema 64. Protección de espermidina con COCF₃.

Las reacciones de amidación se intentaron utilizando ácido hidroxibenzotriazol (HOBT) como agente acoplante según se describe en la referencia de Hart, pero en este caso no se consigue reacción. Cuando se utiliza EDCI y DMAP, en diclorometano y a temperatura ambiente, se obtiene la amida en ambos casos y los rendimientos son buenos (Esquemas 63 y 64).



Reactivos y condiciones de reacción: (a) EDCI (1 eq), DMAP (Cat.), CH₂Cl₂, t.a., 24 h; 92%.

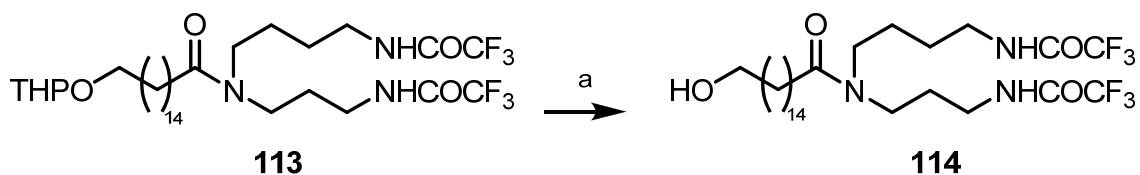
Esquema 65. Amidación para obtener el compuesto **112**.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) EDCI (1 eq), DMAP (Cat.), CH₂Cl₂, t.a., 24 h; 75%.

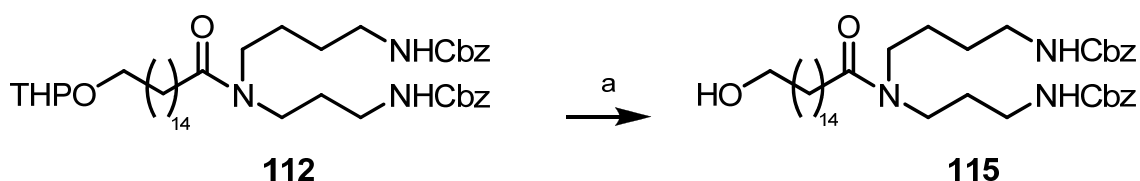
Esquema 66. Amidación para obtener el compuesto **113**.

La desprotección del alcohol se realiza utilizando resina de intercambio ácida Dowex-50W agitando a temperatura ambiente, y se obtiene el producto de interés en ambos casos, **114** y **115**.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) Dowex-50W, t.a., 8 h; 82%.

Esquema 67. Desprotección con Dowex-50W para obtener el alcohol **114**.



Reactivos y condiciones de reacción: (a) Dowex-50W, t.a., 8 h; 85%.

Esquema 68. Desprotección con Dowex-50W para obtener el alcohol **115**.

Estos productos se utilizarán en las reacciones de esterificación con los derivados ácidos sintetizados anteriormente.

4.8 Conclusiones

En la búsqueda de modelos sintéticos donde investigar la generalizada actividad biológica observada en las crambescidinas, se sintetizan, a partir de la succinimida, derivados 2,5 funcionalizados de pirrolidinas, susceptibles de ser utilizados como productos de partida en la síntesis de los diversos núcleos pentacíclicos presentes en las crambescidinas.

Se seleccionan, sobre los modelos preparados condiciones de guanilación y de hidrólisis selectiva de funciones terminales de diéster, para generar monoácidos donde iniciar estudios de esterificación.

Se realizan estudios de síntesis de los compuestos guanidínicos que se aíslan de las raíces de la planta *Cimicifuga racemosa*. A partir de la 2-pirrolidona comercial se sintetiza el compuesto natural ester metílico de cimipronidina.

Se sintetiza la cadena lateral presente en la ptilomicanina A con el fin de preparar ésteres de los modelos guanidínicos preparados.

El criterio seguido en este trabajo sintético ha sido el de, a partir de moléculas de fácil acceso comercial y bajo coste económico, introducir funciones adecuadas para optimizar el proceso sintético definido en el proyecto sobre modelos de crambescidinas donde realizar estudios de bioactividad.

4.9 Abreviaturas y símbolos

[M] ⁺	Ión Molecular
¹³ C- RMN	Resonancia Magnética Nuclear De Carbono
¹ H- RMN	Resonancia Magnética Nuclear De Protón
Ac	Acetilo
Ac ₂ O	Anhídrido Acético
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato De Etilo
AcOH	Ácido Acético
AE	Análisis Elemental
[α] _D ²⁰	Rotaciones Ópticas
BBT	Bis Boc Tiourea
Bn	Bencilo
Boc	Terct-Butiloxycarbonil
Br ₂	Bromo
Bu	Butilo
BZA	Ácido Bencensulfínico
CaCl ₂	Cloruro De Calcio
cat.	Catalítico
CBZ	Carbobenziloxi
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
CI	Ionización Química
COCF ₃	Trifluoroacetato
COSY	Acrónimo De Correlated Spectroscopy
d	Doblete
d	Dias
D ₂ O	Agua Deuterada
dd	Doblete De Doblete
ddd	Doble Doblete De Doblete
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
dt	Doble Triplete
EDCI	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Carbodiimida
EI	Impacto Electrónico
EM	Espectroscopía De Masa De Baja Resolución
eq	Equivalente
ESI	Impacto Por Electro Spray
Et	Etilo
Et ₂ O	Eter Etílico
FAB	Bombardeo Con Átomos Rápidos
g	Gramo
h	Horas
HgCl ₂	Cloruro De Mercurio
HOBT	Ácido Hidroxibenzotriazol
HRMS	Espectroscopía De Masa De Alta Resolución
Hz	Herzios
IR	Infrarrojo
J	Constante De Acoplamiento
K ₂ CO ₃	Carbonato De Potasio
KBr	Bromuro De Potasio

KHMDS	Hexametildisilano De Potasio
KOH	Hidróxido De Potasio
LiBr	Bromuro De Litio
M	Molar
Me	Metilo
m	Multiplete
m.	Minutos
m/z	Relación Masa/Carga
<i>m</i> -CPBA	Ácido <i>m</i> -Cloroperbenzoico
MeOH	Metanol
mg.	Miligramos
MgSO ₄	Sulfato De Magnesio
mL	Mililitros
mmol	Milimol
Na ₂ SO ₄	Sulfato De Sodio
NaCl	Cloruro De Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato De Sodio
NBS	N-Bromosuccinimida
<i>n</i> -Buli	N Butil Litio
NH ₃	Amoniaco
NIS	N-Iodosuccinimida
NMO	N-Óxido De Morfolina
NOP	N-Oxido De Piridina
OBN	Oxibencilo
OsO ₄	Tetróxido De Osmio
P.F.	Punto De Fusión
Pd	Paladio
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis De Trifenilfosfina Paladio (0)
Ph	Fenilo
PMBCl	Cloruro De para-Metoxi Bencilo
ppm	Partes Por Millón
PtO ₂	Óxido De Platino
<i>p</i> -TsOH	Ácido para-Toluensulfónico
Rf	Factor De Retención En TLC
RMN	Resonancia Magnética Nuclear De Carbono
s	Singlete
sat.	Disolución Acuosa Saturada
SMBBIT	S-Metil Bis Boc Iso Tiourea
SnBu ₃ Cl	Cloruro De Tributyl Estaño
t	Triplete
t.a.	Temperatura Ambiente
TBAF	Fluoruro De Tetrabutilamonio
TBAI	Ioduro De Tetrabutilamonio
TBDMS-Cl (TBS-Cl)	Cloruro De Terct-Butil Dimetil Silicio
TBHP	<i>Terct</i> -Butil Hidroperóxido
<i>t</i> -Buli	<i>Terct</i> -Butil Litio
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
THF	Tetrahidrofuranol
THP	Tetrahidropirano
TLC	Cromatografía En Capa Fina

4.10 Parte Experimental

4.10.1 Técnicas instrumentales generales

Disolventes y reactivos

Todas las reacciones fueron realizadas bajo atmósfera de argón, salvo que se indique lo contrario. Los reactivos y disolventes utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Acros o Scharlau.

Los disolventes secos fueron adquiridos de Aldrich o destilados previo a su uso por procedimientos habituales.²¹¹

Procedimientos Generales

Las reacciones fueron extraídas como se indican, secadas sobre Na₂SO₄ o MgSO₄ anhidros, filtradas a través de papel y llevadas a sequedad en rotavapor a presión reducida.

La purificación de los productos de reacción fue realizada por cromatografía en columna a baja presión (flash chromatography)²¹² (utilizando como fase estacionaria gel de sílice Merck 60 (200-400 mesh) y como fase móvil disolventes orgánicos convencionales. Se indica el eluyente utilizado en cada caso, así como también las proporciones empleadas.

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (TLC) empleando cromatofolios de gel de sílice 60F254 Merck, con soporte de aluminio, en capas de 0.2 mm de espesor. Se indica en cada caso la fase móvil utilizada. El revelado de las placas se realizó por inmersión en disolución de: ninhidrina, ácido fosfomolibdico (10 % en EtOH), verde de bromocresol y/o visualización en luz UV (254 nm).

Las reacciones de hidrogenación en condiciones de alta presión se llevaron a cabo en hidrogenadores adaptados con manoreductores proporcionados por Anorsur S.L.

²¹¹ Armarego, W. L.; Perrin, D. D. Purification of Laboratory Chemicals; Butterworth-Heinemann: Oxford, 1996.

²¹² Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.

Técnicas y aparatos

Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ^1H y de carbono ^{13}C (con desacoplamiento de protón) se realizaron a temperatura ambiente en el disolvente indicado en cada caso (CDCl_3 , CD_3OD , DMSO-d_6 , acetona- d_6 , D_2O), utilizando para ellos los siguientes equipos: Bruker DRX-500, Bruker DRX-400 y Bruker DPX-300. Los valores de desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (δ , ppm), utilizando como referencia interna la señal residual del disolvente.

Espectroscopía de Infrarojo

Los espectros de infrarojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro Bruker modelo Vector 22 con software OPUS/IR. Las frecuencias de los máximos de absorción se expresan en cm^{-1} . Las muestras se analizaron con pastillas de NaCl o de KBr.

Espectrometría de Masas

Los espectros de masas de baja resolución (EM) se registraron en un espectrómetro Esquire 6000 ESI-MS Bruker Daltonics. Se realizaron en modo de escaneado positivo, excepto los compuestos **50** y **51** que se hicieron en negativo. Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa (m/z).

Los espectros de masas de alta resolución (H.R.M.S) se realizaron en un FISIONS VG-Autospec. Las técnicas de ionización fueron: impacto electrónico a 70 eV (EI), bombardeo con átomos rápidos (FAB) e ionización química (CI). En cada caso se especifica la técnica utilizada.

Puntos de fusión

Los puntos de fusión (P.F.) han sido determinados en un aparato MEL-TEMP[®] modelo 1002D y se informan sin corregir.

Actividad Óptica

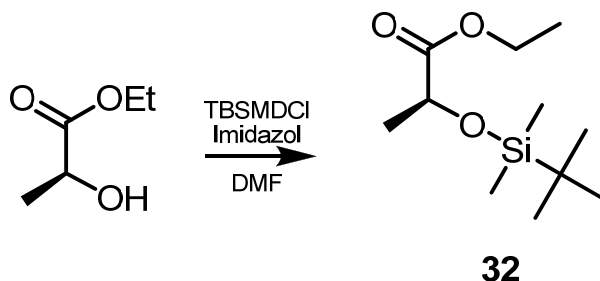
Las rotaciones ópticas ($[\alpha]_D^{20}$) se midieron a temperatura ambiente en un polarímetro Perkin Elmer modelo 341, utilizando una célula de cuarzo de 10 cm de longitud y una capacidad de 1 mL. En cada caso se indica el disolvente y la concentración utilizados (c en g/100 mL).

Análisis elemental

Los análisis elementales (AE) se han realizado en un aparato LECO CHNS-932. Los resultados se expresan en tanto por ciento.

4.10.2 Descripción de reacciones y datos físicos y espectroscópicos de los compuestos preparados en este capítulo

Preparación de (2S)-(2-*tert*-butildimetilsililoxi)propanoato de etilo (32).^{195a}



A una solución de (S)-lactato de etilo (6.52 g, 55.2 mmol, 1 eq) en DMF anhidro (40 mL) bajo argón se agrega imidazol (413 g, 60.7 mmol, 1.1 eq) y TBS-Cl (8.99 g, 59.6 mmol, 1.1 eq). La mezcla se agita durante 48 horas a temperatura ambiente. Se vuelca sobre un baño de agua-hielo. Se extrae con éter etílico (40 mL x3). Las fases orgánicas se reúnen, se lava con brine, se seca con MgSO₄, se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:Et₂O (2:1) como fase móvil. Se obtiene el alcohol protegido **32** como un aceite incoloro (10.7 g, R = 85%).

Rf: 0.90 (n-Hexano:Et₂O; 2:1)

$[\alpha]_D^{20}$: +8.5 (*c* 1.2, CHCl₃)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.31 (1H, q, *J* = 6.73 Hz, H2), 4.17 (2H, dq, *J* = 7.07, 4.70 Hz, OCH₂CH₃), 1.39 (3H, d, *J* = 6.77 Hz, H3), 1.27 (3H, t, *J* = 7.14 Hz, OCH₂CH₃), 0.90 (9H, s, 3xSiCMe₃), 0.10 (3H, s, SiCH₃), 0.07 (3H, s, SiCH₃)

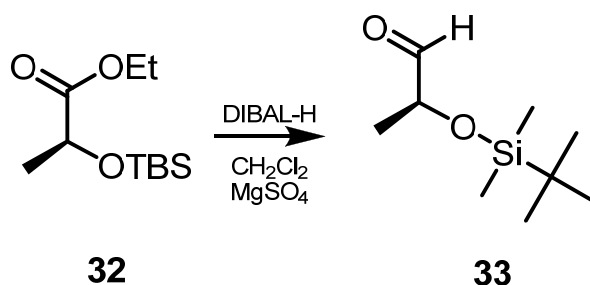
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.1 (C1), 68.4 (C2), 60.7 (OCH₂CH₃), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 21.3 (C5), 18.3 (SiCMe₃), 14.2 (OCH₂CH₃), -5.0 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 255 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹) 2932, 2858, 1754, 1472, 1372, 1256, 1146, 833, 778

AE: Calculado para C₁₁H₂₄O₃Si: C = 56.85, H = 10.41, Si = 12.09. Observado: C = 56.73, H = 9.84

Preparación de (2S)-(terc-butildimetilsililo)propanal (**33**).^{195a}



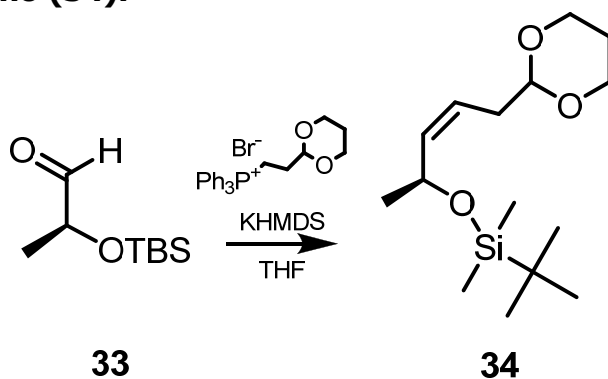
A una solución del alcohol protegido **32** (10.7 g, 46 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ anhidro (135 mL), enfriada a -78 °C, se le agrega una solución 1.0 M de DIBAL-H en CH₂Cl₂ (48.4 mL, 48.4 mmol, 1.05 eq), lentamente y con agitación bajo atmósfera de argón. La solución resultante se agita durante 1 hora a -78 °C. Se agregan 10 mL de agua y se deja alcanzar temperatura ambiente. Se agrega MgSO₄ (1.0 g) y agita durante 10 minutos para precipitar las sales presentes. Se extrae con CH₂Cl₂ (50 mL x 2). Las fases orgánicas combinadas se secan con MgSO₄, se filtra y lleva a sequedad. El aldehído **33** se utiliza directamente en la reacción de acoplamiento de Wittig.

Rf: 0.62 (n-Hexano:Et₂O; 2:1)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.62 (1H, s, H1), 4.12 (1H, dq, *J* = 7.1, 14.21 Hz, H2), 1.29 (3H, dd, *J* = 2.27, 7.0 Hz, H5), 0.92 (9H, s, 3xSiCMe₃), 0.10 (3H, s, SiCH₃), 0.09 (3H, s, SiCH₃)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 204.2 (C1), 73.8 (C2), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 18.5 (C5), 18.2 (SiCMe₃), -4.7 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃)

Preparación de (5S)-(1,3-dioxan-2-il)pent-3Z-en-2-iloxi)(*tert*-butil)dimetilsilano (34).^{195a}



Una solución de 2-(1,3-dioxan-2-il)etiltrifenilfosforano (20.79 g, 45.4 mmol, 1 eq) en THF anhidro (200 mL) se enfría a 0 °C bajo argón. Se agrega KHMDS (9.06 g, 45.4 mmol, 1 eq) en partes y la solución resultante se agita durante 2 horas mientras alcanza temperatura ambiente. Se agrega el aldehído **33** (8.56 g, 45.4 mmol, 1 eq) en THF seco (15 mL) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 36 horas. Se agrega éter etílico y se filtra a través de Florisil[®]. La solución filtrada se seca con MgSO₄, se filtra y lleva a sequedad. Se obtiene un sólido blanco que se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:Et₂O (9:1) como fase móvil. Se obtiene el alqueno **34** como un aceite incoloro (7.7 g, R = 60%).

Rf: 0.53 (n-Hexano:Et₂O; 4:1)

$[\alpha]_D^{20}$: + 31.1 (*c* 2.1, CHCl₃), (lit. +31.06 (*c* 2.07, CHCl₃))

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.52 (1H, ddt, *J* = 11.3, 8.2, 1.6 Hz, H3), 5.34 (1H, dt, *J* = 11.1, 7.4, Hz, H4), 4.61 (1H, ddd, *J* = 8.0, 6.3, 3.2 Hz, H2), 4.53 (1H, t, *J* = 5.3 Hz, H2'), 4.11 (2H, ddd, *J* = 11.8, 5.0, 1.2 Hz, H4'_{eq}, H6'_{ax}), 3.77 (2H, dt, *J* = 12.4, 2.5 Hz, H4'_{ax}, H6'_{ax}), 2.37 (2H, ddd, *J* = 7.1, 5.3, 1.6 Hz, H5), 2.10 (1H, dt, *J* = 12.5, 5.0 Hz, H5'_{ax}), 1.38-1.23 (1H, m, H5'_{eq}), 1.20 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H1), 0.89 (9H, s, 3xSiCMe₃), 0.06 (3H, s, SiCH₃), 0.05 (3H, s, SiCH₃)

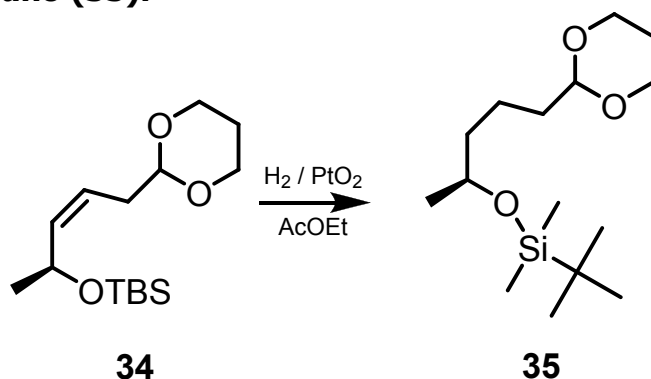
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 137.8, 121.1 (C3, C4), 101.6 (C2'), 66.9 (C4', C6'), 65.2 (C2), 33.8 (C5), 25.9 (SiC(CH₃)₃), 25.7 (C5'), 24.6 (C1), 18.2 (SiCMe₃), -4.2 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 309 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 2957, 2855, 2731, 1731, 1678, 1471, 1429, 1372, 1253, 1141, 1005, 835, 777

AE: Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{Si}$: C = 62.89, H = 10.55, Si = 9.80. Observado: C = 62.91, H = 10.08

Preparación de (2S)-(1,3-dioxan-2-il)pentan-2-iloxi)(*tert*-butil)dimetilsilano (35).^{195a}



A una solución del alqueno **34** (6 g, 20.9 mmol, 1 eq) en AcOEt anhidro (100 mL), bajo argón, se agrega óxido de platino (200 mg, 0.88 mmol, 0.042 eq). El argón se cambia por hidrógeno y la mezcla de reacción se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtra a través de papel y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:Et₂O (4:1) como fase móvil. Se obtiene el producto reducido **35** como un aceite (5.4 g, R = 89%).

Rf: 0.47 (n-Hexano:Et₂O; 4:1)

$[\alpha]_D^{20}$: + 7.6 (*c* 2.5, CHCl₃), (lit. +7.7 (*c* 2.47, CHCl₃))

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.51 (1H, t, *J* = 5.1 Hz, H2'), 4.20-4.02 (2H, m, H4'_{ax}, H6'_{ax}), 3.72-3.82 (3H, m, H2, H4'_{eq}, H6'_{eq}), 2.08 (1H, tq, *J* = 15.5, 5.0 Hz, H5'_{ax}), 1.59 (2H, ddd, *J* = 11.4, 6.6, 3.9 Hz, H3), 1.52-1.27 (5H, m, H5'_{eq}, H5, H4), 1.12 (3H, d, *J* = 6.1, H1), 0.89 (9H, s, 3xSiCMe₃), 0.05 (6H, s, SiCH₃)

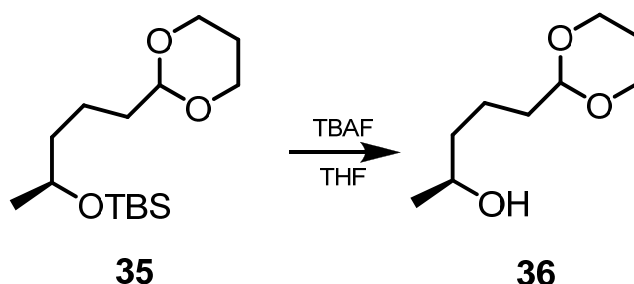
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 102.3 (C2'), 68.5 (C2), 66.9 (C4', C6'), 39.5, 35.2 (C3, C5), 25.9 (SiC(CH₃)₃), 25.8 (C5'), 23.6 (C1), 20.2 (C4), 18.1 (SiCMe₃), -4.4 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 311 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2956, 2928, 2854, 1462, 1376, 1254, 1145, 1079, 1004, 834, 773

AE: Calculado para C₁₅H₃₂O₃Si: C = 62.45, H = 11.18, Si = 9.74. Observado: C = 62.55, H = 10.93

Preparación de (5S)-(1,3-dioxan-2-il)pentan-2-ol (**36**).^{195a}



A una solución del alcohol protegido **35** (5.4 g, 18.7 mmol, 1 eq) en THF anhidro (19 mL), bajo argón, se agrega una solución de TBAF 1.0 M en THF (27 mL, 27 mmol, 1.4 eq). Se agita a temperatura ambiente durante 10 horas. La mezcla se diluye con éter etílico y se lava, primero con agua y Después con brine. La capa orgánica se seca con MgSO₄ y se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:Et₂O (gradiente de 20% a 90% en Et₂O) como fase móvil. Se obtiene el alcohol **36** como un aceite incoloro (5.4 g, R = 92%).

Rf: 0.32 (n-Hexano:Et₂O; 1:9)

$[\alpha]_D^{20}$: + 7.37 (*c* 1.6, CHCl₃), (lit. +7.36 (*c* 1.55, CHCl₃))

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.51 (1H, t, *J* = 5.0 Hz, H2'), 4.21-3.98 (2H, m, H4'_{ax}, H6'_{ax}), 3.90-3.56 (3H, m, H2, H4'_{eq}, H6'_{eq}), 2.19-1.89 (1H, m, H5'_{ax}), 1.77 (1H, s.a, OH), 1.68-1.53 (2H, m, H5), 1.49-1.40 (4H, m, H4, H3), 1.39-1.28 (1H, m, H5'_{eq}), 1.17 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, H1)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 102.2 (C2'), 67.8 (C2), 66.9 (C4', C6'), 39.0, 35.0 (C3, C5), 25.8 (C5'), 23.4 (C1), 20.1 (C4)

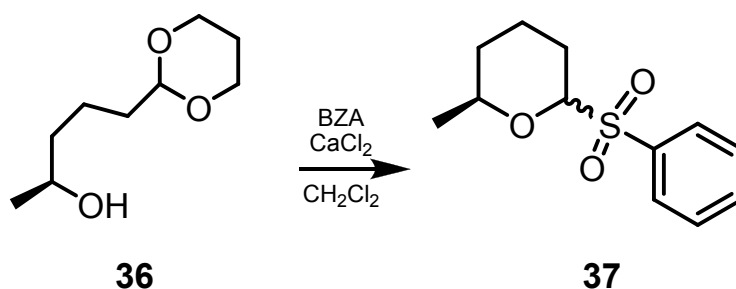
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 197 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3423, 1961, 2852, 1460, 1405, 1377, 1285, 1243, 1144, 1074, 998

AE: Calculado para C₉H₁₈O₃: C = 62.04, H = 10.41. Observado: C = 63.17, H = 10.79

Preparación de (2S)-metil-6-(fenilsulfonil)-tetrahidro-2H-pirano (37).

195a



Se disuelve ácido bencensulfónico recientemente preparado (4.41 g, 31.1 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 anhidro (50 mL) y se agrega CaCl_2 anhidro (13.7 g). A esta suspensión se le agrega el alcohol **36** (5.4 g, 31.1 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 (20 mL) con una cánula. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtra a través de celite, se lleva a sequedad y se purifica por Florisil[®] utilizando una mezcla de n-Hexano:Et₂O (3:7) como fase móvil. Se obtiene la sulfona **37** como una mezcla de los anómeros (3.623 g, R = 48%).

Rf: 0.67 (n-Hexano:Et₂O; 1:9)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.98-7.91 (2H, m, H3'), 7.72-7.63 (1H, m, H4'), 7.56 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H2'), 4.70 (1H, dd, $J = 1.7, 6.6$ Hz, H6), 4.56 (1H, dq, $J = 12.7, 6.4$ Hz, H2), 2.55 (1H, dddd, $J = 1.8, 3.7, 5.6, 14.6$ Hz, H5), 2.03 -1.93 (1H, m, H5), 1.76 (2H, dt, $J = 7.6, 4.8$ Hz, H4), 1.22 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H3), 1.16 (1H, d, $J = 6.14$ Hz, H3), 1.11 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, Me)

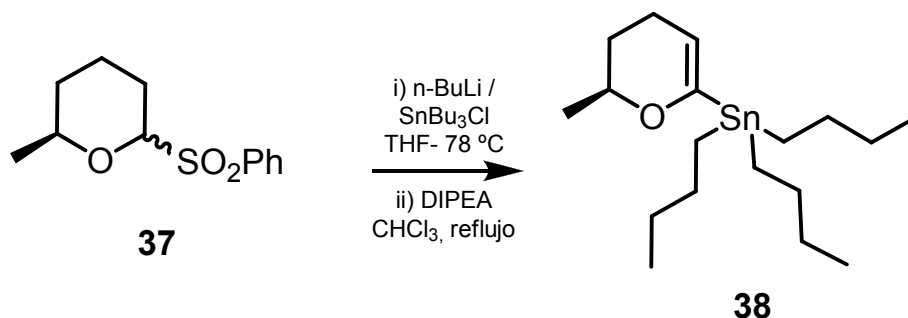
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 136.3 (C1'), 134.4 (C3'), 133.8 (C4'), 129.7 (C2'), 92.0 (C6), 69.6 (C2), 23.5 (C3), 22.9 (C5), 22.4 (C4), 21.8 (Me)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 263 ([M + Na]⁺, 100), 165 (82)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3040, 2934, 2857, 1714, 1644, 1446, 1383, 1303, 1147, 1102, 883, 803, 792, 753, 719, 602

AE: Calculado para C₁₂H₁₆O₃S: C = 59.97, H = 6.71, S = 13.34. Observado: C = 59.16, H = 6.08, S = 12.94

Preparación de (2S)-(metil-3,4-dihidro-2H-piran-6-il)tributilestaño (38).^{195a}



A la mezcla de la sulfona **37** (100 mg, 0.42 mmol, 1 eq) en THF (10 mL) a -78 °C bajo argón, se adiciona una solución 1.6M de n-butillitio en n-Hexanos (0.3 ml, 0.5 mmol, 1.2 eq). Después de 1 hora se agrega lentamente cloruro de tributilestaño (0.13 ml, 0.46 mmol, 1.2 eq). Se mantiene a -20 °C durante 30 minutos y se vuelca sobre una solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrae con éter etílico (10 mLx 3) y las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO₄) y se lleva a sequedad. El aceite obtenido se disuelve en CHCl₃ (10 mL), se adiciona DIPEA (0.4 ml, 2.1 mmol, 5 eq) y la disolución resultante se calienta a reflujo 12 horas. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando Florisil[®] como fase estacionaria y n-Hexano como eluyente. Se obtiene el producto **38** como un aceite incoloro (118 mg, R = 73%).

Rf: 0.24 (n-Hexano)

$[\alpha]_D^{20}$: -6.67 (*c* 1.1, CHCl₃) (lit. -6.67 (*c* 1.1, CHCl₃))

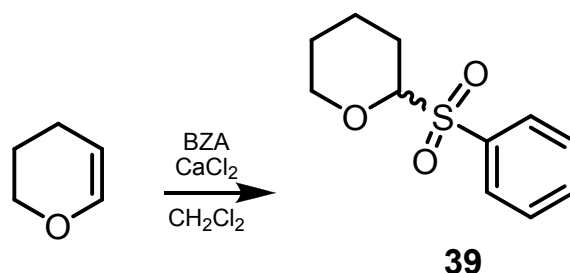
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.71 (1H, ddd, *J* = 4.6, 2.5, 1.3 Hz, H5), 3.99-3.72 (1H, m, H2), 2.10 (1H, ddd, *J* = 10.4, 6.6, 2.6 Hz, H4_{ax}), 2.00 (1H, ddd, *J* = 5.8, 4.8, 3.0 Hz, H4_{eq}), 1.87-1.82 (1H, m, H3), 1.63-1.48 (8H, m, H3, H2'), 1.39-1.26 (6H, m, H3'), 1.22 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, Me), 0.96-0.88 (15H, m, H1', H4')

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.2 (C6), 111.4 (C5), 71.1 (C2), 29.9 (C3), 29.7 (C2'), 29.0 (C4), 27.2 (C3'), 21.4 (Me), 13.7 (C1'), 9.5 (C4')

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2956, 2923, 2850, 1667, 1562, 1377, 1300, 1186, 1105, 1087, 1055, 876, 749, 691

AE: Calculado para $C_{18}H_{36}OSn$: C = 55.84, H = 9.37, Sn = 30.66. Observado: C = 55.21, H = 9.29

Preparación de 2-(fenilsulfonyl)-tetrahidro-2H-pirano (**39**).²¹³



Se disuelve ácido bencensulfónico recientemente preparado (2.35 g, 1.65 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ anhidro (20 mL) y se agrega, gota a gota, dihidropirano (1.39 g, 16.5 mmol, 1 eq). Se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:Et₂O (3:7) como fase móvil. Se obtiene el producto **39** como un sólido blanco (2.98 g, R = 80%).

P.F.: 77-78 °C (lit. 78 °C)

Rf: 0.46 (n-Hexano:Et₂O; 3:7)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.94-7.86 (2H, m, H3'), 7.65 (1H, t, *J* = 7.4 Hz, H4'), 7.54 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H2'), 4.40 (1H, dd, *J* = 9.8, 3.0 Hz, H2), 4.17-4.05 (1H, m, H6), 3.53-3.40 (1H, m, H6), 2.08 (2H, tdd, *J* = 14.1, 9.9, 5.4 Hz, H3), 1.90-1.71 (1H, m, H4), 1.65-1.45 (3H, m, H4, H5)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 136.5 (C1'), 133.9 (C4'), 129.4 (C2'), 128.9 (C3'), 91.3 (C2), 68.6 (C6), 24.7 (C5), 23.7 (C4), 21.5 (C3)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 249 ([M + Na]⁺, 100), 165 (82)

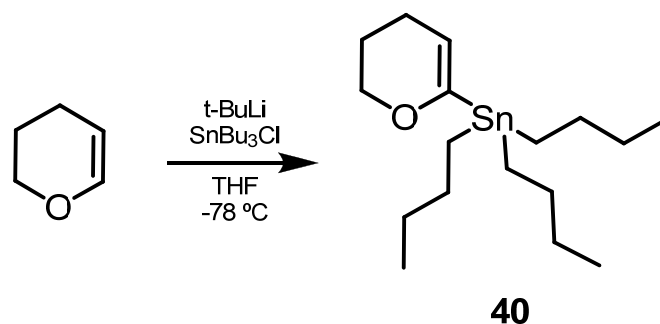
HRMS: Calculado para C₁₁H₁₅O₃S [M+H]⁺ = 227.0742, Observado: = 227.0734

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1307, 1149, 1083, 688

AE: C₁₁H₁₄O₃S: C = 58.38, H = 6.24, S = 14.17. Observado: C = 57.47, H = 6.17, S = 14.25

²¹³ S. V. Ley, B. Lygo, F. Sternfeld, A. Wonnacott, *Tetrahedron* **1986**, 42, 4333-4342.

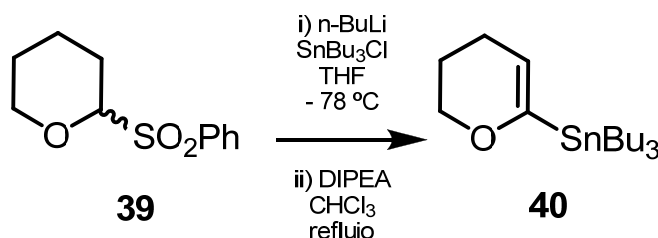
Preparación de (3,4-dihidro-2H-piran-6-il)tributilestaño (**40**).²¹⁴



Procedimiento A:

A una solución de 3,4-dihidro-2H-pirano (1 mL, 10.8 mmol, 1 eq) en THF seco (20 mL) a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ se le trata, gota a gota, con una solución 1.7M en pentano de $t\text{-BuLi}$ (16 mL, 27.1 mmol, 2.5 eq). Se agita 1 hora a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se enfría nuevamente a $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Se agrega cloruro de tributil estaño (7.3 mL, 27 mmol, 2.5 eq) gota a gota. Después de 15 minutos a esta temperatura se agrega agua (50 mL). La mezcla se extrae con éter etílico (20 mL x 3), se seca (MgSO_4), se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica con n-Hexano como fase móvil. Se obtienen 3.18 g del producto **40** como un aceite incoloro ($R = 79\%$).

Procedimiento B:



A una solución de la sulfona **39** (1.35 g, 5.97 mmol, 1 eq) en THF seco (30 mL) enfriada a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ se le trata, gota a gota, con una solución 1.6M en n-Hexanos de $n\text{-BuLi}$ (4.5 mL, 7.17 mmol, 1.2 eq). Se agita 1 hora a $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Se agrega el cloruro de tributil estaño (1.8 mL, 6.57 mmol, 1 eq) y se agita a esa temperatura 20 minutos. Se sube la temperatura a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y se agita durante 30 minutos. Se vuelca sobre NaHCO_3 (sat), se extrae con Et_2O (50 mL x 3); la fracción de éter se seca sobre MgSO_4 , se filtra y lleva a sequedad. El residuo

²¹⁴ L. A. Paquette, J. C. Lanter, J. N. Johnston, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1702-1712.

resultante se purifica por columna cromatográfica utilizando n-Hexano como fase móvil; se obtienen 1.1 g del producto **40** (R = 49%).

Rf: 0.43 (n-Hexano)

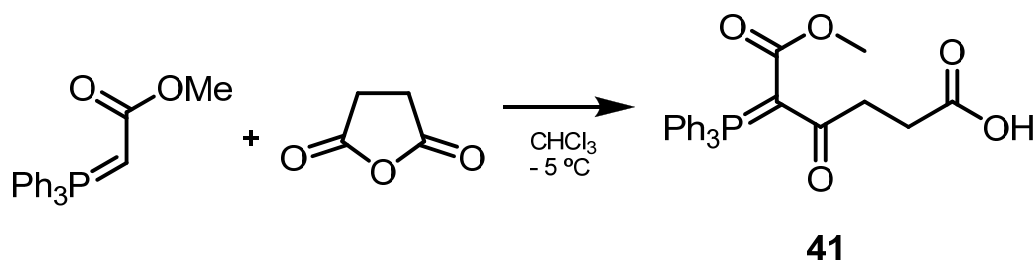
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.74 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H5), 3.96-3.85 (2H, m, H2), 2.02 (2H, ddd, *J* = 4.9, 4.1, 2.2 Hz, H4), 1.91-1.81 (2H, m, H3), 1.61-1.48 (6H, m, H2'), 1.41-1.26 (6H, m, H3'), 0.92 (15H, ddd, *J* = 11.9, 8.3, 5.0 Hz, H1', H4')

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.7 (C6), 112.3 (C5), 65.9 (C2), 29.0 (C2'), 27.2 (C4), 23.2 (C3'), 21.2 (C3), 13.7 (C1'), 9.4 (C4')

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2956, 2926, 2871, 1606, 1463, 1376, 1220, 1069, 1053, 897, 874, 664

AE: Calculado para C₁₇H₃₄OSn: C = 54.72, H = 9.18, Sn = 31.81. Observado: C = 54.09, H = 8.95

Preparación de Ácido 6-metoxi-4,6-dioxo-5-(trifenil- λ^5 -fosfaniliden)n-hexanoico (41).²¹⁵



Se disuelve el trifenilfosforaniliden acetato de metilo (8.7 g, 26 mmol, 1 eq) en CHCl_3 anhidro (30 mL) a temperatura ambiente y se agrega anhídrido succínico (2.6 g, 26 mmol, 1 eq); la solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Se lleva a sequedad y se recrystaliza en AcOEt. Se obtienen 9.26 g del producto **41** como un sólido blanco (R = 82%).

P.F.: 125-128 °C

¹H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.66 (6H, dd, $J = 12.8, 7.8$ Hz, H2'), 7.59 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H4'), 7.50 (6H, td, $J = 7.8, 3.0$ Hz, H3'), 3.42-3.30 (2H, m, H2), 3.17 (3H, s, OCH_3), 2.66-2.52 (2H, m, H3)

¹³C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 196.4 (C4), 176.2 (C1), 167.9 (C6), 133.2 (C2'), 132.1 (C4'), 128.6 (C3'), 125.8 (C1'), 77.3 (C5), 49.9 (OCH_3), 34.3 (C2), 31.1 (C3)

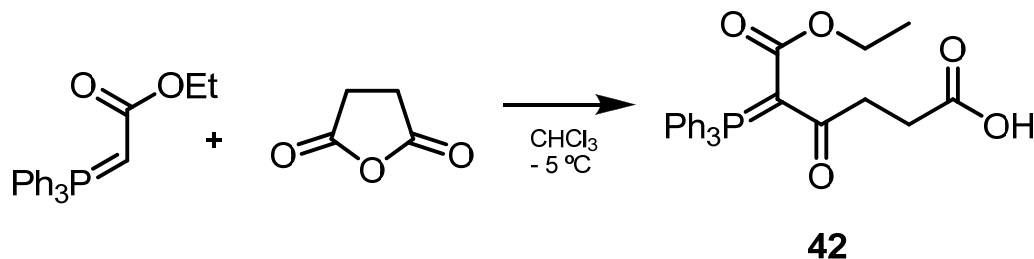
EM (ESI); m/z (int. rel.): 457 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100), 435 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 36)

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 1665, 1562, 1483, 1436, 1379, 1305, 1105, 1028

AE: Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{P}$: C = 69.12, H = 5.34, P = 7.13. Observado: C = 69.21, H = 5.44

²¹⁵ M. M. Kayser, J. Zhu, D. L. Hooper, *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 1322-1330

Preparación de Ácido 6-etoxi-4,6-dioxo-5-(trifenil- λ^5 -fosfaniliden)n-hexanoico (42).²¹⁵



Se disuelve el trifenilfosforaniliden acetato de etilo (9.1 g, 26 mmol, 1 eq) en CHCl₃ anhidro (30 mL) a temperatura ambiente. Se agrega anhídrido succínico (2.6 g, 26 mmol, 1 eq) y la solución resultante se agita durante 16 horas. Se lleva a sequedad y se recristaliza de AcOEt. Se obtienen 7.58 g del producto **42** como un sólido de blanco (R = 65%).

P.F.: 126-132 °C (lit: 130-132 °C)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.66 (6H, dd, J = 12.8, 7.4 Hz, H2'), 7.58 (3H, dd, J = 8.0, 6.8 Hz, H4'), 7.49 (6H, td, J = 7.6, 3.0 Hz, H3'), 3.73 (2H, q, J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 3.41-3.31 (2H, m, H2), 2.64-2.48 (2H, m, H3), 0.67 (3H, t, J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃)

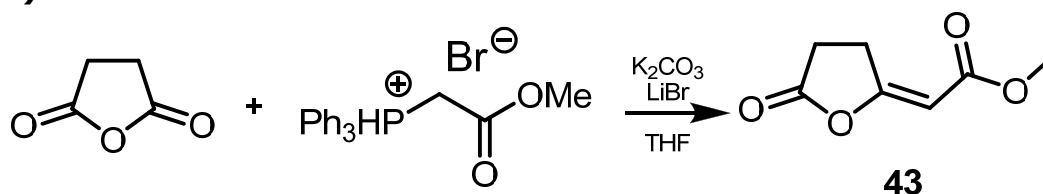
¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 196.4 (C4), 175.5 (C1), 167.5 (C6), 133.1 (C2'), 132.2 (C4'), 125.7 (C3'), 125.0 (C1'), 73.4 (C5), 59.1 (OCH₂CH₃), 34.0 (C2), 31.6 (C3), 13.6 (OCH₂CH₃)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 471 ([M + Na]⁺, 100), 449 ([M+H]⁺, 52)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1715, 1671, 1580, 1560, 1492, 1305, 1105, 1090

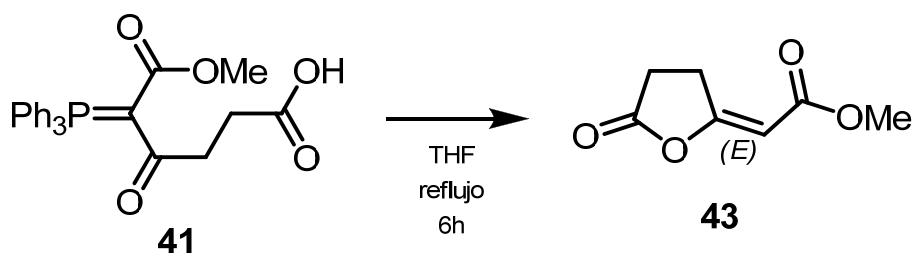
AE: Calculado para C₂₆H₂₅O₅P: C = 69.64, H = 5.62, P = 6.91. Observado: C = 69.53, H = 7.71;

Preparación de E-[5-oxodihidrofuran-2(3H-iliden)]acetato de metilo (**43**).²¹⁶



Procedimiento A:

Se disuelven la sal de fosfonio (830 mg, 2 mmol, 1 eq) y el anhídrido succínico (200 mg, 2 mmol, 1 eq) en THF seco (30 mL). Se agrega carbonato de potasio (691 mg, 5 mmol, 2.5 eq) y bromuro de litio (174 mg, 2 mmol, 1 eq). La mezcla se calienta a reflujo durante 10 horas bajo argón. Se agrega éter etílico (20 mL) y precipita el óxido de trifenilfosfina, que se filtra. La solución resultante se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando éter de petróleo:Et₂O (2:1) como fase móvil. Se obtienen 197 mg de **43** como un sólido blanco cristalino (R = 63%).



Procedimiento B:

Se disuelve el compuesto **41** (4 g, 9.22 mmol, 1 eq) en THF seco (30 mL) y la solución resultante se calienta a reflujo durante 6 horas. Se enfría y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (4:1) como fase móvil. Se obtienen 1.0 g del producto **43** como un sólido cristalino (R = 69%).

P.F.: 103 °C

Rf: 0.29 (n-Hexano:Et₂O; 2:1)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.73 (1H, s, H2'), 3.74 (3H, s, OCH₃), 3.46-3.32 (2H, m, H4), 2.76 (2H, dd, *J* = 9.9, 7.0 Hz, H3)

²¹⁶ J. Zhu, M. M. Kayser, *Synthetic Communications* **1994**, *24*, 1179-1186.

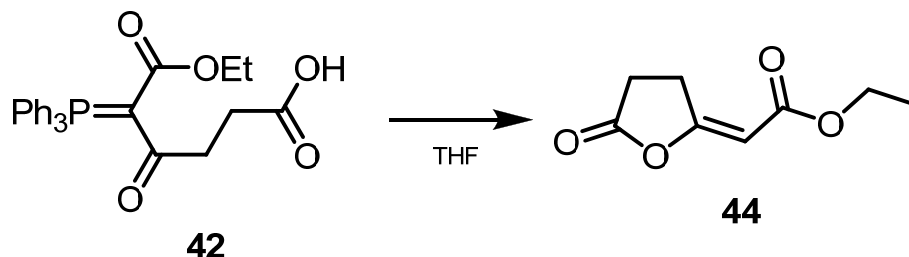
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.5 (C5), 167.7 (C1'), 167.1 (C2), 97.0 (C2'), 51.3 (OCH₃), 26.1 (C3), 26.0 (C4)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 179 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2996, 1829, 1709, 1655, 878

AE: Calculado para C₇H₈O₄: C = 53.85, H = 5.16. Observado: C = 54.05, H = 5.23

Preparación de E-[5-oxodihidrofuran-2(3H-iliden]acetato de etilo (44).²¹⁶



Se disuelve el compuesto **42** (200 mg, 0.48 mmol, 1 eq) en THF seco (5 mL) y la solución resultante se calienta a reflujo durante 6 horas. Se enfría y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (4:1) como fase móvil. Se obtienen 57 mg (R = 70%) del producto **44** como un sólido cristalino.

P.F.: 84-85 °C

Rf: 0.5 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.71 (1H, s, H2'), 4.19 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H4), 3.49-3.26 (2H, m, 3), 2.80-2.62 (2H, m, OCH₂CH₃), 1.30 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃)

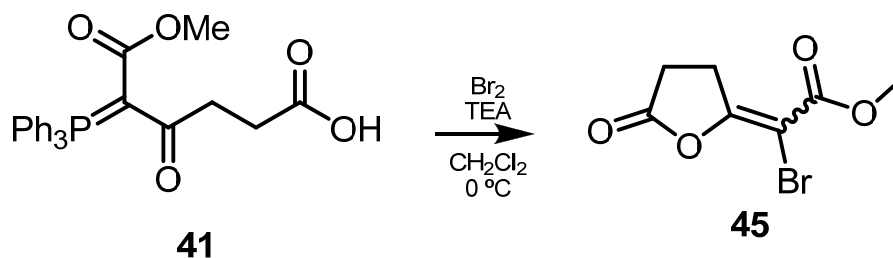
¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.67 (C5), 167.4 (C1'), 166.6 (C2), 97.4 (C2'), 60.2 (OCH₂CH₃), 26.1 (C3), 26.1 (C4), 14.3 (OCH₂CH₃)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 193 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2986, 1823, 1699, 1674, 868

AE: Calculado para C₈H₁₀O₄: C = 56.47, H = 5.92. Observado: C = 56.05, H = 5.63

Preparación de 2-Bromo-2-[5-oxo-4,5-dihidrofuran-2(3*H*)-iliden]acetato de metilo (45**).**²¹⁵



Se disuelve el fosforano **41** (1.7 g, 3.9 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 anhidro (80 mL) y se enfria a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Se añade trietilamina (0.4 mL, 4.3 mmol, 1.1 eq) y bromo (0.2 mL, 4.3 mmol, 1.1 eq). Se agita bajo argón durante 30 minutos a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y después de ese tiempo se deja alcanzar temperatura ambiente. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando CH_2Cl_2 como fase móvil. Se obtienen 742 mg (R = 81%) del producto, **45**, como una mezcla de isómeros. Ratio Z:E = 7:3.

Rf: 0.48 (CH_2Cl_2)

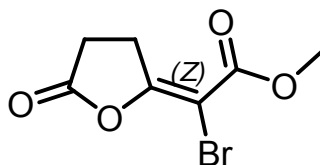
EM (ESI); m/z (int. rel.): 259, 257 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100)

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 2956, 1831, 1702, 1626

AE: Calculado para $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_4\text{Br}$: C = 35.77, H = 3.00, Br = 34.00. Observado: C = 36.10, H = 3.11

Una posterior purificación por columna cromatográfica usando n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil, permite separar la mezcla de estereoisómeros.

Compuesto Z (519 mg):



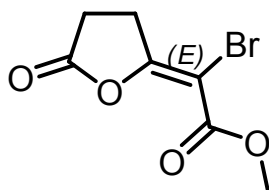
P.F.: 126-128 $^\circ\text{C}$

Rf: 0.45 (n-hexano:AcOEt; 1:1)

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.44 (2H, m, H4), 2.88 (2H, m, H3)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.0 (C5), 163.7 (C1'), 163.6 (C2), 89.3 (C2'), 53.4 (OCH₃), 28.0 (C4), 27.0 (C3)

Compuesto *E* (247 mg):



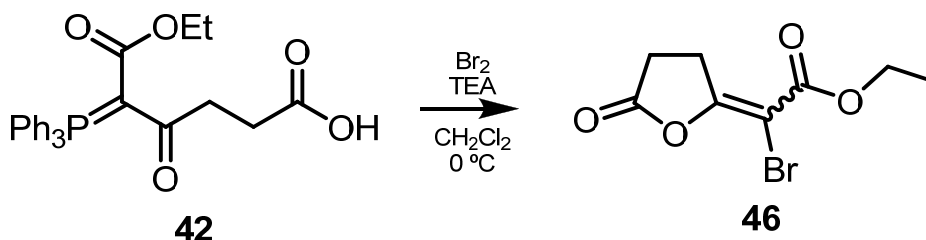
P.F.: 125-128 °C

Rf: 0.38 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.87 (3H, s, OCH₃), 3.13 (2H, m, H₄), 2.81 (2H, m, H₃)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.2 (C5), 162.6 (C1'), 161.3 (C2), 66.4 (C2'), 53.5 (OCH₃), 32.7 (C4), 27.2 (C3)

Preparación de 2-Bromo-2-[5-oxo-4,5-dihidrofuran-2(3H)-iliden]acetato de etilo (46).²¹⁵



Se disuelve el fosforano **42** (1.7 g, 3.79 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 anhidro (80 mL) y se enfria a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Se añade trietilamina (0.4 mL, 4.2 mmol, 1.1 eq) y bromo (0.2 mL, 4.2 mmol, 1.1 eq). Se agita bajo argón durante 30 minutos a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se deja alcanzar temperatura ambiente. Se purifica por columna cromatográfica utilizando CH_2Cl_2 como fase móvil. Se obtienen 840 mg (R = 89%) de la mezcla de isómeros, **46**, como un sólido de color amarillo. Ratio Z:E = 7.5:2.5.

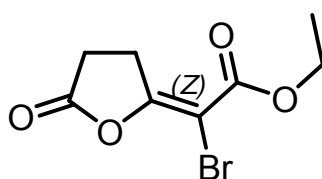
EM (ESI); m/z (int. rel.): 273, 271 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100)

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 2946, 1823, 1698, 1636

AE: Calculado para $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_4\text{Br}$: C = 38.58, H = 3.64, Br = 32.08. Observado: C = 38.51, H = 3.91

Una posterior purificación por columna cromatográfica usando n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil, permite separar la mezcla de isómeros.

Compuesto Z (630 mg):



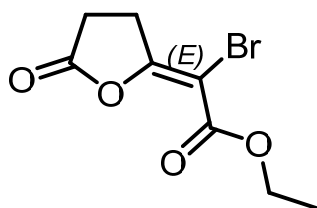
P.F.: 151-154 $^\circ\text{C}$ (lit: 154-156 $^\circ\text{C}$)

Rf: 0.39 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.28 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 3.43-3.40 (2H, m, H4), 2.88-2.85 (2H, m, H3), 1.35 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3)

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.2 (C5), 163.5 (C1'), 163.0 (C2), 89.8 (C2'), 62.2 (OCH_2CH_3), 28.0 (C4), 27.0 (C3), 14.2 (OCH_2CH_3)

Compuesto E (210 mg):



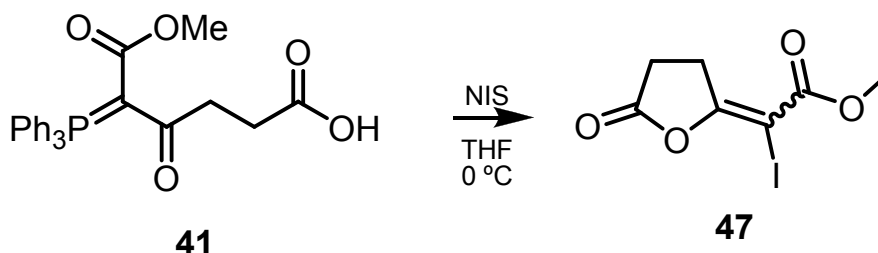
P.F.: 145-149 °C (lit. 148-149 °C)⁶

Rf: 0.27 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.30 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 3.26-3.08 (2H, m, H₄), 2.83-2.73 (2H, m, H₃), 1.36 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃)

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.2 (C₅), 161.5 (C_{1'}), 160.0 (C₂), 93.8 (C_{2'}), 62.2 (OCH₂CH₃), 28.0 (C₄), 26.0 (C₃), 14.2 (OCH₂CH₃)

Preparación de 2-iodo-2-[5-oxo-4,5-dihidrofuran-2(3*H*)-iliden]acetato de etilo (47).²¹⁵



Se disuelve el fosforano **41** (1780 mg, 4.1 mmol, 1 eq) en THF seco (20 mL) enfría la solución a 0 °C. Se añade N-iodosuccinimida (1015 mg, 4.5 mmol, 1.1 eq). Se agita bajo argón a 0 °C durante 5 horas. Se deja alcanzar temperatura ambiente, lleva a sequedad y purifica por columna cromatográfica utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Se obtiene la mezcla de isómeros *E:Z* (80:20), **47**, como un sólido amarillo (890 mg, R = 77%).

P.F.: 62-65 °C

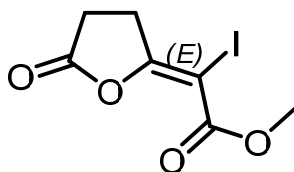
Rf: 0.56 (CH₂Cl₂)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 305 ([M + Na]⁺, 100), 211 (25)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2985, 1840, 1700, 1645, 1280, 1250

AE: Calculado para C₇H₇O₄I: C = 29.81, H = 2.50, I = 45.00. Observado: C = 29.2, H = 2.41

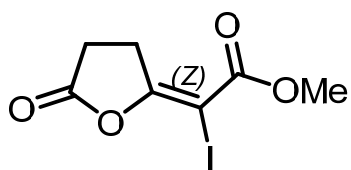
Compuesto *E*



¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.78 (3H, s, OCH₃), 3.06 (2H, dd, *J* = 10.2, 6.6 Hz, H₄), 2.79 (2H, dd, *J* = 10.0, 6.5 Hz, H₃)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.1 (C₅), 162.6 (C_{1'}), 161.2 (C₂), 66.4 (C_{2'}), 53.5 (OCH₃), 32.6 (C₄), 27.1 (C₃)

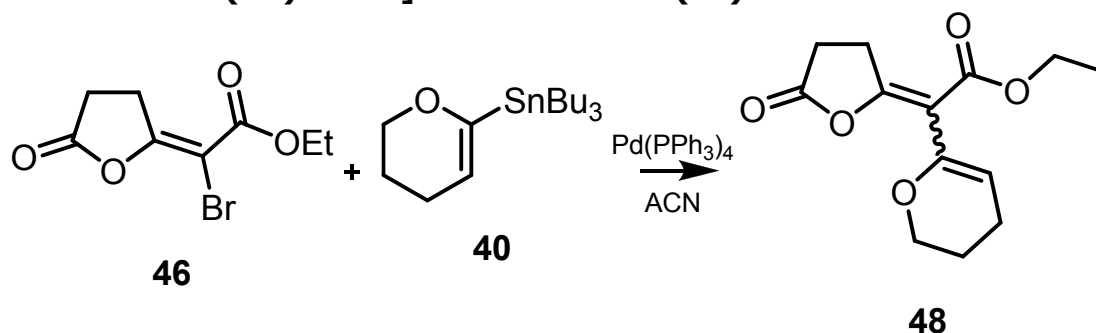
Compuesto Z:



$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.76 (3H, s, OCH_3), 3.42 (2H, dd, $J = 9.7$, 6.9 Hz, H4), 2.88 (2H, dd, $J = 9.8$, 6.8 Hz, H3)

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 178.2 (C5), 174.1 (C1'), 161.2 (C2), 68.3 (C2'), 53.5 (OCH_3), 28.1 (C4), 27.8 (C3)

Preparación de (Z)-2-(3,4-Dihidro-2H-piran-2-il)-2-[5-oxo-4,5-dihidrofuran-2(3H)-iliden]acetato de etilo (48).

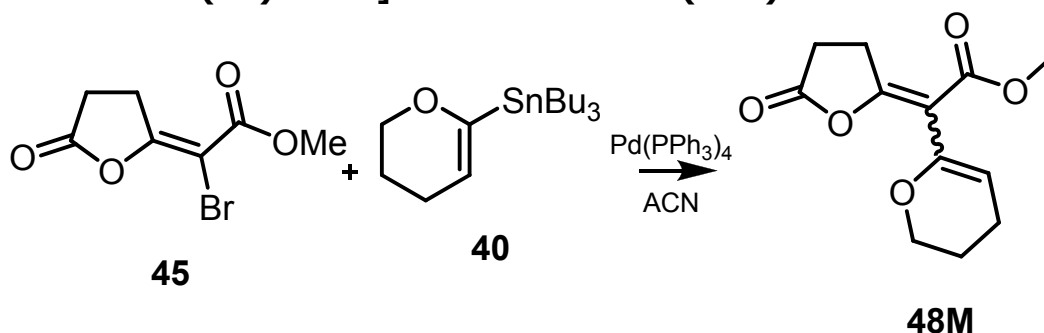


Sobre una disolución de tetraquis(trifenilfosfin)paladio (10.5 mg, 0.01 mmol, 0.05 eq) en acetonitrilo seco y desgasificado (2 mL) se adiciona el bromoderivado **46** (50 mg, 0.2 mmol, 1 eq) y el derivado de estaño **40** (68 mg, 0.18 mmol, 1 eq). La solución resultante se calienta a reflujo durante 3 horas. Se diluye con éter etílico, se filtra a través de celite y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano-AcOEt (7:3). Se obtiene un producto **48** de color marrón claro que descompone (30.2 mg). El rendimiento para esta reacción fué de 60%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.79 (1H, t, *J* = 3.82 Hz, H5''), 4.22 (2H, q, *J* = 7.13, OCH₂CH₃), 4.07 (2H, t, *J* = 5.1 Hz, H2''), 3.39 (2H, m, H3), 2.75 (2H, m, H4), 2.15 (2H, dt, *J* = 3.88, 6.77 Hz, H4''), 1.90 (2H, dt, *J* = 6.36, 12.7 Hz, H3''), 0.94 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, OCH₂CH₃)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.6 (C5), 166.4 (C1'), 163.8 (C2), 145.3 (C2'), 103.2 (C5), 66.5 (C2''), 60.7 (OCH₂CH₃), 26.7 (C3), 26.3 (C4), 22.2 (C3''), 20.5 (C4''), 13.6 (OCH₂CH₃)

Preparación de (Z)-2-(3,4-Dihidro-2H-piran-2-il)-2-[5-oxo-4,5-dihidrofuran-2(3H)-iliden]acetato de metilo (48M).



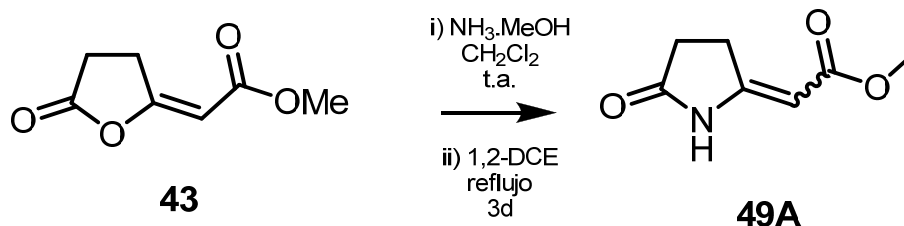
Sobre una disolución de tetraquis(trifenilfosfin)paladio (10.5 mg, 0.01 mmol, 0.05 eq) en acetonitrilo seco y desgasificado (5 mL) se adiciona el bromoderivado **45** (47 mg, 0.2 mmol, 1 eq) y el derivado de estaño **40** (68 mg, 0.18 mmol, 1 eq). La solución resultante se calienta a reflujo durante 3 horas. Se diluye con éter etílico, se filtra a través de celite y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano-AcOEt (7:3). Se obtiene un producto **48M** de color marrón claro que se descompone (20 mg, 42%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.79 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H5''), 4.11–4.05 (2H, m, H2''), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.45–3.36 (2H, m, H3), 2.76 (2H, dd, *J* = 9.8, 7.1 Hz, H4), 2.16 (2H, dd, *J* = 10.3, 6.3 Hz, H4''), 1.95–1.84 (2H, m, H3'').

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.5 (C5), 166.8 (C1'), 164.4 (C2), 145.2 (C2'), 103.18 (C5''), 66.6 (C2''), 51.92 (OCH₃), 26.6 (C3), 26.3 (C4), 22.1 (C3''), 20.45 (C4'')

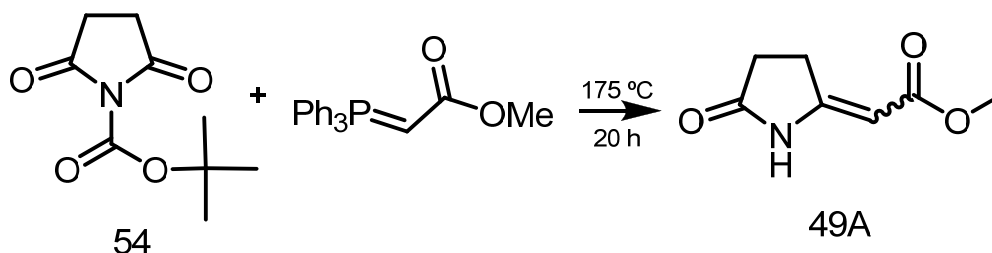
Preparación de (E)-(5-oxopirrolidin-2-ilidene)acetato de metilo (**19AE**) y (Z)-(5-oxopirrolidin-2-ilidene)acetato de metilo (**49AZ**).²¹⁷

Procedimiento A



Se disuelve la esterlactona **43** (300 mg, 2 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 (7 mL) y se adiciona una solución 1M de amoníaco en metanol (20 mL, 20 mmol, 10 eq). La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Se lleva a sequedad, se redisuelve en 1,2-dicloroetano (10 mL) y se calienta a reflujo durante 3 días. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto **49A** como un sólido blanco (301 mg, 97%).

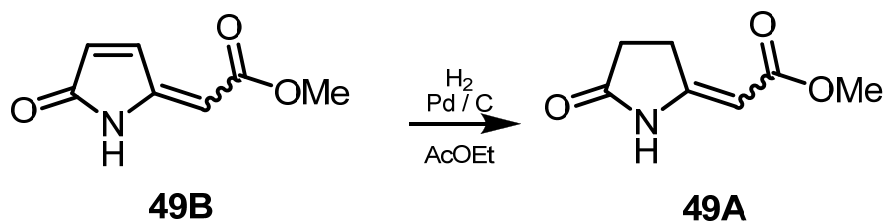
Procedimiento B



Se colocan en un balón BOC-succinimida **54** (221 mg, 1.1 mmol, 1 eq) y trifenilfosforaniliden acetato de metilo (1100 mg, 3.3 mmol, 3 eq) y se calienta a 175°C durante 20 horas. Se deja enfriar y se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Se obtienen el isómero *E*, **49AE**, (37 mg, R = 22%) y el *Z*, **49Z**, (11 mg, R = 6.5%) como sólidos amarillos.

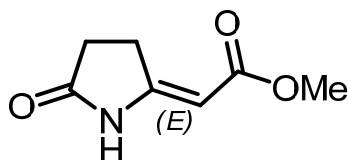
²¹⁷ J. E. Bishop, J. F. OConnell, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5079-5091.

Procedimiento C



A una solución del producto **49B** (110 mg, 0.72 mmol, 1 eq) en AcOEt (10 mL) se le adiciona una punta de espátula de Paladio sobre carbono (10%) y se agita bajo atmósfera de hidrógeno (1 atm), durante 24 horas. Se filtra a través de celite y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Se obtienen 39 mg (R = 35%) del isómero *Z*, **49AZ**, y 45 mg del isómero *E*, **49AE** (R = 40%).

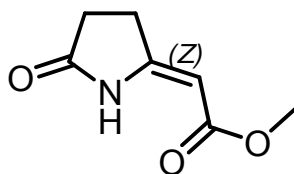
Isómero *E*:



¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.83 (1NH, s.a.), 5.03 (1H, t, *J* = 1.3 Hz, H2'), 3.72 (3H, s, OMe), 3.24-3.13 (2H, m, H3), 2.63-2.48 (2H, m, H4)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 176.9 (C5), 167.7 (C1'), 160.9 (C2), 91.2 (C2'), 50.9 (OMe), 28.0, 24.6 (C3, C4)

Isómero *Z*:



¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.85 (1NH, s.a.), 5.03 (1H, t, *J* = 1.3 Hz, H2'), 3.72 (3H, s, OMe), 2.93-2.85 (2H, m, H3), 2.85-2.75 (2H, m, H4)

¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 176.4 (C5), 167.5 (C1'), 156.7 (C2), 89.7 (C2'), 50.1 (OMe), 26.7, 25.0 (C3, C4)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 178 ([M + Na]⁺, 100)

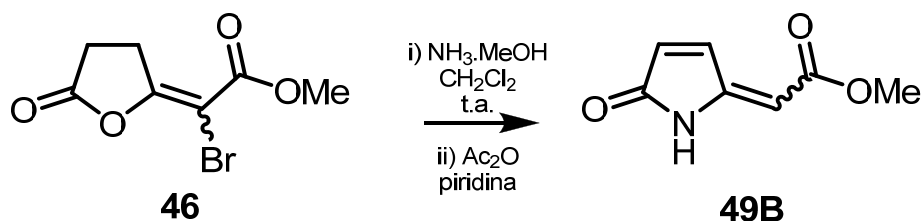
HRMS: Calculado para C₇H₉NO₃ = 155.0582, Observado: = 155.0500

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3234, 1724, 1696, 1632, 1460, 1143, 883, 744

AE: Calculado para $C_7H_9NO_3$: C = 54.19, H = 5.85, N, 9.03. Observado: C = 54.68, H = 5.90, N = 8.93

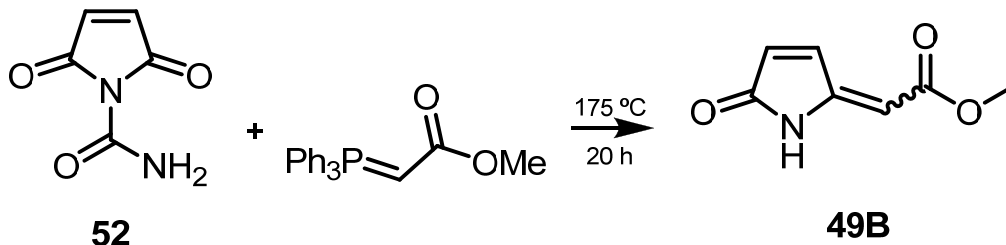
Preparación de 2-(5-oxo-1H-pirrol-2(5H)-iliden)acetato de metilo (49B).²¹⁸

Procedimiento A:



Se disuelve la esterbromolactona **46** (235 mg, 1 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 y se adiciona una solución 1M de amoníaco en metanol (1 mL, 10 mmol, 10 eq), se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Se lleva a sequedad, se redisuelve en piridina (3 mL) y se adiciona anhídrido acético (3 mL); la solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto **49B** como un sólido blanco (91 mg, 60%).

Procedimiento B:



Sobre una suspensión de la urea maleimida **52** (1.4 g, 10 mmol, 1 eq) en tolueno seco (60 mL) se adiciona el trifenilfosforaniliden acetato de metilo (6.7 g, 20 mmol, 2.0 eq) y se calienta a reflujo, bajo argón, durante 20 horas. Se lleva a sequedad y se purifica por cromatografía en columna utilizando n-Hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Se obtienen 657 mg del producto **49B** como un sólido blanco (R = 43%).

P.F.: 131-133 °C (lit. 151-152 °C)

Rf: 0.15 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

²¹⁸ Y. Yoshida, S. Ichikawa, Y. Shinozuka, M. Satoh, K. Mohri, K. Isobe, *Heterocycles* **2005**, *65*, 1481-1490.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.94 (1NH, s), 8.09 (1H, d, *J* = 5.8 Hz, H4), 6.35 (1H, d, *J* = 5.8 Hz, H3), 5.72 (1H, s, H2'), 3.78 (3H, s, OMe)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.4 (C5), 166.1 (C1'), 149.9 (C2), 136.5 (C4), 128.3 (C3), 101.0 (C2'), 51.7 (OMe)

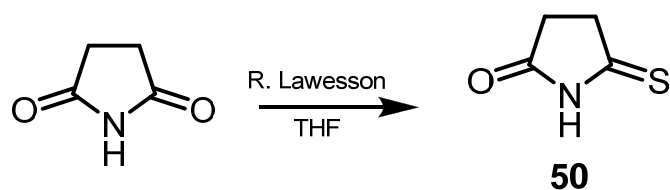
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 154 ([M + H]⁺, 100), 122 (40)

HRMS: Calculado para C₇H₈NO₃ = 154.0504. Observado: = 154.0508

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3306, 1694, 1650, 1438, 1279, 1143, 823

AE: Calculado para C₇H₇NO₃: C = 54.90, H = 4.61, N = 9.15. Observado: C = 54.95, H = 4.82, N = 8.79

Preparación de 5-tioxopirrolidin-2-ona (50).²¹⁹



Se disuelve succinimida (3g, 30 mmol, 1 eq) en THF seco (100 mL) y se agrega el reactivo de Lawesson (12.6 g, 30 mmol, 1 eq). La solución resultante se agita a 60 °C durante 90 minutos. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando n-Hexano:AcOEt (6:4) como fase móvil. Se obtiene el producto monotiosuccinimida **50** como un sólido amarillo (2.41 g, R= 70%).

P.F.: 115 °C (lit. 115-116 °C)

Rf: 0.52 (n-Hexano:AcOEt; 6:4)

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm): 9.56 (1NH, s), 3.15 (2H, dd, *J* = 8.34, 5.42 Hz, H3), 2.82 (2H, dd, *J* = 8.37, 5.40 Hz, H4)

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 212.2 (C2), 180.2 (C5), 31.1 (C4), 40.0 (C3)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 114 ([M - H]⁺, 100)

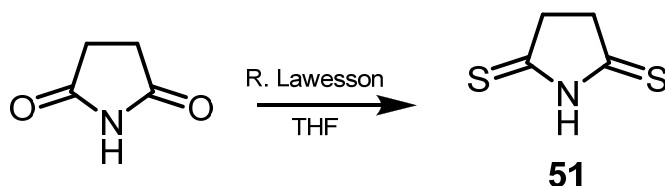
HRMS: Calculado para C₅H₅NOS (M+H)⁺: 116.0173. Observado 116.0170

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3134, 2907, 1746, 1452, 1329, 1293, 1255, 1204, 987, 902, 856, 828, 199, 646

AE: Calculado para C₅H₅NOS: C = 41.75, H = 4.38, N = 12.16, S = 27.85. Observado: C = 41.83, H = 4.32, N = 11.83, S = 27.67

²¹⁹ D. T. Witiak, T-F. Chin, J. L. Lach, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 3721–3724.

Preparación de 2,5-tioxopirrolidina (**51**).²²⁰



Se disuelve succinimida (3g, 30 mmol, 1 eq) en THF seco (100 mL) y se agrega el reactivo de Lawesson (12.6 g, 30 mmol, 1 eq). La solución resultante se agita a 60 °C durante 90 minutos. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando n-Hexano:AcOEt (6:4) como fase móvil. Se obtiene la ditiosuccinimida **51** como un sólido amarillo (1.04 g R = 30%).

P.F.: 106 °C (lit. 108-109 °C)

Rf: 0.87 (n-Hexano:AcOEt; 6:4)

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 10.32 (1NH, s), 3.24 (4H, s, H3, H4)

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 212.6 (C2, C5), 42.9 (C3, C4)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 130 ([M-H]⁺, 100)

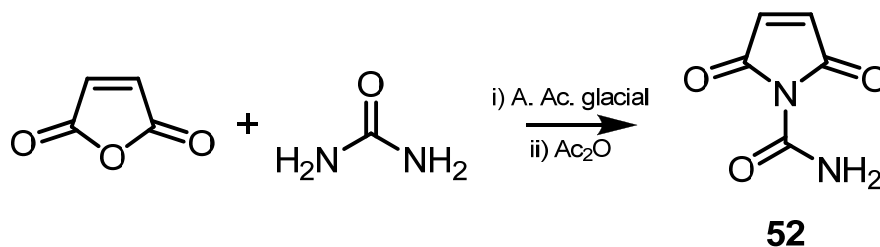
HRMS: Calculado para C₁₅H₅NS₂ (M+H)⁺: 131.9950. Observado: 131.9942

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3100, 2909, 1555, 1199, 1104, 841, 618

AE: Calculado para C₁₅H₅NS₂: C = 36.61, H = 3.84, N = 10.67, S = 48.87.
Observado: C = 37.33, H = 3.81, N = 9.53, S = 47.88

²²⁰ S. Scherbakow, J. C. Namyslo, M. Gjikaj, A. Schmidt, *Synlett* **2009**, 12, 1964-1968.

Preparación de la 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxamida (52).²²¹



Sobre ácido acético glacial (95 mL) se agrega urea (15 g, 0.25 mol) y anhídrido maléico (24.5 g, 0.25 mol). La suspensión resultante se agita a 50 °C bajo atmósfera de argón durante 12 horas. Se obtiene una solución que se deja enfriar y se deja agitando toda la noche. El precipitado obtenido se filtra, se lava con ácido acético glacial (25 mL) y se seca en a vacío. Se suspende en anhídrido acético calentado a 95 °C (30 mL). Cuando la disolución es completa, se filtra en caliente y al dejar enfriar aparece un precipitado, el cual se filtra y se lava con acetona. Se seca a vacío. Se obtiene la urea maleimida **52** como un sólido marrón claro (4.97 g, R = 66%).

P.F.: 107 °C (lit. 108-109 °C)

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.75 (1NH, s.a.), 7.39 (1NH, s.a.), 7.11 (2H, s, H3, H4)

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 169.2 (C2, C5), 148.4 (C1'), 135.9 (C3, C4)

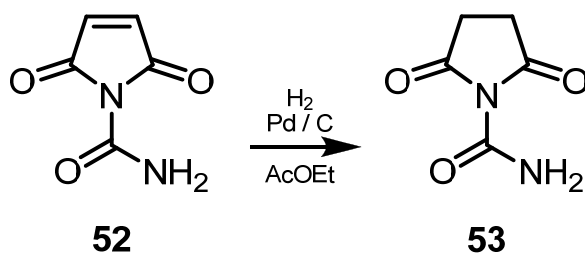
EM (ESI); m/z (int. rel.): 163 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1582, 1368, 1152, 1032, 839

AE: Calculado para C₅H₄N₂O₃: C = 42.87, H = 2.88, N = 20. Observado: C = 42.85, H = 3.09, N = 19.89

²²¹ P. O. Tawney, R. H. Snyder, C. E. Bryan, R. P. Conger, F. S. Dovell, R. J. Kelly, C. H. Stiteler, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 56–60.

Preparación de 2,5-dioxopirrolidin-1-carboxamida (**53**).²²²



A una suspensión de la urea maleimida **52** (5.0 g, 35.7 mmol, 1 eq) en AcOEt (200 mL) se adiciona Paladio al 10% sobre carbono (30 mg) como catalizador bajo argón. El argón se intercambia por hidrógeno y se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución resultante se filtra a través de celite, se lava con AcOEt (50 mL x3) y con acetona (50 mL x2) y se lleva a sequedad. Se obtiene la urea succinimida **53** como un sólido blanco que no se purifica (4.7 g, R = 96%).

P.F.: 158-161 °C (lit. 158-160 °C)

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.91 (1NH, s.a.), 7.71 (1NH, s.a.), 2.68 (4H, s, H3, H4)

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 175.8 (C5, C2), 149.5 (C1'), 29.1 (C3, C4)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 165 ([M + Na]⁺, 100)

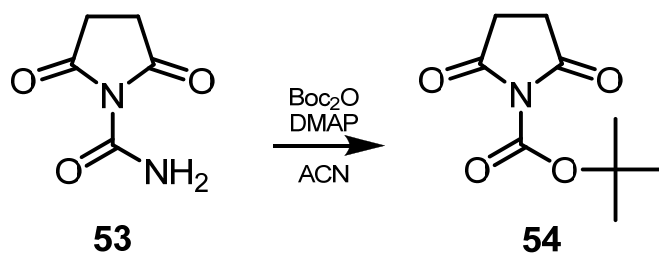
IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1713, 1584, 1299, 1160, 1081, 840, 818, 693

AE: Calculado para C₅H₇N₃O₂: C = 42.26, H = 4.26, N = 19.71. Observado: C = 41.10, H = 4.22, N = 18.97

²²² C. Cogrossi, *Annali di Chimica* **1973**, *63*, 309-318.

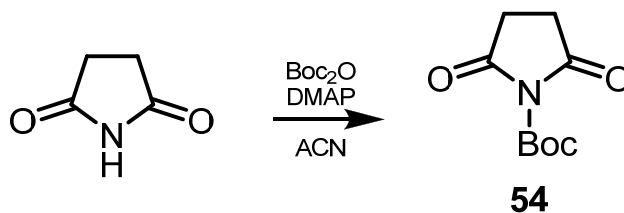
Preparación de 2,5-dioxopirrolidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (**54**).²²³

Procedimiento A



A una suspensión de la urea succinimida **53** (308 mg, 2.11 mmol, 1 eq) en acetonitrilo seco (1 mL), bajo argón y a temperatura ambiente, se le agrega BOC₂O (506.6 mg, 2.32 mmol, 1.1 eq) y 4-DMAP (26 mg, 0.21 mmol, 0.1 eq). Se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Se obtiene el producto protegido **54** (157 mg, R = 40%).

Procedimiento B



A una suspensión de succinimida (990 mg, 10 mmol, 1 eq) en acetonitrilo seco (5 mL), bajo argón se le agrega BOC₂O (2.29 g, 10 mmol, 1 eq) y 4-DMAP (12 mg, 1.5 mmol, 0.15 eq). Rápidamente se desprende CO₂ y se observa la disolución progresiva de la succinimida. Se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta que se obtiene una solución clara. Dicha solución se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (1:4) como fase móvil. Se obtiene el producto protegido **54** (1.81 g, R = 91%) como agujas de color blanco.

P.F.: 84-85 °C (lit. 86 °C)

Rf: 0.75 (n-Hexano:AcOEt; 1:4)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.79 (4H, s, H3, H4), 1.59 (9H, s, H4')

²²³ C. Einhorn, J. Einhorn, C. Marcadal-Abadi, *Synthetic Communications* **2001**, *31*, 741-748.

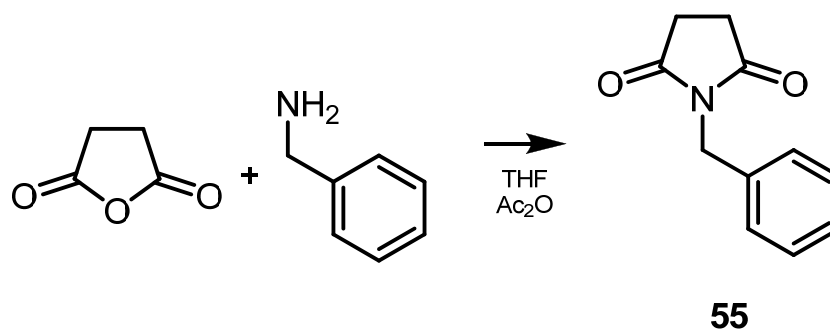
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.9 (C2, C5), 148.5 (C1'), 86.3 (C3'), 28.5 (C3, C4) 27.7 (C4')

EM (ESI); m/z (int. rel.): 222 ([M + Na]⁺, 100), 122 (73)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2988, 2942, 1764, 1709, 1333, 1257, 1144, 822, 632

AE: Calculado para C₉H₁₃NO₄: C = 54.26, H = 6.58, N = 7.03. Observado: C = 55.11, H = 6.58, N = 7.01

Preparación de pirrolidin-2,5-diona-1-bencilo (**55**).²²⁴



A una solución de anhídrido succínico (15 g, 150 mmol, 1 eq) en THF seco (150 mL) bajo argón se añade, gota a gota bencilamina (17 mL, 150 mmol, 1 eq). La mezcla se calienta a reflujo durante 2 horas. Se enfría y lleva a sequedad. El sólido que se obtiene se disuelve en anhídrido acético (150 mL) y refluja durante 2 horas, Después se enfría y vuelca sobre agua-hielo. El precipitado se recrystaliza en metanol para obtener el producto protegido **55** como agujas blancas (24.4 g, R = 86%).

P.F.: 97 °C (lit. 103 °C)

Rf: 0.26 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.37-7.29 (2H, m, H4') 7.28-7.19 (2H, m, H3', H5'), 4.57 (2H, s, H1'), 2.57 (4H, s, H3, H4)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177.0 (C2, C5), 135.9 (C2'), 128.8 (C3'), 128.6 (C4'), 127.9 (C5'), 42.2 (C1'), 27.2 (C3, C4)

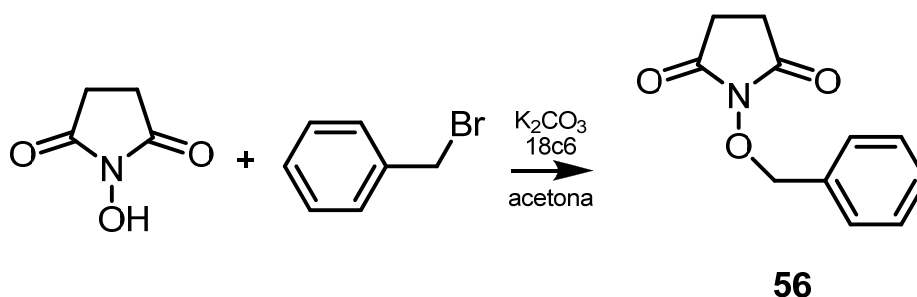
EM (ESI); m/z (int. rel.): 212 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1696, 1334, 1168

AE: Calculado para C₁₁H₁₁NO₂: C = 69.83, H = 5.86, N = 7.40. Observado: C = 69.79, H = 5.57, N = 7.52

²²⁴ P. Y. Reddy, S. Kondo, T. Toru, Y. Ueno, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2652-2654.

Preparación de pirrolidin-2,5-diona-1-oxibencilo (**56**).²²⁵



Se disuelven N-hidroxisuccinimida (5 g, 43.4 mmol, 1 eq), bromuro de bencilo (5.68 mL, 47.7 mmol, 1.1 eq), carbonato de potasio (6.0 g, 43.4 mmol, 1 eq) y 18-corona-6 (0.57 g, 2.16 mmol, 0.05 eq) en acetona (100 mL). Se calienta a reflujo durante 16 horas. Se enfría y se lleva a sequedad. Se redissuelve en CH₂Cl₂ y se lava con agua. La capa orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Se obtiene el producto protegido **56** en forma de agujas blancas (7.694 g, R = 86%).

P.F.: 135-136 °C (lit. 139-141 °C)

Rf: 0.38 (CH₂Cl₂)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.56-7.47 (2H, m, H5'), 7.40 (3H, dd, *J* = 6.6, 3.4 Hz, H4', H6'), 5.13 (2H, s, H2'), 2.66 (4H, s, H3, H4)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.1 (C2, C5), 133.3 (C3'), 129.9 (C4'), 129.4 (C5'), 128.5 (C6'), 78.8 (C2'), 25.4 (C3, C4)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 228 ([M + Na]⁺, 100)

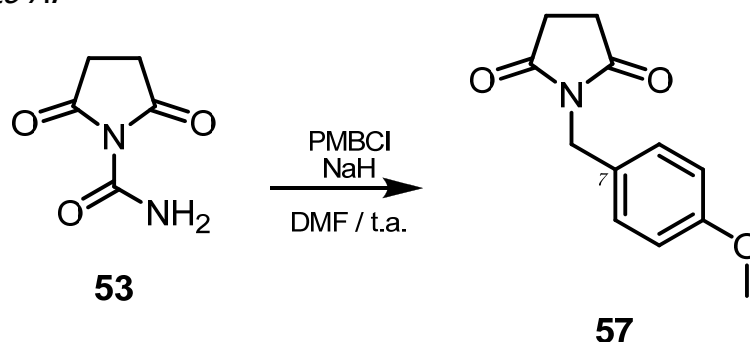
IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1772, 1712, 1396, 1205, 727, 701, 652

AE: Calculado para C₁₁H₁₁NO₃: C = 64.36, H = 5.79, N = 5.36. Observado: C = 64.86, H = 5.28, N = 5.69

²²⁵ E. Malmstrom, R. D. Miller, C. J. Hawker, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15225-15236.

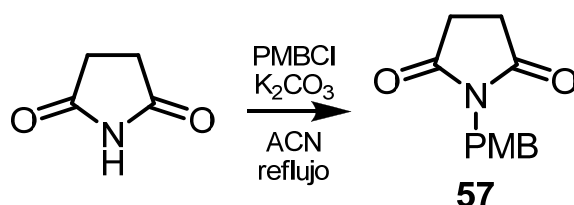
Preparación de pirrolidin-2,5-diona-1-4-metoxibencilo (**57**).²²⁶

Procedimiento A:



Se disuelve la urea succinimida **53** (200 mg, 1.41 mmol, 1 eq) en DMF seca (10 mL). Se adiciona hidruro de sodio (60 % en aceite mineral) (62 mg, 1.55 mmol, 1.1 eq) y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agrega, gota a gota, cloruro de p-metoxibencilo, PMB (0.22 mL, 1.55 mmol, 1.1 eq) y se agita durante 24 horas. Se agregan 20 mL de CH₂Cl₂, se lava con brine, se seca con MgSO₄, se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando n-Hexano:AcOEt (6:4) como fase móvil. Se obtienen 123 mg del producto **57** como un sólido blanco (R = 39%).

Procedimiento B:



Sobre una solución de succinimida (990 mg, 10 mmol, 1 eq) en acetonitrilo seco (10 mL) se adiciona carbonato de potasio (1.38 g, 10 mmol, 1 eq) y cloruro de p-metoxibencilo (2 mL, 15 mmol, 1.5 eq). La suspensión resultante se calienta a reflujo 12 horas. La mezcla se deja enfriar y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (6:4) como fase móvil. Se obtienen 1.95 g de **57** como un sólido blanco cristalino (R = 89%).

P.F.: 129 °C (lit. 127.6-128.8 °C)

Rf: 0.26 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

²²⁶ P. Camps, J. A. Fernandez, J. Rull, S. Vazquez E. *J. Org. Chem.* **2009**, *18*, 3081-3087.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.31 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H4'), 6.80 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H3'), 4.56 (2H, s, H1'), 3.75 (3H, s, OCH₃), 2.63 (4H, s, H3, H4)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177.0 (C2, C5), 159.3 (5'), 130.4 (C4'), 128.1 (C2'), 113.9 (C3'), 55.2 (OCH₃), 41.7 (C1'), 28.2 (C3, C4)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 242 ([M + Na]⁺, 100)

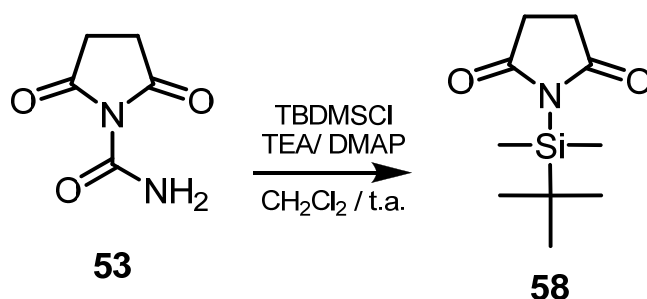
HRMS: Calculado para C₁₂H₁₃NO₃ = 219.0895. Observado = 219.0903

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1694, 1515, 1340, 1230, 1171, 1027, 812

AE: Calculado para C₁₂H₁₃NO₃: C = 65.74, H = 5.98, N = 6.39. Observado: C = 65.69, H = 6.09, N = 6.29

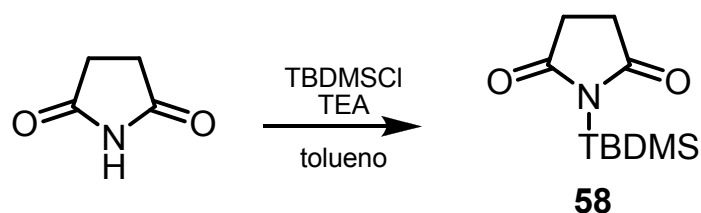
Preparación de pirrolidin-2,5-diona-1-*tert*-butildimetilsililo (**58**).

Procedimiento A:



Se disuelve la urea succinimida **53** (200 mg, 1.41 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 seco (15 mL). Se enfría a 0 °C y se adiciona trietilamina (0.3 mL, 3.5 mmol, 2.5 eq) y DMAP (cat.) Se adiciona, lentamente, TBDMSCl (317 mg, 2.1 mmol, 1.5 eq) y la solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Se adicionan 20 mL de CH_2Cl_2 y se lava con NH_4Cl y Después con brine. La fase orgánica se seca (MgSO_4), se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica, utilizando n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtienen 143 mg del producto **58** como un sólido amarillo (R = 39%).

Procedimiento B:



Se disuelve la succinimida (140 mg, 1.41 mmol, 1 eq) en tolueno seco (10 mL) y se enfría a 0 °C. Se adiciona trietilamina (0.3 mL, 3.5 mmol, 2.5 eq) y, lentamente, TBDMSCl (317 mg, 2.1 mmol, 1.5 eq). La solución resultante se deja que alcance la temperatura ambiente y se agita durante 12 horas. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtienen 210 mg del producto protegido **58** como un sólido amarillo (R = 70%).

P.F.: 65-68 °C

Rf: 0.44 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.70 (4H, s, H3, H4), 0.95 (9H, s, SiC(CH₃)₃), 0.43 (6H, s, SiCH₃)

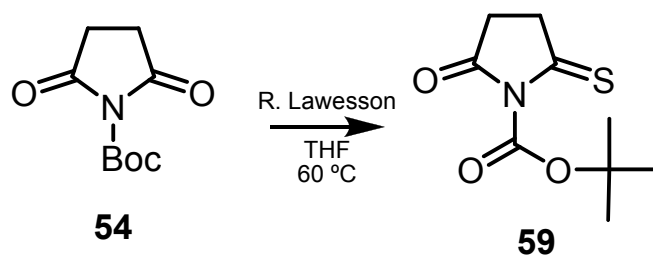
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 183.2 (C2, C5), 30.7 (C3, C4), 26.3 (SiC(CH₃)₃), 18.9 (SiC(CH₃)₃), -4.4 (Si(CH₃)₂)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 236 ([M + Na]⁺, 100), 214 ([M+H]⁺, 63)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2928, 1691, 1168, 849

AE: Calculado para C₁₀H₁₉NO₂Si: C = 56.30, H = 8.98, N = 6.57. Observado: C = 55.53, H = 8.23, N = 6.27

Preparación de 2-oxo-5-tioxopirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (59).



Se disuelve BOC-succinimida **54** (800 mg, 4.02 mmol, 1 eq) en THF seco (40 mL) y se agrega el reactivo de Lawesson (1.49 g, 0.92 mmol, 1 eq). La solución resultante se agita a 60 °C durante 90 minutos. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto **59** (190 mg, R = 22%) como un sólido amarillo.

P.F.: 56-60 °C

Rf: 0.58 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.23-3.13 (2H, m, H3), 2.88-2.80 (2H, m, H4), 1.62 (9H, s, H8)

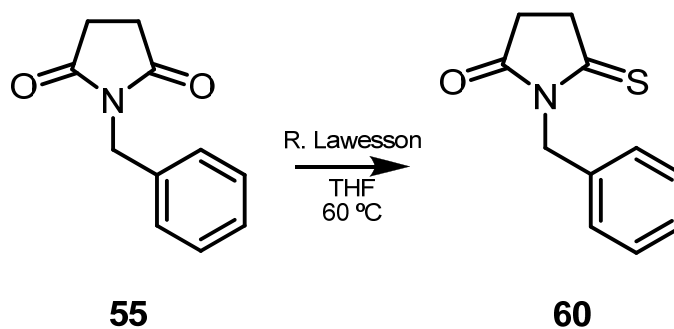
¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 206.6 (C5), 174.5 (C2), 148.2 (C1'), 87.0 (C3'), 39.4 (C3), 30.0 (C4), 27.7 (C4')

EM (ESI); m/z (int. rel.): 238 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2982, 2935, 1747, 1624, 1456, 1370, 1256, 1145, 843, 734, 662

AE: Calculado para C₉H₁₃NO₃S: C = 50.21, H = 6.09, N = 6.51, S = 14.90.
Observado: C = 50.11, H = 6.19, S = 15.01

Preparación de 5-tioxopirrolidin-2-ona-1-bencilo (**60**).²²⁷



Se disuelve la bencil-succinimida **55** (150 mg, 0.79 mmol, 1 eq) en THF seco (10 mL) y se agrega el reactivo de Lawesson (319 mg, 0.79 mmol, 1 eq). La solución resultante se agita a 60 °C durante 90 minutos. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto **60** (22 mg, R = 14%) como un sólido amarillo.

P.F.: 57-60 °C (lit. 60-65 °C)

Rf: 0.51 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.45 (1H, dd, *J* = 7.5, 1.9 Hz, H4'), 7.38-7.19 (3H, m, H3', H5'), 5.10 (2H, s, H1'), 3.25-3.09 (2H, m, H3), 2.83-2.67 (2H, m, H4)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 210.4 (C5), 178.7 (C2), 135.1 (C2'), 129.1 (C3'), 128.5 (C4'), 128.1 (C5'), 45.5 (C1'), 38.8 (C3), 28.8 (C4)

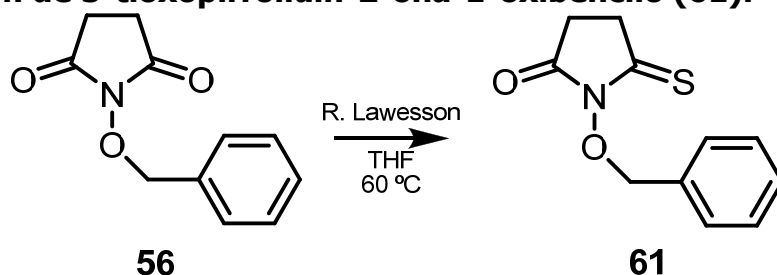
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 228 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1754, 1456, 1393, 1008, 870

AE: Calculado para C₉H₁₃NOS: C = 64.36, H = 5.70, N = 6.82, S = 15.62.
Observado: C = 64.22, H = 5.34, N = 6.69, S = 15.34

²²⁷ A. L. J. Beckwith, D. R. Boate, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4339-4348.

Preparación de 5-tioxopirrolidin-2-ona-1-oxibencilo (**61**).



Se disuelve la oxi-bencil-succinimida **56** (1000 mg, 4.88 mmol, 1 eq) en THF seco (100 mL) y se agrega el reactivo de Lawesson (987 mg, 2.44 mmol, 0.5 eq). La solución resultante se agita a 60 °C durante 90 minutos. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Se obtiene el producto **61** (194 mg, R = 18%) como un sólido amarillo.

P.F.: 76-80 °C

Rf: 0.7 (CH₂Cl₂)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.65-7.56 (2H, m, H5'), 7.44-7.36 (3H, m, H4', H6'), 5.23 (2H, s, H2'), 3.18-2.98 (2H, m, H3), 2.82-2.59 (2H, m, H4)

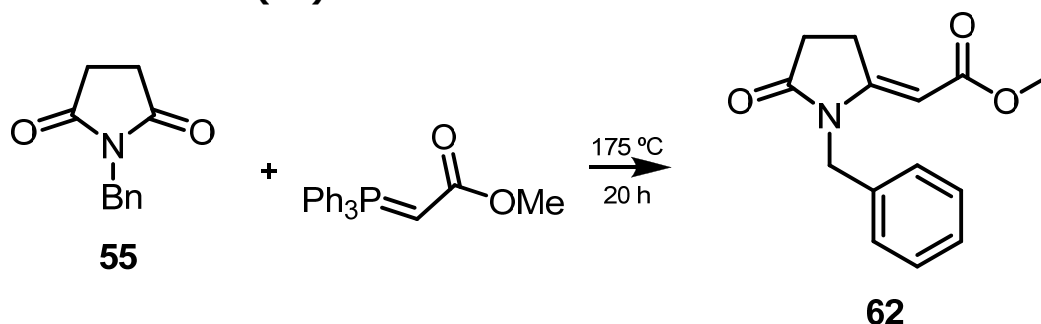
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 210.4 (C5), 178.7 (C2), 133.0 (C3'), 130.5 (C4'), 129.5 (C5'), 128.5 (C6'), 77.7 (C2'), 35.3 (C3), 26.3 (C4)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 244 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1762, 1719, 1268, 1229, 754, 716, 695, 655

AE: Calculado para C₁₁H₁₁NO₂S: C = 59.71, H = 5.01, N = 6.33, S = 14.49.
Observado: C = 60.40, H = 5.27, N = 5.96, S = 13.52

Preparación de acetato de (E)-[1-bencil-5-oxopirrolidin-2-iliden] acetato de metilo (62).²²⁸



Se colocan en un balón la bencil-succinimida **55** (205 mg, 1.08 mmol, 1 eq) y trifenilfosforaniliden acetato de metilo (1100 mg, 3.29 mmol, 3 eq) y se calienta a 175 °C durante 20 horas. Se deja enfriar y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Se obtiene el producto de acoplamiento, **62**, como un sólido amarillo (200 mg, R = 86%).

P.F.: 103-106 °C (lit. 109 °C)

Rf: 0.51 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.40-7.26 (3H, m, H3'', H5''), 7.24 (2H, dd, *J* = 7.8, 6.2 Hz, H4''), 5.22 (1H, t, *J* = 1.9 Hz, H2'), 4.74 (2H, s, H1''), 3.66 (3H, s, OMe), 3.39-3.21 (2H, m, H3), 2.83-2.59 (2H, m, H4)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177.1 (C5), 167.5 (C1'), 159.5 (C2), 134.8 (C2''), 128.9 (C4''), 127.8 (C5''), 127.2 (C3''), 92.3 (C2'), 50.9 (OMe), 44.2 (C1''), 27.9, 24.7 (C3, C4)

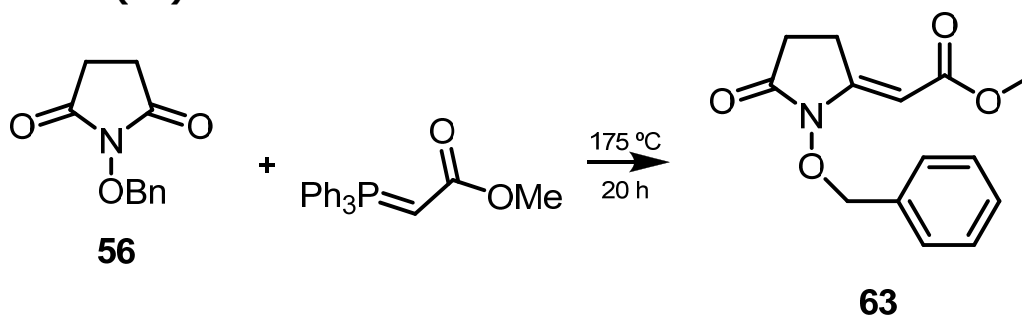
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 268 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1737, 1707, 1616, 1316, 1141

AE: Calculado para C₁₄H₁₅NO₃: C = 66.56, H = 6.16, N = 5.71. Observado: C = 67.03, H = 6.17, N = 5.59

²²⁸ J. P. Celerier, E. Marx, G. Lhomme, *J. Het. Chem.* **1988**, 25, 1275-1276.

Preparación de de (E)-[1-oxibencil-5-oxopirrolidin-2-iliden] acetato de metilo (63).



Se colocan en un balón oxi-bencil-succinimida **56** (221 mg, 1.1 mmol, 1 eq) y trifenilfosforaniliden acetato de metilo (1100 mg, 3.3 mmol, 3 eq) y se calienta a 175 °C durante 20 horas. Se deja enfriar y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Se obtiene el producto, **63**, como un sólido amarillo (148 mg, R = 52%).

P.F.: 75-77 °C

Rf: 0.54 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.53-7.45 (2H, m, H5''), 7.40 (3H, dd, *J* = 3.7, 2.5 Hz, H4'', H6''), 5.47 (1H, t, *J* = 2.0 Hz, H2'), 5.07 (2H, s, H2''), 3.71 (3H, s, OMe), 3.32-3.09 (2H, m, H3), 2.63-2.48 (2H, m, H4)

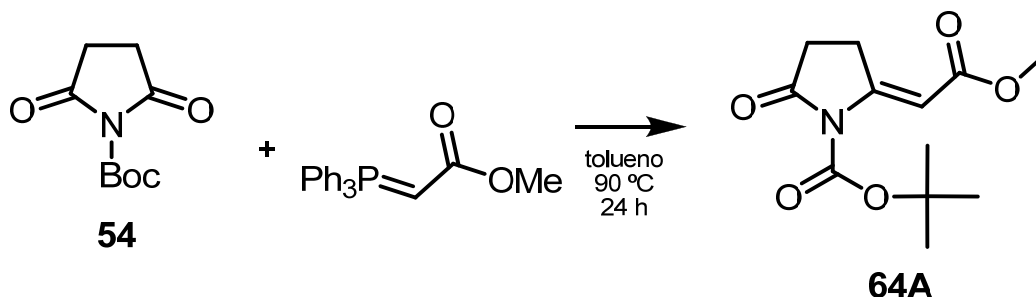
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.4 (C5), 166.6 (C1'), 153.2 (C2), 132.7 (C3''), 128.8 (C5''), 128.5 (C6''), 127.5 (C4''), 89.6 (C2'), 76.4 (OMe), 50.0 (C2''), 24.6, 20.8 (C3, C4)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 284 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1742, 1702, 1663, 1440, 1246, 1162, 1147

EA: Calculado para C₁₄H₁₅NO₄: C = 64.36, H = 5.79, N = 5.36. Observado: C = 64.54, H = 5.89, N = 5.58

Preparación de (E)-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5-oxopirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (64A).



Se disuelve la BOC-succinimida **54** (221 mg, 1.1 mmol, 1 eq) y trifenilfosforaniliden acetato de metilo (1100 mg, 3.3 mmol, 3 eq) en tolueno seco (20 mL). La suspensión resultante se calienta a $90\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 horas. Se lleva a sequedad y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Se obtiene el producto de reacción de Wittig, **64A** (205 mg, R = 73%) como un sólido blanco.

P.F.: $90\text{ }^\circ\text{C}$

Rf: 0.45 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.01 (1H, s, H1'), 3.60 (3H, s, OCH_3), 3.17 (2H, dd, $J = 9.2, 6.8$ Hz, H3), 2.51 (2H, dd, $J = 9.5, 6.6$ Hz, H4), 1.49 (9H, s, H4'')

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.8 (C5), 167.5 (C2'), 154.8 (C2), 148.5 (C1''), 97.6 (C1'), 85.3 (C3''), 50.9 (OCH_3), 28.5 (C4), 27.7 (C4''), 24.1 (C3)

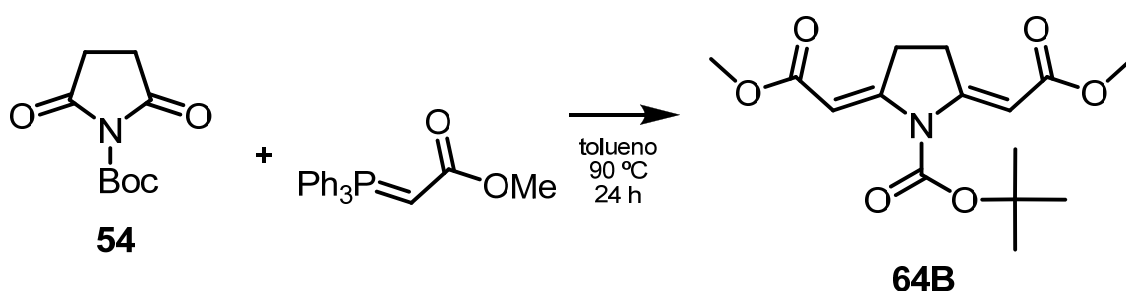
EM (ESI); m/z (int. rel.): 278 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100), 178 (57)

HRMS: Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_5 = 255.1107$. Observado = 255.1097

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 2984, 1738, 1634, 1435, 1372, 1146, 845

AE: Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_3$: C = 56.46, H = 6.71, N = 5.49. Observado: C = 56.21, H = 6.64, N = 5.88

Preparación de (2,5E)-bis[2-metoxi-2-oxoetiliden]-pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (64B).



Se disuelve la BOC-succinimida **54** (221 mg, 1.1 mmol, 1 eq) y trifenilfosforaniliden acetato de metilo (1100 mg, 3.3 mmol, 3 eq) en tolueno seco (20 mL). La suspensión resultante se calienta a 90 °C durante 20 horas. Se lleva a sequedad y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Se obtiene el producto de doble acoplamiento de Wittig (**64B**) (15 mg, R = 5%) como un sólido blanco.

P.F.: 138 °C

Rf: 0.57 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.25 (2H, s, H1'), 3.71 (6H, s, OMe), 3.21 (4H, s, H3, H4), 1.61 (9H, s, H4'')

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.3 (C2'), 157.5 (C2, C5), 150.1 (C1''), 98.7 (C1'), 85.5 (C3''), 51.0 (OMe), 28.0 (C4''), 27.7 (C3, C4)

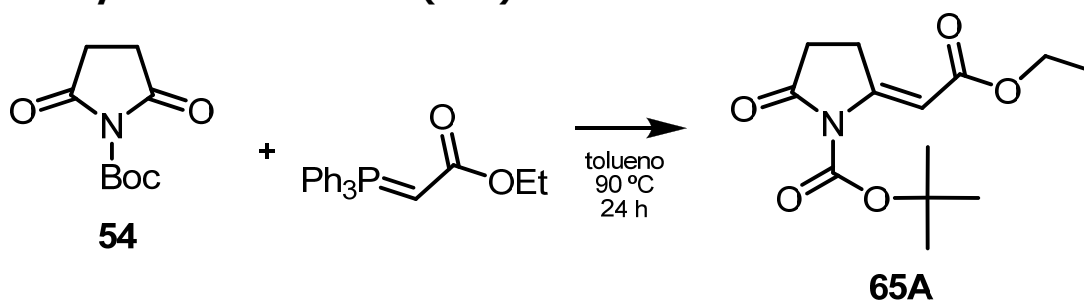
EM (ESI); m/z (int. rel.): 334 ([M + Na]⁺, 100), 234 (26)

HRMS: Calculado para C₁₅H₂₁NO₆ = 311.1369. Observado = 311.1374

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1739, 1606, 1436, 1367, 1135, 850

AE: Calculado para C₁₅H₂₁NO₆: C = 57.87, H = 6.80, N = 4.50. Observado: C = 57.52, H = 6.53, N = 4.96

Preparación de (E)-(2-etoxi-2-oxoetiliden)-5-oxopirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (65A).



Se disuelve la BOC-succinimida **54** (2.3 g, 11.48 mmol, 1 eq) y trifenilfosforaniliden acetato de etilo (10 g, 28.7 mmol, 2.5 eq) en tolueno seco (70 mL). La suspensión resultante se calienta a 90 °C durante 20 horas. Se lleva a sequedad y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto de reacción de Wittig, **65A** (1.89 g, R = 61%), como un sólido blanco.

P.F.: 51 °C

Rf: 0.60 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.12 (1H, s, H1'), 4.28-3.97 (2H, m, OCH₂CH₃), 3.34-3.22 (2H, m, H4), 2.65-2.54 (2H, m, H3), 1.60 (9H, s, H4''), 1.29 (3H, t, J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃)

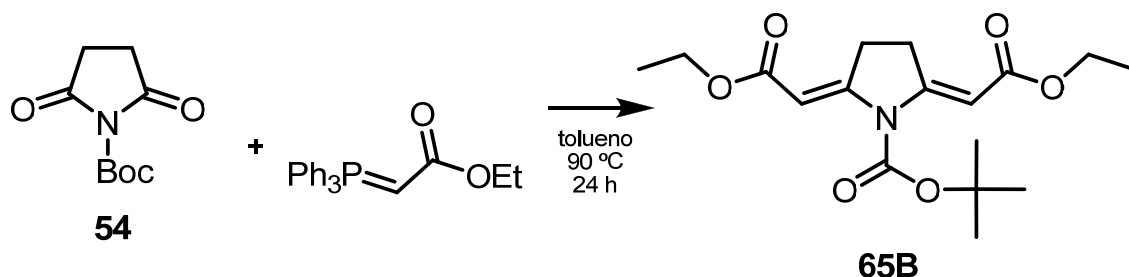
¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.0 (C5), 167.3 (C2'), 154.4 (C1''), 148.7 (C2), 98.4 (C1'), 85.6 (C3''), 59.8 (OCH₂CH₃), 28.7 (C3), 27.8 (C4''), 24.2 (C4), 14.3 (OCH₂CH₃)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 292 ([M + Na]⁺, 100), 192 (72)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2980, 1738, 1634, 1370, 1142, 847

AE: Calculado para C₁₃H₁₉NO₅: C = 57.98, H = 7.11, N = 5.20. Observado: C = 58.05, H = 7.13, N = 5.01

Preparación de 2,5-bis[(E)-2-etoxi-2-oxoetiliden]-pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (65B).



Se disuelve la BOC-succinimida **54** (2.3 g, 11.48 mmol, 1 eq) y trifenilfosforaniliden acetato de etilo (10 g, 28.7 mmol, 2.5 eq) en tolueno seco (70 mL). La suspensión resultante se calienta a 90 °C durante 20 horas. Se lleva a sequedad y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto de doble acoplamiento de reacción de Wittig, **65B** (779 mg, R = 20%), como un sólido blanco.

P.F.: 56 °C

Rf: 0.76 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.01 (2H, s, H1'), 4.12-3.98 (4H, m, OCH₂CH₃), 3.09 (4H, s, H3, H4), 1.50 (9H, s, H4''), 1.18 (6H, td, J = 7.1, 1.4 Hz, OCH₂CH₃)

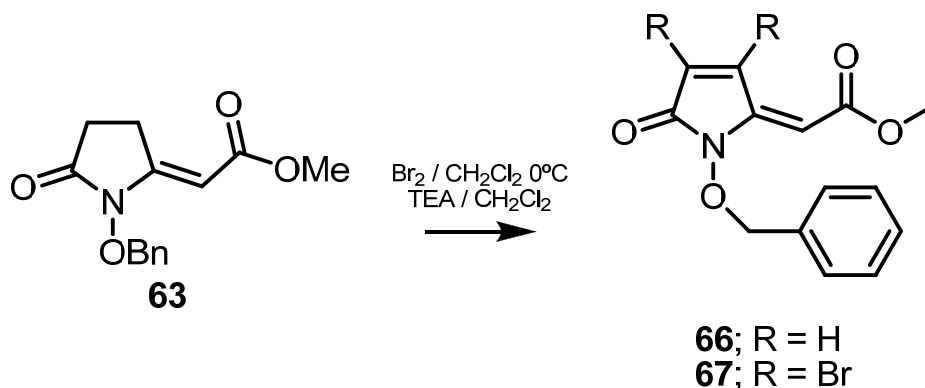
¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.0 (C2'), 167.3 (C2, C5), 154.3 (C1''), 98.4 (C1'), 85.6 (C3''), 59.8 (OCH₂CH₃), 28.8 (C4''), 27.8 (C3, C4), 14.3 (OCH₂CH₃)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 362 ([M + Na]⁺, 100)

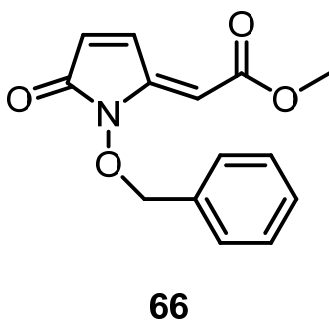
IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2982, 1782, 1630, 1370, 1143, 859

AE: Calculado para C₁₇H₂₅NO₆: C = 60.16, H = 7.42, N = 4.13. Observado: C = 60.30, H = 7.41, N = 4.01

Preparación de (E)-(1-(benciloxi)-5-oxo-1H-pirrol-2(5H)-iliden)acetato de metilo (66) y (E)-(1-(benciloxi)-3,4-dibromo-5-oxo-1H-pirrol-2(5H)-iliden)acetato de metilo (67).



A una solución del alqueno **63** (110 mg, 0.42 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (2 mL) a 0 °C se le adiciona bromo (0.03 mL, 0.57 mmol, 1.3 eq). Se agita durante 2 horas. Se vuelca sobre tiosulfato de sodio y extrae con eter etílico. Se seca (MgSO₄), filtra y lleva a sequedad. Se disuelve el residuo en CH₂Cl₂ (2 mL) y adiciona trietilamina (0.3 mL, 2.11 mmol, 5 eq). Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Se lleva a sequedad y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (4:1) como fase móvil. Se obtienen 27 mg del producto insaturado **66** (26%) y 63 mg del producto dibromado **67** (38%).



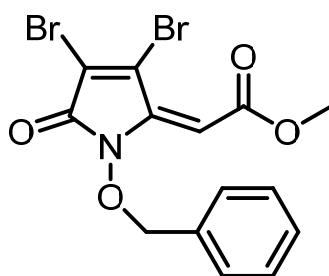
Rf: 0.63 (n-Hexano:AcOEt; 1:1).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.19 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H3), 7.42-7.25 (3H, m, H4'', H6''), 7.21-7.18 (2H, m, H5''), 6.42 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H4), 5.50 (1H, s, H2'), 4.82 (2H, s, H2''), 3.74 (3H, s, OMe)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.3 (C5), 165.9 (C1'), 150.8 (C2), 136.0 (C3), 135.9 (C3''), 128.9 (C4''), 127.7 (C6''), 127.2 (C4'), 126.8 (C5''), 99.9 (C2'), 51.7 (C2''), 42.9 (OMe)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 282 ([M + Na]⁺, 100)

AE: Calculado para C₁₄H₁₃NO₄: C = 64.86, H = 5.05, N = 5.40. Observado: C = 64.51, H = 5.64, N, 5.25



67

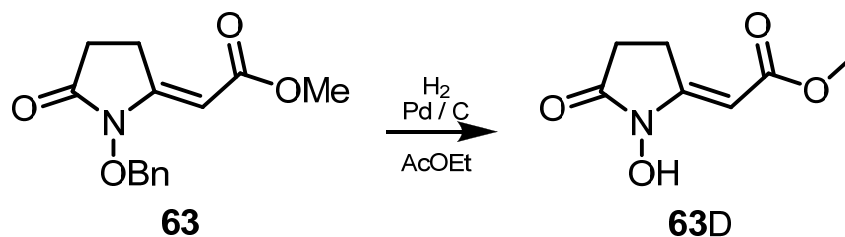
Rf: 0.86 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36-7.20 (3H, m, H4'', H6''), 7.15-7.04 (2H, m, H5''), 5.85 (1H, s, H2'), 5.39 (2H, s, H2''), 3.62 (3H, s, OMe)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.0 (C5), 164.4 (C1'), 143.0 (C2), 136.1 (C3), 133.50 (C3''), 128.5 (C4''), 127.5 (C6''), 126.9 (C5''), 121.4 (C4), 103.7 (C2'), 52.2 (OMe), 46.0 (C2'')

AE: Calculado para C₁₄H₁₁Br₂NO₄: C = 40.32, H = 2.66, Br = 38.32, N = 3.36. Observado: C = 40.28, H = 2.56, N = 3.18

Preparación de (E)-(1-hidroxi-5-oxopirrolidin-2-ilidene)acetato de metilo (63D).



A una solución del producto de reacción de Wittig **63** (80 mg, 0.31 mmol, 1 eq) en AcOEt (10 mL) se agrega una punta de espátula de Paladio al 10 % sobre carbono. Se coloca bajo hidrógeno a una presión de 1 atm y agita vigorosamente durante 5 horas. Se filtra a través de celite y lleva a sequedad. Se obtienen 36 mg del producto **63D** como un sólido blanco que no se purifica (R = 70%).

P.F.: 154-156 °C

Rf: 0.13 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

¹H RMN (300 MHz, acetona-d₆) δ (ppm): 5.68 (1H, s, H2'), 3.73 (3H, s, OMe), 3.35-3.15 (2H, m, H3), 2.73-2.52 (2H, m, H4)

¹³C RMN (75 MHz, acetona-d₆) δ (ppm): 172.2 (C5), 171.0 (C1'), 167.1 (C2), 88.2 (C2'), 49.9 (OMe), 25.0 (C4), 21.7 (C3)

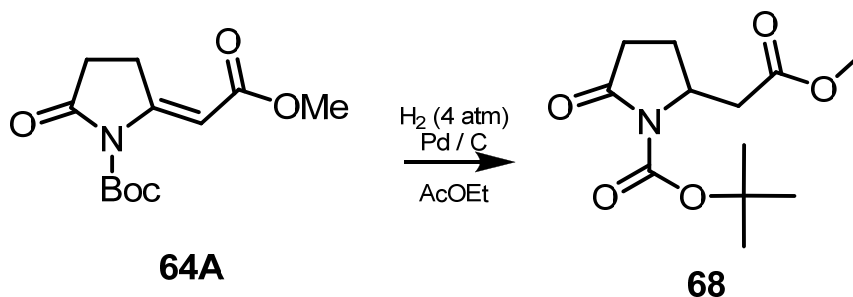
EM (ESI); m/z (int. rel.): 172 ([M + H]⁺, 100)

HRMS: calculado para C₇H₁₀NO₄ = 172.0610, Observado: = 172.0610

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1634, 1167, 843

AE: Calculado para C₇H₉NO₄: C = 49.12, H = 5.30, N = 8.18. Observado: C = 49.50, H = 5.17, N = 8.31

Preparación de 2-[2-Metoxi-2-oxoetil]-5-oxopirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (68).²²⁹



Se disuelve la W-BOC-succinimida **64A** (952 mg, 3.73 mmol, 1 eq) en AcOEt (30 mL) y agrega una punta de espátula de Paladio al 10 % sobre carbono. Se coloca bajo hidrógeno a una presión de 4 atm y agita vigorosamente durante 24 horas. Se filtra a través de celite y lleva a sequedad. Se obtienen 956 mg del producto reducido, **68**, como un aceite incoloro que se utiliza en la próxima reacción sin purificación previa.

Rf: 0.38 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.47 (1H, td, *J* = 8.4, 2.6 Hz, H2), 3.67 (3H, s, OMe), 2.86 (1H, dd, *J* = 15.5, 3.2 Hz, H4), 2.55 (2H, ddd, *J* = 17.9, 16.7, 9.7 Hz, H1', H4), 2.41 (1H, ddd, *J* = 17.7, 9.4, 2.8 Hz, H1'), 2.21 (1H, dt, *J* = 20.1, 9.2 Hz, H3), 1.90-1.75 (1H, m, H3), 1.49 (9H, s, H4'')

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.7 (C5), 170.8 (C2), 149.7 (C1''), 83.3 (C3''), 54.5 (C2), 51.8 (OMe), 38.0 (C1'), 30.9 (C4), 28.0 (C4''), 23.0 (C3)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 280 ([M + Na]⁺, 100)

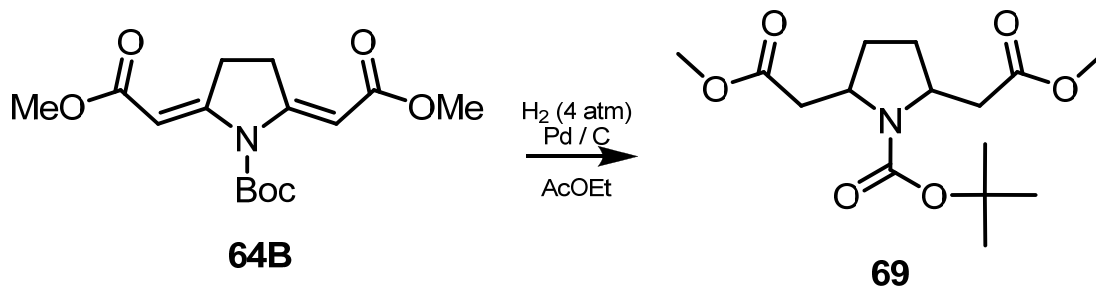
HRMS: Calculado para C₁₂H₂₀NO₅ = 258.1341. Observado = 258.1339

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2977, 1170, 1436, 1025

AE: Calculado para C₁₂H₂₀NO₅: C = 56.02, H = 7.44, N = 5.44. Observado: C = 56.42, H = 7.83, N = 5.45

²²⁹ A. Gheorghe, M. Schulte, O. Reiser, *J. Org. Chem* **2006**, *71*, 2173-2174.

Preparación de 2,5-bis-[2-metoxi-2-oxoetil]-pirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (69).



Se disuelve el producto de doble reacción de Wittig **64B** (73 mg, 0.23 mmol, 1 eq) en AcOEt (10 mL) y se agrega una punta de espátula de Paladio al 10 % sobre carbono. Se coloca bajo hidrógeno a una presión de 4 atm y agita vigorosamente durante 48 horas. Se filtra a través de celite y lleva a sequedad. Se obtienen 72 mg del producto reducido **69** como un aceite incoloro que se utiliza en la próxima reacción sin purificación previa.

Rf: 0.72 (n-hex:AcOEt; 1:1)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.11 (2H, s, H2, H5), 3.64 (6H, s, OMe), 3.12-2.59 (2H, m, H3, H4), 2.33 (2H, dd, *J* = 15.0, 9.4 Hz, H3, H4), 2.06 (2H, d, *J* = 4.9 Hz, H1'), 1.73 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H1'), 1.44 (9H, s, H4'')

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.7 (C2'), 154.2 (C1''), 79.9 (C3''), 55.3 (C2, C5), 51.5 (OMe), 28.4 (C4''), 28.2 (C3, C4), 27.3 (C1')

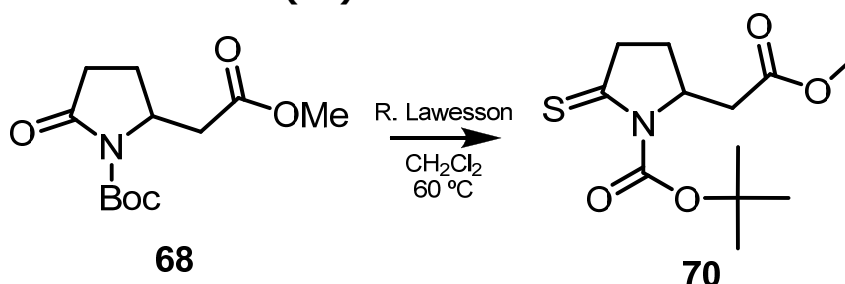
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 338 ([M + Na]⁺, 216 (91)

HRMS: Calculado para C₁₅H₂₆NO₆ = 316.1760. Observado = 316.1757

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2977, 1733, 1436, 1004

AE: Calculado para C₁₅H₂₆NO₆: C = 57.13, H = 7.99, N = 4.44. Observado: C = 57.97, H = 7.51, N = 4.83

Preparación de 2-[2-Metoxi-2-oxoetil]-5-tioxopirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (70).



A una solución del producto reducido **68** (100 mg, 0.39 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ seco (10 mL) se adiciona el reactivo de Lawesson (158 mg, 0.39 mmol, 1 eq). La mezcla se calienta a 60 °C bajo argón durante 90 minutos. Se deja enfriar, se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtienen 67 mg del producto **70** como un aceite amarillo (R = 63%).

Rf: 0.56 (n-hex:AcOEt; 7:3)

¹H RMN: (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.83 (1H, dd, *J* = 12.4, 5.8 Hz, H₂), 3.71 (3H, s, OMe), 3.14-3.02 (2H, m, H₄), 2.92 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H_{1'}), 2.61 (1H, dd, *J* = 15.5, 10.0 Hz, H_{1'}), 2.37-2.20 (1H, m, H₃), 1.98-1.82 (1H, m, H₃), 1.55 (9H, s, H_{4''})

¹³C RMN: (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 207.2 (C₅), 170.6 (C_{2'}), 150.0 (C_{1''}), 84.6 (C_{3''}), 62.0 (C₂), 52.0 (OMe), 46.6 (C₄), 37.5 (C_{1'}), 27.9 (C_{4''}), 25.7 (C₃)

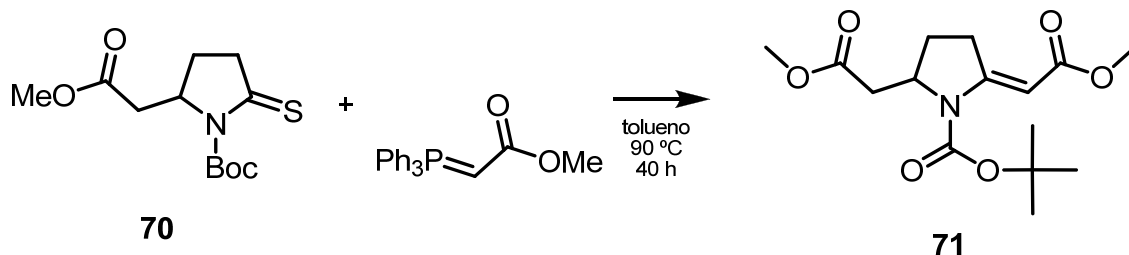
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 296 ([M + Na]⁺, 100)

HRMS: Calculado para C₁₂H₁₉NO₄ = 273.1035. Observado: = 273.1036

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2980, 1733, 1598, 1024

AE: Calculado para C₁₂H₁₉NO₄: C = 52.73, H = 7.01, N = 5.12, S = 11.73. Observado: C = 53.19, H = 6.92, N = 5.28, S = 12.16

Preparación de (E)-2-[2-Metoxi-2-oxoetil]-5-[-2-metoxi-2-oxoetiliden]pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (71).



Se disuelve el tioderivado **70** (168 mg, 0.61 mmol, 1 eq) en tolueno seco (10 mL) y se adiciona el trifenilfosforaniliden acetato de metilo (611 mg, 1.83 mmol, 3 eq). La suspensión resultante se calienta a 90 °C durante 40 horas. Se lleva a sequedad y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto **71** como un aceite amarillo (158.6 mg, R = 83%).

Rf: 0.46 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.46 (1H, s, H1''), 4.60-4.52 (1H, m, H2), 3.71 (3H, s, OCH₃), 3.67 (3H, s, OCH₃), 3.51 (1H, dd, *J* = 18.4, 9.0 Hz, H4), 2.99-2.84 (1H, m, H4), 2.78 (1H, dd, *J* = 15.2, 3.3 Hz, 1'), 2.43 (1H, dd, *J* = 15.2, 10.1 Hz, H1'), 2.06 (1H, ddd, *J* = 20.5, 12.3, 8.6 Hz, H3), 1.84 (1H, dd, *J* = 12.9, 8.5 Hz, H3), 1.54 (9H, s, H4''')

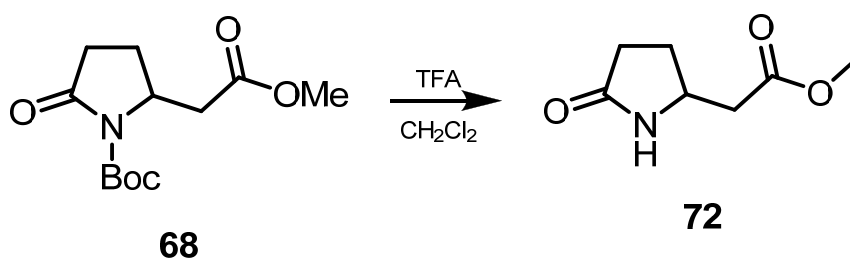
¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.2 (C2''), 169.2 (C2'), 156.7 (C5), 151.3 (C1'''), 96.4 (C1''), 82.7 (C3'''), 57.9 (C2), 51.8 (OCH₃), 50.7 (OCH₃), 37.7 (C1'), 29.6 (C4), 28.1 (C4'''), 26.2 (C3)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 354 ([M + K]⁺, 100), 336 ([M + Na]⁺, 37)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2977, 1732, 1622, 1435, 1372, 1139, 1004, 849

AE: Calculado para C₁₅H₂₃NO₆: C = 57.50, H = 7.40, N = 4.47. Observado: C = 57.44, H = 7.63, N = 4.51

Preparación de 2-(5-oxopirrolidin-2-il)acetato de metilo (**72**).²³⁰



A una disolución del compuesto reducido **68** (971 mg, 3.77 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 seco (30 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.87 mL, 11.3 mmol, 3 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 2 horas. Se vuelven a adicionar 3 equivalentes de TFA, también gota a gota. Después de 2 horas se para la reacción con NaHCO_3 (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH_2Cl_2 (20 mL x3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO_4), filtran y llevan a sequedad. Se obtienen 491 mg del producto desprotegido **72** como un sólido blanco que no se purifica (R = 83%).

P.F.: 62 °C (lit. 64 - 64.5 °C)

Rf: 0.24 (n-hex:AcOEt; 7:3)

¹H RMN: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.16 (1NH, s), 3.96-3.77 (1H, m, H2), 3.51 (3H, s, OMe), 2.37 (2H, d, $J = 6.9$ Hz, H4), 2.23-1.96 (3H, m, 2H3, H2'), 1.72-1.43 (1H, m, H2')

¹³C RMN: (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 178.0 (C1'), 171.4 (C5), 51.6 (OMe), 50.6 (C2), 40.6 (C3), 29.7 (C4), 26.6 (C2')

EM (ESI); m/z (int. rel.): 180 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 80), 158 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100)

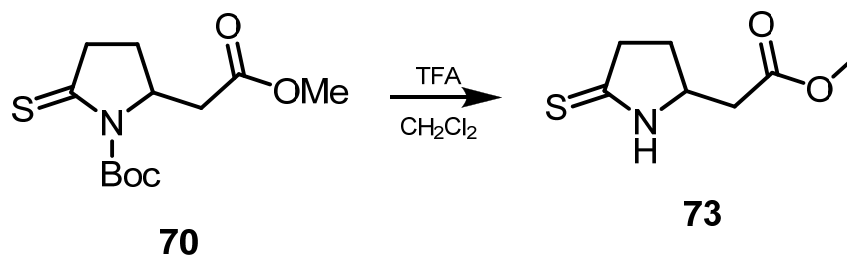
IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 3336, 2950, 1733, 1436, 1170, 835, 734

AE: Calculado para $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_3$: C = 53.49, H = 7.05, N = 8.91. Observado: C = 53.47, H = 6.35, N = 8.75

²³⁰ Y. Nagao, J. W-M. Dai, M. Ochiai, S. Tsukagoshi, E. Fujita, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1148-1156.

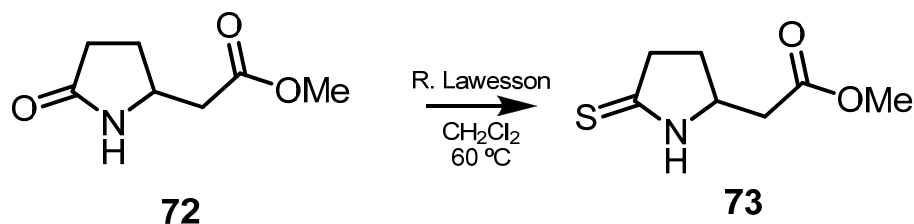
Preparación de 2-(5-tioxopirrolidin-2-il)acetato de metilo (**73**).

Procedimiento A:



A una disolución del tioderivado **70** (150 mg, 0.55 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ seco (4 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.13 mL, 1.65 mmol, 3 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 2 horas. Se vuelven a adicionar 3 equivalentes de TFA, también gota a gota. Después de 2 horas se para la reacción con NaHCO₃ (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH₂Cl₂ (5 mL x3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO₄), se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 82.6 mg del producto desprotegido **73** como un aceite amarillo que no se purifica (R = 87%).

Procedimiento B:



A una solución del producto desprotegido **72** (200 mg, 1.27 mmol, 1 eq) en tolueno seco (3 mL) se adiciona el reactivo de Lawesson (283 mg, 0.7 mmol, 0.55 eq). La mezcla se calienta a 60 °C bajo argón durante 90 minutos. Se deja enfriar, se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtienen 185 mg del producto, **73**, como un aceite amarillo (R = 84%).

Rf: 0.16 (n-Hexano:AcOEt; 1:1)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.71 (1NH,s), 4.26-4.25 (1H, m, H2), 3.68 (3H, s, OMe), 2.98-2.76 (2H, m, H4), 2.62-2.56 (2H, m, H2'), 2.46-2.31 (1H, m, H3), 1.79 (1H, dddd, J = 13.0, 9.1, 7.8, 6.5 Hz, H3)

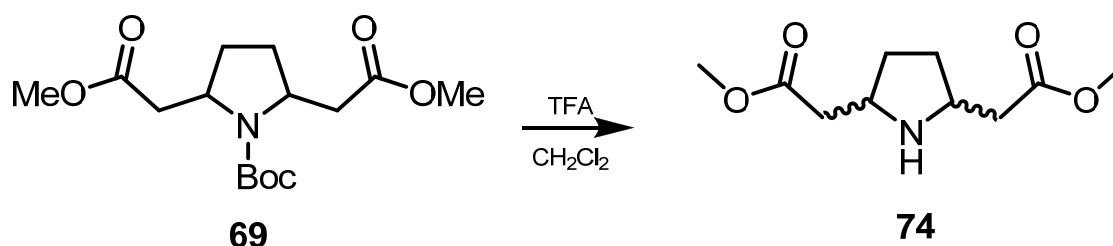
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 205.4 (C5), 171.2 (C1'), 58.3 (C2), 52.2 (OMe), 42.6 (C4), 39.4 (C2'), 28.9 (C3)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 196 ([M + Na]⁺, 100), 174 ([M + H]⁺, 15)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3132, 2986, 1723, 1422, 800

AE: Calculado para C₇H₁₁NO₂S: C = 48.53, H = 6.40, N = 8.09, S = 18.51.
Observado: C = 48.37, H = 6.51, N = 8.32, S = 18.75

Preparación de 2,2'-(pirrolidin-2,5-diiliden)diacetato de metilo (**74**).



A una disolución del producto doblemente reducido **69** (71 mg, 0.225 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ seco (2 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.05 mL, 0.56 mmol, 3 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 2 horas. Se vuelven a adicionar 3 equivalentes de TFA, también gota a gota. Después de 2 horas se para la reacción por adición de NaHCO₃ (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH₂Cl₂ (3 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO₄), filtran y llevan a sequedad. Se obtienen 47 mg del producto desprotegido **74** como un aceite incoloro que no se purifica.

EM (ESI); m/z (int. rel.): 238 ([M + Na]⁺, 82), 216 ([M + H]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2935, 1735, 1437, 1170, 1000

AE: Calculado para C₁₀H₁₇NO₄: C = 55.80, H = 7.96, N = 6.51. Observado: C = 55.27, H = 8.09, N = 6.68

Los datos de RMN son de la mezcla de productos

Compuesto mayoritario

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.68 (6H, s, OMe), 3.56-3.48 (2H, m, H₂), 2.58-2.48 (4H, m, 2H₂', 2H₂''), 1.95 (2H, ddd, *J* = 6.6, 4.4, 2.1 Hz, 1H₃, 1H₄), 1.52-1.41 (2H, m, 1H₃, 1H₄)

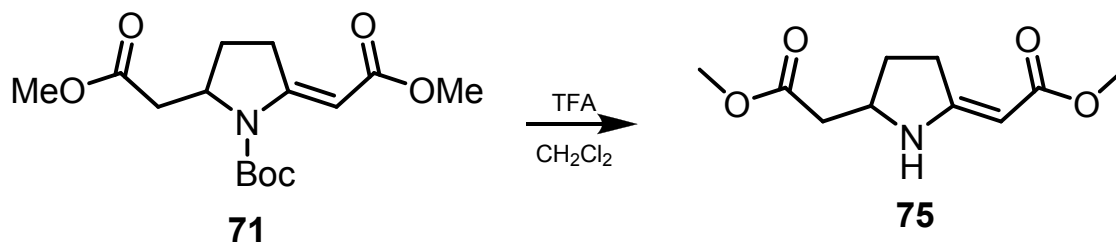
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.7 (C1', C1''), 54.6 (C2, C5), 51.5 (OMe), 40.8 (C2', C2''), 30.1 (C3, C4)

Compuesto minoritario

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.69 (6H, s, OMe), 3.44 (2H, d, *J* = 2.7 Hz, H₂), 2.57-2.47 (4H, m, 2H₁', 2H₁''), 2.13-2.05 (2H, m, 1H₃, 1H₄), 1.55-1.41 (2H, m, 1H₃, 1H₄)

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.3 (C2', C2''), 54.1 (C2, C5), 51.6 (OMe), 40.1 (C1', C1''), 29.7 (C3, C4)

Preparación de (E)-(5-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidin-2-ilidene)acetato de metilo (75).



A una disolución del producto doblemente funcionalizado **71** (170 mg, 0.54 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ seco (3 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.13 mL, 1.63 mmol, 3 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 2 horas. Se vuelven a adicionar 3 equivalentes de TFA, también gota a gota. Después de 2 horas se para la reacción por adición de NaHCO₃ (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH₂Cl₂ (3 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO₄), se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 78.5 mg del producto desprotegido, **75**, como un aceite incoloro que no se purifica (R = 69%).

Rf: 0.2 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.11 (1NH, s), 4.49 (1H, s, H2'), 4.16-4.07 (1H, m, H5), 3.69 (3H, s, OMe), 3.61 (3H, s, OMe), 2.63-2.55 (2H, m, H1''), 2.52 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H3), 2.17 (1H, td, *J* = 13.3, 7.1 Hz, H4), 1.59 (1H, td, *J* = 15.3, 8.0 Hz, H4)

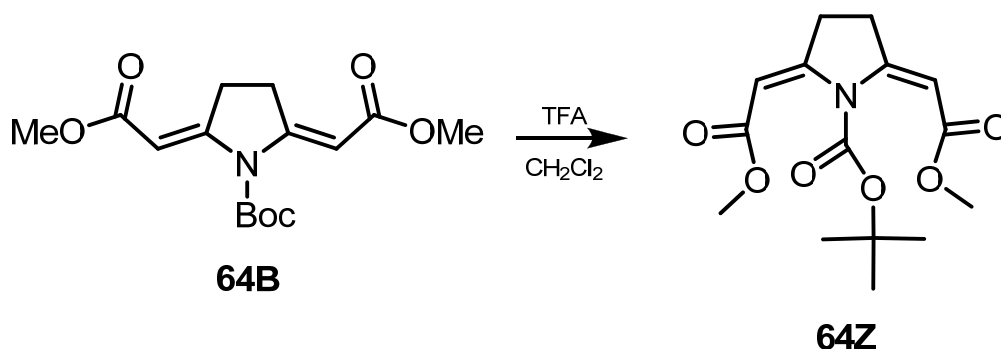
¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.5 (C1), 170.8 (C2''), 165.2 (C2), 77.0 (C2'), 55.5 (C5), 51.8 (OMe), 50.1 (OMe), 40.4 (C1''), 31.3 (C3), 28.0 (C4)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 252 ([M + K]⁺, 34), 236 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2953, 1734, 1437, 1200, 1000

AE: Calculado para C₁₀H₁₅NO₄: C = 56.33, H = 7.09, N = 6.57. Observado: C = 56.59, H = 6.74, N = 6.43

Preparación de (2Z,5Z)-bis[2-etoxi-2-oxoetiliden]-pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (64Z).



Sobre una disolución del producto de doble acoplamiento de Wittig **64B** (28.3 mg, 0.09 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ seco (2 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.03 mL, 0.27 mmol, 3 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 2 horas. Se para la reacción por adición de NaHCO₃ (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH₂Cl₂ (2 mL x3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO₄), filtran y llevan a sequedad. Se obtienen 38 mg del producto protegido **64Z**, con la configuración de los dobles enlaces invertida, como un sólido color blanco (17.5 mg, R = 62%).

P.F.: 89-90 °C

Rf: 0.55 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.94 (2H, s, H1', H1''), 3.81 (4H, s, 2H3, 2H4), 3.63 (6H, s, OMe), 1.47 (9H, s, H4''')

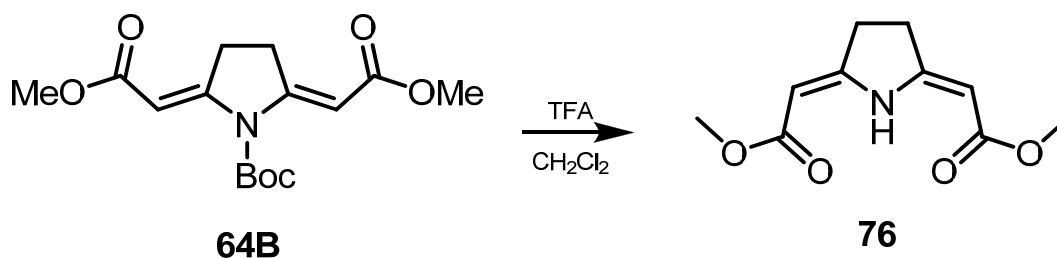
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.9 (C2', C2''), 149.9 (C1'''), 128.0 (C2, C5), 112.7 (C1', C1''), 84.7 (C3'''), 51.9 (OMe), 35.6 (C3, C4), 27.6 (C4''')

EM (ESI); m/z (int. rel.): 350 ([M + K]⁺, 20), 334 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1739, 1606, 1436, 1367, 1135, 850

AE: Calculado para C₁₅H₂₁NO₆: C = 57.87, H = 6.80, N = 4.50. Observado: C = 57.79, H = 6.87, N = 4.56

Preparación de (2Z,5Z)-(pirrolidin-2,5-diiliden) diacetato de metilo (76).



Sobre una disolución del producto de doble acoplamiento de Wittig **64B** (200 mg, 0.64 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 seco (15 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.5 mL, 6.4 mmol, 10 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 12 horas. Se para la reacción por adición de NaHCO_3 (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH_2Cl_2 (10 mL x3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO_4), filtran y llevan a sequedad. Se obtienen 38 mg del producto desprotegido, **76**, un como un aceite marrón (R = 28%).

Rf: 0.45 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.95 (2H, d, $J = 2.6$ Hz, $\text{H1}'$, $\text{H1}''$), 3.76 (6H, s, OMe), 3.68 (4H, s, 2H3 , 2H4)

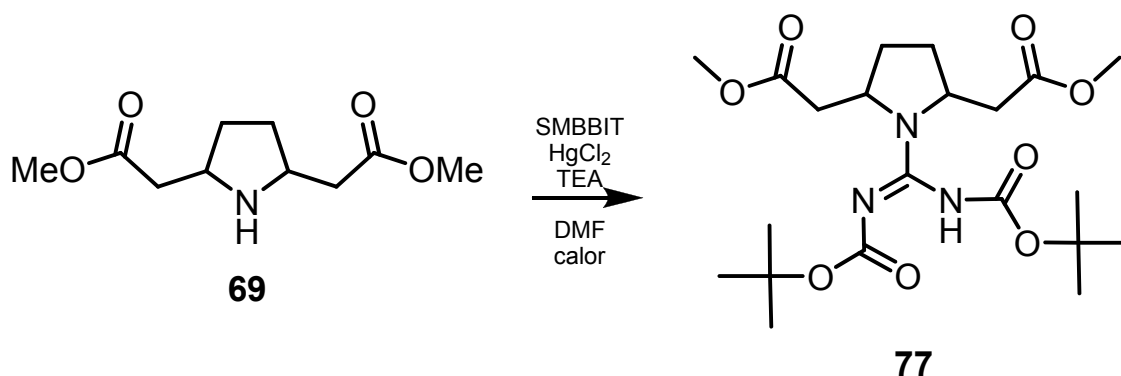
$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.5 ($\text{C2}'$, $\text{C2}''$), 123.3 (C2 , C5), 107.5 ($\text{C1}'$, $\text{C1}''$), 52.2 (OMe), 33.2 (C3 , C4)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 234 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100)

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 1674, 1615, 1297, 1186, 1149, 795

AE: Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4$: C = 56.86, H = 6.20, N = 6.63. Observado: C = 56.45, H = 5.94, N = 6.40

Preparación de 2,2'-(1-(N,N'-bis(*terc*-butoxicarbonil)carbamimidoil)-pirrolidin-2,5-diil)diacetato de metilo (77**).**



Se disuelve el producto desprotegido **69** (54 mg, 0.25 mmol, 1 eq) en DMF (4 mL) y se adiciona S-metil bisbocisotiourea (SMBBIT) (80 mg, 0.275 mmol, 1.1 eq), y trietilamina (0.05 mL 0.75 mmol, 3 eq). A esa mezcla, bajo argón, se añade cloruro de mercurio (75 mg, 0.275 mmol, 1.1 eq). La suspensión resultante se agita 12 horas a temperatura ambiente. Se lleva a sequedad, se agrega agua y se extrae con Et₂O (10 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavan con NH₄Cl (sat.), secan (MgSO₄), filtran y llevan a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtienen el producto **77** como una mezcla de dos productos, 51 mg de uno (R = 45%) y 42 mg del otro (R = 37%), como sólidos blancos.

Producto Mayoritario

P.F.: 54-56 °C

Rf: 0.19 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.59 (2H, s, H2, H5), 3.71 (6H, s, OMe), 2.99 (2H, dd, *J* = 15.9, 5.7 Hz, H2', H2''), 2.42 (2H, dd, *J* = 16.0, 7.8 Hz, H2', H2''), 2.16 (2H, s, H3, H4), 1.80 (2H, s, H3, H4), 1.50 (18H, s, H6''')

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.1 (C1', C1''), 161.2 (C1'''), 151.0 (C3'''), 81.5 (C5'''), 56.3 (C2, C5), 51.8 (OMe), 39.3 (C2', C2''), 29.8 (C3, C4), 28.1 (C6''')

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 458 ([M + H]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 2978, 1739, 1601, 1367, 1136

AE: Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_8$: C = 55.13, H = 7.71, N = 9.18. Observado:

Producto Minoritario

P.F.: 103-106 °C

Rf: 0.24 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.77 (2H, s, H2, H5), 3.69 (6H, s, OMe), 2.88-2.87 (2H, m, H2', H2''), 2.43-2.42 (2H, m, H2', H2''), 2.24 (2H, s, H3, H4), 1.85 (2H, s, H3, H4), 1.52 (18H, s, H6''')

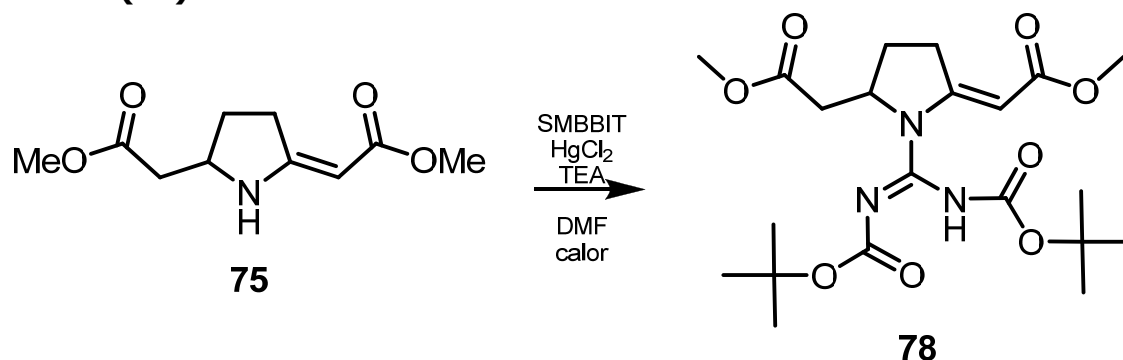
^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.41 (C1', C1''), 152.7 (C1'''), 148.7 (C3'''), 83.4 (C5'''), 56.2 (C2, C5), 51.7 (OMe), 37.6 (C2', C2''), 29.9 (C3, C4), 28.2 (C6''')

EM (ESI); m/z (int. rel.): 458 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100)

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 2978, 1739, 1601, 1367, 1136

AE: Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_8$: C = 55.13, H = 7.71, N = 9.18. Observado:

Preparación de (2E)-(1-(N,N'-bis(*tert*-butoxicarbonil)-carbamimidoil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidin-2-iliden)acetato de metilo (78).



Se disuelve el producto desprotegido **75** (28 mg, 0.13 mmol, 1 eq) en DMF (3 mL) y se adiciona S-metil bisbocisotiourea (SMBBIT) (42 mg, 0.143 mmol, 1.1 eq), y trietilamina (0.05 mL 0.39 mmol, 3 eq). A esa mezcla, bajo argón, se añade cloruro de mercurio (39 mg, 0.143 mmol, 1.1 eq). La suspensión resultante se agita 12 horas a temperatura ambiente. Se lleva a sequedad, se agrega agua y se extrae con éter etílico (5 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavan con NH₄Cl (sat.), secan (MgSO₄), filtran y llevan a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto **78** como un aceite incoloro (53 mg, R= 89%).

Rf: 0.28 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.81 (1NH, s), 5.60 (1H, s, H2'), 4.76-4.62 (1H, m, H5), 3.70 (3H, s, OMe), 3.65 (3H, s, OMe), 3.43-3.28 (1H, m, H1''), 3.16-2.93 (2H, m, H1'', H3), 2.47 (1H, dd, *J* = 15.7, 9.4 Hz, H3), 2.21 (1H, ddd, *J* = 12.7, 12.2, 3.2 Hz, H4), 1.85 (1H, ddd, *J* = 12.7, 7.5, 4.3 Hz, H4), 1.50 (18H, s, H6''')

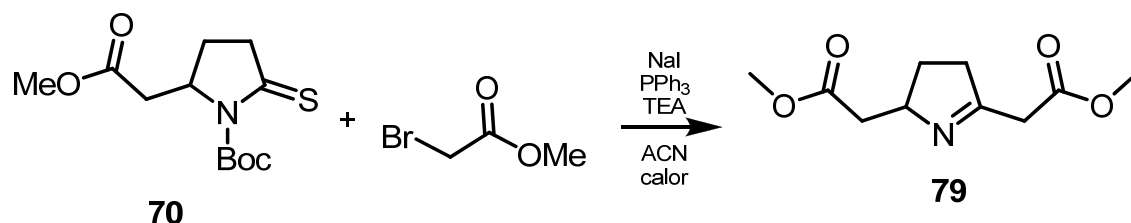
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.3 (C1'), 168.1 (C2''), 158.8 (C2), C1''' no se observa, 151.2 (C3'''), 94.9 (C2'), 77.3 (C85'''), 60.0 (C5), 51.8 (OMe), 50.8 (OMe), 37.6 (C1''), 29.9 (C3), 28.0 (C6''), 26.5 (C4)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 494 ([M + K]⁺, 25), 478 ([M + Na]⁺, 59), 456 ([M + H]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2980, 1797, 1714, 1603, 1369, 1136

AE: Calculado para $C_{21}H_{33}N_3O_8$: C = 55.37, H = 7.30, N = 9.23. Observado: C = 55.67, H = 7.43, N = 9.19

Preparación de 2,2'-(3,4-dihidro-2H-pirrol-2,5-diil)diacetato de metilo (79).



A una solución de yoduro de sodio (48 mg, 0.31 mmol, 0.5 eq) y el tioderivado **70** (169 mg, 0.61 mmol, 1 eq) en acetonitrilo seco (1 mL) se adiciona bromoacetato de metilo (0.17 mL, 1.83 mg, 3 eq). Se calienta a reflujo 2 horas y se adiciona lentamente una disolución de trifenilfosfina (324 mg, 1.22 mmol, 2 eq) y trietilamina (0.17 mL, 1.22 mmol, 2 eq) en acetonitrilo (3 mL). Se calienta a reflujo durante 7 horas. Se lleva a sequedad y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtienen 33 mg del producto **79** como un aceite amarillo (R = 39%)

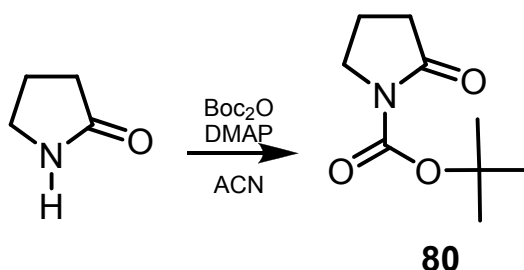
Rf: 0.43 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.46-4.26 (1H, m, H₂), 3.86 (2H, dt, *J* = 16.0, 13.9 Hz, H₂''), 3.74 (3H, s, OMe), 3.70 (3H, s, OMe), 2.72 (2H, ddd, *J* = 12.0, 11.1, 6.8 Hz, H₄), 2.68-2.55 (1H, m, H₂'), 2.38 (1H, ddd, *J* = 15.7, 9.2, 6.3 Hz, H₂'), 2.30 (1H, tdd, *J* = 9.5, 6.0, 3.8 Hz, H₃), 1.74-1.60 (1H, m, H₃)

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.1 (C1'), 170.7 (C1''), 169.5 (C5), 68.7 (C2), 52.6 (OMe), 51.6 (OMe), 40.8 (C2'), 38.2 (C2''), 32.9 (C4), 29.8 (C3)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 214 ([M + H]⁺, 100)

Preparación de 2-oxopirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**80**).²³¹



A una suspensión de pirrolidinona (1.024 g, 12.05 mmol, 1 eq) en acetonitrilo seco (5 mL), bajo argón y a temperatura ambiente, se le agrega Boc_2O (3.0 g, 13.1 mmol, 1.1 eq) y 4-DMAP (cat.). Rápidamente se desprende CO_2 y se observa disolución progresiva de la pirrolidinona. Se agita a temperatura ambiente hasta que se obtiene una solución limpia. La solución resultante se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto protegido **80** (1.81 g, R= 81%) como un aceite incoloro.

Rf: 0.32 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.76 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H5), 2.52 (2H, t, $J = 8.1$ Hz, H3), 2.09–1.91 (2H, m, H4), 1.54 (9H, s, H4')

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.3 (C2), 150.2 (C1'), 82.7 (C3'), 46.4 (C3), 33.0 (C5), 28.0 (C4'), 17.4 (C4)

EM (ESI); m/z (int. rel.): 186 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100)

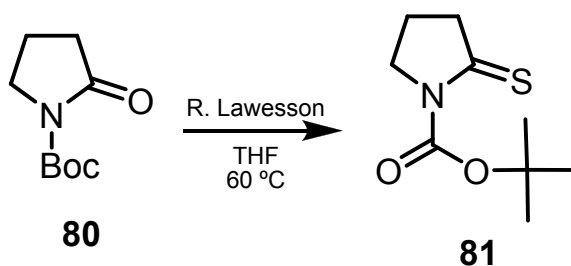
HRMS: Calculado para $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_3 = 186.1130$. Observado = 186.1121

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 2980, 1784, 1750, 1713, 1393, 1314, 1153, 1018, 778

AE: Calculado para $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_3$: C, 58.36; H, 8.16; N, 7.56; O, 25.91. Observado: C, 58.05; H, 8.232; N, 8.092.

²³¹ H. K. Lee, J. Kim, C. S. Pak, *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, 2173-2174.

Preparación de 2-tioxopirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**81**).²³¹



Se disuelve la BOC-pirrolidinona **80** (1 g, 5.4 mmol, 1 eq) en THF seco (50 mL). Se agrega el reactivo de Lawesson (1.21 g, 2.98 mmol, 0.55 eq) y la suspensión resultante se calienta, bajo argón, a 60 °C durante 90 minutos. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto **81** como un sólido amarillo (1.0 g, R = 92%).

P.F.: 75 °C

Rf: 0.61 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.05 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H3), 3.05 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H5), 2.11–1.95 (2H, m, H4), 1.54 (9H, s, H4')

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 207.8 (C2), 150.4 (C1'), 84.0 (C3'), 53.8 (C3), 49.0 (C5), 28.0 (C4'), 20.1 (C4)

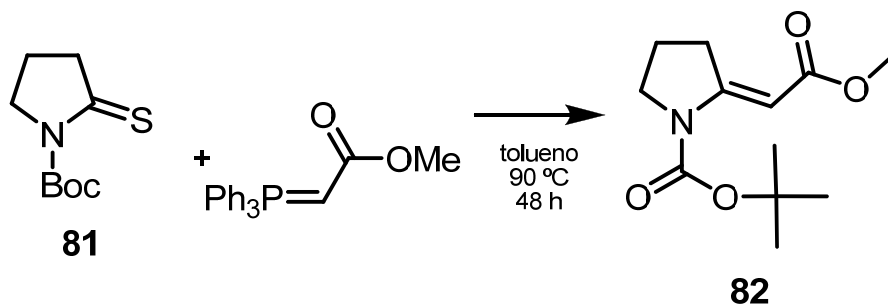
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 202 ([M + H]⁺, 100)

HRMS: Calculado para C₉H₁₅NO₂S = 201.0824. Observado = 201.0823

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2981, 1774, 1748, 1389, 1291, 1152, 1030, 766

E.A.: Calculado para C₉H₁₅NO₂S: C, 53.70; H, 7.51; N, 6.96; O, 15.90; S, 15.93. Observado: C, 53.39; H, 7.26; N, 7.04; S, 15.38

Preparación de (E)-(2-metoxi-2-oxoetiliden)pirrolidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (82).²³¹



Se disuelve el tioderivado **81** (2.0 g, 10 mmol, 1 eq) y el fosfonoacetato de metilo (10 g, 10 mmol, 3 eq) en tolueno seco (150 mL). La suspensión resultante se calienta a 90 °C durante 48 horas. Se lleva a sequedad y purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Se obtiene el producto de reacción de tio-Wittig **82** (1.52 g, R = 63%) como un sólido marrón claro.

P.F.: 105 °C

Rf: 0.68 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.47 (1H, s, H1'), 3.75–3.63 (5H, m, 2H5, OMe), 3.20 (2H, td, *J* = 7.7, 1.6 Hz, H3), 1.90 (2H, p, *J* = 7.5 Hz, H4), 1.54 (9H, s, H4'')

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.4 (C2'), 157.8 (C1''), 152.0 (C2), 95.6 (C1'), 82.1 (C3''), 50.6 (OMe), 49.8 (C5), 31.9 (C3), 28.2 (C4''), 20.9 (C4)

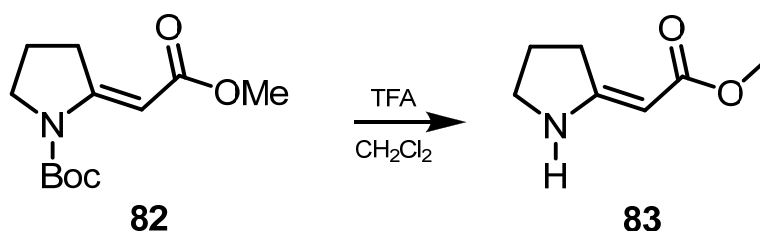
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 263 ([M + Na]⁺, 100)

HRMS: Calculado para C₁₂H₁₉NO₄ = 241.1314. Observado = 241.1308

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2978, 1729, 1611, 1244, 1005, 842

AE: Calculado para C₁₂H₁₉NO₄: C, 59.73; H, 7.94; N, 5.81; O, 26.52. Observado: C, 59.42; H, 7.91; N, 6.17

Preparación de (2E)-(pirrolidin-2-iliden)acetato de metilo (**83**).²³²



A una disolución del producto de acoplamiento de Wittig **82** (500 mg, 2.07 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ seco (12 mL), se adiciona TFA (0.5 mL, 6.22 mmol, 3 eq) y se agita a temperatura ambiente durante 90 minutos. Después de ese tiempo se vuelve a adicionar TFA (0.5 mL, 6.22 mmol, 3 eq) y se agita durante otras 2 horas. Se neutraliza con NaHCO₃ (10 %), extrae con CH₂Cl₂, seca sobre (MgSO₄), filtra y lleva a sequedad. Se obtiene el producto **83** como un sólido de color naranja que se utiliza directamente en la siguiente reacción (286 mg, R = 98%).

P.F.: 90 °C

Rf: 0.49 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.85 (1H, s, NH), 4.45 (1H, s, H2'), 3.55 (3H, s, OMe), 3.44 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, H5), 2.50 (2H, t, *J* = 7.7 Hz, H3), 1.90 (2H, dd, *J* = 14.5, 7.2 Hz, H4)

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.9 (C1'), 166.5 (C2), 76.1 (C2'), 49.9 (OMe), 47.0 (C5), 32.2 (C3), 21.9 (C4)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 164 ([M + Na]⁺, 100)

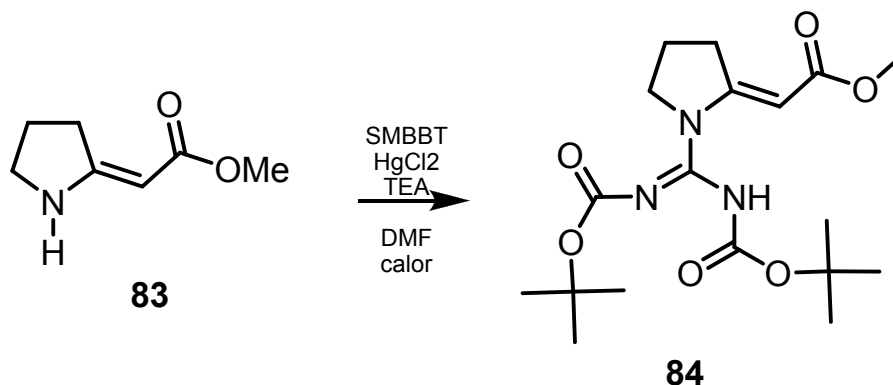
HRMS: Calculado para C₇H₁₂NO₂ [M+H]⁺, = 142.0868. Observado = 142.0868

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2982, 1733, 1652, 1598, 1222, 1146, 1057, 775

AE: Calculado para C₇H₁₂NO₂: C, 59.56; H, 7.85; N, 9.92; O, 22.67. Observado: C, 59.70; H, 7.730; N, 10.05

²³² H. Taguchi, H. Yazawa, J. F. Arnett, Y. Kishi, *Tetrahedron Letters* **1977**, *7*, 627-630.

Preparación de (E)-(1-(N,N'-bis(*tert*-butoxicarbonil)carbamimidoidil)-pirrolidin-2-iliden)acetato de metilo (84**).**



Se disuelve el producto desprotegido **83** (175 mg, 1.24 mmol, 1 eq), la S-metilbisbocisotiourea (396 mg, 1.36 mmol, 1.1 eq) y la trietilamina (0.5 mL, 3.72 mmol, 3 eq) en DMF seca (15 mL). Se adiciona cloruro de mercurio (369 mg, 1.36 mmol, 1.1 eq) y la suspensión resultante se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Se lleva a sequedad, se redissuelve en Et₂O, se lava con NH₄Cl, se seca (MgSO₄), se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:Acetato de etilo (7:3) como fase móvil. Se obtienen 370.5 mg (R = 78%) del producto guanilado **84** como un sólido blanco.

P.F.: 125-127 °C

Rf: 0.26 (n-Hexano:AcOEt; 8:2)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.81 (1H, t, *J* = 1.8 Hz, H2'), 3.81 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, H5), 3.64 (3H, s, OMe), 3.20 (2H, td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, H3), 1.92 (2H, p, *J* = 7.4 Hz, H4), 1.49 (18, s, H6'')

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.3 (C1'), 158.5 (C2), 152.0 (C1''), 149.2 (C3''), 95.8 (C2'), 83.3 (C5''), 52.3 (C5), 50.8 (OMe), 32.1 (C3), 27.9 (C6''), 20.9 (C4)

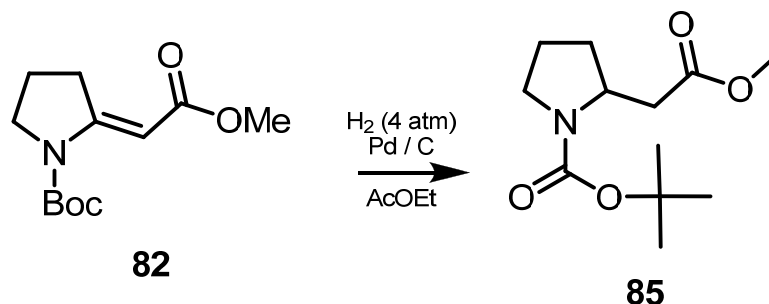
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 406 ([M + Na]⁺, 33), 384 ([M + H]⁺, 100)

HRMS: Calculado para C₁₈H₃₀N₃O₆ [M+H]⁺ = 384.2135. Observado = 384.2130

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2979, 1751, 1706, 1653, 1596, 1392, 1283, 1137, 848

AE: Calculado para $C_{18}H_{29}N_3O_6$: C, 56.38; H, 7.62; N, 10.96; O, 25.04.
Observado: C, 56.90; H, 7.70; N, 11.29

Preparación de 2-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (85**).**²³³



Se disuelve el producto de acoplamiento de Wittig **82** (100 mg, 0.41 mmol, 1 eq) en AcOEt (5 mL) y se agrega una punta de espátula de Paladio al 10% sobre carbono. Se coloca bajo hidrógeno a una presión de 4 atm de y se agita vigorosamente durante 24 horas. Se filtra a través de celite y lleva a sequedad. Se obtiene el producto reducido **85** como un aceite incoloro que se utiliza, sin purificación previa, en la siguiente reacción (97.8 mg, R = 97%).

Rf: 0.54 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.11 (1H, d, *J* = 33.3 Hz, H₂), 3.64 (3H, s, OMe), 3.41–3.25 (2H, m, H₅), 2.84 (1H, dd, *J* = 6.42, 13.9 Hz, H_{1'}), 2.28 (1H, dd, *J* = 14.8, 9.9 Hz, H_{1'}), 2.11–1.94 (1H, m, H₃), 1.81 (2H, dd, *J* = 9.5, 4.5 Hz, H₄), 1.75 (1H, d, *J* = 27.8 Hz, H₃), 1.43 (9H, s, H_{4''})

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.9 (C_{2'}), 154.2 (C_{1''}), 79.5 (C_{3''}), 54.0 (C₂), 51.5 (OMe), 46.5 (C₅), 39.1 (C_{1'}), 31.2 (C₃), 28.6 (C_{4''}), 23.5 (C₄)

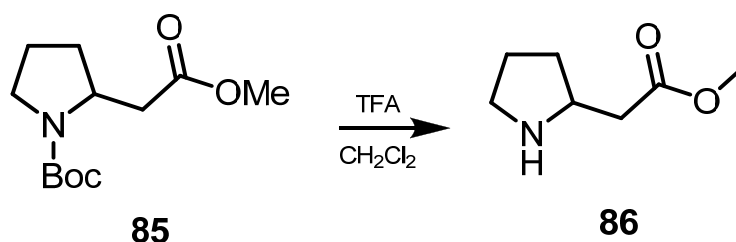
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 282 ([M + K]⁺, 41), 266 ([M + Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2975, 1738, 1694, 1393, 1168, 772

AE: Calculado para C₁₂H₂₁NO₄: C, 59.24; H, 8.70; N, 5.76; O, 26.30. Observado: C, 59.79; H, 8.08; N, 6.04

²³³ Y. J. Zhang, J. H. Park, S. Lee, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2209-2212.

Preparación de 2-(pirrolidin-2-il)acetato de metilo (**86**).²³⁴



A una disolución del producto de reacción de Wittig reducido **85** (55 mg, 0.226 mmol, 1 eq) en CH_2Cl_2 seco (4 mL), se adiciona TFA (0.1 mL, 0.91 mmol, 4 eq) y se agita a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se vuelve a adicionar TFA (0.1 mL, 0.91 mmol, 4 eq) y se agita durante 2 horas. Se neutraliza con NaHCO_3 (10 %), se extrae con CH_2Cl_2 , se seca (MgSO_4), se filtra y lleva a sequedad. Se obtiene el producto **86** como un aceite que se utiliza, sin purificación previa, en la siguiente reacción (31 mg, 97%).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.54 (1H, s.a., NH), 3.93 (1H, s.a., H2), 3.71 (3H, s, OMe), 3.40 (2H, d, $J = 5.3$ Hz, H5), 3.00 (1H, dd, $J = 17.3, 8.4$ Hz, H2'), 2.77 (1H, dd, $J = 17.4, 5.3$ Hz, H2'), 2.44–2.23 (1H, m, H3), 2.23–1.98 (2H, m, H4), 1.88–1.69 (1H, m, H3)

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.8 (C1'), 55.6 (C2), 52.1 (OMe), 45.2 (C5), 36.0 (C2'), 30.6 (C3), 23.7 (C4)

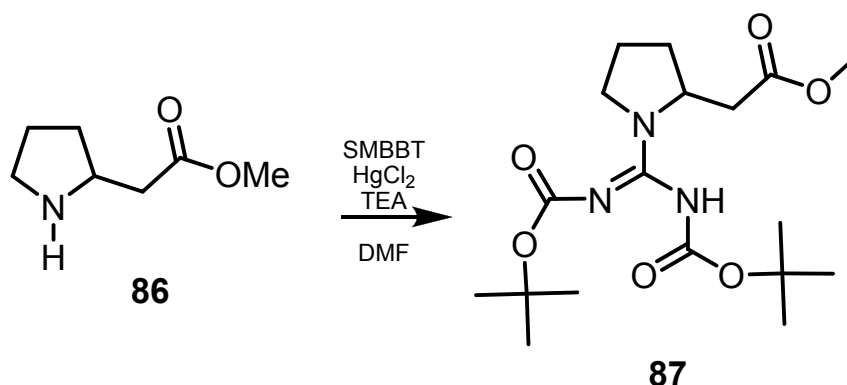
EM (ESI); m/z (int. rel.): 144 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100)

IR (NaCl) ν (cm^{-1}): 2921, 1731, 1677, 1441, 1200, 1141

²³⁴ G. H. Fülep, C. E. Hoessl, G. H., K. T. Wanner, *E. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 809–824.

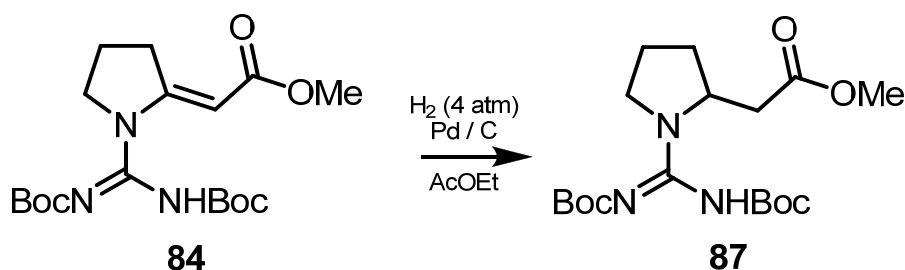
Preparación de 2-(1-(N,N'-bis(*tert*-butoxicarbonil)carbamimidoil)-pirrolidin-2-il)acetato de metilo (**87**).

Procedimiento A:



Se disuelve la amina **86** (9 mg, 0.06 mmol, 1 eq), S-metil bisbocisotiurea (SMBBIT) (19 mg, 0.066 mmol, 1.1 eq) y la trietilamina (0.03 mL, 0.2 mmol, 3 eq) en DMF seca (0.6 mL). Se adiciona cloruro de mercurio (18 mg, 0.066 mmol, 1.1 eq). La suspensión resultante se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Al cabo de ese tiempo se lleva a sequedad, se redisuelve en Et₂O, lava con NH₄Cl, seca (MgSO₄), filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil, se obtiene el producto guanilado **87** como un sólido blanco-amarillo (19.7 mg, R = 85%).

Procedimiento B:



Se disuelve el producto guanilado **84** (100 mg, 0.26 mmol, 1 eq) en AcOEt seco (5 mL) y se agrega una punta de espátula de Paladio al 10 % sobre carbono. Se coloca bajo hidrógeno a una presión de 4 atm de y se agita vigorosamente durante 24 horas. Se filtra a través de celite y se lleva a sequedad. Se obtiene el producto reducido **87** como un aceite incoloro que se utiliza, sin purificación previa, en la próxima reacción (90.3 mg, R = 90 %).

P.F.: 137-139 °C

Rf: 0.41 (n-Hexano:AcOEt; 7:3)

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.61 (1H, s, H2), 3.70 (3H, s, OMe), 3.64 (1H, dd, *J* = 16.8, 9.9 Hz, H5), 3.57–3.42 (1H, m, H5), 3.13 (1H, s, H3), 2.47 (1H, dd, *J* = 15.6, 8.7 Hz, H3), 2.27 (1H, dd, *J* = 14.5, 8.8 Hz, H2'), 1.95 (1H, d, *J* = 11.1 Hz, 1H2'), 1.77 (2H, dd, *J* = 12.3, 6.4 Hz, H4), 1.51 (18H, s, H6'')

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.0 (C1'), 167.3 (C1''), 154.4 (C3''), 85.6 (C5''), (C2) 59.8 (C2), 51.3 (OMe), 48.0 (C5), 28.7 (C2'), 27.8 (C3), 24.2 (C6''), 14.3 (C4)

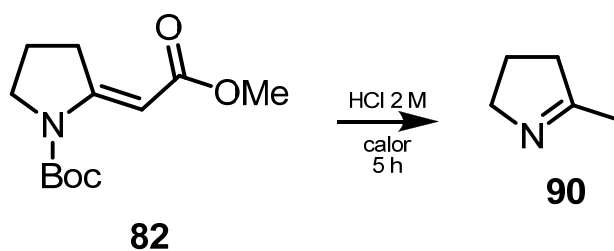
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 385 ([M + H]⁺, 100)

HRMS: Calculado para C₁₈H₃₀N₃O₆ [M-H]⁺ = 384.2135. Observado = 384.2121

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2279, 1750, 1706, 1652, 1595, 1436, 1137, 847

AE: Calculado para C₁₈H₃₁N₃O₆: C, 56.09; H, 8.11; N, 10.90; O, 24.90.
Observado: C, 56.41 H, 7.75; N, 11.13.

Preparación de 5-metil-3,4-dihidro-2H-pirrol (90).

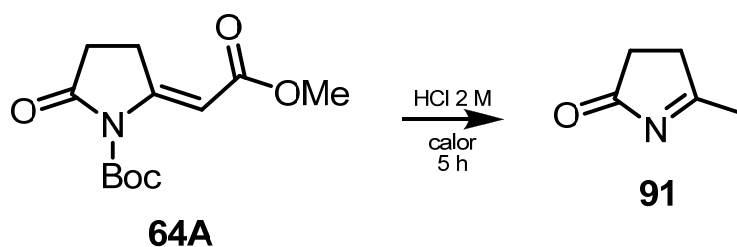


Se disuelve el alqueno **82** (24 mg, 0.1 mmol, 1 eq) en HCl 2M (5 mL) y calienta a reflujo durante 2 horas. Se lleva a sequedad, redisuelve en agua (5 mL) y adicionan 250 mg de resina Dowex-50W. Después de 2 horas la suspensión se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 8 mg del producto **90** que no se purifica.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 4.01 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H2), 3.10 (2H, t, *J* = 8.1 Hz, H4), 2.44 (3H, s, Me), 2.31–2.20 (2H, m, H3)

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 159.4 (C5), 53.3 (C1), 38.1 (C4), 19.6 (C3), 17.6 (Me)

Preparación de 5-metil-3,4-dihidro-2H-pirrol-2-ona (91).²³⁵



Se disuelve el alqueno **64A** (240 mg, 1 mmol, 1 eq) en HCl 2M (15 mL) y se calienta a reflujo durante 2 horas. Se lleva a sequedad, redissuelve en agua (15 mL) y adicionan 250 mg de resina Dowex. Después de 2 horas la suspensión se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 83 mg del producto **91** que no se purifica.

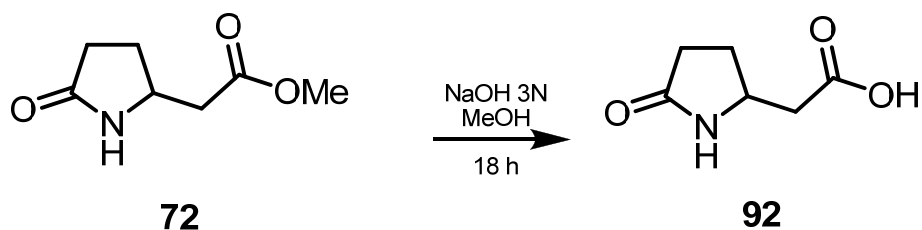
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 2.76 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H3), 2.49 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H4), 2.12 (3H, s, Me)

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 177.3 (C2), 161.2 (C5), 37.7 (C3), 29.1 (Me), 27.7 (C4)

²³⁵ W. M. Kan, C-L. Cheng, C-Y. Chern, *Synthetic Communications* **2004**, *34*, 4257-4264.

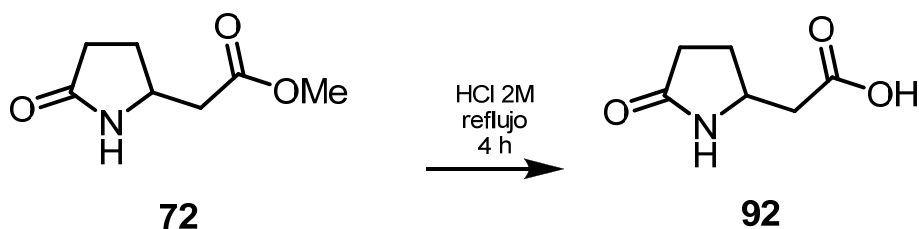
Preparación de 2-(5-oxopirrolidin-2-il)ácido acético (**92**).²³⁰

Método A:



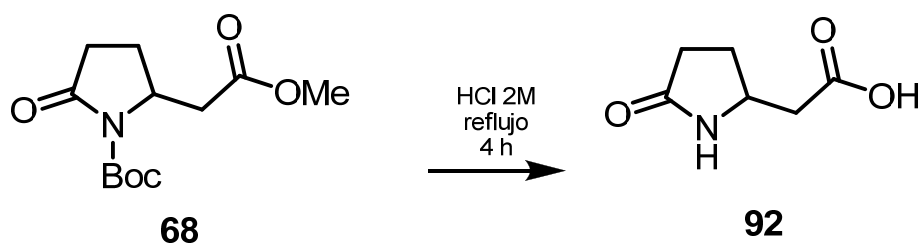
Se disuelve el producto reducido **72** (32 mg, 3.89 mmol, 1 eq) en metanol (1 mL), se añade NaOH 3N (1 mL) y la solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 18 horas. Se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 18 mg del producto **92** que no se purifica (R = 62%).

Método B:



Se disuelve el producto reducido **72** (1 g, 3.89 mmol, 1 eq) en HCl 2M (20 mL) y se calienta a reflujo durante 2 horas. Se lleva a sequedad, se redisuelve en agua (15 mL) y se adicionan 900 mg de resina Dowex. Después de 2 horas se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 464 mg del producto **92** que no se purifica (R = 51%).

Método C:



Se disuelve el producto reducido **68** (257 g, 1 mmol, 1 eq) en HCl 2M (10 mL) y se calienta a reflujo durante 2 horas. Se lleva a sequedad, se redisuelve en agua (15 mL) y se adicionan 900 mg de resina Dowex. Después de 2 horas se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 316 mg del producto **92**

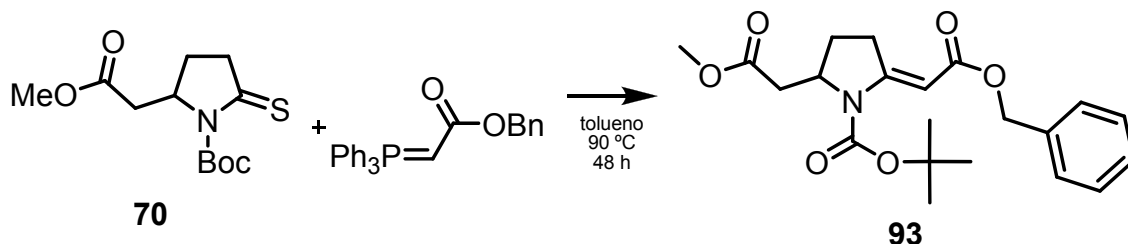
P.F.: 270 °C (desc.)

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 3.62–3.50 (1H, m, H2), 2.72 (1H, dd, *J* = 17.8, 4.6 Hz, H2'), 2.60 (1H, dd, *J* = 17.8, 7.9 Hz, H2'), 2.41 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H4), 1.95–1.79 (2H, m, H3)

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ (ppm): 176.4 (C5), 173.8 (C1'), 47.6 (C2), 35.5 (C2'), 29.5 (C4), 26.9 (C3)

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 144 ([M + H]⁺, 100)

Preparación de (E)-2-(benciloxi)-2-oxoetiliden)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (93).



A una solución del tioderivado **70** (273 mg, 1 mmol, 1 eq) en tolueno (15 mL) se adiciona trifenilfosforaniliden acetato de bencilo (1.23 g, 3 mmol, 3 eq). La mezcla se calienta a reflujo durante 48 horas. Se deja enfriar, se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Se obtiene el producto de acoplamiento **93** como un sólido de color marrón claro (293 mg, R = 75%).

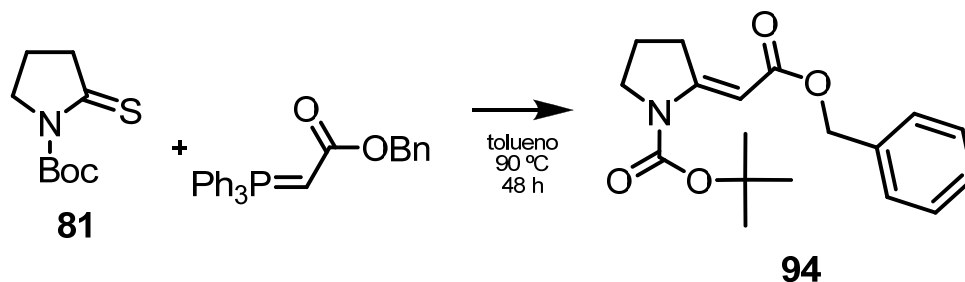
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36-7.34 (5H, m, Har), 6.57 (1H, s, H1'), 5.15 (2H, s, H4') , 4.56 (1H, t, *J* = 7.4 Hz, H5), 3.72 (3H, s, OMe), 3.53 (1H, dd, *J* = 18.3, 8.7 Hz, H3), 3.01-2.89 (1H, m, H3), 2.78 (1H, dd, *J* = 15.2, 2.8 Hz, H1''), 2.44 (1H, dd, *J* = 15.2, 10.3 Hz, H1''), 2.12-2.02 (1H, m, H4), 1.90-1.80 (1H, m, H4), 1.55 (9H, s, H4''').

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.1 (C2''), 168.5 (C2'), 157.1 (C2), 151.2 (C1'''), 136.9 (C5'), 128.4 (C6'), 127.8 (C7'), 126.9 (C8'), 96.5 (C1'), 82.7 (C3''), 65.2 (C4'), 57.9 (C5), 51.8 (OMe), 37.8 (C1''), 29.7 (C3), 28.1 (C4'''), 26.3 (C4)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1728, 1614, 1298, 1122, 1011

AE: Calculado para C₂₁H₂₇NO₆: C = 64.77, H = 6.99, N = 3.60. Observado: C = 64.57, N = 3.969, H = 6.77

Preparación de (E)-2-(benciloxi)-2-oxoetiliden)pirrolidin-1-carboxilato de *terct*-butilo (94).



A una solución del tioderivado **81** (201 mg, 1 mmol, 1 eq) en tolueno (15 mL) se adiciona trifenilfosforaniliden acetato de bencilo (1.23 g, 3 mmol, 3 eq). La mezcla se calienta a reflujo durante 48 horas. Se deja enfriar, se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Se obtiene el producto de acoplamiento **94** como un sólido de color marrón claro (216 mg, 68%).

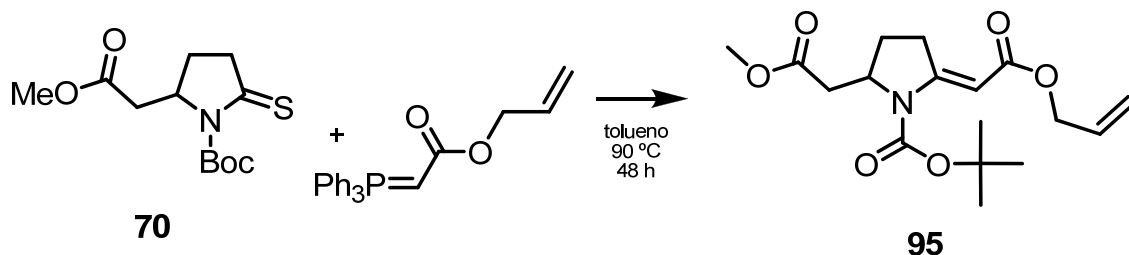
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.31-7.28 (5H, m, Har), 6.56 (1H, s, H1'), 5.11 (2H, s, H4'), 3.64 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H5), 3.17 (2H, td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, H3), 1.97–1.70 (2H, m, H4), 1.50 (9H, s, H4'')

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.7 (C2'), 158.2 (C2), 151.9 (C1''), 137.0 (C5'), 128.4 (C6'), 127.8 (C7'), 127.7 (C8'), 95.6 (C1'), 82.0 (C3''), 65.0 (C4'), 49.8 (C5), 32.0 (C3), 28.1 (C4''), 20.9 (C4)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 1725, 1703, 1606, 1384, 1312, 1124, 980, 845

AE: Calculado para C₁₈H₂₃NO₄: C = 68.12, H = 7.30, N = 4.41. Observado: C = 67.82, H = 6.977, N = 6.803

Preparación de (E)-2-(aliloxi)-2-oxoetiliden)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (95).



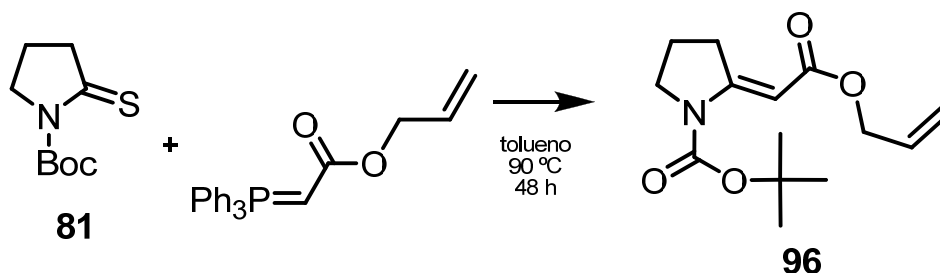
A una solución del tioderivado **70** (273 mg, 1 mmol, 1 eq) en tolueno (15 mL) se adiciona trifenilfosforaniliden acetato de alilo (1.0g, 3 mmol, 3 eq). La mezcla se calienta a reflujo durante 48 horas. Se deja enfriar, se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Se obtiene el producto de acoplamiento **95** como un sólido de color marrón claro (180 mg, 53%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.49 (1H, s, H1'), 5.90 (1H, ddd, *J* = 22.6, 10.7, 5.5 Hz, H5'), 5.28 (1H, dd, *J* = 17.2, 1.4 Hz, H6'), 5.16 (1H, dd, *J* = 10.5, 1.1 Hz, H6'), 4.56-4.54 (2H, s, H4'), 4.55-4.52 (1H, m, H5), 3.67 (3H, s, OMe), 3.48 (1H, dd, *J* = 18.5, 9.0 Hz, H3), 2.97-2.85 (1H, m, H3), 2.75 (1H, dd, *J* = 15.2, 3.2 Hz, H1''), 2.41 (1H, dd, *J* = 15.2, 10.1 Hz, H1''), 2.02 (1H, dq, *J* = 12.1, 8.7 Hz, H4), 1.81 (1H, dd, *J* = 12.8, 8.6 Hz, H4), 1.51 (9H, s, H4''')

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.2 (C2''), 168.4 (C2'), 157.0 (C2), 151.3 (C1'''), 133.1 (C5'), 117.2 (C6'), 96.5 (C1'), 82.7 (C3''), 64.1 (C4'), 57.9 (C5), 51.8 (OMe), 37.8 (C1''), 29.7 (C3), 28.2 (C4''), 26.2 (C4)

AE: Calculado para C₁₇H₂₅NO₆: C = 60.16, H = 7.42, N = 4.13. Observado: C = 60.66, H = 7.141, N = 3.846

Preparación de (E)-2-(aliloxi)-2-oxoetiliden)pirrolidin-1-carboxilato de *terct*-butilo (96).



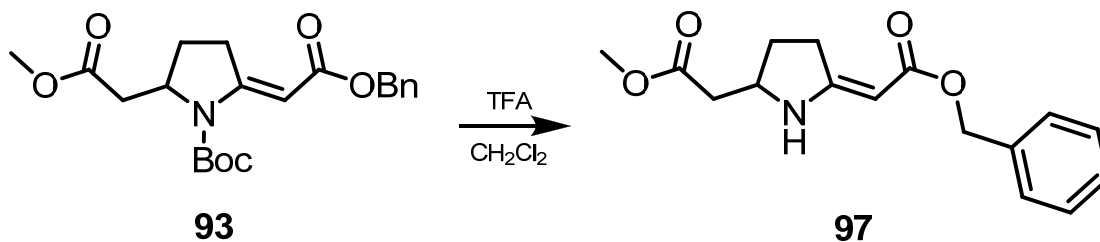
A una solución del tioderivado **81** (201 mg, 1 mmol, 1 eq) en tolueno (15 mL) se adiciona trifenilfosforaniliden acetato de alilo (1.08 g, 3 mmol, 3 eq). La mezcla se calienta a reflujo durante 48 horas. Se deja enfriar, se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Se obtiene el producto de acoplamiento **96** como un sólido de color marrón claro (140 mg, 52%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.48 (1H, s, H1'), 5.90 (1H, ddd, *J* = 22.3, 10.6, 5.4 Hz, H5'), 5.27 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, H6'), 5.14 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, 1H6'), 4.54 (2H, d, *J* = 5.4 Hz, H4'), 3.65 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H5), 3.15 (2H, dd, *J* = 7.6, 6.7 Hz, H3), 1.85 (2H, p, *J* = 7.4 Hz, H4), 1.49 (9H, s, H4'').

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.5 (C2'), 157.9 (C2), 151.9 (C1'''), 133.1 (C5'), 117.0 (C6'), 95.6 (C1'), 82.0 (C3'''), 63.9 (C4'), 49.7 (C5), 31.9 (C3), 28.1 (C4'''), 20.9 (C4)

AE: Calculado para C₁₄H₂₁NO₄: C = 62.90, H = 7.92, N = 5.24. Observado: C = 62.60, H = 7.997, N = 5.240

Preparación de (E)-2-(5-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidin-2-iliden)acetato de bencilo (97).

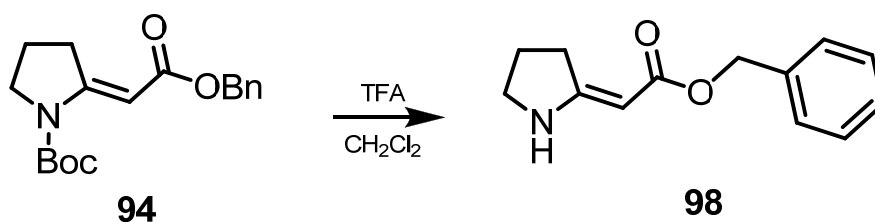


A una disolución del producto de acoplamiento de Wittig **93** (131 mg, 0.34 mmol, 1eq) en CH₂Cl₂ seco (15 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.08 mL, 1.0 mmol, 3 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 3 horas, después de las cuales se añaden 3 equivalentes adicionales de TFA, también gota a gota. Después de 2 horas se adiciona una solución de NaHCO₃ (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH₂Cl₂ (15 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO₄), se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 88 mg del producto desprotegido, **97**, como un aceite incoloro (R = 90%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.18 (1H, s, NH), 7.38 (5H, dd, *J* = 16.7, 13.2 Hz, Har), 5.25–5.01 (2H, m, H4'), 4.62 (1H, s, H1'), 4.20–4.09 (1H, m, H5), 3.72 (3H, d, *J* = 5.4 Hz, OMe), 2.72–2.58 (2H, m, H1''), 2.56 (2H, dd, *J* = 6.7, 4.5 Hz, H3), 2.29–2.11 (1H, m, H4), 1.75–1.52 (1H, m, H4)

¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.5 (C2''), 170.10 (C2'), 165.5 (C2), 137.5 (C5'), 128.4 (C6'), 127.8 (C7'), 127.7 (C8'), 69.6 (C1'), 64.4 (C4'), 55.6 (C5), 51.9 (OMe), 40.4 (C4), 31.4 (C3), 28.0 (C1'')

Preparación de (E)-2-(pirrolidin-2-iliden)acetato de bencilo (**98**).

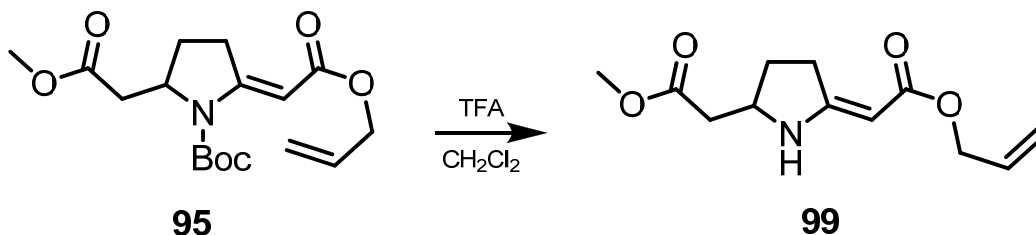


A una disolución del producto de acoplamiento de Wittig **94** (97 mg, 0.31 mmol, 1eq) en CH₂Cl₂ seco (5 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.07 mL, 0.92 mmol, 3 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 3 horas, después de las cuales se añaden 3 equivalentes adicionales de TFA, también gota a gota. Después de 2 horas se adiciona una solución de NaHCO₃ (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH₂Cl₂ (5 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO₄), se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 60 mg del producto desprotegido, **98**, como un aceite incoloro (R = 89%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.40-7.28 (5H, m, Har), 5.14 (2H, s, H4'), 4.73 (1H, s, H1'), 3.56 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H5), 2.63 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H3), 2.06–1.94 (2H, m, H4)

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.3 (C2'), 155.9 (C2), 137.4 (C5'), 128.4 (C6'), 127.8 (C7'), 127.6 (C8'), 95.3 (C1'), 64.5 (C4'), 47.5 (C5), 32.3 (C3), 22.0 (C4)

Preparación de (E)-2-(5-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidin-2-iliden)acetato de alilo (99).

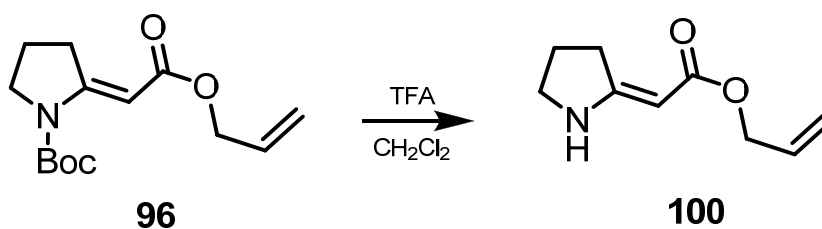


A una disolución del producto de acoplamiento de Wittig **95** (80 mg, 0.236 mmol, 1eq) en CH₂Cl₂ seco (5 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.05 mL, 0.71 mmol, 3 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 3 horas, después de las cuales se añaden 3 equivalentes adicionales de TFA, también gota a gota. Después de 2 horas se adiciona una solución de NaHCO₃ (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH₂Cl₂ (5 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO₄), se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 45 mg del producto desprotegido, **99**, como un aceite incoloro (R = 80%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.14 (1H, s.a., NH), 5.95 (1H, ddt, *J* = 16.2, 10.6, 5.4 Hz, H5'), 5.30 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, H6'), 5.18 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H6'), 4.58-4.56 (3H, m, H1',4'), 4.20-4.00 (1H, m, H5), 3.71 (3H, s, OMe), 2.62 (2H, dd, *J* = 15.8, 8.3 Hz, H3), 2.56 (2H, dd, *J* = 14.7, 9.3 Hz, H1''), 2.27-2.08 (1H, m, H4), 1.68-1.55 (1H, m, H4)

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.5 (C2''), 170.0 (C2'), 165.4 (C2), 133.7 (C5'), 116.9 (C6'), 77.1 (C1'), 63.4 (C4'), 55.6 (C5), 51.9 (OMe), 40.5 (C3), 31.4 (C1''), 28.0 (C4)

Preparación de (E)-2-(pirrolidin-2-iliden)acetato de bencilo (**100**).

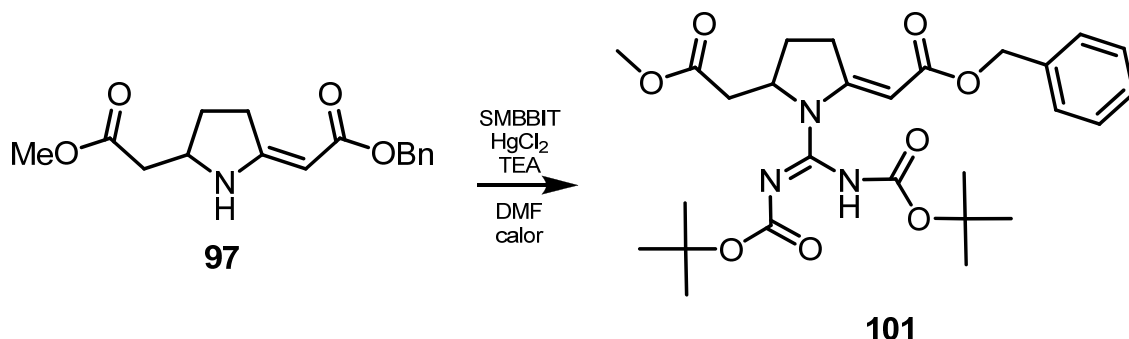


A una disolución del producto de acoplamiento de Wittig **96** (63 mg, 0.236 mmol, 1eq) en CH₂Cl₂ seco (5 mL) se adiciona, gota a gota, ácido trifluoroacético (0.05 mL, 0.71 mmol, 3 eq). La mezcla se agita bajo argón a temperatura ambiente durante 3 horas, después de las cuales se añaden 3 equivalentes de TFA, también gota a gota. Después de 2 horas se adiciona una solución de NaHCO₃ (sat.) hasta pH neutro. Se extrae con CH₂Cl₂ (5 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se secan (MgSO₄), se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 32 mg del producto desprotegido, **100**, como un aceite incoloro (R = 82%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.92 (1H, s.a., NH), 5.96 (1H, ddd, *J* = 22.6, 10.7, 5.5 Hz, H5'), 5.31 (1H, dd, *J* = 17.2, 1.5 Hz, H6'), 5.19 (1H, dd, *J* = 10.4, 1.1 Hz, H6'), 4.584 (1H, s, H1'), 4.573 (2H, s, H4'), 3.53 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H5), 2.60 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H3), 2.06–1.90 (2H, m, H4)

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.3 (C2'), 167.0 (C2), 133.8 (C5'), 116.8 (C6'), 76.1 (C1'), 63.3 (C4'), 47.1 (C5), 32.3 (C3), 22.0 (C4)

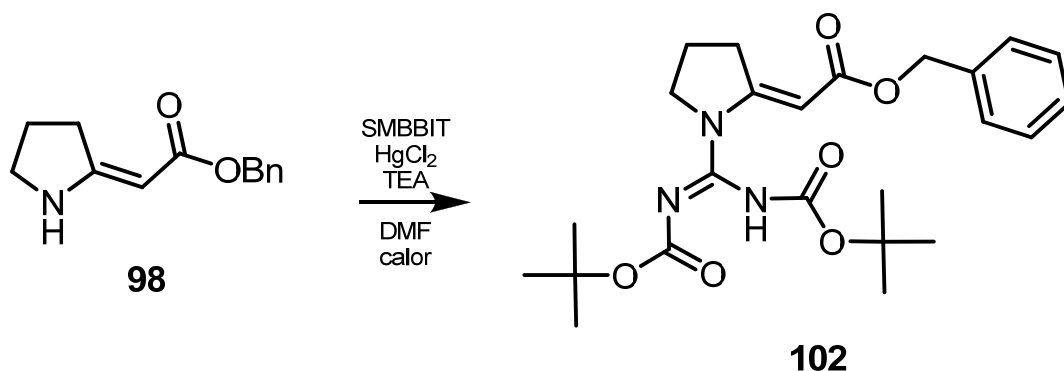
Preparación de (E)-2-(1-(N,N'-bis(*tert*-butoxicarbonil)carbamimidoil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidin-2-iliden)acetato de bencilo (101**).**



Se disuelve el producto desprotegido **97** (88 mg, 0.304 mmol, 1 eq) en DMF (12 mL) y se adiciona S-metil bisbocisotiourea (SMBBIT) (92 mg, 0.334 mmol, 1.1 eq), y trietilamina (0.13 mL 0.912 mmol, 3 eq). A esa mezcla, bajo argón, se añade cloruro de mercurio (91 mg, 0.334 mmol, 1.1 eq). La suspensión resultante se agita 12 horas a temperatura ambiente. Se lleva a sequedad, se agrega agua y se extrae con Et₂O (10 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavan con NH₄Cl (sat.), se secan (MgSO₄), se filtran y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto guanilado **101** como un aceite incoloro (79 mg, R = 49%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.16 (1H, s.a., NH), 7.36-7.34 (5H, m, Har), 5.65 (1H, s, H1'), 5.14 (2H, s, H4'), 4.76-4.65 (1H, m, H5), 3.70 (3H, s, OMe), 3.38 (1H, dd, *J* = 18.6, 8.4 Hz, H3), 3.18-2.96 (1H, m, H3), 2.61 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H1'), 2.49 (1H, dd, *J* = 15.7, 9.4 Hz, H1'), 2.30-2.17 (1H, m, H4), 1.99-1.78 (1H, m, H4), 1.46 (18H, s, H6''')

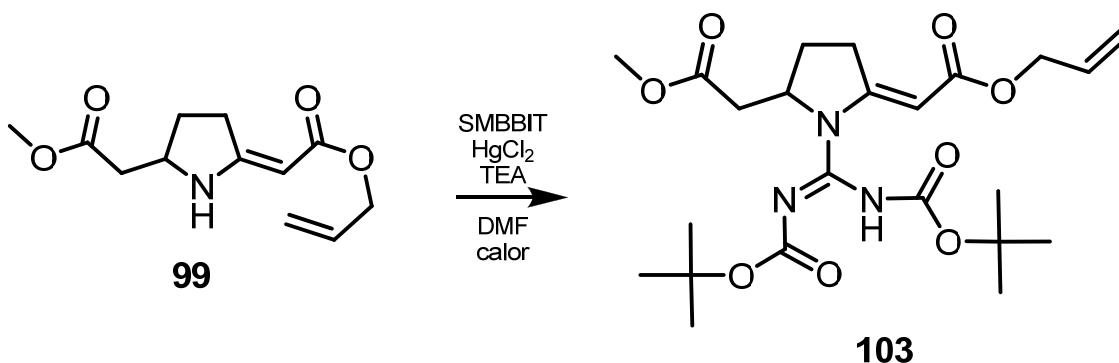
Preparación (E)-2-(1-(N,N'-bis(*tert*-butoxicarbonil)carbamimidoil)pirrolidin-2-iliden) acetato de bencilo (102**).**



Se disuelve el producto desprotegido **98** (14 mg, 0.06 mmol, 1 eq) en DMF (2 mL) y se adiciona S-metil bisbocisotiourea (SMBBIT) (20 mg, 0.071 mmol, 1.1 eq), y trietilamina (0.03 mL 0.18 mmol, 3 eq). A esa mezcla, bajo argón, se añade cloruro de mercurio (19 mg, 0.071 mmol, 1.1 eq). La suspensión resultante se agita 12 horas a temperatura ambiente. Se lleva a sequedad, se agrega agua y se extrae con Et₂O (10 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavan con NH₄Cl (sat.), se secan (MgSO₄), se filtran y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto guanilado **102** como un aceite incoloro (12 mg, R = 43%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.43–7.34 (5H, m, Har), 5.85 (1H, s, H1'), 5.14 (2H, s, H4'), 3.86 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H5), 3.26 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H3), 2.04-1.95 (2H, m, H4), 1.51 (18H, s, H6'')

Preparación de (E)-2-(1-(N,N'-bis(*tert*-butoxicarbonil)carbamimidoil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)pirrolidin-2-iliden)acetato de alilo (103**).**

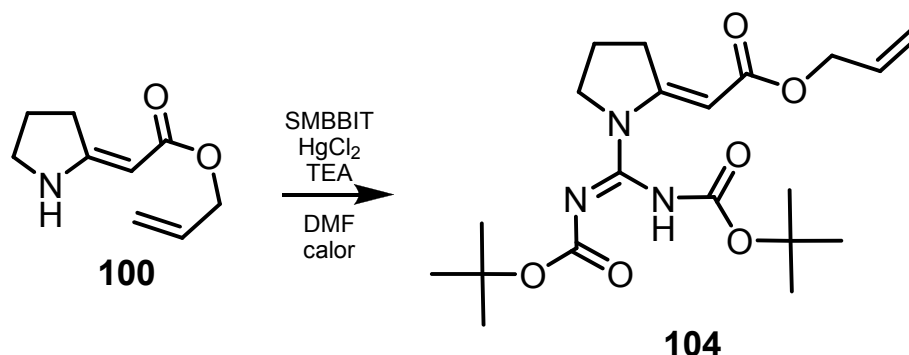


Se disuelve el producto desprotegido **99** (75 mg, 0.313 mmol, 1 eq) en DMF (10 mL) y se adiciona S-metil bisbocisotiourea (SMBBIT) (95 mg, 0.334 mmol, 1.1 eq), y trietilamina (0.15 mL 0.939 mmol, 3 eq). A esa mezcla, bajo argón, se añade cloruro de mercurio (94 mg, 0.344 mmol, 1.1 eq). La suspensión resultante se agita 12 horas a temperatura ambiente. Se lleva a sequedad, se agrega agua y se extrae con Et₂O (10 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavan con NH₄Cl (sat.), se secan (MgSO₄), se filtran y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto guanilado **103** como un aceite incoloro (88 mg, R = 59%).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.14 (1H, s.a., NH), 5.92 (1H, tt, *J* = 10.8, 6.6 Hz, H5'), 5.62 (1H, s, H1'), 5.30 (1H, dt, *J* = 17.2, 2.8 Hz, H9), 5.24–5.12 (1H, m, H9), 4.70 (1H, ddd, *J* = 11.8, 7.3, 4.1 Hz, H5), 4.58 (2H, t, *J* = 4.9 Hz, H4'), 3.70 (3H, s, OMe), 3.37 (1H, dd, *J* = 18.7, 8.5 Hz, H3), 3.08 (1H, dd, *J* = 13.3, 4.5 Hz, H3), 3.07–2.99 (1H, m, H1''), 2.48 (1H, dd, *J* = 15.7, 9.4 Hz, H1''), 2.28–2.09 (1H, m, H4), 1.92–1.79 (1H, m, H4), 1.55–1.44 (18H, m, H6''')

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.3 (C2''), 167.3 (C2'), 159.1 (C2), 151.3 (C3'''), 132.9 (C5'), 117.5 (C6'), 94.7 (C1'), 77.8 (C5'''), 64.2 (C4'), 60.1 (C5), 51.7 (OMe), 37.6 (C1''), 29.9 (C3), 28.0 (C6'''), 26.5 (C4)

Preparación de (E)-2-(1-(N,N'-bis(*tert*-butoxicarbonil)carbamimidol)pirrolidin-2-iliden) acetato de alilo (104).



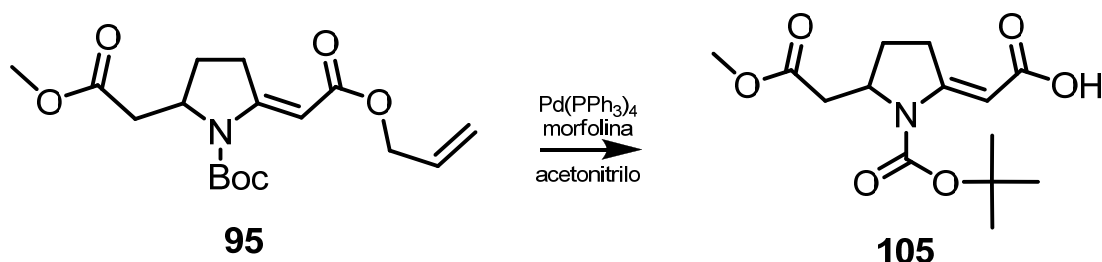
Se disuelve el producto desprotegido **100** (32 mg, 0.19 mmol, 1 eq) en DMF (5 mL) y se adiciona S-metil bisbocisotiourea (SMBBIT) (58 mg, 0.21 mmol, 1.1 eq), y trietilamina (0.08 mL 0.57 mmol, 3 eq). A esa mezcla, bajo argón, se añade cloruro de mercurio (57 mg, 0.21 mmol, 1.1 eq). La suspensión resultante se agita 12 horas a temperatura ambiente. Se lleva a sequedad, se agrega agua y se extrae con Et₂O (10 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavan con NH₄Cl (sat.), se secan (MgSO₄), se filtran y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto guanilado **104** como un aceite incoloro (47 mg, R = 6%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.93 (1H, ddd, *J* = 22.6, 10.8, 5.6 Hz, H5'), 5.84 (1H, s, H1'), 5.31 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, H9'), 5.22 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H9'), 4.59 (2H, d, *J* = 5.5 Hz, H4'), 3.85 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H5), 3.24 (2H, dd, *J* = 10.8, 4.4 Hz, H3), 1.96 (2H, p, *J* = 7.3 Hz, H4), 1.51 (18H, s, H6'').

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 167.5 (C2'), 158.9 (C2), 152.1 (C3''), 132.9 (C5'), 117.5 (C6'), 95.7 (C1'), 78.3 (C5''), 64.2 (C4'), 52.4 (C5), 32.2 (C3), 28.0 (C6''), 20.9 (C4)

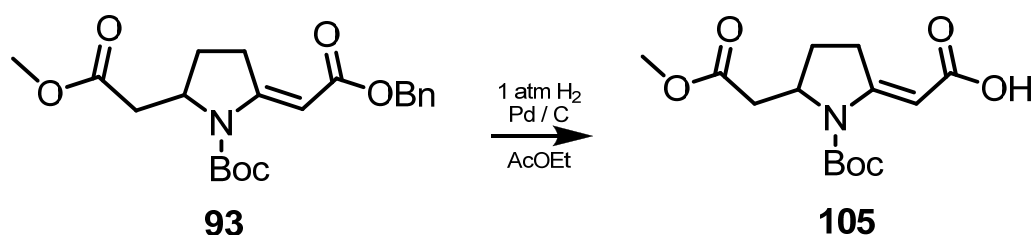
Preparación de (2E)-(1-(*tert*-butoxicarbonil)-5-(2-metoxi-oxoetil)pirrolidin-2-iliden) ácido acético (**105**).

Método A:



A una solución de producto de partida, **95**, (80 mg, 0.236 mmol, 1 eq) en acetonitrilo seco (2 mL) se le adiciona el complejo de paladio (108 mg, 0.094 mmol, 0.4 eq) y morfolina (0.06 mL, 0.74 mmol, 3 eq). La suspensión resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Se filtra a través de celite y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto **105** como un aceite amarillo (48 mg, R = 68%).

Método B:



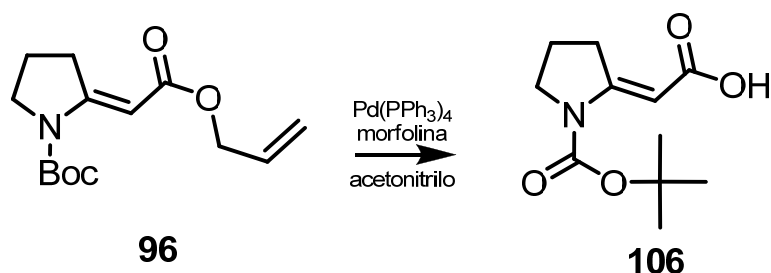
A una solución del producto de reacción de Wittig **93** (13 mg, 0.034 mmol, 1 eq) en AcOEt (5 mL) se agrega una punta de espátula de Paladio al 10 % sobre carbono. Se coloca bajo hidrógeno a una presión de 1 atm y se agita vigorosamente durante 2 horas. Se filtra a través de celite y se lleva a sequedad. Se obtienen 9 mg del producto **105** como un aceite amarillo que no se purifica.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.46 (1H, s, H2'), 4.57 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H5), 3.71 (3H, s, OMe), 3.52 (1H, dd, *J* = 18.6, 8.9 Hz, H3), 3.00–2.85 (1H, m, H3), 2.79 (1H, d, *J* = 13.2 Hz, H1''), 2.45 (1H, dd, *J* = 15.0, 10.2 Hz, H1''), 2.13–1.98 (1H, m, H4), 1.89–1.79 (1H, m, H4), 1.55 (9H, s, H4''')

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.1 (C2''), 158.7 (C1') (FALTA C2), 151.2 (C1'''), 96.1 (C2'), 83.2 (C3'''), 58.1 (C5), 51.9 (OMe), 37.7 (C1''), 28.4 (C3), 28.1 (C4'''), 26.1 (C4)

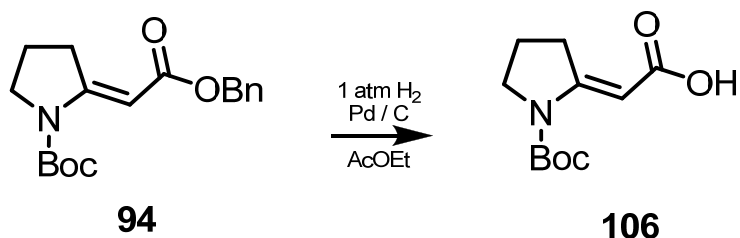
Preparación de (2E)-(1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidin-2-iliden) ácido acético (**106**).

Método A:



A una solución de producto de partida, **96**, (63 mg, 0.236 mmol, 1 eq) en acetonitrilo seco (2 mL) se le adiciona el complejo de paladio (108 mg, 0.094 mmol, 0.4 eq) y morfolina (0.06 mL, 0.74 mmol, 3 eq). La suspensión resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Se filtra a través de celite y se lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de n-Hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil. Se obtiene el producto **106** como un aceite amarillo (38 mg, R = 71 %).

Método B:

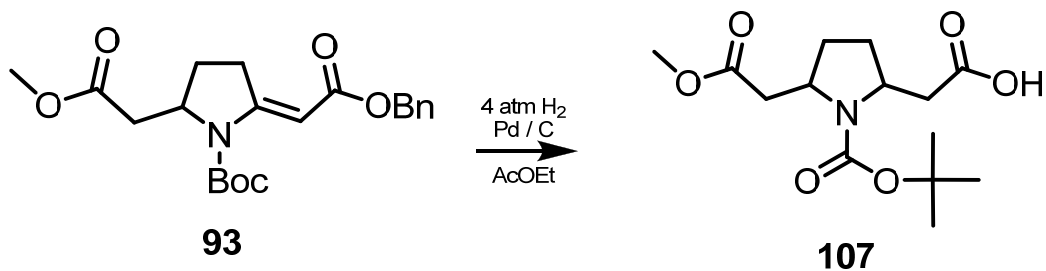


A una solución del producto de reacción de Wittig **94** (97 mg, 0.31 mmol, 1 eq) en AcOEt (5 mL) se agrega una punta de espátula de Paladio al 10 % sobre carbono. Se coloca bajo hidrógeno a una presión de 1 atm y se agita vigorosamente durante 2 horas. Se filtra a través de celite y se lleva a sequedad. Se obtienen 69 mg del producto **106** como un aceite amarillo que no se purifica.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.50 (1H, s, H2'), 3.69 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H5), 3.27–3.15 (2H, m, H3), 1.93–1.84 (2H, m, H4), 1.54 (9H, s, H4'')

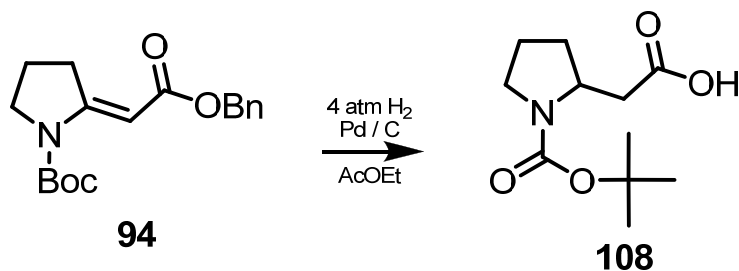
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.2 (C1'), 159.5 (C2), 152.1 (C1''), 95.0 (C2'), 82.4 (C3''), 50.0 (C5), 32.3 (C3), 28.2 (C4''), 20.8 (C4)

Preparación de 2-(1-(*tert*-butoxicarbonil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-pirrolidin-2-il) ácido acético (107).



A una solución del producto de reacción de Wittig **93** (29 mg, 0.09 mmol, 1 eq) en AcOEt (2 mL) se agrega una punta de espátula de Paladio al 10 % sobre carbono. Se coloca bajo hidrógeno a una presión de 4 atm y se agita vigorosamente durante 24 horas. Se filtra a través de celite y lleva a sequedad. Se obtienen 9 mg del producto **107** como un aceite amarillo que no se purifica.

Preparación de 2-(1-(*tert*-butoxicarbonil)pirrolidin-2-il) ácido acético (108).²³⁶



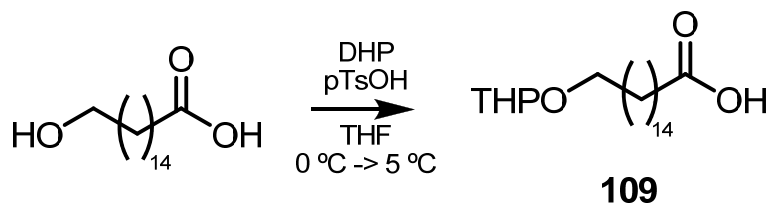
A una solución del producto de reacción de Wittig **94** (80 mg, 0.25 mmol, 1 eq) en AcOEt (6 mL) se agrega una punta de espátula de Paladio al 10 % sobre carbono. Se coloca bajo hidrógeno a una presión de 4 atm y se agita vigorosamente durante 24 horas. Se filtra a través de celite y lleva a sequedad. Se obtienen 52 mg del producto **108** como un aceite amarillo que no se purifica.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.14-4.13 (1H, m, H2), 3.36-3.34 (2H, m, H5), 2.36 (2H, d, *J* = 11.9 Hz, H4), 2.09-2.07 (1H, m, H3), 1.85 (2H, d, *J* = 27.2 Hz, H2'), 1.83-1.82 (1H, m, H3), 1.47 (9H, s, H4'')

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.1 (C1'), 154.7 (C1''), 79.9 (C3''), 53.9 (C2), 46.2 (C5), 38.8 (C4), 31.3 (C2'), 28.7 (C4''), 22.8 (C3)

²³⁶ D. W. Knight, A. C. Share, P. T. Gallagher, *J. Chem. Soc. Perkin trans 1* **1997**, 14, 2089-2097.

Preparación del Ácido 16-[(Tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi]hexadecanoico (**109**).²³⁷



Se disuelve el ácido 16-hidroxihexadecanoico (1.15 g, 4.24 mmol, 1 eq) en THF seco (7.5 mL) a 0 °C y se adiciona, gota a gota, una solución de dihidropirano (0.53 mL, 5.9 mmol, 1.4 eq) y ácido p-toluen sulfónico (24 mg, 0.12 mmol, 0.03 eq) en THF seco (1 mL). Se agita a 5 °C durante 4.5 horas. Se diluye con éter etílico (10 mL), se lava con agua (2 x 10 mL), se seca (MgSO₄), se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando cloroformo como fase móvil y se obtiene el producto protegido **109** como un sólido blanco (1.21 g, R = 80%).

P.F.: 53 °C (lit.: 50-52 °C)

Rf: 0.33 (CHCl₃:MeOH; 9.5:0.5)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.60 (1H, s), 3.88 (1H, dd, *J* = 14.0, 5.6 Hz), 3.73 (1H, dd, *J* = 15.4, 7.8 Hz), 3.56 – 3.48 (1H, m), 3.39 (1H, dd, *J* = 15.1, 7.6 Hz), 2.34 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.84 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 1.72 (1H, t, *J* = 11.0 Hz), 1.68 – 1.57 (6H, m), 1.26 (23H, s)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.7, 98.8, 67.7, 62.2, 34.1, 30.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29, 4. 29.2, 29.1, 26.2, 25.5, 24.7, 19.6

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 395 ([M+K]⁺, 18), 379 ([M+Na]⁺, 100)

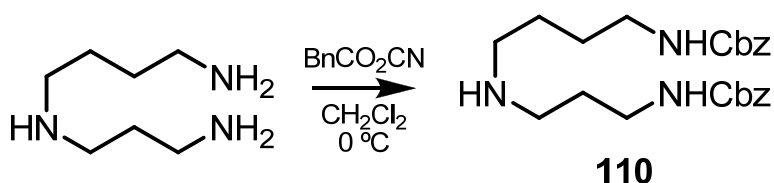
HRMS: Calculado para C₂₁H₄₀O₄Na = 370.2824. Observado = 379.2823

IR: (NaCl) ν (cm⁻¹): 1707

AE: Calculado para C₂₁H₄₀O₄: C, 70.74; H, 11.31; O, 17.95. Observado: C, 70.45; H, 11.37.

²³⁷ (a) A-L. Grillot, D. J. Hart *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11377-11392 (b) A. S., J. Stefely, S. L. Regen *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7789-7791 (c) T. M. Fyles, C-W. Hu, H. Luong *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8545-8551.

Protección de espermidina con carboxibenzoilo (**110**).²³⁸



A una solución de espermidina (280 mg, 1.93 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (9 mL), enfriada a 0°C, se le adiciona cianoformato de bencilo (0.56 mL, 3.95 mmol, 2 eq); la solución resultante se agita durante 2 horas. Se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando una mezcla de CHCl₃:MeOH (5:1) como fase móvil. Se obtiene un el producto protegido **110** como un sólido color blanco (119 mg, R = 95%).

P.F.: 104 °C

Rf: 0.13 (CHCl₃:MeOH; 9:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36 (10H,s), 5.55 (1H, s), 5.24 (1H,s), 5.10 (4H, s), 3.29 (2H, d, *J* = 5.7 Hz), 3.20 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 2.68 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 2.61 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 1.77 – 1.63 (2H, m), 1.63 – 1.37 (6H, m)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 156.5, 136.7, 128.5, 128.2, 128.1, 128.0, 66.6, 66.5, 49.3, 47.8, 40.9, 39.9, 29.5, 27.8, 27.3

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 414 ([M+H]⁺,100)

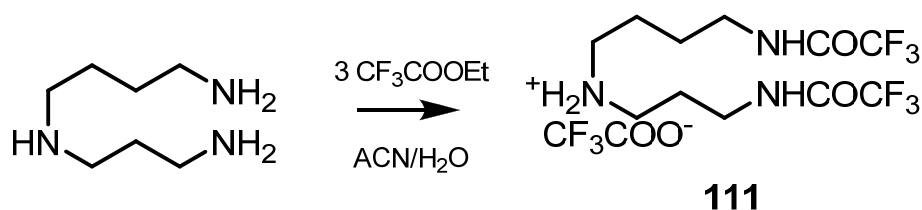
IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3323, 1683, 1523

AE: Calculado para C₂₃H₃₁N₃O₄: C, 66.81; H, 7.56; N, 10.16; O, 15.48.
Observado: C, 66.36; H, 7.74; N, 10.73.

HRMS: Calculado para C₂₃H₃₁N₃O₄ = 414.2393. Observado = 414.2391

²³⁸ A. Georgieva, M. Hirai, Y. Hashimoto, T. N, Y. Ohizumi, K. Nagasawa *Synthesis* **2003**, 9, 1427-1432

Protección de espermidina con trifluoroacetato (**111**).²³⁹



Se disuelve espermidina (140 mg, 0.97 mmol, 1 eq) en acetonitrilo (1 mL) y se adiciona una solución de trifluoroacetato de etilo (0.5 mL, 4.2 mmol, 3 eq) en agua (0.65 mL). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 4 horas. Se deja enfriar y se lleva a sequedad. El sólido que se obtiene se lava con CH₂Cl₂ frío y se seca a vacío. Se obtiene el producto **111** como un sólido amarillo (400 mg, 91%) que no se purifica.

P.F.: 135- 137 °C (lit. 145-146 °C)²⁴⁰

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.53 (1H, d, *J* = 40.1 Hz), 8.64 (1H, s), 3.36 – 3.16 (4H, m), 2.92 (4H, s), 1.94–1.78 (2H, m), 1.55 (4H, d, *J* = 6.5 Hz)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 159.6, 159.3, 159.0, 158.7), (157.4, 157.2, 157.1, 156.9), (156.8, 156.7, 156.5, 156.3), (119.8, 119.7, 117.6, 117.5, 115.2, 115.2, 112.9, 112.9), 46.9, 44.9, 38.9, 36.9, 25.8, 25.5, 23.3

EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 338 ([M + H]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3312, 1695, 1193

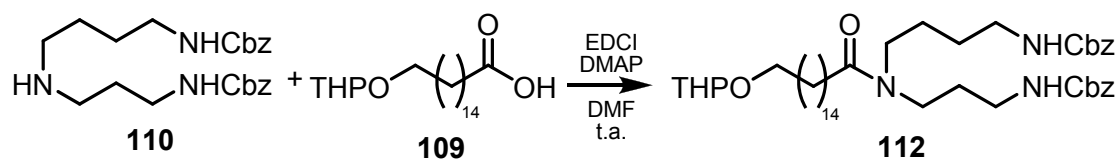
A.E. Calculado para C₁₁H₁₈F₆N₃O₂: C, 34.60; H, 4.02; F, 37.89; N, 9.31; O, 14.18. Observado: C, 34.25; H, 3.92; N, 9.00

HRMS: Calculado para C₁₁H₁₈F₆N₃O₂: 338.1303. Observado: 338.1290.

²³⁹ M. A. Ilies, W. A. Seitz, B. H. Johnson, E. L. Ezell, A. L. Miller, E. B. Thompson, A. T. Balaban *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3872-3887.

²⁴⁰ M. C. O'Sullivan, D. M. Dalrymple *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 3451-3452.

Reacción de amidación del CBZ derivado (**112**).



Se disuelve el ácido **109** (54 mg, 0.15 mmol, 1 eq) en DMF seca (15 mL) bajo argón y se adicionan la amina protegida **110** (62.6 mg, 0.15 mmol, 1 eq), el EDCI (29 mg, 0.15 mmol, 1 eq) y la DMAP (cat.). La suspensión resultante se agita bajo argón durante 18 horas. Se adiciona Et₂O (15 mL), se lava con brine (2 x 15 mL), se seca (MgSO₄), se filtra y lleva a sequedad. Se purifica por columna cromatográfica utilizando una fase móvil de hexano:acetato de etilo (1:1). Se obtiene el producto **112** como un aceite incoloro (105 mg, R = 92%.)

Rf: 0.66 (CHCl₃:MeOH; 9:1)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.30-7.37 (10H, s), 4.99 (4H, d, *J* = 3.4 Hz), 4.48 (1H, d, *J* = 4.1 Hz), 3.78 (1H, dd, *J* = 11.3, 7.4 Hz), 3.64 (1H, dt, *J* = 9.3, 6.9 Hz), 3.46 – 3.36 (4H, m), 3.28 (4H, dd, *J* = 11.3, 4.8 Hz), 3.11 (2H, s), 3.01 (2H, d, *J* = 5.6 Hz), 2.23 – 2.10 (2H, m), 1.83 – 1.69 (2H, m), 1.68 – 1.61 (2H, m), 1.57 – 1.33 (11H, m), 1.17 (23H, s)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.7, 156.6, 136.8, 128.1, 128.0, 127.9, 98.8, 67.6, 66.7, 66.4, 62.3, 37.6, 33.1, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 27.5, 26.2, 25.6, 25.5, 19.7

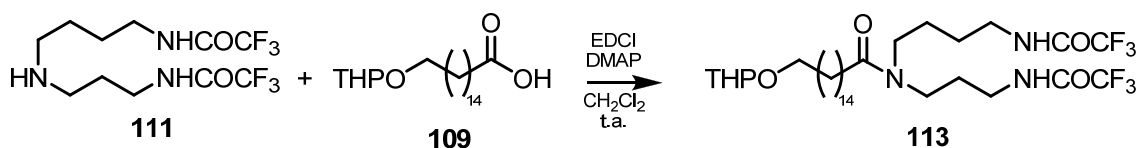
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 791 ([M+K]⁺, 34), 775 ([M+Na]⁺, 100), 753 ([M+H]⁺, 40)

HRMS: Calculado para C₄₄H₆₉N₃O₇ Na= 774.5033. Observado: 774.5063

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 3329, 1695, 1634

AE: Calculado para C₄₄H₆₉N₃O₇: C, 70.27; H, 9.25; N, 5.59; O, 14.89. Observado: C, 70.44; H, 9.38; N, 5.54.

Reacción de amidación del COCF₃ derivado (**113**).



Se disuelve el ácido **109** (67 mg, 0.15 mmol, 1 eq) en DMF (15 mL) bajo argón y se adicionan la amina **111** (53 mg, 0.15 mmol, 1 eq), el EDCI (29 mg, 0.15 mmol, 1 eq) y la DMAP (cat.). La suspensión resultante se agita bajo argón durante 24 horas. Se filtra, se lleva a sequedad y se purifica por columna cromatográfica utilizando na mezcla de CHCl₃:MeOH (9:1). Se obtiene el producto **113** como un aceite incoloro (76 mg, R = 75%).

Rf: 0.55 (CHCl₃:MeOH; 9:1).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.33 (1H, s), 6.76 (1H, s), 4.62–4.55 (1H, m), 3.93–3.85 (1H, m), 3.74 (1H, dt, *J* = 9.5, 6.9 Hz), 3.51 (1H, dd, *J* = 10.9, 5.1 Hz), 3.46–3.39 (5H, m), 3.31 – 3.25 (4H, m), 2.36–2.29 (2H, m), 1.92–1.79 (3H, m), 1.72 (3H, dt, *J* = 15.9, 6.3 Hz), 1.65 (10H, s), 1.60 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 1.55 (2H, d, *J* = 6.7 Hz), 1.27 (23H, s)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.8, 98.9, 67.7, 62.4, 47.5, 42.0, 39.2, 36.1, 33.1, 30.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 26.9, 26.4, 26.2, 25.9, 25.6, 25.5, 19.7

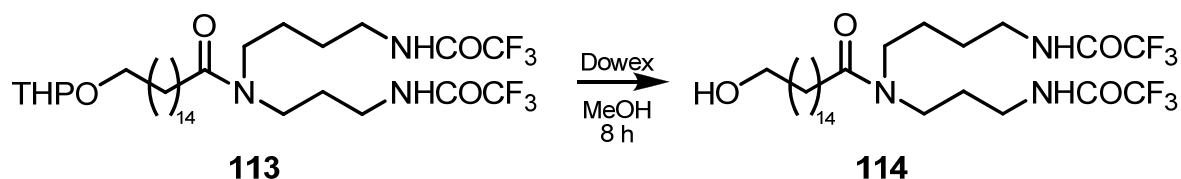
EM (ESI); *m/z* (int. rel.): 698 ([M+Na]⁺, 100)

IR (NaCl) ν (cm⁻¹): 2923, 2853, 1717, 1627, 1557, 1155

AE: Calculado para C₃₂H₅₅F₆N₃O₅Na: C, 56.87; H, 8.20; F, 16.87; N, 6.22; O, 11.84. Observado: C, 56.95; H, 8.56; N, 5.91

HRMS: Calculado para C₃₂H₅₅F₆N₃O₅Na: 698.3944. Observado: 698.3928.

Preparación del ácido del COCF₃ derivado (**114**).

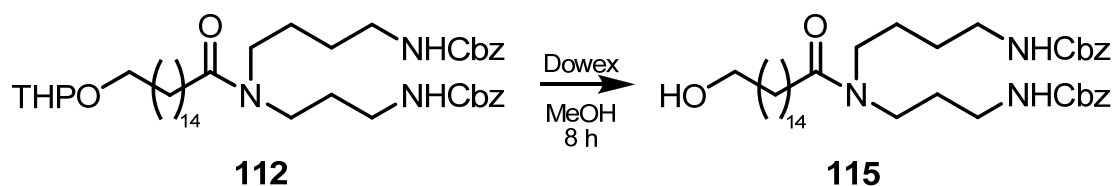


Sobre una solución de la amida **113** (76 mg, 0.112 mmol, 1 eq) en metanol seco (2 mL) se adicionan 17 mg de resina Dowex ácida (50W). Se agita a temperatura ambiente durante 8 horas bajo argón. Al cabo de ese tiempo se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 54 mg del alcohol **114** como un sólido blanco que no se purifica (R = 82%).

¹H NMR (500 MHz, MeOD₄) δ (ppm): 3.56 (1H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.43–3.26 (4H, m, *J* = 35.7, 20.3, 14.0 Hz), 2.41–2.30 (1H, m), 1.93–1.85 (1H, m), 1.85–1.77 (1H, m), 1.62 (2H, d, *J* = 13.6 Hz), 1.59–1.51 (2H, m), 1.33 (12H, d, *J* = 16.3 Hz)

¹³C NMR (125 MHz, MeOD₄) δ (ppm): 174.5, 174.1, 95.0, 61.6, 45.3, 45.0, 43.0, 38.7, 37.0, 32.6, 32.5, 32.3, 29.4, 29.3, 29.32, 29.2, 29.2, 29.0, 28.0, 26.6, 25.8, 25.7, 25.6, 25.3, 24.4

Preparación del ácido del CBZ derivado (**115**).



A una disolución de la amida **112** (95 mg, 0.126 mmol, 1 eq) en metanol seco (3 mL) se adicionan 25 mg de resina Dowex ácida (50W). Se agita a temperatura ambiente durante 8 horas bajo argón. Al cabo de ese tiempo se filtra y lleva a sequedad. Se obtienen 71.4 mg del alcohol **115** como un sólido blanco que no se purifica (R = 85%).

¹H NMR (500 MHz, MeOD₄) δ (ppm): 7.35 (10H, s.a., Har), 5.09 (4H, s), 3.56 (1H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.34 (1H, dd, *J* = 11.2, 9.7 Hz), 3.24–3.10 (1H, m), 2.45–2.23 (1H, m), 1.78 (1H, s), 1.75–1.67 (1H, m), 1.64–1.41 (1H, m), 1.30 (3H, s)

¹³C NMR (125 MHz, MeOD₄) δ (ppm): 174.3, 171.5, 157.5, 151.5, 128.1, 127.6, 127.4, 127.3, 66.0, 61.6, 45.4, 43.1, 39.8, 32.6, 32.5, 32.3, 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 29.1, 26.8, 25.6, 25.4, 24.4