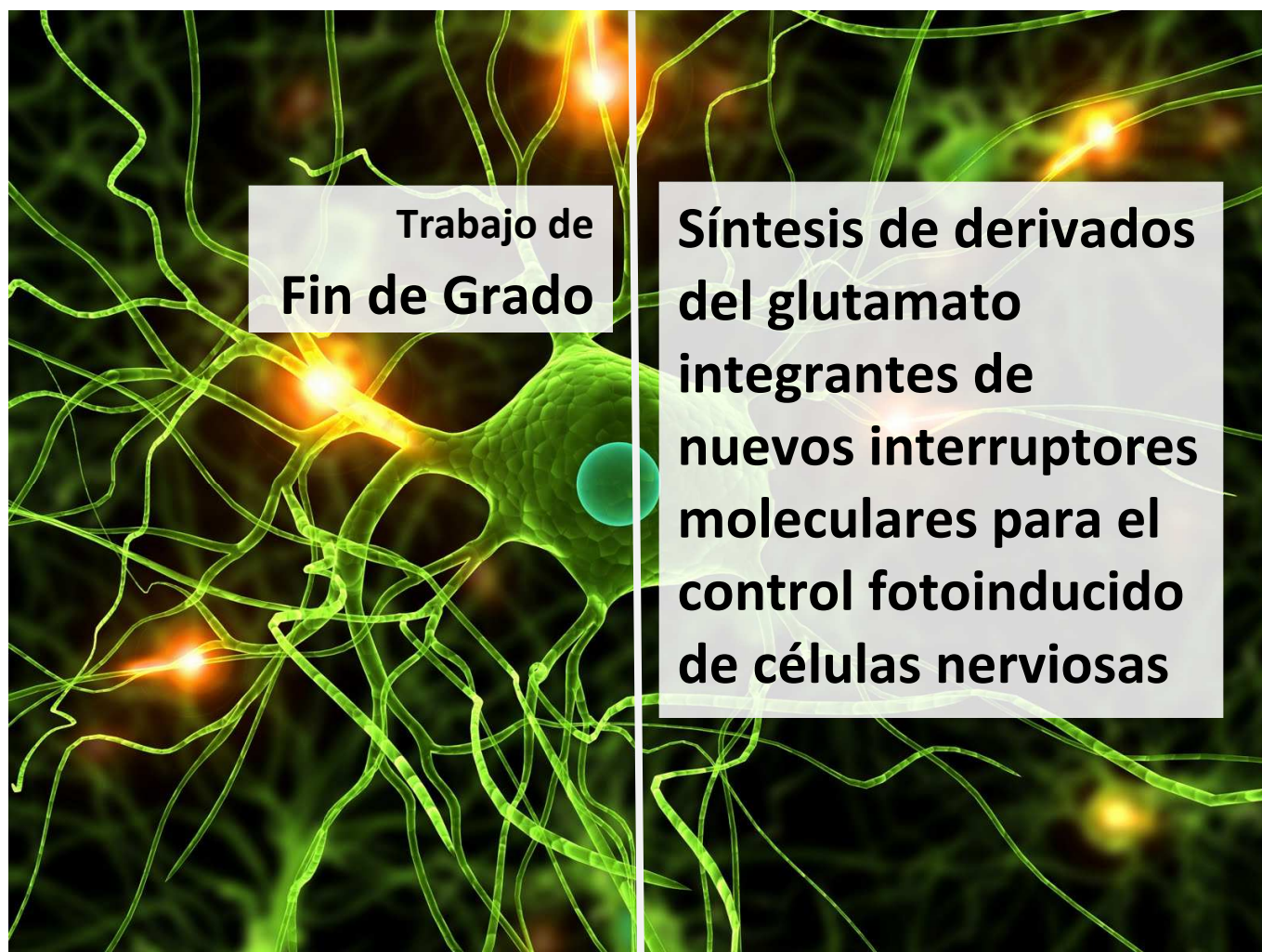


UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

Facultat de Ciències



Trabajo de
Fin de Grado

**Síntesis de derivados
del glutamato
integrantes de
nuevos interruptores
moleculares para el
control fotoinducido
de células nerviosas**

Dirección: Dr. Félix Busqué

Sergio Jurado Moreno

Septiembre 2014

Trabajo de Fin de Grado presentado en la Facultat de Ciències
de la Universitat Autònoma de Barcelona para la obtención del Grado en Química

Abstract

The project of the present TFG is part of a research line that pursues development of molecular switches based on the MAG system (Figure 1), which allow control of the functioning of ion channel in neuronal glutamate receptors by photo-excited induction. These molecules present 3 different fragments with complementary activity: I) a maleimida cysteine-reactive fragment to bind to the protein near the ion channel; II) a glutamate derivative as agonist of the receptor of ion channel; III) a photoisomerizable azobenceno unit that allows, or not, the agonist to reach the receptor, depending on the isomeric form of the molecule.

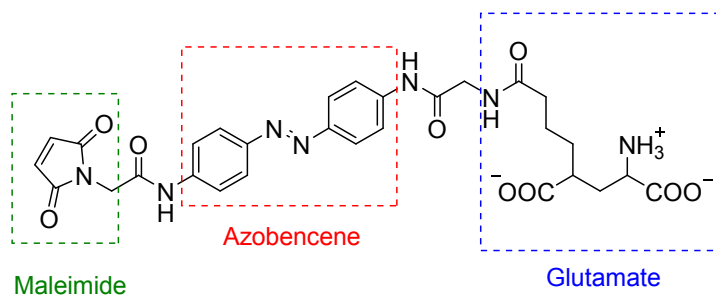
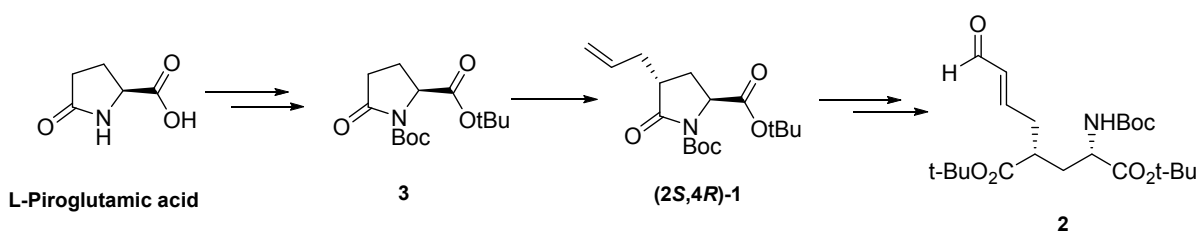


Figure 1. Structure molecular switches based on the MAG system

This work has been focused in improving a synthetic route of intermediate **2** previously established in the research group and make this a reproducible procedure. The synthesis consisted in 6 reaction steps with a low 9 % overall yield described and with problems of reproducibility, starting from commercial L-pyroglutamic acid.



Scheme 1. Synthetic strategy for the synthesis of intermediate glutamate

The main challenges pending to resolve of this synthetic route were: I) the scaling-up of the two first steps; II) to improve both the yield and the reproducibility of the alkylation of lactame **3** to afford the intermediate **1**.

After much research, the two first steps have been scaled-up successfully and the key transformation of **3** in **1** has been improved in reproducibility and yield. Once intermediate **1** is obtained, in three reaction steps: the lactame hydrolysis, protection of the carboxyl group and the olefin metathesis (Scheme 1), the advanced intermediate **2** has been synthesized with a 60 % overall yield of the last three steps.

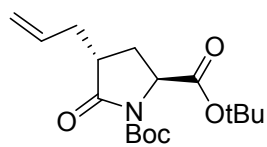
Índice

Abstract	1
Índice	2
Abreviaturas	3
Índice de Fórmulas	4
I. Introducción	5
1.1 Receptores de glutamato	5
1.2 Interruptores moleculares	6
II. Objetivos	10
III. Resultados y discusión	11
3.1. Síntesis de (S)-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di- <i>terc</i> -butilo, 3	12
3.2. Síntesis de (2S,4R)-4-alilo-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di- <i>terc</i> -butilo, (2S,4R)-1	14
3.3. Obtención del ácido (2R)-2-[(2S)-3- <i>terc</i> -butoxi-2-[(<i>terc</i> -butoxicarbonilo)amino]-3-oxopropilo]-4-pentenoico, 5	18
3.4. Obtención de (2R,4S)-2-alilo-4-[(<i>terc</i> -butoxicarbonilo)amino]pentanodiodato de di- <i>terc</i> -butilo, 6	19
3.5. Síntesis de (2S,4R)-2-[(<i>terc</i> -butoxicarbonilo)amino]-4-[(E)-4-oxobut-2-en-1-ilo]pentanodioato de di- <i>terc</i> -butilo, 2	20
IV. Conclusiones	22
V. PARTE EXPERIMENTAL	23
5.1 Métodos de caracterización	23
5.2 Síntesis de Fragmento de Glutamato	24
VI. Bibliografía	30
Anexo	
I. Índice de espectros.....	I
II. Esquema ciclo catalítico de Hoveyda-Grubbs 2ª generación.....	VII

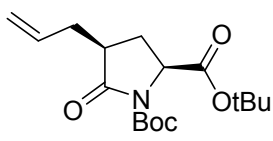
Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
Boc ₂ O	Dicarbonato de di-terc-butil
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0-undec-7-eno]
DMAP	Dimetilaminopiridina
DCM	Diclorometano
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
LiHMDS	Bis(trimetilsilil)amida de litio
M	Molaridad
iGluR	Receptor de Glutamato ionotrópico
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
¹³ C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
δ	Desplazamiento químico
MAG	Maleimida-azobenceno-glutamato
NOE	Nuclear Overhauser effect
reflux	Reflujo
t	Tiempo
TM	Transmembrana
t.a.	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
GE	Gradiende de elución
h	Horas
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio

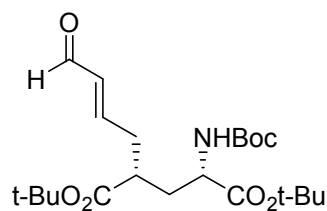
Índice de Fórmulas



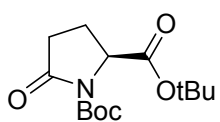
(2S,4R)-1



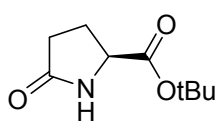
(2S,4S)-1



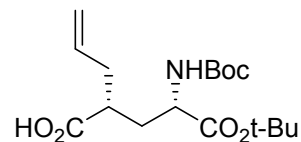
2



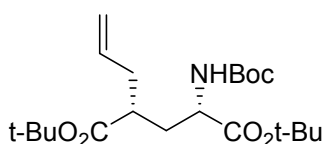
3



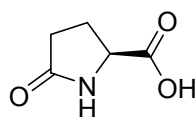
4



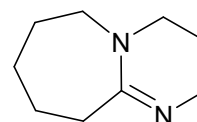
5



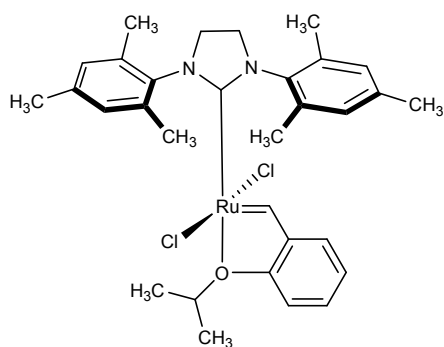
6



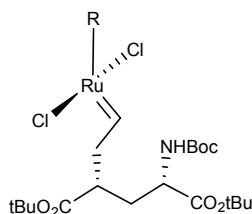
Ácido L-pirolglutámico



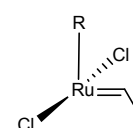
DBU



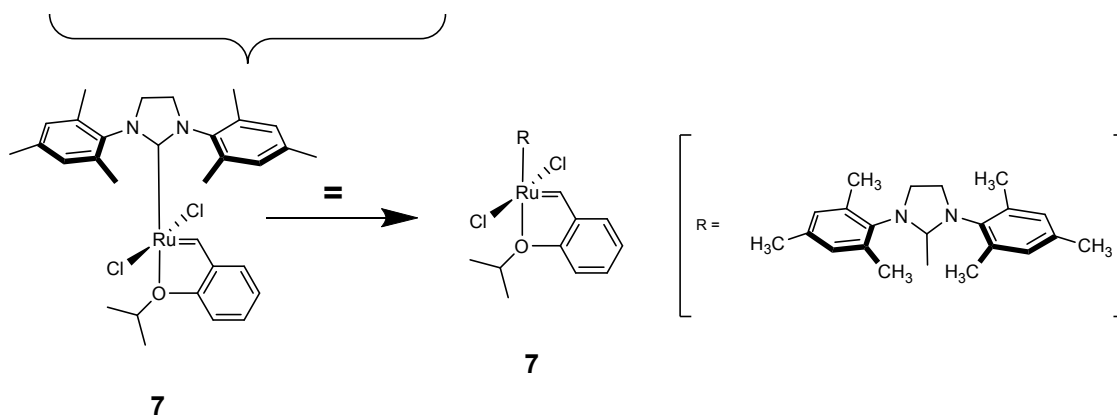
7



8



9



I. Introducción

La nanociencia y la nanotecnología se centran en el estudio de los fenómenos y la manipulación de los materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, con el objetivo de diseñar y construir dispositivos funcionales a esta escala.

Los interruptores moleculares forman parte de estos dispositivos donde se ha propuesto aplicaciones en campos tan diversos como la química, la biomedicina o la ciencia de los materiales.¹ En este Trabajo Final de Grado se reproducirá la síntesis que se planteó en este grupo de investigación para la obtención de una parte de un interruptor molecular, derivado del glutamato. Es por este motivo que a lo largo de la introducción de este trabajo se explicará, primero, el funcionamiento de los receptores de glutamato en el sistema nervioso central y, a continuación, los interruptores moleculares y sus aplicaciones en el campo de las biociencias.

1.1 Receptores de glutamato

El ácido L-glutámico, o en su forma ionizada, el glutamato (abreviado Glu o E) es uno de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas. A Parte, es el neurotransmisor excitatorio por excelencia de la corteza cerebral humana, formando parte del 90 % de la sinapsis en el cerebro humano.² Su papel como neurotransmisor está mediado por la estimulación de receptores específicos, denominados receptores de glutamato, que se clasifican en: ionotrópicos (iGluR) el receptor está unido directamente al canal iónico, y receptores metabotrópicos (mGluR) de siete dominios transmembrana y acoplados a proteínas G de ácido glutámico. El proyecto que incluye este trabajo estudia interruptores moleculares que permitan controlar ópticamente los receptores ionotrópicos de glutamato.³

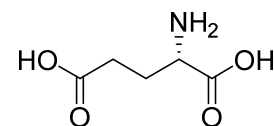


Figura 2. Ácido L-glutámico

1.1.1. iGluR (receptores de glutamato ionotrópicos)

Los receptores de glutamato ionotrópicos son complejos proteicos formados por cuatro subunidades (por donde se une el glutamato), las cuales comparten una estructura básica común, así como, cuatro regiones hidrofóbicas dentro de la secuencia central (Figura 3 (i)). De esta manera, los receptores iGlu forman un canal catiónico que permite el paso selectivo de iones sodio (Na⁺), potasio (K⁺) o calcio (Ca²⁺), (Figura 3 (ii)) produciendo una despolarización en la membrana celular, vital para la transición sináptica excitatoria, es decir, la comunicación entre neuronas dentro del cerebro humano los cuales son procesos muy rápidos.

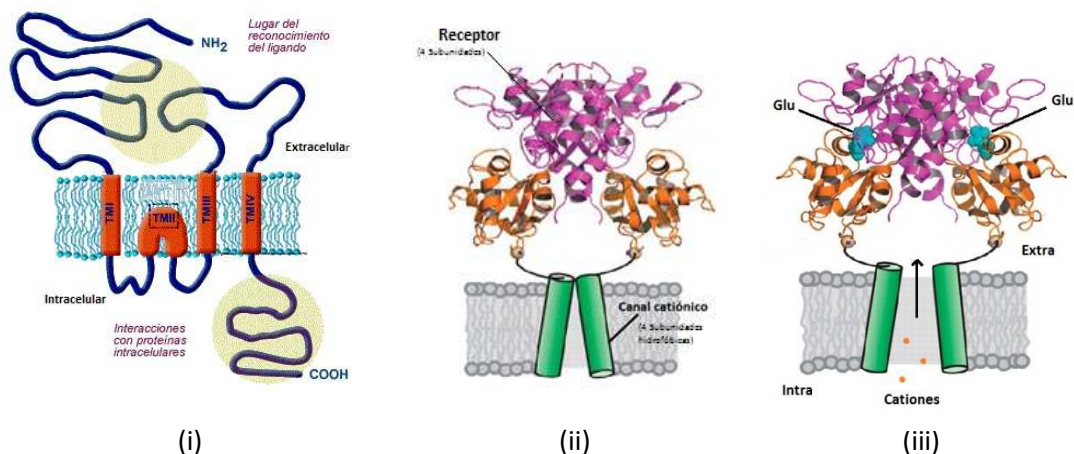


Figura 3. (i) Estructura general de una subunidad del receptor de glutamato ionotrópico. (ii) Estructura del receptor ionotrópico de glutamato. El receptor está unido al canal catiónico (sin glutamato unido al centro activo, canal cerrado). (iii) Glutamato unido al receptor iGlu haciendo que se abra el canal iónico liberando cationes fuera de la célula.

La sinapsis (comunicación entre neuronas) se produce cuando un impulso nervioso (descarga química, que origina una corriente eléctrica en la membrana de la célula), iniciado en una célula emisora, viaja a lo largo del axón hasta alcanzar su extremo. Allí el impulso provoca la entrada de cationes de calcio dentro de la célula y, posteriormente, la liberación del neurotransmisor químico (glutamato en este caso) al espacio sináptico que se difunde a través de éste, estimulando la siguiente neurona de la cadena (célula post sináptica) mediante la interacción con proteínas receptoras (en este caso iGluR). Una vez el glutamato se une al receptor iGluR, iones como Na^+ o K^+ , pasan a través del canal hasta llegar al centro del complejo, provocando la despolarización de la membrana y con ello generando un nuevo impulso eléctrico que volverá a viajar a lo largo de la célula hasta que éste encuentre a otra (Figura 3 (iii)).

1.2 Interruptores moleculares

Los interruptores moleculares son compuestos, que se caracterizan por tener dos o más estados estables y diferenciales (con diferentes propiedades físico-químicas), los cuales pueden evolucionar de manera reversible como respuesta a un estímulo externo. Frente al estímulo, el interruptor molecular puede interconvertir su estado en forma "On" y "Off" (Figura 4 (i)).

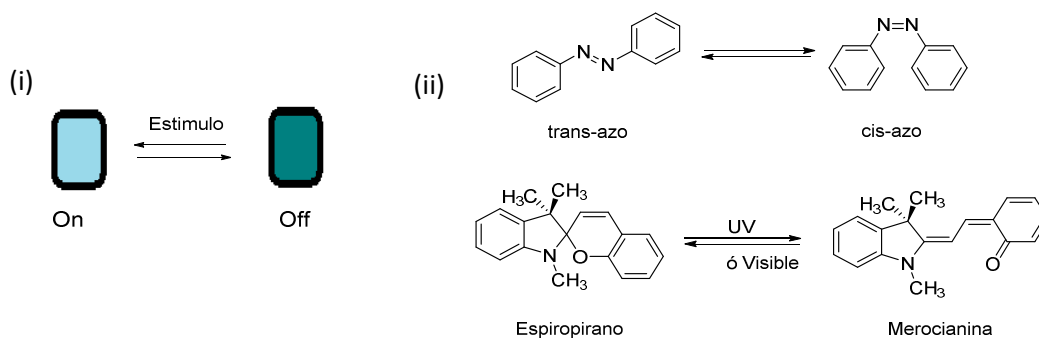


Figura 4. (i) Dibujo esquemático de la interconversión de los estados "On" y "Off". (ii) Ejemplos de interconversión estereoisometría *trans* y *cis*, arriba; interconversión constitucional, abajo.

Normalmente, los dos estados de un interruptor molecular presentan una relación de estereoisomería o de isomería constitucional. En la Figura 4 (ii) se muestra un ejemplo de cada situación: arriba la interconversión estereoisométrica *trans* y *cis* de un interruptor molecular tipo azobencénico.⁴ La de abajo muestra la interconversión entre dos isómeros constitucionales, el espiropirano (isómero cerrado incoloro) y el merocianina (isómero abierto da color). En cualquiera de los dos casos, y como consecuencia a las diferencias estructurales, los dos estados del interruptor se difieren en sus propiedades físico-químicas.

En general, los interruptores moleculares pueden responder a una gran variedad de estímulos, tales como térmica, eléctrica, óptica, magnética, o estímulos químicos. Dependiendo de la respuesta del interruptor frente al estímulo, así como las condiciones en las que se utilicen, se obtendrán interruptores con diferentes aplicaciones. De especial interés es el uso de estímulos fotoquímicos, ya que aparte de ser no invasivo, permiten controlar la actividad del interruptor a distancia (fotorelé). El grupo de compuestos que mejor responden a este tipo de estímulo son los fotocromos.

El fotocromismo se define como una transformación fotoquímica inducida mediante la absorción de radiación electromagnética entre dos especies químicas A y B que se diferencian, no sólo en su espectro de absorción sino también en sus índices de refracción, constante dieléctrica, estructura geométrica y potencial de oxidación/reducción. Los sistemas fotocromicos más extendidos involucran reacciones unimoleculares. En la figura 5 se muestra el perfil de energía característico de un sistema fotocromico. La especie A, termodinámicamente más estable, se transforma mediante irradiación en la forma B. La reacción inversa puede tener lugar térmicamente o bien fotoquímicamente. Dependiendo del tipo de fotocromismo que adopte la molécula influirá, entre otras cosas, en las aplicaciones que esta pueda tener.⁵

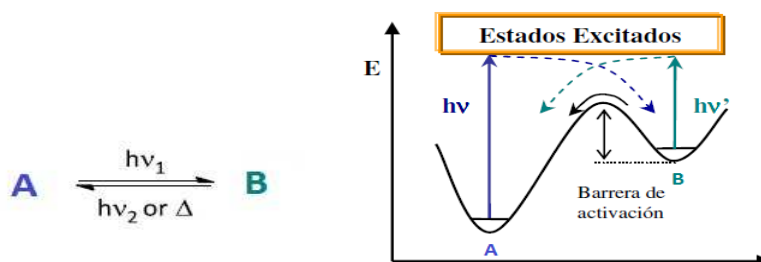


Figura 5. Perfil de energía característico de un sistema fotocromico.

Los interruptores moleculares se pueden utilizar en diferentes campos, por ejemplo, en ciencia de los materiales se ha propuesto de utilizarlos como memorias moleculares capaces de almacenar información y como válvulas y máquinas moleculares. En estos últimos años el campo de las biociencias está encontrando mayor aplicaciones para estos compuestos ya sea como sensores para monitorizar especies biológicas o como herramientas para controlar y modificar la estructura de biomoléculas y la actividad celular. El Grupo de investigación en el cual pertenece este trabajo investiga interruptores moleculares que puedan tener aplicaciones en el control de la actividad neuronal.⁶

1.2.1 Interruptores moleculares capaces de controlar la actividad neuronal mediante estímulo foto-químico.

Gracias a las propiedades que ofrecen los interruptores moleculares podemos conseguir modificar material biológico mediante un estímulo lumínico de tal manera que podamos controlar y manipular externamente la actividad celular.^{7,8} Con estos compuestos podemos desarrollar estrategias de manipulación óptica utilizando técnicas no invasivas y selectivas donde éstos puedan activarse (“On”) o desactivarse (“Off”) a distancia. Una de las aplicaciones más relevantes del control óptico de la actividad celular se produce en el campo de la neurotransmisión y del control de la actividad neuronal.

Como se ha comentado a lo largo de la introducción, los neurotransmisores son moléculas capaces de transmitir, amplificar y modular señales entre neuronas. Por lo tanto, tener el control de su actividad mediante la aplicación de estímulos externos no solo nos permitirá controlar la neurona a voluntad, sino que también se podría estudiar el papel que juegan las diferentes células del sistema nervioso y con ello entender su funcionamiento en detalle.

La estrategia que se sigue, para este tipo de control, es la modificación de los compuestos que actúan como neurotransmisores, de manera que pueda activar o desactivar su capacidad para interactuar en los sitios de unión neuronal bajo irradiación. En concreto, se han centrado en el glutamato como neurotransmisor sintetizando un interruptor molecular que permita el control del canal iGluR.⁹

Los grupos de los profesores Pau Gorostiza (Institut de Bioenginyeria de Catalunya, Barcelona), Dirk Trauner (Universidad de Munich, Alemania), Ehud Y. Isacoff (Universidad de California, Estados Unidos), Jordi Hernando (grupo de Electroquímica, fotoquímica y reactividad orgánica, UAB) conjuntamente con este grupo de investigación (Grupo de Síntesis Orgánica Estereoselectiva, UAB) de la mano de Félix Busqué y Ramón Alibés; han desarrollado una familia de interruptores moleculares que controlan el funcionamiento del receptor iGluR. La molécula diseñada con este fin es el sistema MAG (Maleimida-Azobenceno-Glutamato), que representa el ejemplo más simple de esta familia de interruptores.¹⁰

Este compuesto está formado por tres unidades básicas (Figura 6):

- 1) Un grupo **Maleimida** que permite anclar el interruptor MAG a una unidad de cisteína en el exterior del dominio de la unión del ligando.
- 2) Un grupo **Azobenceno** fotoisomerizable. Constituye el interruptor en sí.

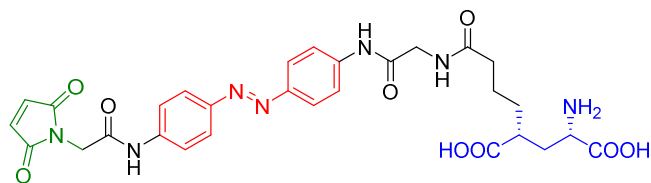


Figura 6. Estructura del interruptor molecular MAG.¹¹

- 3) Una unidad de **Glutamato** que actúa de agonista en el centro activo del receptor iGluR, abriendo o cerrando el canal iónico.

En primer lugar, para que este compuesto pueda cumplir con su objetivo debe ser unido covalentemente en una región cercana al centro activo del receptor mediante el acoplamiento

del grupo maleimida y el grupo tiol de un residuo de cisteína del sistema iGluR. Una vez se ha unido al receptor, y en ausencia de irradiación, el interruptor MAG se encuentra en su forma extensa *trans* favorecida termodinámicamente. De esta manera el grupo terminal glutamato se encuentra alejado del lugar de unión del receptor, por lo cual el canal iónico se mantendrá cerrado sin la posibilidad del intercambio de iones con el exterior celular. Cuando al sistema MAG se le irradia con luz de frecuencia adecuada ($\nu_1 \sim 360$ nm), la unidad central azobencénica de MAG se interconvierte a su forma isomérica plegada *cis*. Esto permite el acoplamiento entre la unidad de glutamato y el lugar de unión del receptor, haciendo que el canal iónico del receptor se abra permitiendo el paso de los cationes. Finalmente este proceso puede revertir o bien de forma espontánea una vez la forma *cis* de MAG se relaje termodinámicamente en su estado estable *trans*, o bien por irradiación con luz de frecuencia adecuada ($\nu_2 \sim 450$ nm) para fotoinducir la transformación *cis*→*trans* (Figura 7).¹²

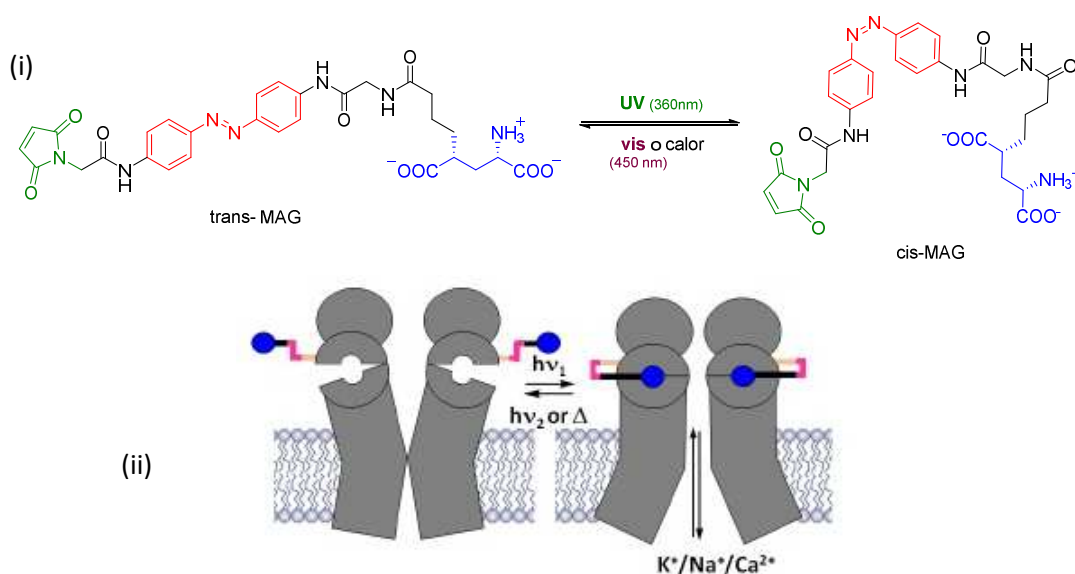


Figura 7. (i) Interconversión entre los estados *trans* y *cis* del sistema MAG. (ii) Mecanismo de apertura y cerramiento del canal iónico controlado por el receptor iGluR mediante la interconversión fotoquímica entre los dos estados del interruptor MAG.¹³

La capacidad de controlar el proceso de apertura-cerramiento del canal iónico gobernado por el receptor iGluR mediante estímulo óptico del interruptor molecular MAG, así como la reversibilidad y reproducibilidad de este funcionamiento se demostró mediante medidas electroquímicas. La técnica Patch clamp (fijación de membranas) permite medir potenciales de membrana. Se usa una micropipeta como electrodo que tiene una punta abierta de cerca de un micrómetro de diámetro, un tamaño que encierra un área superficial que a menudo contiene uno o pocos canales iónicos moleculares. El electrodo, un alambre de cloruro de plata es puesto en contacto con esta solución y conduce la corriente eléctrica al amplificador, obteniendo las medidas electroquímicas (Figura 8).

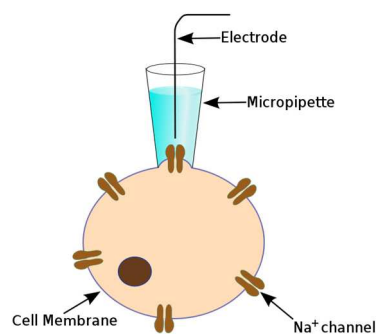


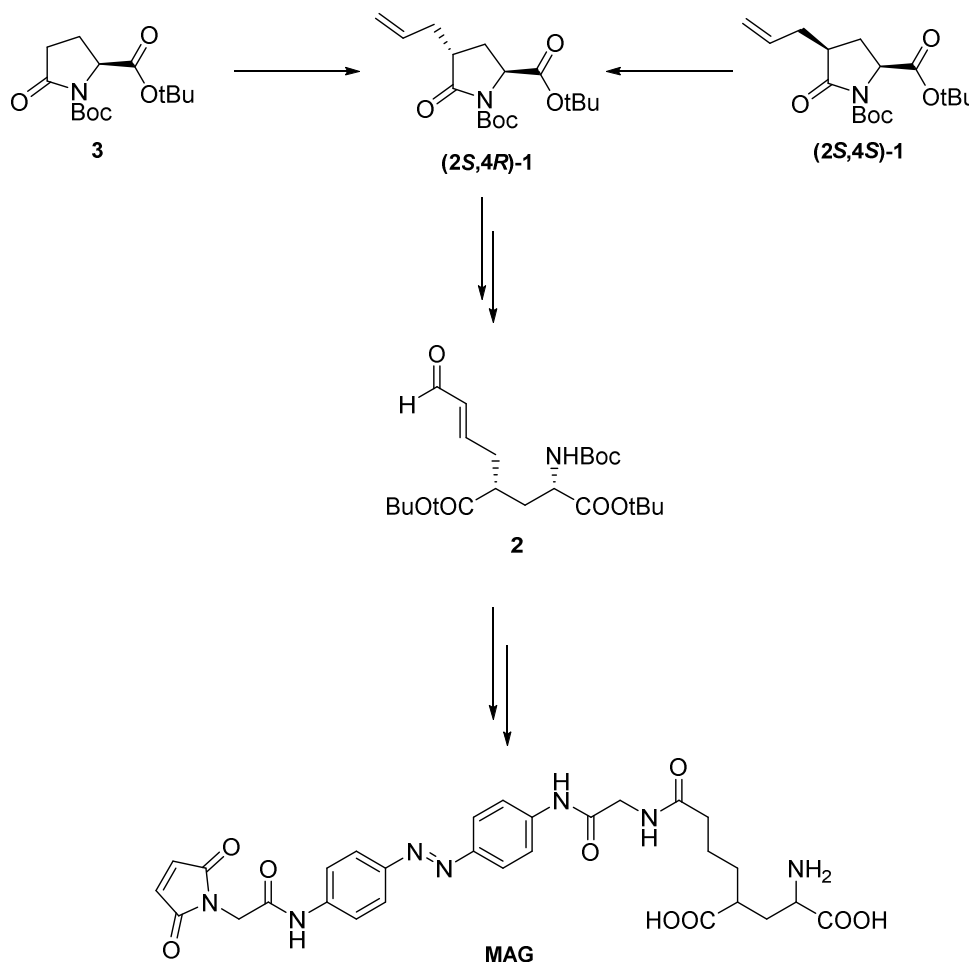
Figura 8. Esquema de la técnica Patch clamp

II. Objetivos

A lo largo de la introducción se ha hablado del papel que juega la parte del glutamato en el sistema MAG en el estudio del funcionamiento neuronal. Dado la importancia que tiene la obtención del precursor de glutamato para estos sistemas, se ha visto necesario la reproducción y optimización de la ruta sintética puesta en marcha en el grupo de investigación, con el fin de convertirlo en un procedimiento robusto y reproducible.

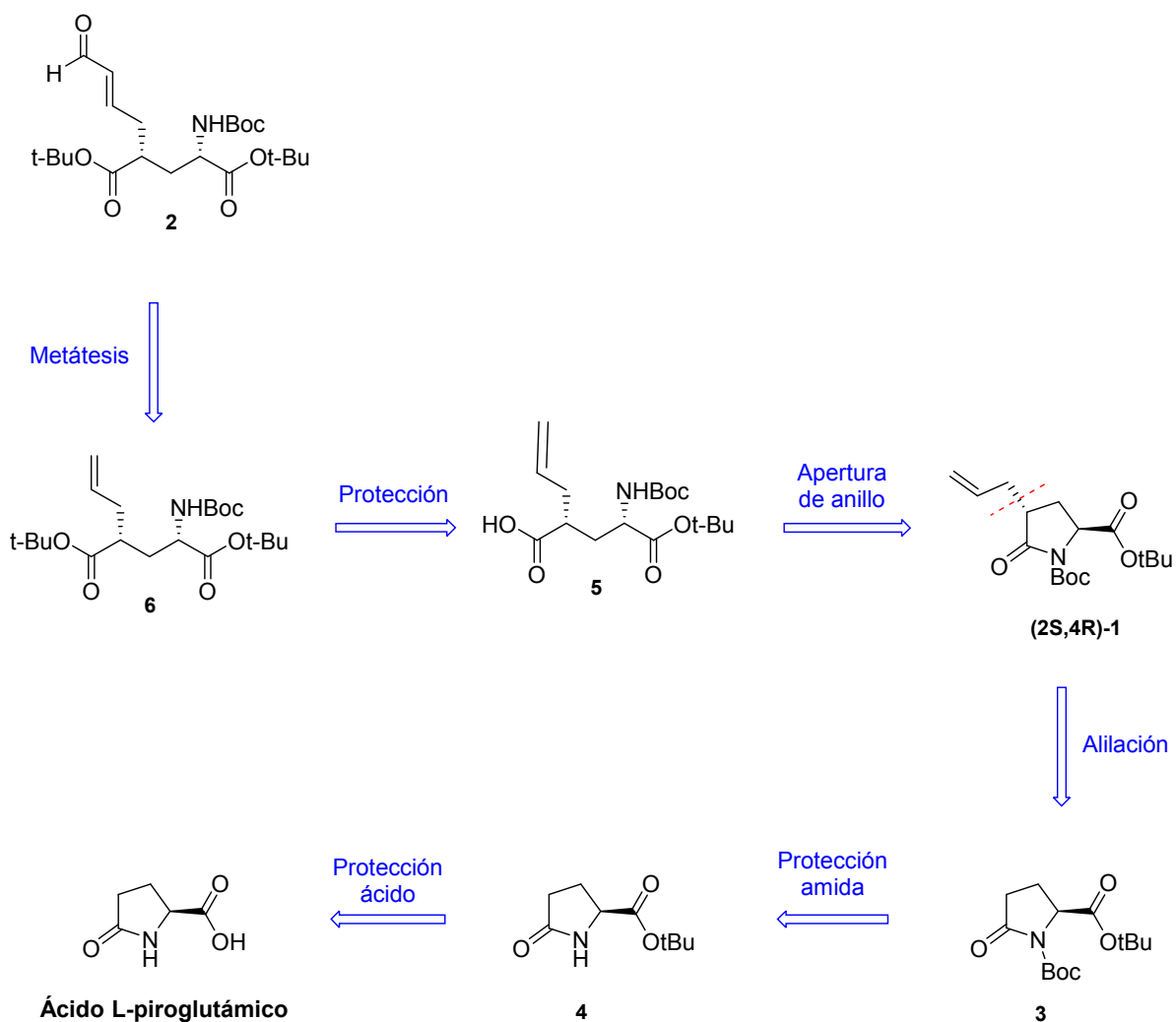
Para este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

- El escalado de las 2 primeras etapas de reacción para obtener **3** en la mayor cantidad posible para la posterior utilización en el estudio de la obtención del intermedio clave **(2S,4R)-1**.
- La optimización de las condiciones de reacción, tratamiento y purificación en la obtención de la molécula **(2S,4R)-1**, mediante alquilación de la lactama **3**, con el fin de obtener el máximo rendimiento posible, ya que es una reacción que es pobre en rendimiento.
- Obtención del intermedio clave **(2S,4R)-1** a partir de su diastereoisómero no deseado, **(2S,4S)-1** que inevitablemente se forma en la reacción. Para ello se realizará un estudio de la reacción de epimerización del centro estereogénico (4S) en diferentes condiciones (temperatura, disolvente, reactivos, etc.) para obtenerla con el mayor rendimiento posible.
- Obtención del intermedio **2**, que posteriormente formará el precursor de glutamato para formar parte del interruptor molecular MAG.



III. Resultados y discusión

En el esquema 2 se recoge el análisis retrosintético planteado para la obtención del precursor del fragmento de glutamato **2**.



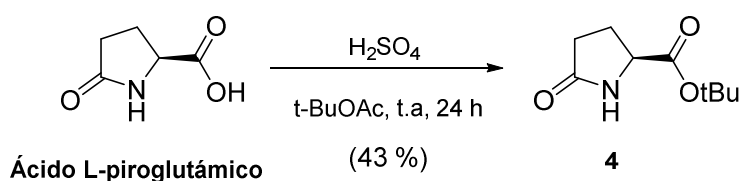
Esquema 2. Análisis retrosintético para la preparación del precursor de glutamato **2**.

El precursor de glutamato **2** proviene de la metátesis entre el crotonaldehído y el intermedio **6**, que éste viene de la esterificación del ácido carboxílico de la molécula **5** en forma de éster *tert*-butílico. La apertura de anillo de **(2S,4R)-1** en condiciones básicas permite la obtención de la molécula **5**. El intermedio clave de la síntesis es la molécula **(2S,4R)-1**, que proviene de la alilación de la posición α de la amida cíclica protegida, **3**. Por último, el intermedio **3** proviene de dos etapas de protección de los grupos funcionales, amida y ácido carboxílico, del ácido L-pirolglutámico en forma de carbamato y éster respectivamente. El ácido L-pirolglutámico es un producto comercial.

3.1. Síntesis de (s)-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, **3**.

La ruta sintética comienza a partir del ácido L-pirolglutámico, donde protegeremos sus grupos funcionales, el nitrógeno de la amida y el carbono del ácido, en forma de carbamato de *tert*-butilo y de éster *tert*-butílico, respectivamente. Las dos primeras etapas de protección del L-pirolglutámico tienen como objetivo obtener **3** en cantidades grandes.

La primera reacción de protección que se hace es la del ácido carboxílico. La esterificación se hizo basándose en el proceso descrito por Gross ¹⁴, ya que trabajaba con la misma molécula, pero en vez de utilizar HClO₄ se utilizó H₂SO₄. De esta manera se obtenía un rendimiento ligeramente más bajo, por esta razón la cantidad de los equivalentes de sulfúrico utilizados es más grande así como el tiempo de reacción que es de 16 h, el doble del descrito, tal y como se muestra en el esquema 3.

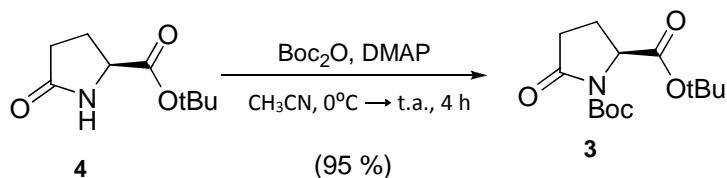


Esquema 3. Reacción de esterificación del ácido carboxílico en forma de *tert*-butilo, **4**.

La evolución de la reacción se seguía mediante cromatografía de capa fina, pero nunca se observó que el sustrato de partida se acabara. Se utilizó AcOEt para mejorar la extracción del producto en lugar de éter dietílico. Después de las extracciones se requería una última lavada de la fase orgánica con una disolución de NaHCO₃ saturada, porque en el proceso de extracción el AcOEt arrastraba el ácido acético que se genera en la reacción. De esta manera se obtiene el intermedio **4** con un rendimiento del 43 % sin poder recuperar el reactivo de partida. Normalmente las reacciones de esterificación con *tert*-butilo suelen dar rendimientos bajos, es por esto que el rendimiento de la reacción no es alta.

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón del producto presenta una señal a δ 1.47 en forma de singlete que integra 9 protones. Confirmando de esta manera la formación del éster *tert*-butílico (Anexo I). Según vemos en el espectro, el crudo de la reacción sale bastante limpio de impurezas, por lo tanto el mismo crudo de reacción se puede utilizar para la siguiente reacción sin la necesidad de purificar.

El siguiente paso de reacción es la protección del nitrógeno de la lactama en forma de carbamato de *tert*-butilo, siguiendo la misma metodología que plantea Goss para esta misma molécula tal y como se indica en el esquema 4.



Esquema 4. Protección del nitrógeno de la lactama en forma de carbamato de *terc*-butilo.

El DMAP (dimetilaminopiridina) actúa como catalizador en esta reacción de formación del carbamato, permitiendo realizarla en ausencia de ácido, en condiciones suaves, para que no se vea afectado el éster *terc*-butílico o que se nos pueda generar especies no deseadas. El DMAP reacciona con el dicarbonato de di-*terc*-butilo (Boc_2O) formando la especie de *terc*-butilpiridinio correspondiente, donde éste será atacado por el nitrógeno de la lactama formando el carbamato de *terc*-butilo y recuperándose el DMAP.

La reacción se sigue mediante capa fina hasta la consumición total del producto de partida. Se le hace una posterior purificación mediante cromatografía en columna de sílice obteniendo el compuesto **3** con un rendimiento del 95 %.

El espectro de resonancia magnética del producto muestra un nuevo singlete alrededor de δ 1.40. Se observan los dos singletes alrededor de δ 4.45, integrando los dos picos salen 18 protones, 9 del éster *terc*-butílico y 9 del carbamato de *terc*-butilo, confirmando de esta manera la formación del producto **3**. También se observa la señal del protón α -carboxílico, H-2, a δ 4.40 que antes era un multiplete, pasa ahora a ser un doblete de dobletes. Esto es debido a que ahora solo se acopla a los dos protones diferenciales de H-3, tal y como se puede observar en la figura 9.

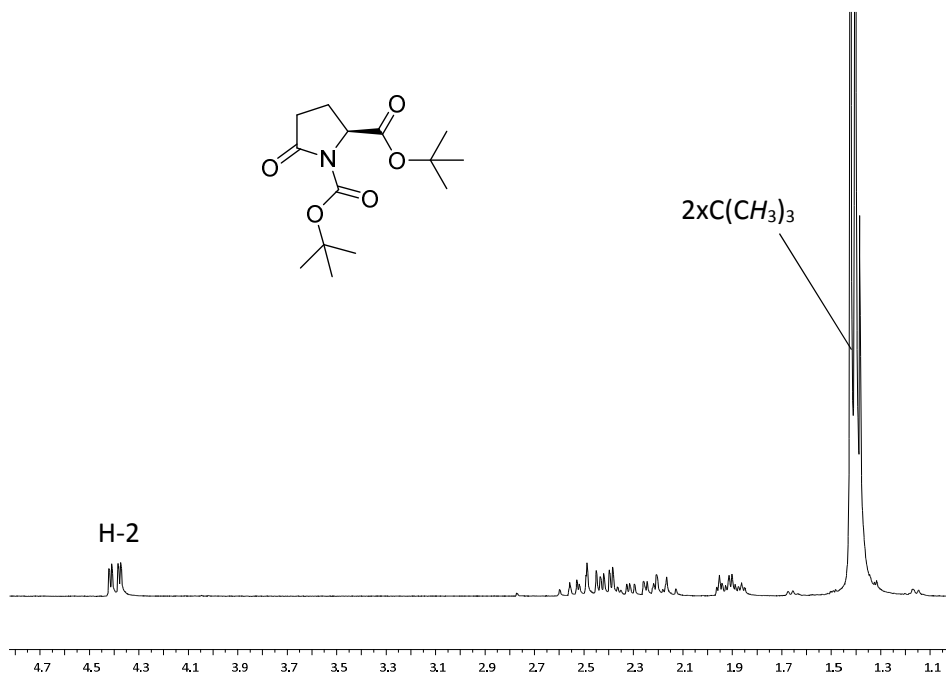


Figura 9. Espectro de ^1H RMN (250 MHz, CDCl_3) de **3**.

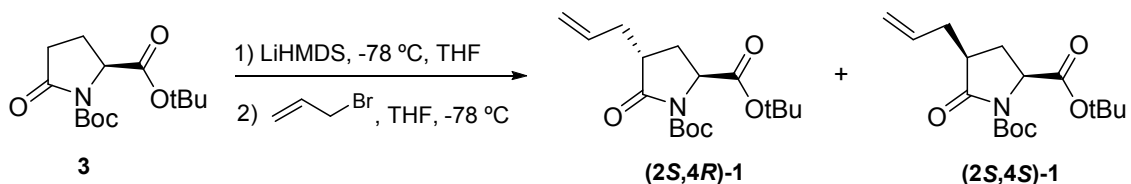
3.2. Síntesis de (2S,4R)-4-alilo-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, (2S,4R)-1.

El siguiente paso de reacción es la obtención de la molécula objetivo **(2S,4R)-1**, que plantea la introducción del grupo alilo en la posición α respecto la lactama de **3**.

La obtención de este intermedio se ha convertido en la etapa clave de esta síntesis por los rendimientos tan bajos que plantea esta reacción de alilación. Por este motivo hemos desarrollado un estudio de optimización de las condiciones de reacción, tratamiento y purificación para obtener **(2S,4R)-1** con el máximo rendimiento posible y hacer de esta reacción un procedimiento robusto y reproducible. También nos hemos centrado en la recuperación del producto **(2S,4R)-1** a partir de su diastereoisómero no deseado, **(2S,4S)-1** en una reacción de epimerización a partir de diferentes condiciones de reacción.¹⁵

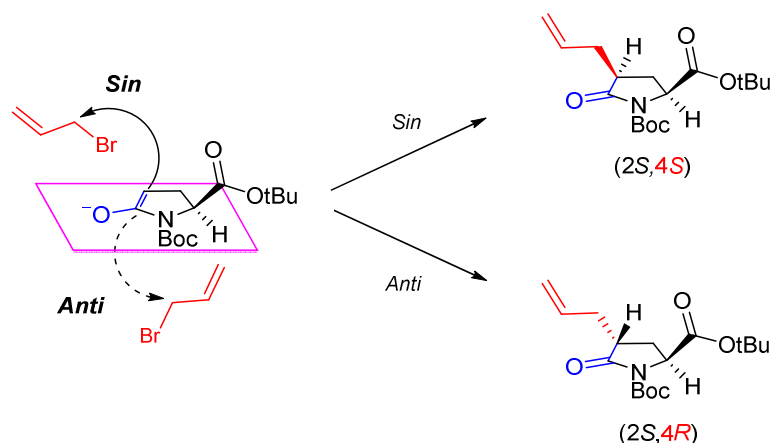
Es importante que la molécula tenga una isomería definida, en este caso (2S,4R), para seguir con la ruta sintética, porque el derivado de glutamato final, cuando forme parte del interruptor molecular, tiene que ser reconocido por el receptor iGluR y llevar a cabo su papel. El isómero (2S,4S) actuaría de antagonista dejando sin funcionalidad al interruptor molecular. Es el motivo por el que necesitamos **(2S,4R)-1** con el mayor rendimiento posible.

La reacción de alilación consiste, en primera instancia, la formación del enolato lactámico de **3** en condiciones cinéticas, para después hacerlo reaccionar con una molécula electrófila como es el bromuro de alilo tal y como se observa en el esquema 5.



Esquema 5. Reacción de alilación de **3** en condiciones cinéticas.

La reacción se lleva a cabo en condiciones cinéticas, es decir, la utilización de base fuerte (LiHMDS) y a temperaturas bajas (-78 °C). Son necesarias estas condiciones de reacción para evitar las dialilaciones y la formación de productos no deseados. La base arranca el protón de la posición α respecto la lactama formando así el enolato correspondiente. Una vez formado el enolato, éste puede atacar por la cara de arriba (ataque en *sin*) y nos daría el producto no deseado **(2S,4S)-1** o puede atacar por la cara de abajo (ataque en *anti*) dándonos el producto deseado **(2S,4R)-1**, tal y como se observa en el esquema 6.



Esquema 6. Mecanismo del ataque del enolato al bromuro de alilo

De esta manera se genera un nuevo centro estereogénico en la molécula, con la mezcla de los dos diastereoisómeros, aunque, se trata de una reacción diastereoselectiva, es decir, el isómero (2S,4R) se genera en más cantidad que el (2S,4S) ya que el ataque del enolato por la cara de abajo (ataque en *anti*) tiene menos impedimento estérico que el ataque en *sin* causado por el éster terc-butílico del centro 2S.

Todas las reacciones que se hicieron en el estudio se añadiendo siempre los mismos equivalentes de base (1.1 equivalentes) y de bromuro de alilo (4 equivalentes), que anteriormente en este mismo grupo de investigación se vio que en estas cantidades de equivalentes proporcionaban mejores rendimientos. Solo se modifican las condiciones de escalado, adición, tratamiento y purificación de los reactivos de tal manera que se diseñaron diferentes experimentos tal y como se observa en la tabla 1.

Nº exp	Tamaño	Adición	Basificación	Purificación	Anti (%)	Sin (%)
1	300 mg	Bromuro → Enolato	NH ₄ Cl	Hexano/AcOEt (GE 20:1 a 4:1)	21	6.3
2	300 mg	Enolato → Bromuro	NH ₄ Cl	Hexano/AcOEt (GE 20:1 a 4:1)	10	6
3	300 mg	Bromuro → Enolato	Sílica	Hexano/AcOEt (GE 20:1 a 4:1)	22	8
4	1 g	Bromuro → Enolato	Sílica	Hexano/AcOEt (GE 20:1 a 4:1)	18	9
5	2 g	Bromuro → Enolato	Sílica	Hexano/AcOEt (GE 20:1 a 4:1)	12	6

Tabla 1. Diferentes condiciones de reacción para la alilación con el rendimiento de los diastereoisómeros.

Después de realizar los diferentes experimentos se ve, en primer lugar, que el escalado de la reacción influye en el rendimiento. Cuando se hace a escala de milígramo los rendimientos son mejores que cuando se hace a escala de gramo (nº 5). El orden de adición es lo que más influye en el rendimiento final (nº 2), siendo el orden bromuro sobre enolato lo que da mejores

resultados. Basificar con NH_4Cl supone posible pérdida del producto mediante las diferentes extracciones que se hacen en comparación al basificar con sílica, pero se observa que la diferencia entre los dos rendimientos es pequeña (n° 1 y 3). Sin embargo, lo que se observa con diferencia respecto a los demás experimentos es la fase de purificación del producto. Cuando se purifica por cromatografía en columna de gel sílice sin utilizar gradiente de elución se favorece la separación de los diastereoisómeros y de otros productos obteniendo mejores resultados (n° 6). Por lo tanto, Como se observa en la tabla, el experimento 6 es el que nos proporciona mejor rendimiento ya que éste recoge las mejores condiciones descritas.

La asignación de los dos diastereoisómeros se ha basado en la comparación de los resultados obtenidos por RMN descritas en la bibliografía. Como se puede apreciar en la figura 10, los dos isómeros se pueden diferenciar por la señal correspondiente al protón H-2, alrededor de δ 4.40 donde cada señal presenta diferenciaciones en las constantes de acoplamiento de este protón con los dos protones de H-3 para (2*S*,4*R*)-1 ($J_{2,3S}=9.6$ Hz, $J_{2,3R}=1,6$ Hz) y para (2*S*,4*S*)-1 ($J_{2,3S}=9.3$ Hz, $J_{2,3R}=5,7$ Hz).

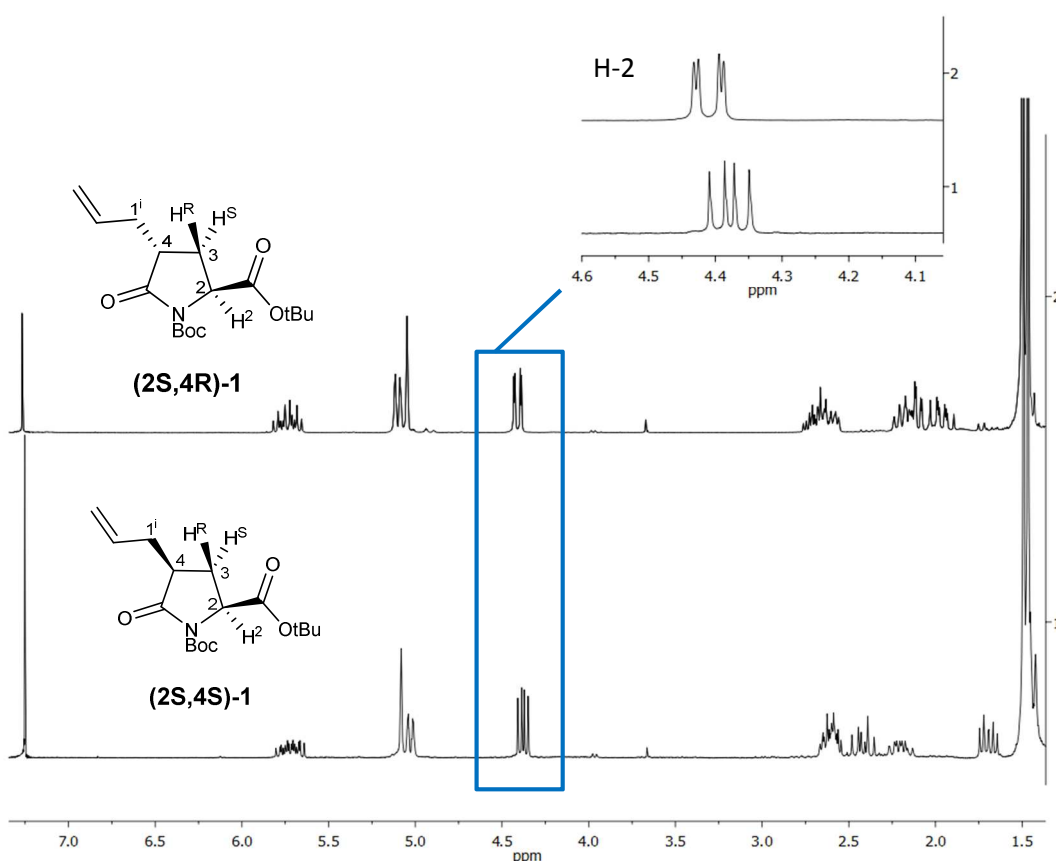
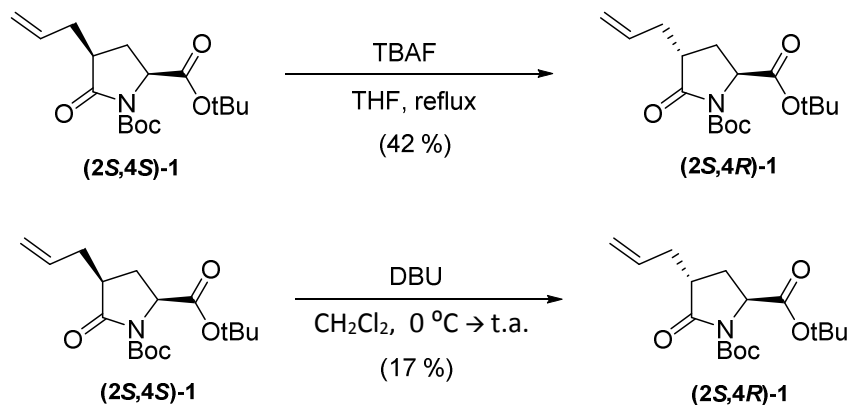


Figura 10. Comparación entre los dos espectros de ^1H RMN de los dos estereoisómeros.

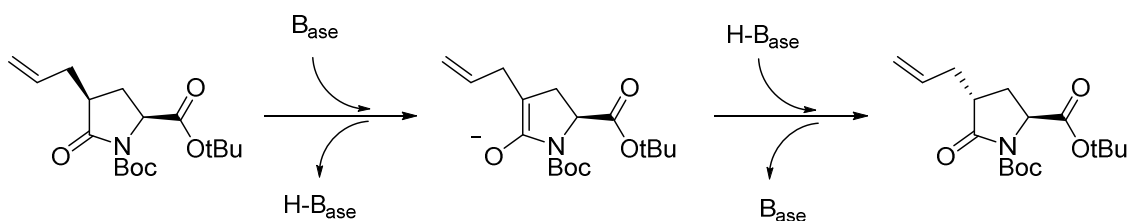
A parte, en este mismo grupo de investigación se hizo la caracterización de los dos isómeros mediante la técnica nOe, irradiando el protón H-2. Se observó que en la especie (2*S*,4*R*)-1 el H-2 se encontraba próximo con el protón H-1ⁱ, es decir, posicionado en *cis* respecto la cadena alílica. En cambio, irradiando la señal del protón H-2 del diastereoisómero (2*S*,4*S*)-1, se observaba nOe sobre los protones H-3 y H-4 donde se deducía que H-2 está en la misma dirección en el espacio que el protón H-4 y que por lo tanto, en *trans* respecto a la cadena alílica.

Acumulando el producto **(2S,4S)-1**, que se nos generaba en la reacción de alilación como producto no deseado, se estudió la forma de recuperar, a partir de éste, el producto **(2S,4R)-1** en una reacción de epimerización del centro (4S). Para ello se utilizaron dos bases como catalizadores (TBAF y DBU) para establecer un equilibrio entre ambos isómeros y de esta manera obtener la máxima cantidad de **(2S,4R)-1**.



Esquema 7. Reacción de epimerización con diferentes bases catalíticas.

El TBAF es una base no nucleófila que al ser soluble en disolventes orgánicos puede ser utilizada en condiciones anhidras. De esta manera, el TBAF representa una fuente de fluoruro “anhidro” donde la falta de cantidades significativas de agua permite la presencia de aniones fluoruros “desnudos” (libres de la solvatación del agua), y hacer que sean más accesibles y mucho más reactivos que serán los que arranquen el protón de la posición α respecto a la lactama. El DBU, de la misma manera que el TBAF, es una base amidina no nucleófila, voluminosa, que actúa de la misma manera en la reacción de epimerización arrancando el protón α tal y como se indica en el esquema 8.



Esquema 8. Mecanismo de epimerización.

Se llevaron a cabo diferentes reacciones de epimerización con estas dos bases catalíticas a diferentes condiciones para así encontrar la más óptima para obtener la especie en *anti* (2S,4R) con mayor rendimiento. La siguiente tabla muestra los diferentes experimentos diseñados con las dos bases catalíticas.

Nº	Disolvente (*)	Base	Equivalentes	Temperatura	Tiempo	Ratio Anti / Sin	
1	CH ₂ Cl ₂	TBAF	1.1	60° C	2h	3	1
2	CH ₂ Cl ₂	DBU	1.1	60°C	2h	1	2
3	CH ₂ Cl ₂	DBU	4	25°C (**)	48h	1	2
4	THF	TBAF	1.1	80°C	2h	2	1
5	THF	DBU	1.1	80°C	2h	1	3

(*) Los disolventes utilizados en todos los experimentos son anhidros.

(**) Excepto este experimento, que se hizo a temperatura ambiente, es resto experimentos de la tabla se

Tabla 2. Experimentos de epimerización a diferentes condiciones de reacción.

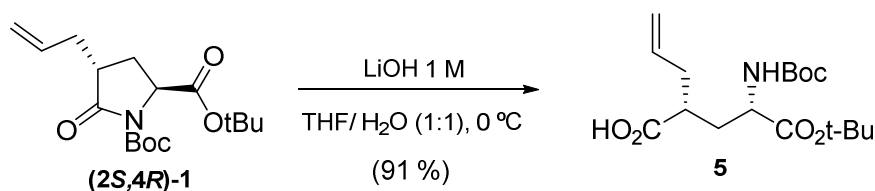
Tal y como se observa en la tabla 2, aparentemente a igual de condiciones, la función del anión fluoruro del TBAF es más eficaz como base catalítica en esta reacción de epimerización que una amidina como es el DBU. El máximo rendimiento obtenido fue en el experimento 1 con un 42% de rendimiento, pudiendo recuperar el reactivo de partida.

En esta reacción se podría haber epimerizado tanto el centro 4S como el 2S de la molécula, pero debido a la poca accesibilidad del protón H-4 gracias al éster *terc*-butílico, no se observó epimerización en este centro, por lo tanto se trata de una reacción regioselectiva.

3.3. Obtención del ácido (2R)-2-{(2S)-3-*terc*-butoxi-2-[(*terc*-butoxicarbonilo)amino]-3-oxopropilo}-4-pentenoico, 5.

Una vez obtenido (2S,4R)-1 con una cantidad asequible para poder proseguir con la ruta sintética, el siguiente paso de reacción supone la apertura del anillo lactámico para obtener la estructura de tipo glutamato. Esta apertura consiste en una hidrólisis básica de la lactama utilizando como base nucleófila LiOH.

Este paso de reacción es uno de los motivos de porque se protege los grupos funcionales con grupos voluminosos como son los *terc*-butilos, para que no se nos hidrolizen y perdamos los grupos protectores de la molécula. De todos modos, para no correr riesgo de que se nos hidrolize tanto el éster *terc*-butílico como el carbamato, haremos la reacción con una concentración de LiOH no muy grande (1 M) y bajo una temperatura de 0 °C tal y como se puede ver en el esquema 9. Después del tratamiento del crudo y su purificación mediante cromatografía en columna de gel sílice, se ha obtenido 5 con un rendimiento del 91 %.



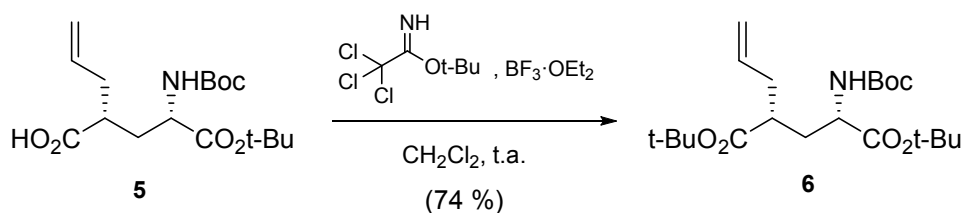
Esquema 9. Apertura del anillo mediante hidrólisis básica.

El espectro de resonancia magnética de protón del intermedio **5** muestra la aparición de la señal del hidrógeno enlazado al nitrógeno carbámico, en forma de doblete a δ 5.3. También se observa en el espectro la aparición del protón del ácido carboxílico a δ 9.9. Por otro lado en el espectro del RMN de carbono nos muestra la aparición de la señal del carbono del ácido carboxílico a δ 178.8 confirmando definitivamente la formación del intermedio **5** (Anexo I).

3.4. Obtención de (2*R*,4*S*)-2-alilo-4-[(*tert*-butoxicarbonilo)amino]pentanodiodato de di-*tert*-butilo, **6**.

La siguiente reacción que se lleva a cabo en nuestra ruta sintética consiste en la esterificación del ácido carboxílico en forma de éster *tert*-butílico para tener el grupo funcional carboxílico protegido para las siguientes etapas de reacción.

Este caso, la esterificación se realiza en condiciones de reacción mucho más suaves que en las utilizadas en las protecciones anteriores para evitar la formación de productos no deseados. Para llevar a cabo esta esterificación, en estas condiciones, se utiliza el 2,2,2-tricloroacetimidato de *tert*-butilo y un ácido de Lewis como el $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ disueltos en diclorometano a temperatura ambiente tal y como muestra el esquema 10.



Esquema 10. Reacción de esterificación del ácido carboxílico en condiciones suaves.

En esta reacción, el oxígeno de nuestro ácido carboxílico ataca al carbono del acetimidato, que, con la presencia de del ácido de Lewis es un potente electrófilo, en una reacción de sustitución desplazando al *tert*-butóxido y formándose el acetimidato correspondiente, en una reacción de equilibrio. Posteriormente el anión *tert*-butóxido desplaza el equilibrio atacando al carbono carboxílico de nuestra molécula, en otra reacción de sustitución, formándose el éster *tert*-butílico, **6**, y el 2,2,2-tricloroacetamida.¹⁶

La evolución de la reacción se seguía mediante cromatografía de capa fina, pero nunca se observó que el producto de partida se acabara. Después de 3 horas damos la reacción por finalizada, ya que no se veía evolución de la reacción. Después del tratamiento del crudo de reacción y su posterior purificación por columna de gel sílice se obtuvo **6** con un rendimiento del 74 %.

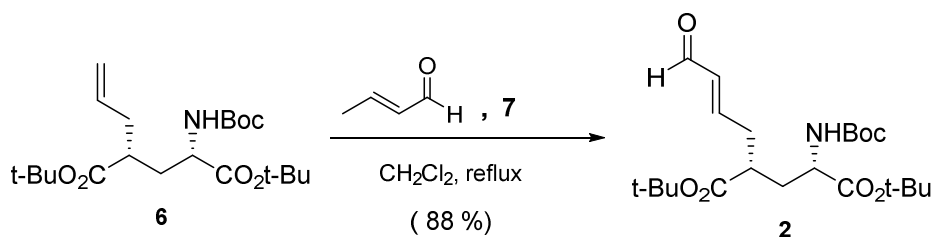
En el espectro de resonancia magnética de protón realizado al producto **6** se observa una nueva señal a δ 1.39 en forma de singlete y que integra 9 protones confirmando la presencia del nuevo grupo *terc*-butílico. Además, en el espectro no se observa la presencia de la señal del protón del ácido a δ 9.9 como se observaba para la molécula **5**. La formación del producto se confirma con el espectro obtenido de resonancia magnética de carbono donde nos revela una nueva señal a δ 173.4 que confirma la aparición del nuevo grupo éster formado así como la nueva señal obtenida a δ 80 que corresponde al carbono terciario del grupo *terc*-butílico.

3.5. Síntesis de (2*S*,4*R*)-2-[(*terc*-butoxicarbonilo)amino]-4-[(*E*)-4-oxobut-2-en-1-ilo] pentanodioato de di-*terc*-butilo, **2**.

A este paso de reacción tenemos el esqueleto del glutamato, con todos los grupos funcionales protegidos en forma de éster o carbamato, con una cadena alílica. Por esta cadena alílica es por donde se unirá el fragmento de glutamato al interruptor molecular. Para facilitar esta unión se añadirá un grupo aldehído de un carbono, **2** que será nuestro intermedio para posteriormente formar el precursor de glutamato que irá unido al interruptor.

Para llevar a cabo la introducción de este grupo aldehído se hace una metátesis del doble enlace de la cadena alílica. El método que se escogió para esta síntesis es la metátesis de olefinas de Grubbs. El catalizador que se utiliza es el de Hoveyda-Grubbs de 2ª generación, **7** (véase en Índice de fórmulas).^{17,18}

El catalizador de Hoveyda-Grubbs hace la metátesis entre la molécula **6** y el crotonaldehído para darnos la molécula **2** tal y como muestra el esquema 11. Se trata de una reacción intermolecular en la que las dos olefinas se intercambian los grupos (cross metathesis) dando el producto final. La reacción se hace a reflujo, en condiciones anhidras y bajo atmósfera inerte debido a la sensibilidad de este catalizador al oxígeno y humedad.



Esquema 11. Metátesis de olefinas del compuesto **6**.

Debido al alto precio del catalizador se optimizó la reacción utilizando la menor cantidad de **7** (1.7 % mol). Como se trabaja con muy poca cantidad de catalizador, se añadirá, éste, en pequeñas porciones al crudo de reacción para aumentar, de esta manera, su actividad catalítica. Antes de que le catalizador inicie el ciclo catalítico de la metátesis, primero éste debe activarse en un proceso dinámico en donde se libera el estireno a partir de la metátesis cruzada entre el precursor y la olefina para generar la especie activa, que una vez se ha consumido todo el sustrato, puede retornar el estireno liberado y generar de nuevo el precursor (efecto

boomerang) tal y como se muestra en la figura 11, aunque el mecanismo de recuperación siguen en procesos de estudios.¹⁹

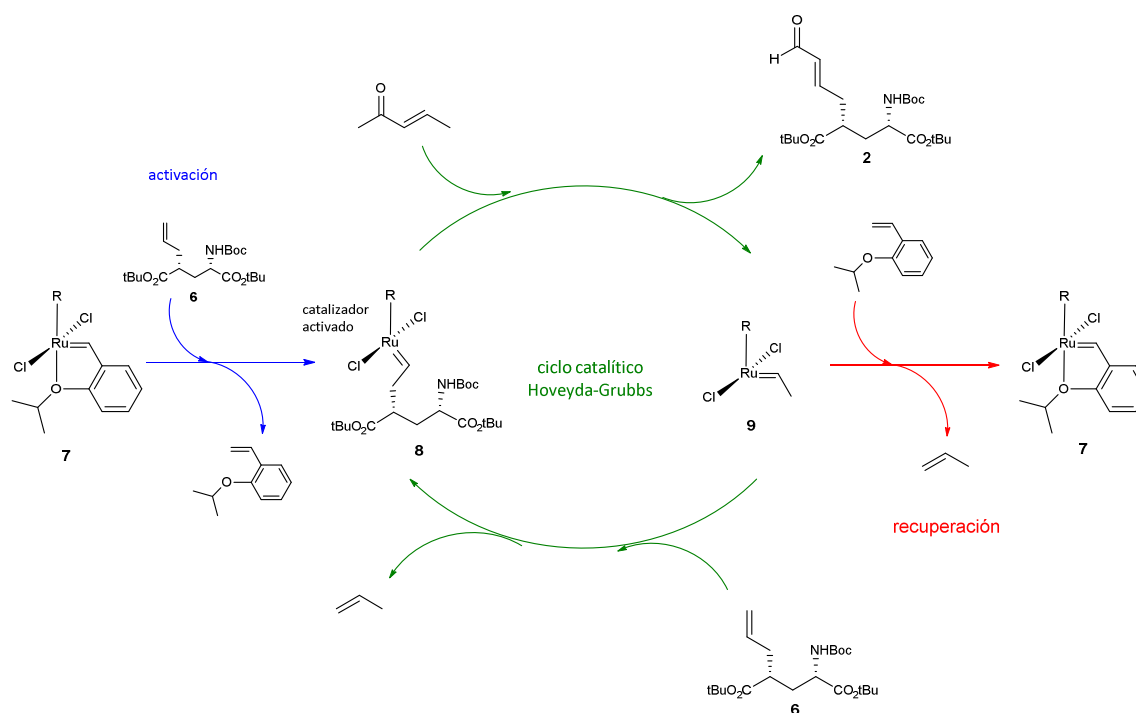


Figura 11. Mecanismo de acción del catalizador Hoveyda-Grubbs simplificado. (en el anexo II muestra el ciclo catalítico)

En ciclo catalítico, el catalizador activado **8** (carbeno metálico) enlazado con la molécula **6**, en el crotonaldehído en su esfera de coordinación. Se produce una cicloadición [2+2] entre el crotonaldehído y el carbeno metálico formando un metalociclobutano, donde su posterior cicloreversión nos da la molécula **2** en forma de olefina *cis* y el carbeno metálico correspondiente **9**. El nuevo carbeno formado, primero libera la molécula **2** de su esfera de coordinación y posteriormente mediante otra cicloadición y cicloreversión entre **9** y **6** volvemos a tener el carbeno metálico **8** con la liberación de propeno, donde nuevamente **8** volverá a iniciar un nuevo ciclo catalítico (Anexo II). Gracias a los factores estéricos y electrónicos del catalizador, la estereoquímica de la reacción siempre nos da nuestro producto en *cis* (reacción estereoselectiva).²⁰

De esta manera, después del tratamiento del crudo de reacción y su purificación mediante cromatografía de gel sílice, utilizando 1.7 % de catalizador se obtuvo un rendimiento del 88 %.

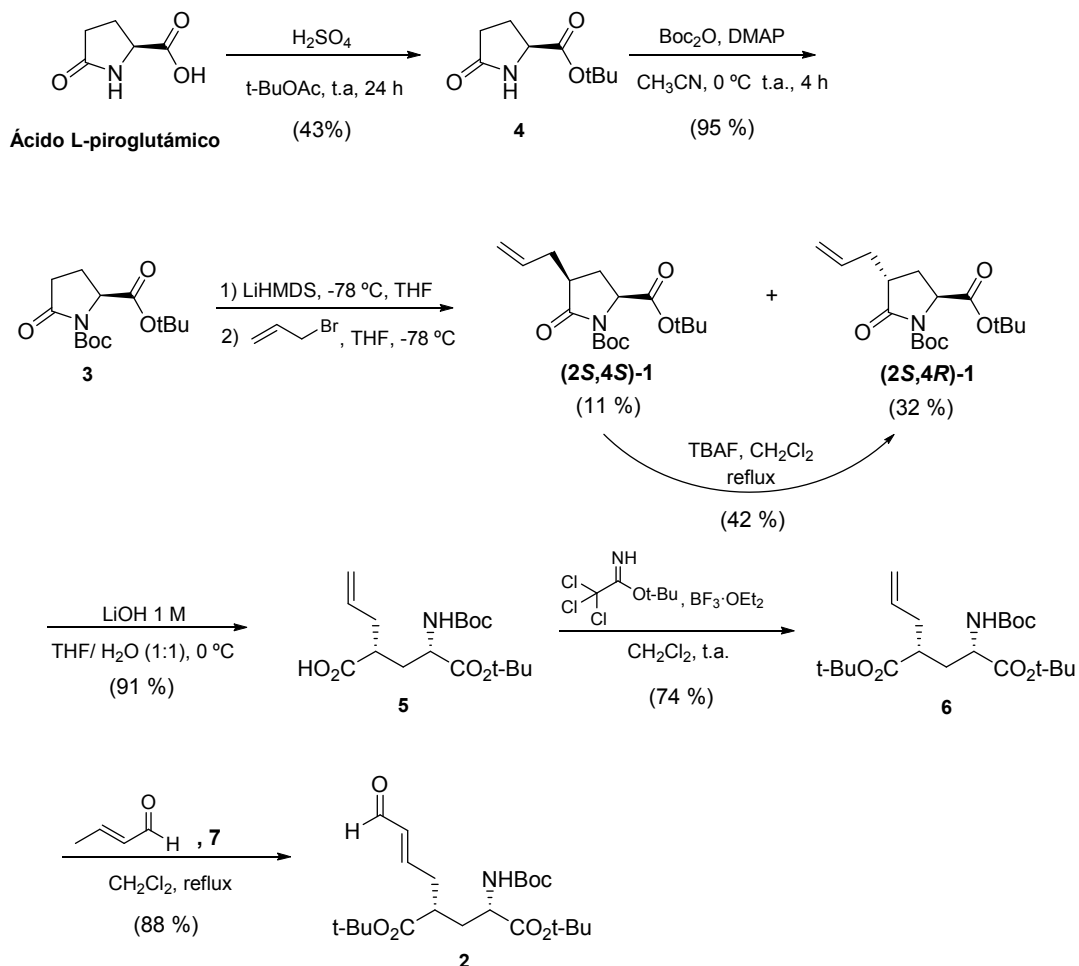
El espectro de resonancia magnética de protón del producto **2** revela la aparición de la nueva señal en forma de doblete a δ 9.50, integrando un protón característica de los aldehídos. Esta señal se acopla con la señal del protón H-3' ($J_{\text{CHO},3'} = 7.8$ Hz). Por otro lado, en el espectro de resonancia de carbono se observa la nueva señal δ 193.6 correspondiente con el carbono carbonílico del aldehído.

IV. Conclusiones

En este trabajo de Fin de Grado se ha conseguido sintetizar el intermedio **2**, a partir del ácido L-pirolglutámico comercial y mediante una ruta sintética de 6 pasos con un rendimiento global del 6 %. Este precursor de glutamato que formará parte del sistema MAG en posteriores estudios.

Para ello se ha conseguido:

- Realizar el escalado de las dos primeras reacciones, obteniendo aproximadamente unos 6 g del producto **3**, con un rendimiento global de las dos primeras etapas del 41 %.
- Estudiar y optimizar la obtención del intermedio clave **(2S,4R)-1**, mediante la alquilación de la lactama **3**. Desafortunadamente, pese a probar varias condiciones de reacción para obtener este producto con el mayor rendimiento posible, no se ha conseguido tener un rendimiento mayor al 32 %, aunque sí se ha conseguido ganar reproducibilidad en la reacción. No obstante se ha conseguido obtener dicho intermedio a partir de su diastereoisómero **(2S,4S)-1** no deseado y subproducto de la reacción de alquilación. De esta manera se obtuvo un rendimiento total del 37 % de **(2S,4R)-1**.



Esquema 12. Ruta sintética para la obtención del precursor de glutamato.

- Avanzar hasta el intermedio **2** a partir de **1**, mediante tres pasos de reacción con un rendimiento global de estas tres transformaciones del 60 %.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Métodos de caracterización

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se han registrado en el *Servicio de Resonancia Magnética Nuclear* de la *Universidad Autónoma de Barcelona*. Para los espectros de protón y carbono de 250 MHz se ha utilizado un aparato Bruker AC 250.

Los desplazamientos químicos δ se da en ppm, utilizando como referencia interna el propio disolvente deuterado (CDCl_3). Las abreviaturas usadas para describir la multiplicidad de las absorciones son las siguientes: s (singlete), d (doblete), t (triplete), dd (doblete de doblete), dt (doblete de triplete), td (triplete de doblete), m (multiplete).

Cromatografía

Las cromatografías de capa fina han sido efectuadas sobre cromofolios Alugram Sil G/UV₂₅₀ de 0.25 mm de grueso. El revelado de las mismas se ha realizado, dependiendo de cada caso, bajo una lámpara de ultravioleta de 254 nm y/o con una solución de KMnO_4 y posterior calentamiento.

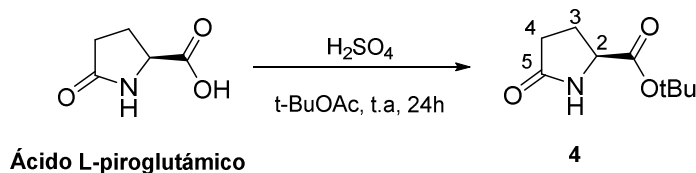
Las cromatografías en columna se han realizado usando gel de sílice de 230-400 mesh como fase estacionaria. La fase móvil de la columna se encuentra indicada para cada caso.

Disolventes anhidros

Para las reacciones sensibles a la presencia de agua, los disolventes han estado previamente anhidridados en mismo día que se realizó la reacción.

5.2 Síntesis de Fragmento de Glutamato

5.2.1. Síntesis de (S)-5-oxopirrolidina-2-carboxilato de *tert*-butilo, **4**



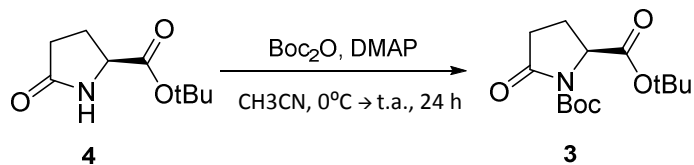
En un matraz de fondo redondo de 250 ml de capacidad, con agitación magnética, se disuelven 5.78 g (44.79 mmol) del ácido L-pirolglutámico, en 70 ml de acetato de *tert*-butilo. Se deja agitar la reacción durante unos 15 min (el ácido no llega a disolverse del todo) y se le añade 3.6 ml de H₂SO₄ (96% en agua, 64.83 mmol). Se deja la mezcla de la reacción en agitación 24 h a temperatura ambiente.

Después de dejar la reacción durante toda la noche se adiciona lentamente 100 ml de una disolución saturada de NaHCO₃ y termino llegando a pH =5-6 añadiéndole poco a poco una disolución de NaOH 30%. El producto se extrae con AcOEt (4 x 100 ml). Se juntan las fases orgánicas y se lavan con 70 ml de una disolución saturada NaHCO₃ y posteriormente con 70 ml de una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida, obteniendo 3.52 g (19 mmol, 43%) de un sólido blanco identificado como (S)-5-oxopirrolidina-2-carboxilato de *tert*-butilo, **4**.

Datos espectroscópicos de **4**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 6.10 (s_(ancho), 1H, H-1), 4.12 (m, 1H, H-2), 2.38 (m, 3H, H-4, H-3), 2.18 (m, 1H, H-3), 1.47 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

5.2.2. Síntesis de (S)-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, **3**.



En un Schlenk de 250 ml de capacidad, con agitación magnética y bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelven 3.60 g (19.5 mmol) de (S)-5-oxopirrolidina-2-carboxilato de *tert*-butilo, **4**, en 90 ml de acetonitrilo anhidro y se enfría a 0 °C. Seguidamente, se adiciona 735 mg (6.02 mmol) de DMAP y 9.88 g (45.25 mmol) de carbonato de di-*tert*-butilo (Boc₂O). Se deja agitando la disolución durante 30 min a 0 °C y luego se deja durante 4 horas a temperatura ambiente. La evolución de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina (hexano/AcOEt 2:1).

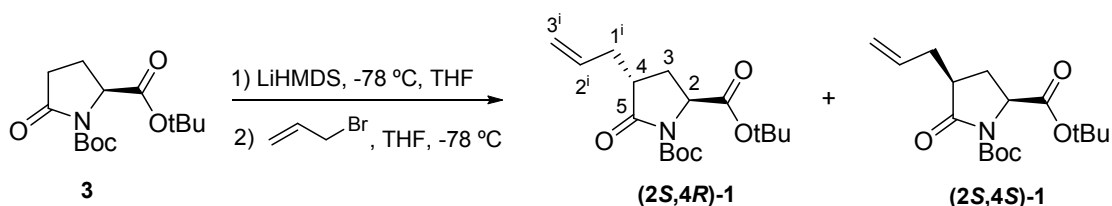
Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente, a presión reducida, hasta llegar a sequedad para obtener un aceite anaranjado. Se purifica el crudo de la reacción con una cromatografía en columna de gel sílice (hexano/AcOEt 2:1) obteniéndose 5.28 g (18.54 mmol, 95 %) de un sólido

parcialmente blanco identificado como (*S*)-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, **3**.

Datos espectroscópicos de 3:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 4.40 (dd, $J_{2,3S}=9.3$ Hz, $J_{2,3R}=2.7$ Hz, 1H, H-2), 2.36 (m, 3H, H-3_R, H-4), 1.91 (m, 1H, H-3_S), 1.43 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.38 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

5.2.3. Síntesis de (2*S*,4*R*)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, (2*S*,4*R*)-1y (2*S*,4*S*)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, (2*S*,4*S*)-1.



En un Schlenck de 50 ml de capacidad, con agitación magnética y bajo atmosfera de nitrógeno (condiciones anhidras), se disuelven 303 mg (1.06 mmol) de (*S*)-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, **3**, en 8 ml de THF anhidro. Se sumerge la disolución en un baño de acetona a -78 °C y se adiciona, gota a gota en un intervalo de 10 minutos, 1.17 ml (1.17 mmol) de LiHMDS (1 M en THF) y se deja agitar durante una hora a -78 °C.

Por otro lado, en un Schlenck de 25 ml de capacidad, con agitación magnética y bajo atmosfera de nitrógeno (condiciones anhidras), se disuelven 0.38 ml (4.25 mmol) de bromuro de alilo en 5 ml de THF anhidro a -78 °C. Transcurrida una hora esta disolución de bromuro de alilo se adiciona vía jeringuilla, gota a gota, en un intervalo de 10 min aprox. al enolato formado en el Schlenck de 50 ml. Se deja agitar la disolución resultante a -78 °C durante 4 horas. La evolución de la reacción se sigue mediante cromatografía de capa fina (hexano/AcOEt 3:1).

Transcurrido este tiempo, no se observa evolución en la capa fina. Se le añade 100 mg de sílica y se deja agitar 5 minutos. Se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniendo un sólido color marrón. El crudo de la reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel sílice (hexano/AcOEt 10:1) obteniéndose 110 mg (0.34 mmol, 32 %) de un sólido parcialmente marrón identificado como (2*S*,4*R*)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, **(2*S*,4*R*)-1** y 38 mg (0.12 mmol, 11 %) de un sólido color marrón identificado como (2*S*,4*S*)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, **(2*S*,4*S*)-1**.

Datos espectroscópicos de (2*S*,4*R*)-1:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 5.74 (ddt, $J_{2',3'trans}=17.0$ Hz, $J_{2',3'cis}=10.1$ Hz, $J_{2',1'}=6.9$ Hz, 1H, H-2ⁱ), 5.08 (m, 2H, H-3ⁱ), 4.41 (dd, $J_{2,3S}=9.6$ Hz, $J_{2,3R}=1.6$ Hz, 1H, H-2), 2.66 (m, 2H, H-1^a, H-4), 2.23-1.91 (m, 3H, H-1^r, 2H-3), 1.52 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.48 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 174.6 (C-5), 170.5 ($\text{CO}_{(\text{éster})}$), 149.5 ($\text{CO}_{(\text{carbamato})}$), 134.5 (C-2 i), 117.7 (C-3 i), 83.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 82.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.9 (C-2), 41.2 (C-4), 34.6 (C-1 i), 28.04 ($2\times\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.0 (C-3).

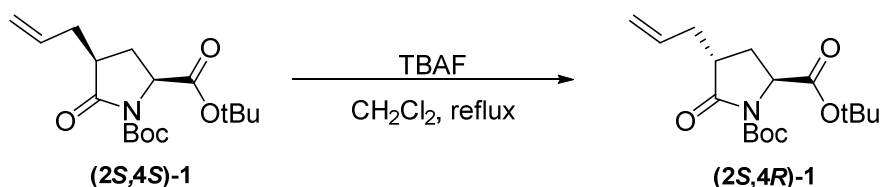
Datos espectroscópicos de (2S,4S)-1:

^1H RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 5.72 (dddd, $J_{2',3'}^{\text{trans}}= 16.5$ Hz, $J_{2',3'}^{\text{cis}}= 10.5$ Hz, $J_{2',1'S}= 7.7$ Hz, $J_{2',1'R}= 5.9$ Hz, 1H, H-2 i), 5.05 (m, 2H, H-3 i), 4.38 (dd, , $J_{2,3S}= 9.3$ Hz, $J_{2,3R}= 5.7$ Hz, 1H, H-2), 2.60 (m, 2H, H-1', H-4), 2.44 (dd, $J_{3R,4}= 13.5$ Hz, $J_{3S,2}= 9.4$ Hz, 1H, H-3 $_S$), 2.21 (m, 1H, H-1 i), 1.70 (dt, 1H, H-3 $_R$), 1.49 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.47 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 174.9 (C-5), 170.7 ($\text{CO}_{(\text{éster})}$), 149.6 ($\text{CO}_{(\text{carbamato})}$), 134.9 (C-2 i), 117.7 (C-3 i), 83.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 82.2 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 58.2 (C-2), 42.2 (C-4), 35.5 (C-1 i), 28.0 ($2\times\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.4 (C-3).

5.2.4. Epimerización de (2S,4S)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, (2S,4S)-1.

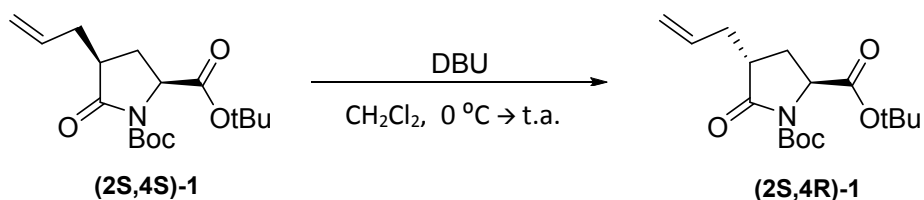
5.2.4.1. Epimerización de (2S,4S)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, (2S,4S)-1. Utilización de TBAF como base catalítica.



En un matraz de fondo redondo de 50 ml de capacidad, con agitación magnética, se disuelven 155 mg (0.48 mmol) de (2S,4s)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, (2S,4S)-1, en 2.5 ml de CH_2Cl_2 a 0 °C. A esta temperatura, se le adiciona lentamente 0.52 ml (0.52 mmol) de fluoruro de tetrabutilamonio, TBAF (1 M, THF). Una vez adicionado, se lleva la mezcla de reacción a reflujo y se deja evolucionar 2 horas. La evolución de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina (hexano/ AcOEt 3:1). No desaparece reactivo de partida.

Transcurrido este tiempo, se le añade al balón 10 ml de una disolución saturada de NH_4Cl , se deja agitar y se decantan las dos fases. El producto se extrae con AcOEt (2x 10 ml) se combinan las fases orgánicas y se secan con Na_2SO_4 anhidro. Se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida hasta llegar a sequedad, obteniendo un aceite marrón. Se purifica el crudo con una cromatografía en columna de gel sílice (hexano/AcOEt 10:1) obteniéndose 65 mg (0.2 mmol, 42%) de un sólido parcialmente marrón identificado como (2S,4R)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, (2S,4R)-1.

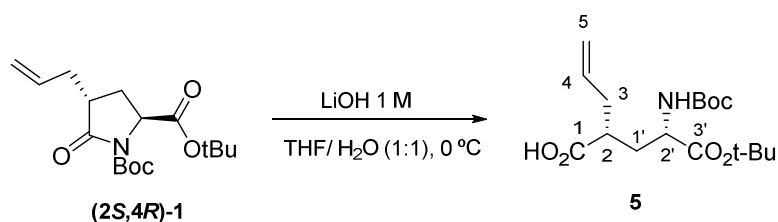
5.2.4.2 Epimerización de (2S,4S)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, (2S,4S)-1. Utilización de DBU como base catalítica.



En un matraz de fondo redondo de 10 ml de capacidad, con agitación magnética, se disuelven 72 mg (0.22 mmol) de (2*S*,4*S*)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, **(2*S*,4*S*)-1**, en 2 ml de CH₂Cl₂ a 0 °C. A esta temperatura, se le adiciona lentamente 120 µl (0.88 mmol) de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, DBU. Se deja agitar la disolución durante 2 días a temperatura ambiente. La evolución de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina (hexano/ AcOEt 3:1). No desaparece reactivo de partida.

Transcurrido este tiempo, diluyo la disolución con 2 ml de CH₂Cl₂. Se hacen lavadas con HCl 10% (2 x 3 ml), 3 ml de H₂O y 3 ml de una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro. Se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida hasta llegar a sequedad, obteniendo un aceite marrón. Se purifica el crudo con una cromatografía en columna de gel sílice (hexano/AcOEt 10:1) obteniéndose 12.3 mg (0.038 mmol, 17%) de un sólido parcialmente marrón identificado como (2*S*,4*R*)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, **(2*S*,4*R*)-1**.

5.2.5 Síntesis del ácido (2*R*)-2- {(2*S*)-3-*tert*-butoxicarbonilo-2-[(*tert*-butoxicarbonilo)amino]-3-oxopropilo}-4-pentanoico, **5**.



En un matraz de fondo redondo de 100 ml de capacidad, con agitación magnética, se disuelven 600 mg (1.84 mmol) de (2*S*,4*R*)-4-alil-5-oxopirrolidina-1,2-dicarboxilato de di-*tert*-butilo, **(2*S*,4*R*)-1**, en 14 ml de THF y 11.2 ml de H₂O. La disolución resultante se sumerge en un baño de agua-hielo, a 0 °C, y se adicionan 2.8 ml de LiOH 1M (2.8 mmol). Se deja la reacción agitando durante 2 horas a 0 °C. La evolución de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina (hexano/ AcOEt 1:1).

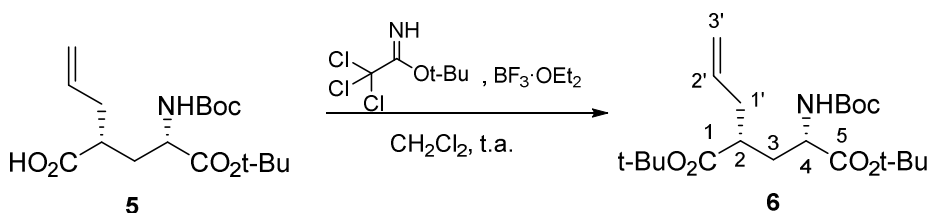
Transcurrido este tiempo, y después de ver que no hay reactivo de partida, se añade una solución de HCl 5% hasta llegar a un pH 2-3. El producto se extrae con AcOEt (3 x 25 ml). Se combinan las fases orgánicas y se secan con Na₂SO₄ anhidro. A continuación, se filtra y se evapora el disolvente obteniendo un aceite amarillo. Se purifica el crudo con cromatografía de gel sílice (hexano/AcOEt 1:1) obteniéndose 576 mg (1.67 mmol, 91%) de un sólido de color amarillo-pardo identificado como el ácido (2*R*)-2- {(2*S*)-3-*tert*-butoxicarbonilo-2-[(*tert*-butoxicarbonilo)amino]-3-oxopropilo}-4-pentanoico, **5**.

Datos espectroscópicos de **5**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 9.94 (b, 1H, -COOH), 5.61 (m, 1H, H-4), 5.28 (d, *J*_{NH,2'} = 6.7 Hz, 1H, -NH-), 5.0 (m, 2H, H-5), 4.22 (m, 1H, H-2ⁱ), 2.35 (m, 4H, H-2, H-3, H-1^s), 1.63 (m, H-1^r), 1.45 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.45 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

^{13}C RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 178.8 (-COOH), 171.4 (C-3ⁱ), 156.5 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 134.5 (C-4), 117.3 (C-5), 81.9 (-C(CH₃)₃), 80.9 (-C(CH₃)₃), 52.4 (C-2ⁱ), 41.3 (C-2), 36.2 (C-1ⁱ), 33.5 (C-3), 28.1 (-C(CH₃)₃), 27.7 (-C(CH₃)₃).

5.2.6. Síntesis de (2R,4S)-2-alilo-4-[(*tert*-butoxicarbonilo)amino] pentanodiodato de di-*tert*-butilo, 6.



En un matraz de fondo redondo de 2 bocas de 50 ml de capacidad con agitación magnética y bajo atmosfera de argón (condiciones anhidras), se disuelven 500 mg (1.46 mmol) de ácido (2R)-2-[(2S)-3-*tert*-butoxicarbonilo-2-[(*tert*-butoxicarbonilo)amino]-3-oxopropilo]-4-pentanoico, **5**, en 13 ml de CH_2Cl_2 anhidro. Se adiciona 0.52 ml (2.91 mmol) de 2,2,2-tricloroacetimidato de *tert*-butilo y 73 μl (0.58 mmol) de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Se deja agitando la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Al cabo de 3 horas damos la reacción por finalizada. La evolución de la reacción se sigue por cromatografía de capa fina (hexano/AcOEt 3:1).

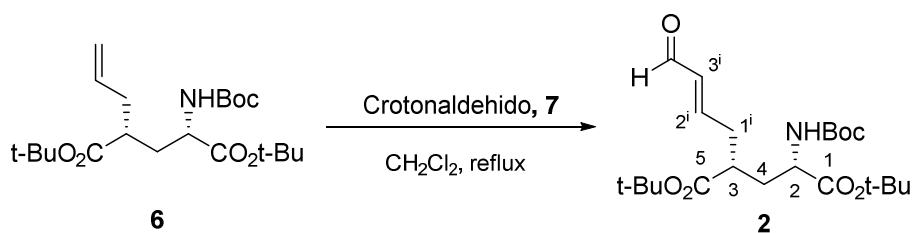
Transcurrido ese tiempo, se le añade al balón 3 ml de una disolución saturada de $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) y se deja agitar 5 min. El producto se extrae en un embudo de decantación con CH_2Cl_2 (3x 7 ml). Se combinan las fases orgánicas y se secan con Na_2SO_4 anhidro. Se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida hasta llegar a sequedad, obteniendo un aceite amarillento. Se purifica el crudo con una cromatografía en columna de gel sílice (hexano/AcOEt 3:1) obteniéndose 429 mg (1.07 mmol, 74%) de un sólido parcialmente amarillo identificado como (2R,4S)-2-alilo-4-[(*tert*-butoxicarbonilo)amino]pentanodiodato de di-*tert*-butilo, **6**.

Datos espectroscópicos de 6:

^1H RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 5.51 (ddt, $J_{2',3'}^{\text{trans}} = 16.8$ Hz, $J_{2',3'}^{\text{cis}} = 10.2$ Hz, $J_{2',1'} = 6.8$ Hz, 1H, H-2ⁱ), 4.85 (m, 3H, H-3ⁱ, -NH-), 4.19 (m, 1H, H-4), 2.33 (m, 2H, H-2, H-1ⁱ_S), 2.12 (m, 2H, H-3, H-1ⁱ_R), 1.63 (m, 1H, H-3), 1.41 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.41 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.39 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

^{13}C RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 173.4 (C-5), 171.3 (C-1), 155.0 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 134.7 (C-2ⁱ), 116.7 (C-3ⁱ), 81.2 (-C(CH₃)₃), 80.2 (-C(CH₃)₃), 78.9 (-C(CH₃)₃), 52.3 (C-4), 41.9 (C-2), 36.6 (C-1ⁱ), 33.6 (C-3), 28.0 (-C(CH₃)₃), 27.7 (-C(CH₃)₃), 27.6 (-C(CH₃)₃).

5.2.7 Síntesis de (2*S*,4*R*)-2-[(*tert*-butoxicarbonilo)amino]-4-[(*E*)-4-oxobut-2-en-1-ilo] pentanodioato de di-*tert*-butilo, **2**.



En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 50 ml de capacidad, con agitación magnética y bajo condiciones anhidras (atmósfera de argón), se disuelven 442 mg (1.11 mmol) de (2*R*,4*S*)-2-alilo-4-[(*tert*-butoxicarbonilo)amino] pentanodioato de di-*tert*-butilo, **6**, en 5 ml de CH₂Cl₂ anhidro.

Paralelamente se coge un matraz de fondo redondo de dos bocas de 5 ml de capacidad, con agitación magnética y bajo atmósfera de argón y se disuelven 17 mg (0.02 mmol) de catalizador de Grubbs de 2^a generación, **7**, en 2 ml de CH₂Cl₂ anhidro.

Al balón de 50 ml, donde tenemos **6**, se le adiciona 0.5 ml (5.53 mmol) de crotonaldehído y 1 ml de la disolución del catalizador, del balón de 5 ml, y se lleva a reflujo. Pasados 40 min de reflujo se le adiciona el otro mililitro de catalizador a la mezcla de reacción. Se lava el balón de 5 ml con 0.5 ml de CH₂Cl₂ anhidro y se sigue dejando refluir hasta alcanzar las 3 horas de reacción. La evolución de la reacción se sigue mediante cromatografía de capa fina (hexano/AcOEt 3:1).

Transcurrido este tiempo no se observa producto de partida, se para el reflujo y se evapora el disolvente bajo presión reducida hasta llegar a sequedad obteniendo un aceite negro. El crudo se purifica con cromatografía en columna de gel sílice (hexano/AcOEt gradiente de elución 3:1 a 2:1) obteniéndose 416 mg (0.97 mmol, 88 %) de un aceite color amarillo identificado como (2*S*,4*R*)-2-[(*tert*-butoxicarbonilo)amino]-4-[(*E*)-4-oxobut-2-en-1-ilo] pentanodioato de di-*tert*-butilo, **2**.

Datos espectroscópicos de **2**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 9.51 (d, $J_{\text{CHO},3'} = 7.8$ Hz, 1H, -CHO), 6.77 (dt, $J_{2',3'} = 15.7$ Hz, $J_{2',1'} = 6.9$ Hz, 1H, H-2ⁱ), 6.14 (dd, $J_{3',2'} = 15.7$ Hz, $J_{3',\text{CHO}} = 7.8$ Hz, 1H, H-3ⁱ), 4.24 (m, 1H, H-2), 2.61 (m, 3H, H-1ⁱ, H-4), 2.19 (m, 2H, H-3_R), 1.68 (m, 1H, H-3_S), 1.45 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.42 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 1.41 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

¹³C RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 193.6 (-CHO), 173.0 (C-5), 171.4 (C-1), 155.3 (CO_{carbamato}), 154.4 (C-2ⁱ), 134.7 (C-3ⁱ), 82.6 (-C(CH₃)₃), 81.9 (-C(CH₃)₃), 80.2 (-C(CH₃)₃), 52.8 (C-2), 41.9 (C-4), 35.6 (C-1ⁱ), 34.9 (C-3), 28.6 (-C(CH₃)₃), 28.3 (-C(CH₃)₃), 28.3 (-C(CH₃)₃).

VI. Bibliografía

- ¹ Balzani, V.; Venturi, M.; Credi, A. *Molecular Devices and Machines*. VCH: Weinheim, Germany, **2003**.
- ² Brun, M. A.; Tan, K. T.; Griss, R.; Kielkowska, A.; Reymond, L.; Johnsson, K. J. *Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7676-7678.
- ³ MRC Centre for Synaptic Plasticity [Bristol]: University of Bristol, 2002. <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/receptors/> [consulta: agosto 2014].
- ⁴ Halabieh, R.; Mermut, O.; Barrett, C. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1445-1465
- ⁵ Gascón, M.; Alibés, R.; Busqué, F.; Hernando, J. *Ph.D. Thesis*, UAB. **2014**
- ⁶ a) Bissell, R. A.; Cordova, E.; Kaifer, A. E.; Stoddart, J. F. *Nature* **1994**, *369*, 133-137. (b) Badjic, J. D.; Balzani, V.; Credi, A.; Silvi, S.; Stoddart, J. F. *Science* **2004**, *303*, 1845-1849.
- ⁷ Gorostiza, P.; Isacoff, E. Y. *Science* **2008**, *322*, 395-399.
- ⁸ Gorostiza, P.; Isacoff, E. Y. *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 686-704.
- ⁹ Szobota, S.; Gorostiza, P.; Del Bene, F.; Wyart, C.; Fortin, D. L.; Kolstad, K. D.; Tulyathan, O.; Volgraf, M.; Numano, R.; Aaron, H.L.; Scott, E. K.; Trauner, D.; Isacoff, E. Y. *Neuron* **2007**, *54*, 535-545.
- ¹⁰ Volgraf, M.; Gorostiza, P.; Numano, R.; Kramer, R. H.; Isacoff, E. Y.; Trauner, D. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 47-52.
- ¹¹ Gorostiza, P.; Volgraf, M.; Numano, R.; Szobota, S.; Trauner, D.; Isacoff, E.Y. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10865-10870.
- ¹² Volgraf, M.; Gorostiza, P.; Szobota, S.; Helix, M. R.; Isacoff, E. Y.; Trauner, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 260-261
- ¹³ Numano, R.; Szobota, S.; Lau, A. Y.; Gorostiza, P.; Volgraf, M.; Roux, B.; Trauner, D.; Isacoff, E. Y. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6814-6819.
- ¹⁴ Gross, U.; Nieger, M.; Bräse, S. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4740-4742
- ¹⁵ Ezquerro, J.; Pedregal, C.; Rubio, A.; Yruretagoyena, B.; Escribano, A.; Sanchez-Ferrando, F. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 8665-8678.
- ¹⁶ Ten Brink, H. T.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1817-1824.
- ¹⁷ Schrock, R. R.; Hoveyda, A. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4592-4633.
- ¹⁸ Chatterjee, A. K.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.*, *1*, 1751-1753, **1999**.
- ¹⁹ Nuñez, F.; Solans, X.; Rodríguez, L. *Tesis doctoral*, UAB. **2012**.
- ²⁰ (a) Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 8168; (b) Gessler, S.; Randl, S.; Blechert, S. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 9973-9976.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Ciències

Anexo

Síntesis de derivados del glutamato integrantes de nuevos interruptores moleculares para el control fotoinducido de células nerviosas.

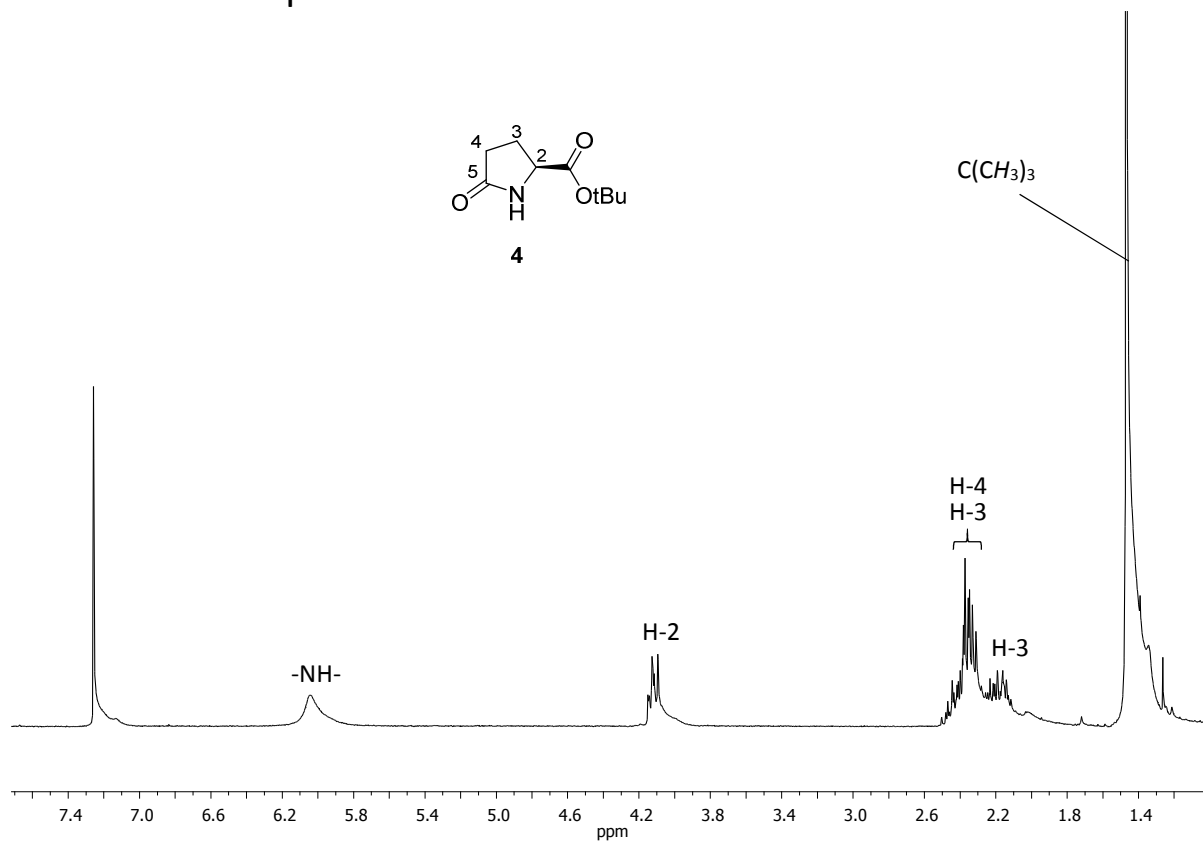
Trabajo Fin de Grado

Sergio Jurado Moreno

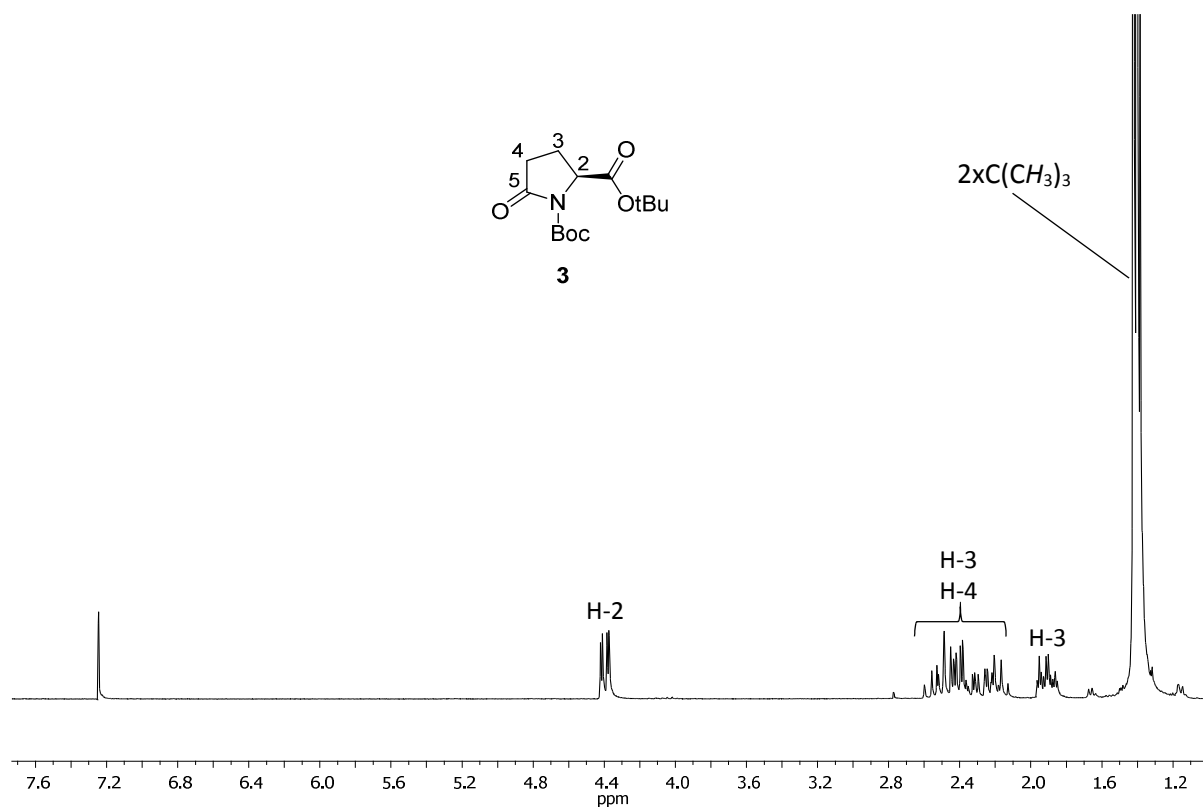
Dirección: Dr. Félix Busqué Sánchez

Septiembre 2014

I. Índice de Espectros

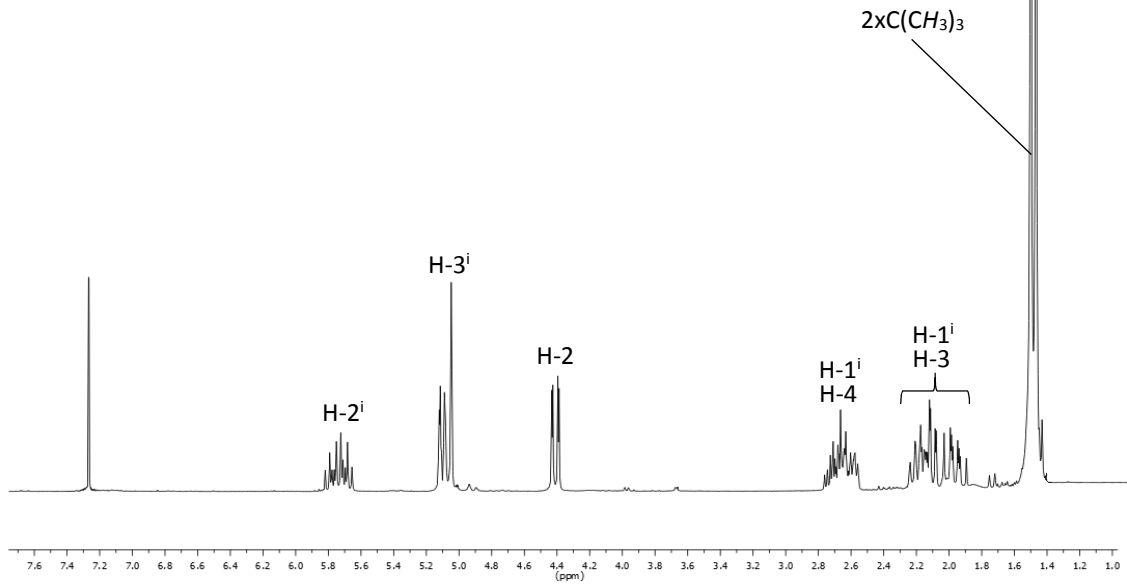
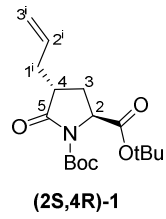


$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3)

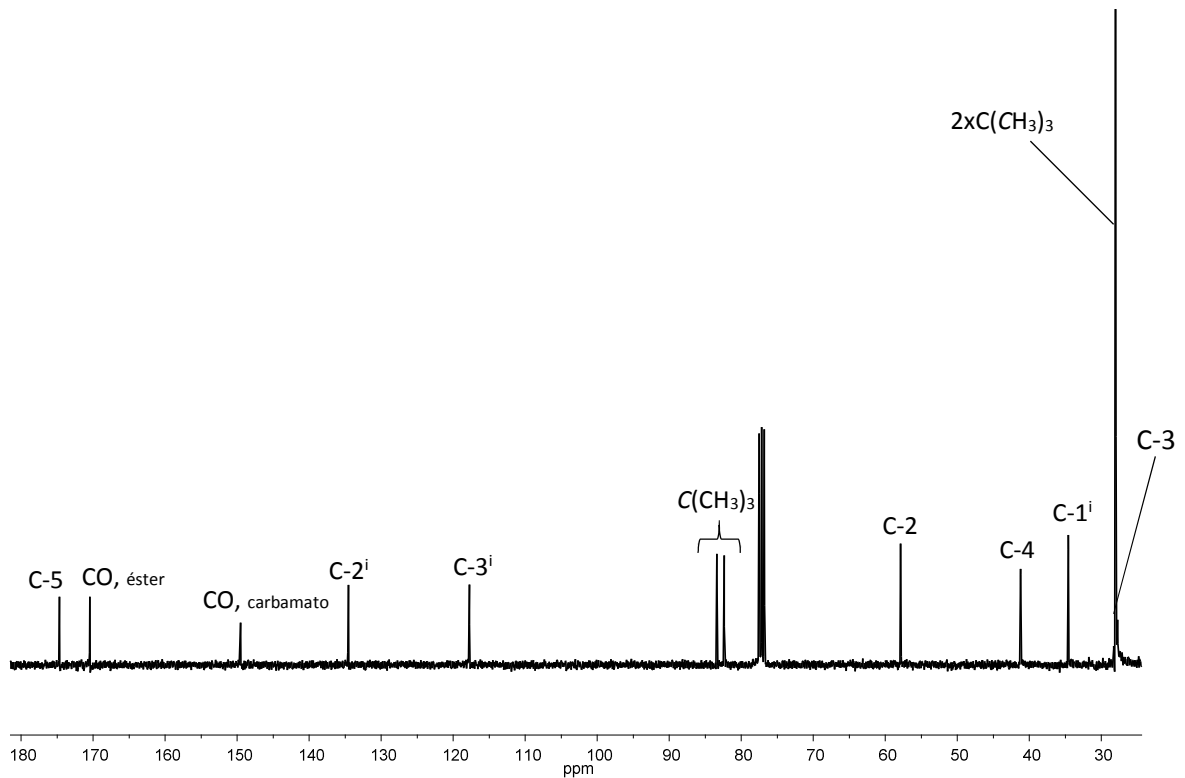


$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3)

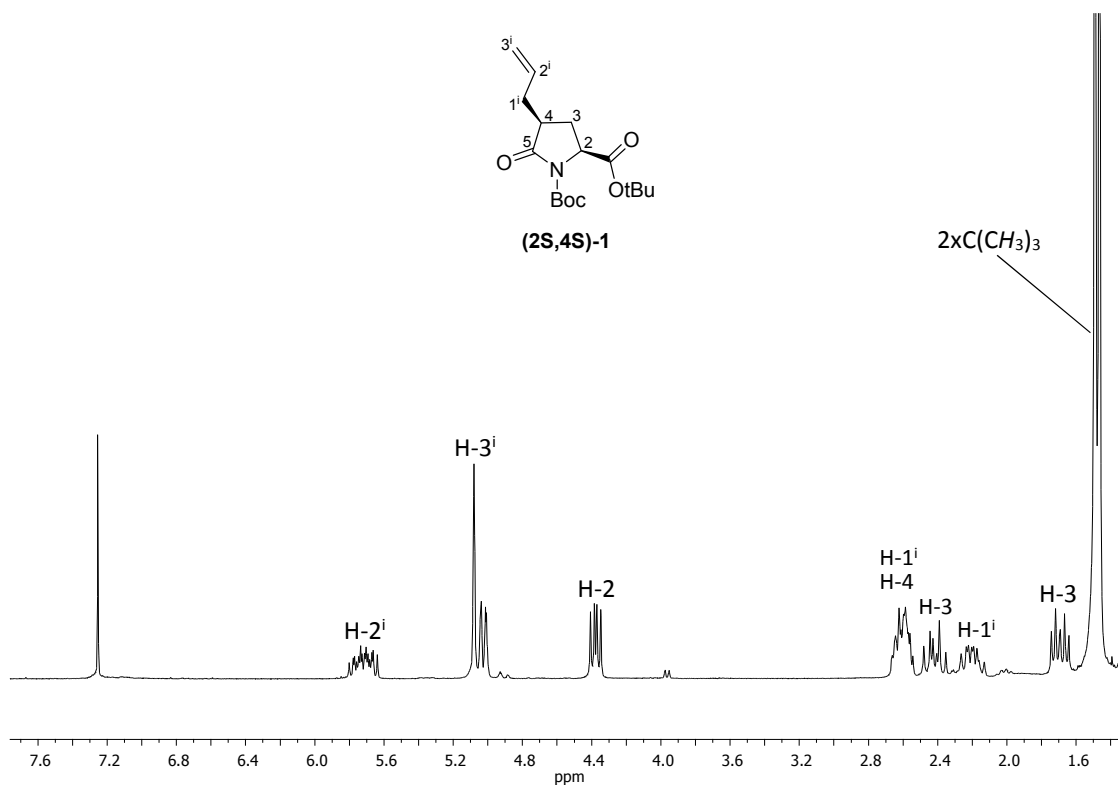
Síntesis derivado de glutamato para formar parte del sistema MAG.



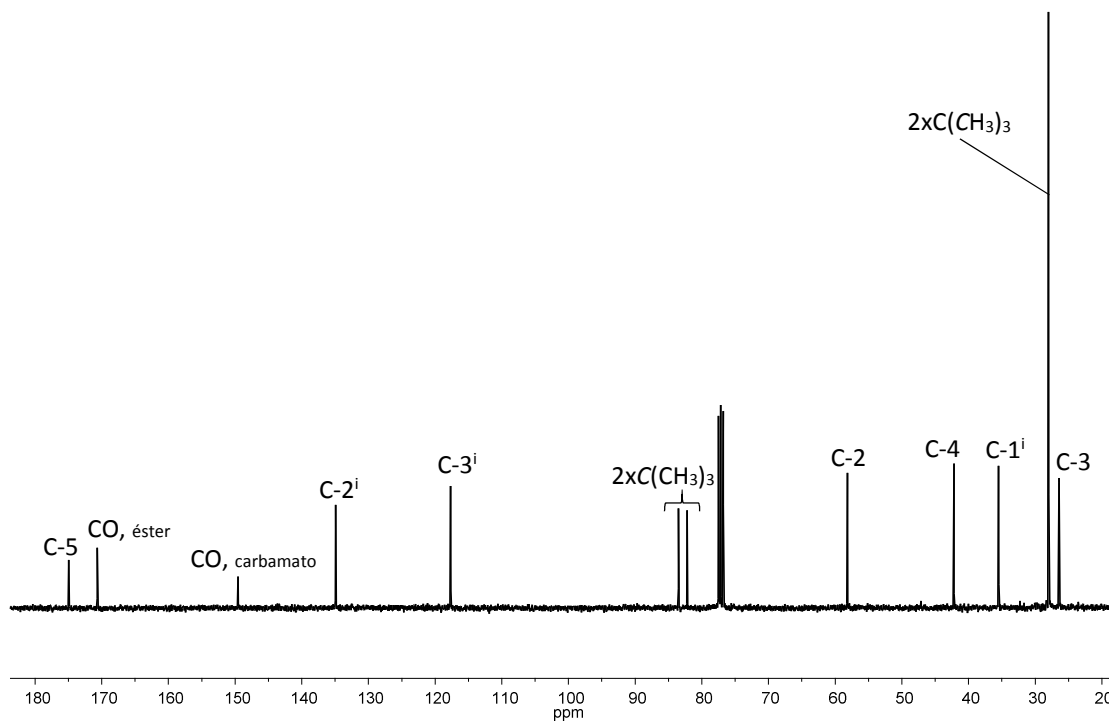
¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃)



¹³C-RMN (250 MHz, CDCl₃)

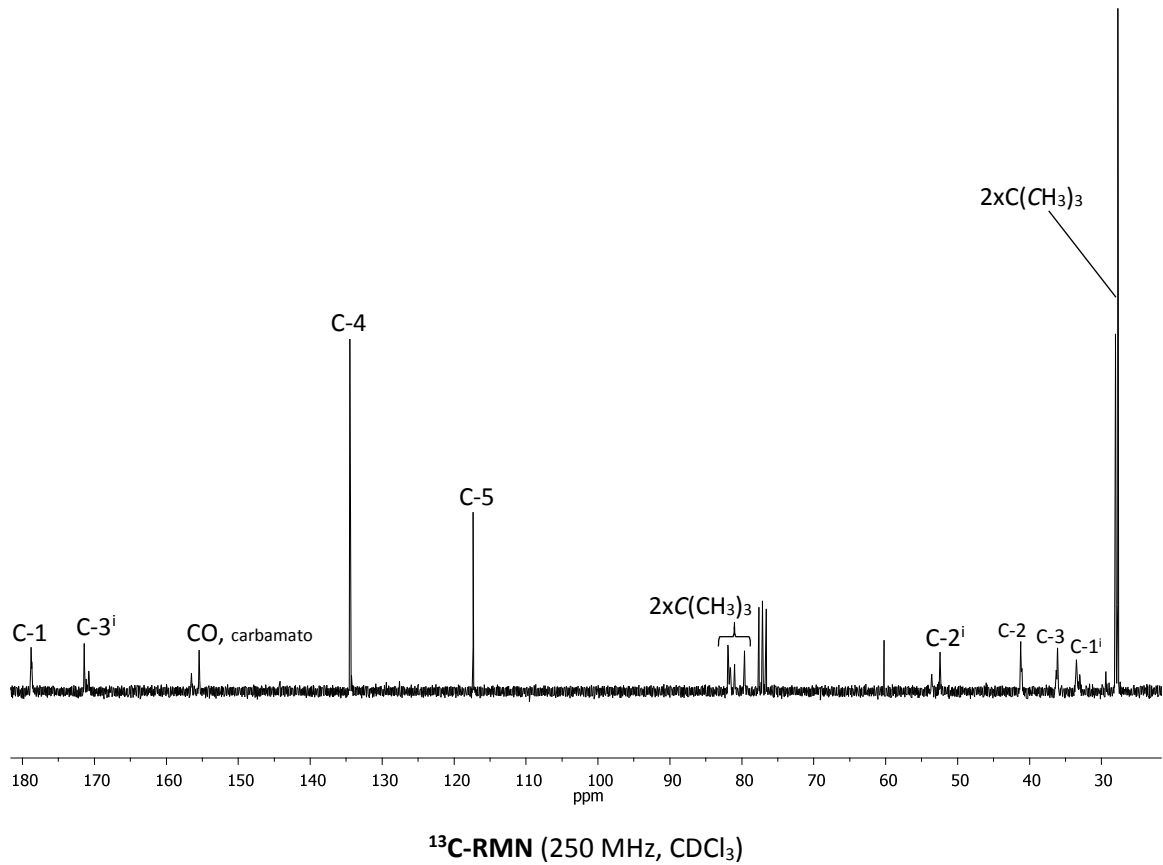
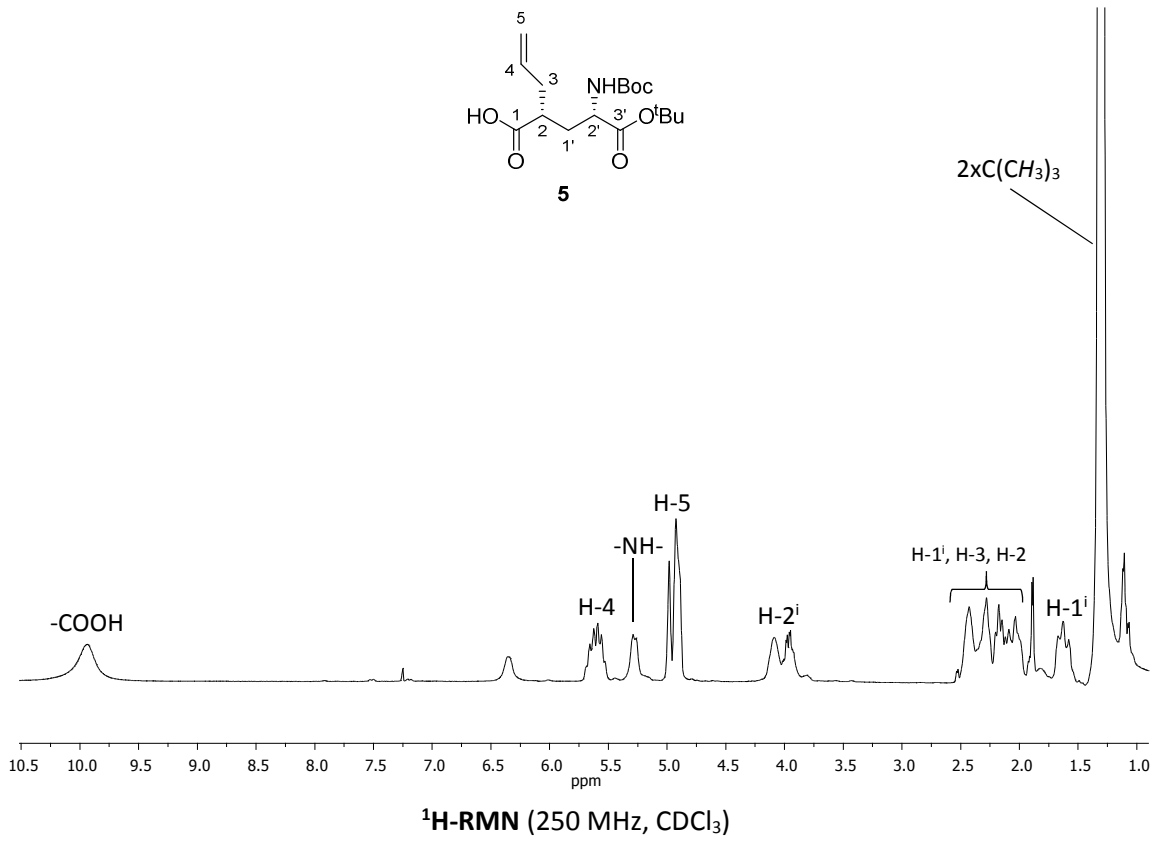


¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃)

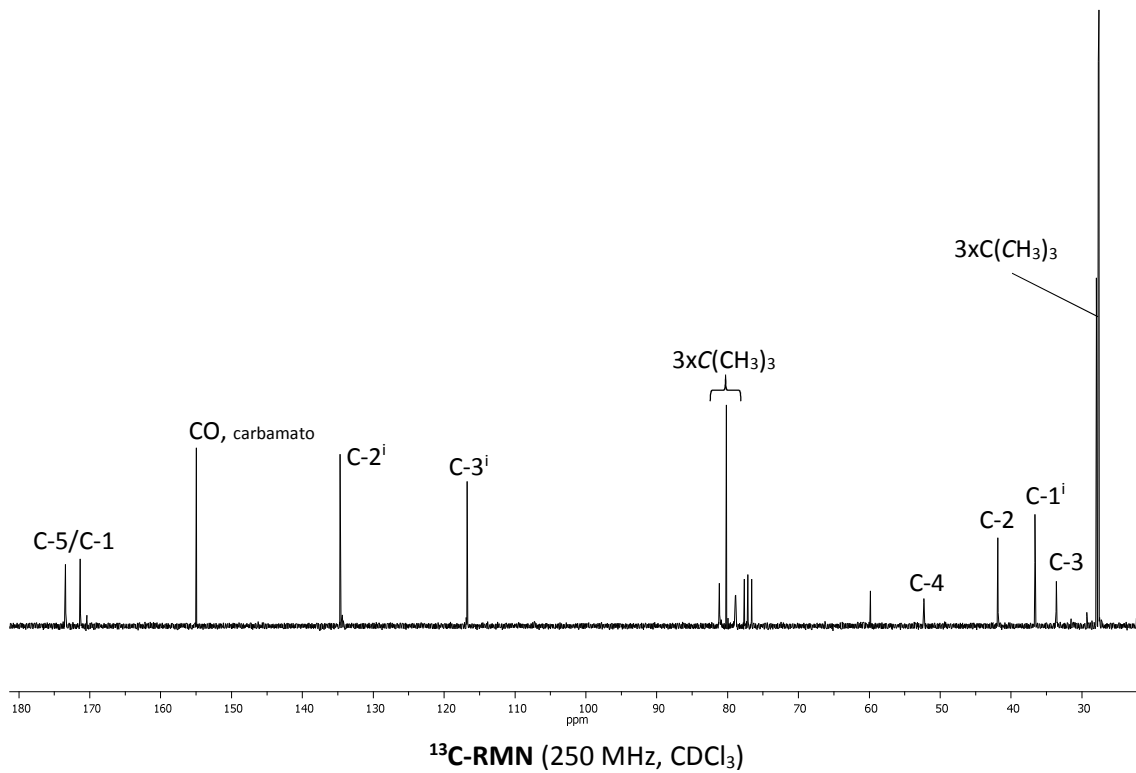
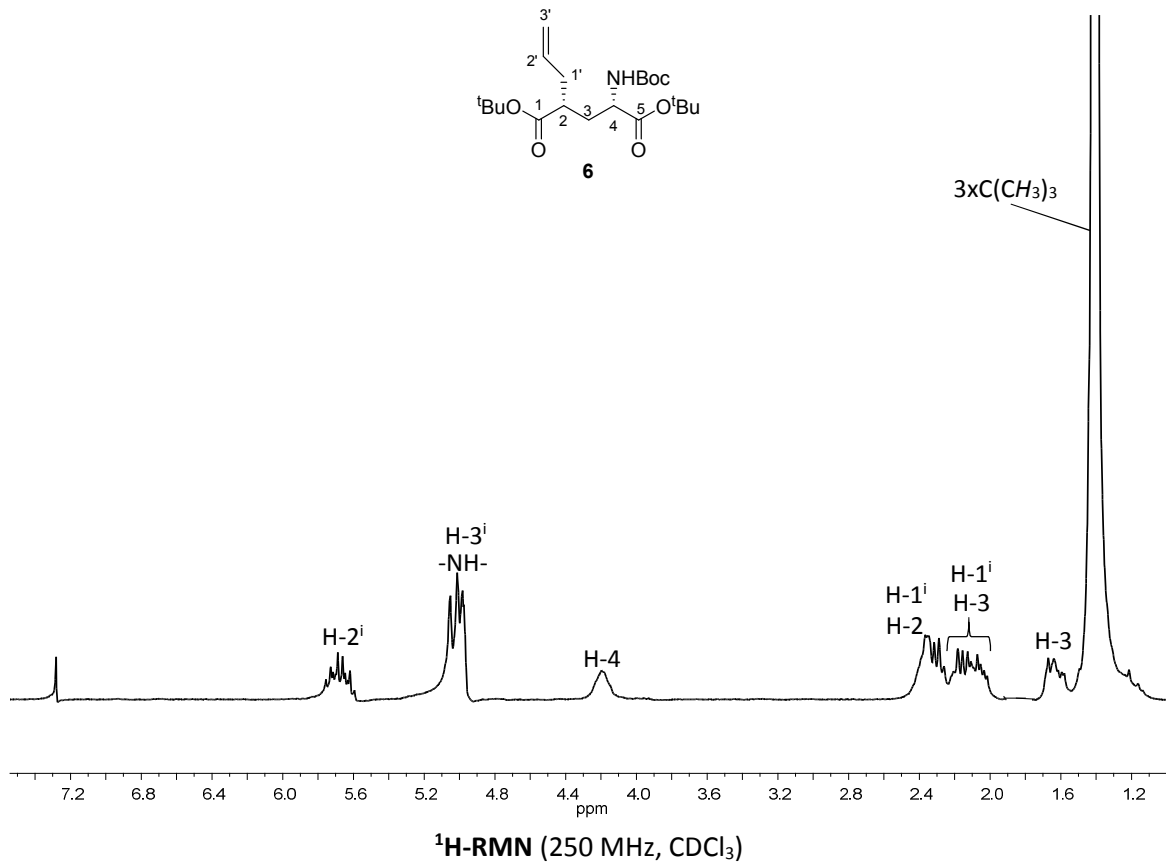


¹³C-RMN (250 MHz, CDCl₃)

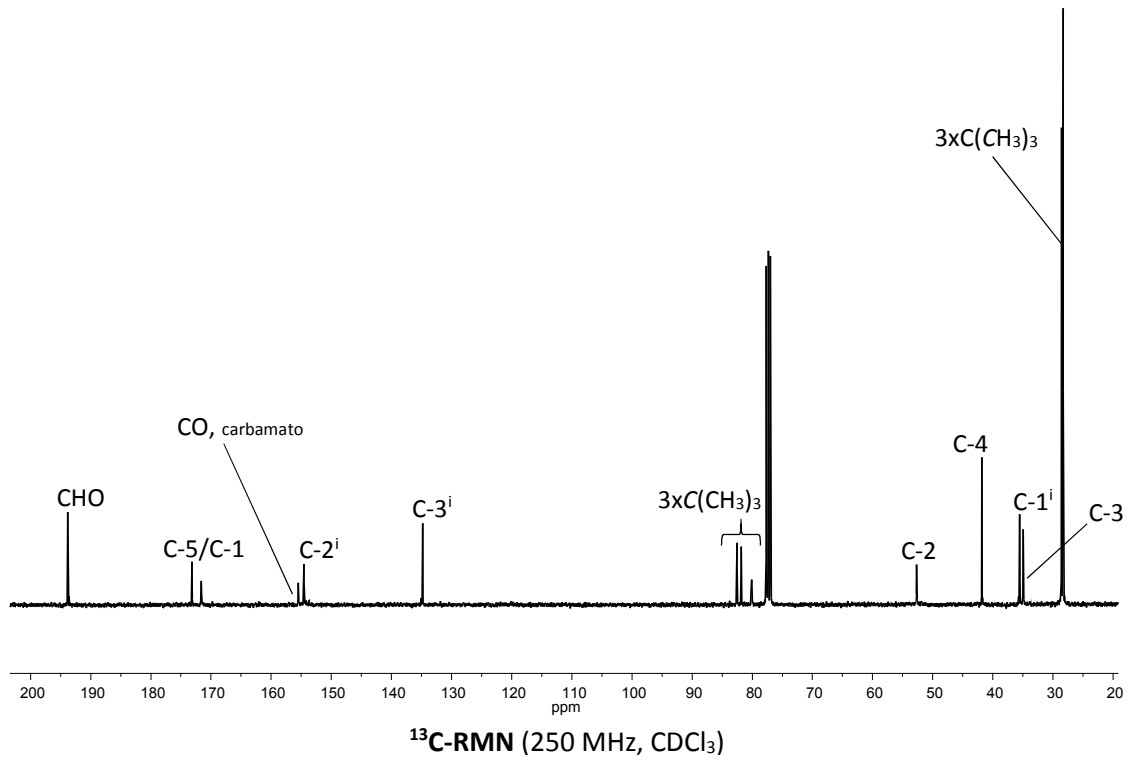
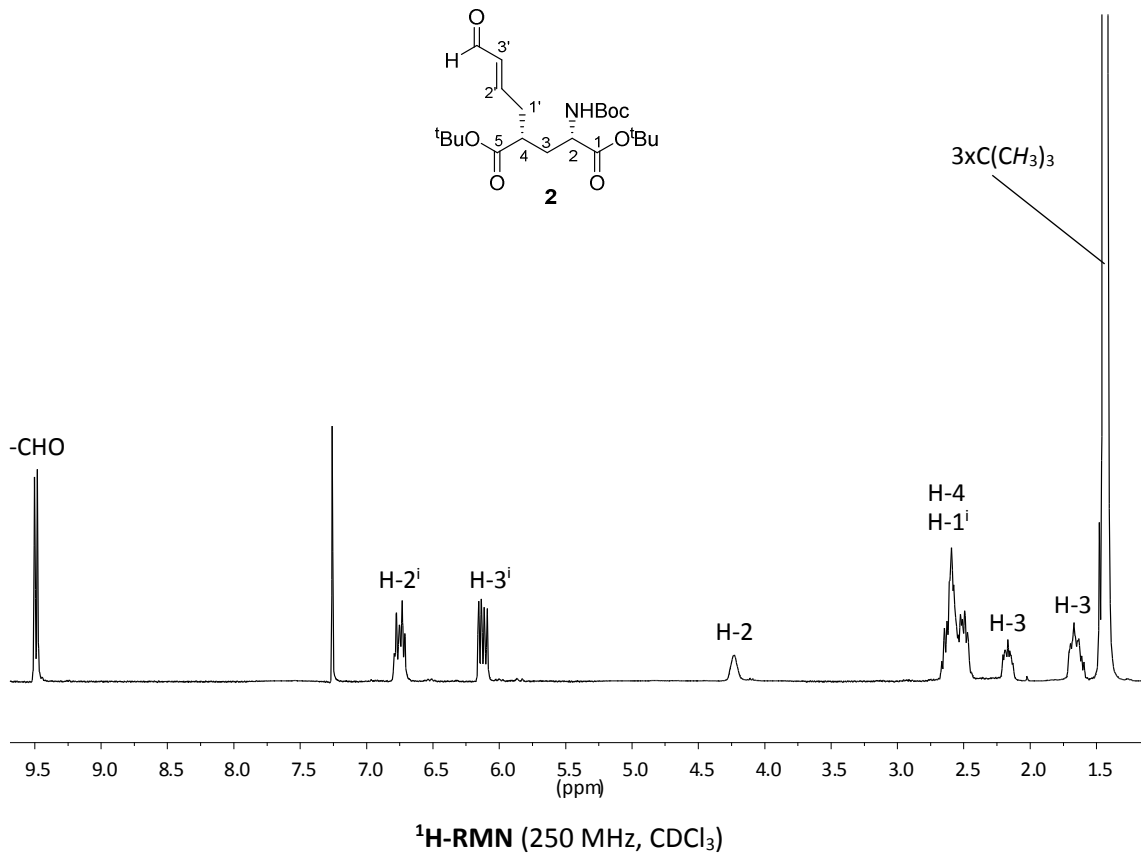
Síntesis derivado de glutamato para formar parte del sistema MAG.



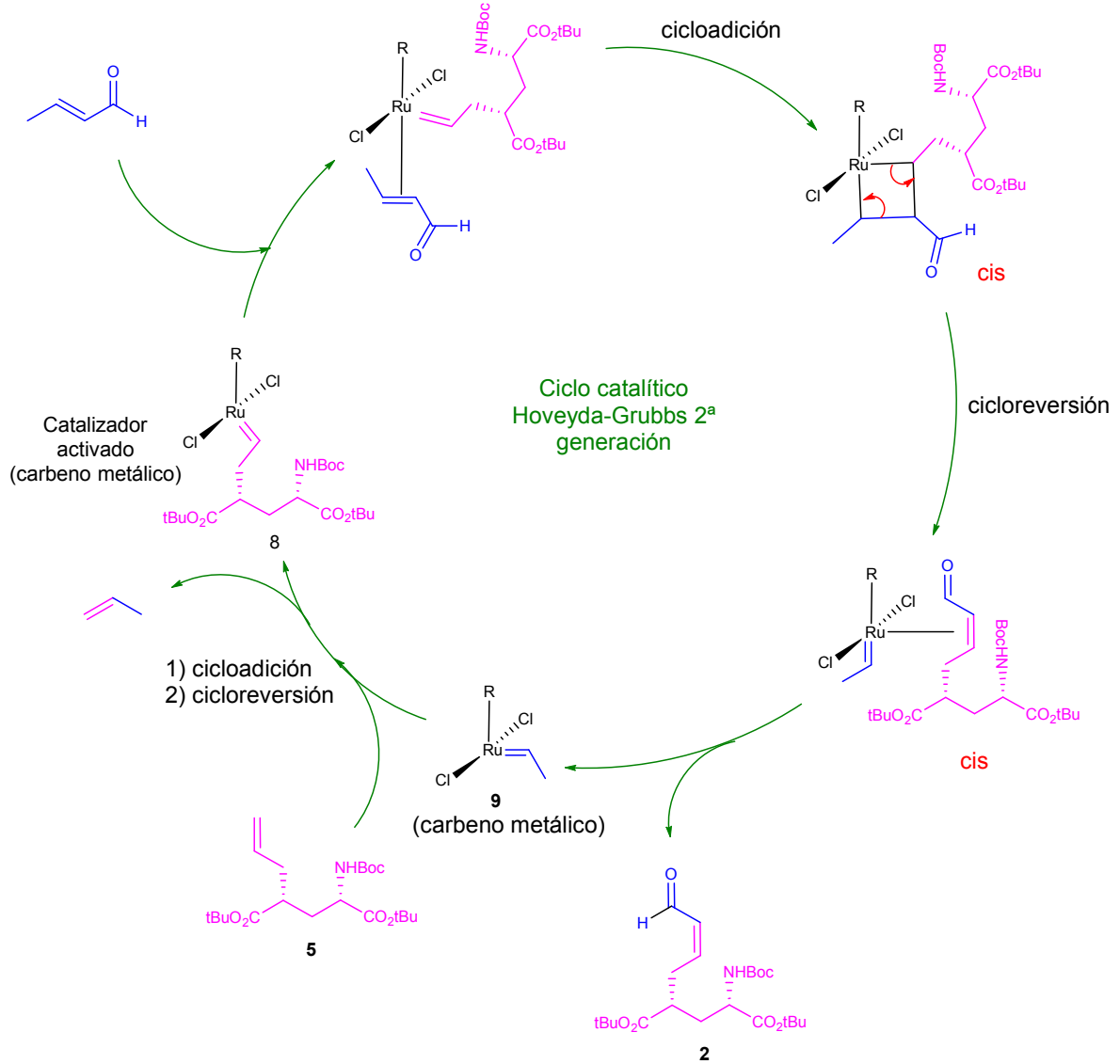
Síntesis derivado de glutamato para formar parte del sistema MAG.



Síntesis derivado de glutamato para formar parte del sistema MAG.



II. Esquema ciclo catalítico de Hoveyda-Grubbs 2ª generación.



Esquema del mecanismo de acción del catalizador Hoveyda-Grubbs.

