



Universidad de Chile.  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.  
Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica.  
Laboratorio de Química orgánica.



Pontificia Universidad Católica de Chile.  
Facultad de Química.  
Departamento de Química Orgánica.  
Laboratorio de Química orgánica.

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO:**

**“Síntesis de derivados de ácidos y aminoácidos  
organoboronatos con potencial actividad  
inhibitoria hacia arginasas”**

**Francisco Andrés Agüero Gaete**

**Director de memoria**  
Dr. Marcelo Preite

**Profesor patrocinante**  
Dr. Hernán Pessoa Mahana

Santiago, Chile 2017



## AGRADECIMIENTOS

Al terminar este trabajo, me gustaría darles las gracias a las personas que hicieron parte de este proceso y que me han acompañado a lo largo de los años.

En primer lugar, a mis padres **Lucía Gaete D.** y **Carlos Agüero A.**, por esforzarse día a día y hacer posible que siguiera una carrera profesional. Por ellos llegué a ser lo que soy hoy.

A mi pareja **Mireya Araya A.**, por tantos años de incondicionalidad, cariño, apoyo y quererme tal cuál soy.

Al **Dr. Marcelo Preite**, por permitirme realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio y guiarme durante el proceso.

A mi amigo de tantos años, **Diego Alarcón E.**, por haberme ayudado cuando lo necesité y conseguirme esta oportunidad.

A mis amigos del laboratorio **Jordán Correa V.**, **Camilo Verdugo L.**, **Ignacio Erazo V.** y **Jorge Cuvertino S.** por su grata compañía e integrarme a la Facultad de Química de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

A **Alejandro Ñanculeo O.**, **Javiera Molina C.** y **Carlos Muñoz P.** por formar parte de mi trabajo y su disposición a colaborar conmigo durante sus vacaciones.

A la **Dra. Ivonne Chávez M.**, por dejarme utilizar su laboratorio. También a **Carmen Araneda B.** y **Francisco Castillo S.** que gracias a sus gestiones pude continuar mi tesis.

A mis amigos de infancia de Melipilla, por siempre sacarme alguna carcajada, formar parte de mi vida y con quienes me enseñaron que de los errores se aprende.

A mis profesores de la academia de Tae Kwon Do Golden Team, **Anyelina Contreras L.**, **Yeny Contreras L.** y **Mario Guerra S.**, que me dieron a conocer este lindo deporte y me enseñaron sobre la auto superación y el carácter.

Y al proyecto FONDEF D11/1098 por el apoyo económico brindado.

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>VI</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. ASPECTOS GENERALES:	1
1.2. REGULACIÓN DE LA HIPERTENSIÓN	2
1.3. ARGINASA Y SUS INHIBIDORES	4
1.4. SÍNTESIS DE ABH	6
1.5. RUTA SINTÉTICA PROPUESTA	8
<b>2. HIPÓTESIS:</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL:	11
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	11
<b>4. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS</b>	<b>12</b>
4.1. MATERIALES:	12
4.1.1. SOLVENTES	12
4.1.2. REACTIVOS	12
4.1.3. EQUIPOS	12
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL:</b>	<b>13</b>
5.1. SÍNTESIS DE 2,2-DIALILMALONATO DE DIETILO (1A)	13
5.2. SÍNTESIS DE 2,2-BIS(3-(3,3,4,4-TETRAMETILBOROLAN-1-IL)PROPIL)MALONATO DE DIETILO (1B)	14
5.3. SÍNTESIS DE ÁCIDO 5-BORONO-2-(3-BORONOPROPIL) PENTANOICO (1C)	15
5.4. SÍNTESIS DE 2-ALILMALONATO DE DIETILO (2A)	16
5.5. SÍNTESIS DE 2-(3-(4,4,5,5-TETRAMETIL-1,3,2-DIOXABOROLAN-2-IL)PROPIL)MALONATO DE DIETILO (2B)	17
5.6. SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(3-BORONOPROPIL) MALÓNICO (2C)	18
5.7. SÍNTESIS 2-((DIFENILMETILEN)AMINO)-4-PENTENOATO DE ETILO (3A)	19
5.8. SÍNTESIS 2-((DIFENILMETILEN)AMINO)-5-(4,4,5,5-TETRAMETIL-1,3,2-DIOXABORO-LAN-2-IL) PENTANOATO DE ETILO (3B)	20
5.9. SÍNTESIS ÁCIDO 2-AMINO-5-BORONOPENTANOICO (3C)	21
5.10. SÍNTESIS 2-(3-BUTEN-1-IL) MALONATO DE DIETILO (4A)	22

5.11. SÍNTESIS 2-(3-(4,4,5,5-TETRAMETIL-1,3,2-DIOXABOROLAN-2-IL)PROPIL)MALONATO DE DIETILO (4B)	23
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
6.1. MECANISMOS PROPUESTOS:	24
6.2. SÍNTESIS:	31
6.2.1. SÍNTESIS 2,2-DIALILMALONATO DE DIETILO (1A):	31
6.2.2. SÍNTESIS DE 2,2-BIS(3-(3,3,4,4-TETRAMETILBOROLAN-1-IL)PROPIL)MALONATO DE DIETILO (1B):	32
6.2.3. SÍNTESIS DE ÁCIDO 5-BORONO-2-(3-BORONOPROPIL) PENTANOICO (1C)	33
6.2.4. SÍNTESIS DE 2-ALILMALONATO DE DIETILO (2A)	34
6.2.5. SÍNTESIS DE 2-(3-(4,4,5,5-TETRAMETIL-1,3,2-DIOXABOROLAN-2-IL)PROPIL) MALONATO DE DIETILO (2B)	35
6.2.6. SÍNTESIS DE ÁCIDO-2-(3-BORONOPROPIL) MALÓNICO (2C)	36
6.2.7. SÍNTESIS 2-((DIFENILMETILEN)AMINO)-4-PENTENOATO DE ETILO (3A)	37
6.2.8. SÍNTESIS 2-((DIFENILMETILEN)AMINO)-5-(4,4,5,5-TETRAMETIL-1,3,2-DIOXABOROLAN-2-IL) PENTANOATO DE ETILO (3B)	38
6.2.9. SÍNTESIS ÁCIDO -2-AMINO-5-BORONOPENTANOICO (3C)	39
6.2.10. SÍNTESIS DIETIL 2-(3-BUTEN-1-IL) MALONATO (4A)	40
6.2.11. SÍNTESIS 2-(3-(4,4,5,5-TETRAMETIL-1,3,2-DIOXABOROLAN-2-IL)PROPIL) MALONATO DE DIETILO (4B)	41
6.3. COMPARACIÓN DE LOS PASOS SINTÉTICOS DE CADA MOLÉCULA OBJETIVO	42
6.4. EFECTOS ESPERADOS EN MEDICIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	44
<b>7. CONCLUSIONES:</b>	<b>47</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>48</b>
<b>9. ANEXO:</b>	<b>52</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1: Producción biológica de óxido nítrico catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa. (Tenorio L y col <sup>(11)</sup>)</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2: Esquema que ilustra las interacciones del inhibidor ABH de puentes de hidrógeno (líneas punteadas negras) y las interacciones de coordinación con el magnesio de la arginasa (Fuente: Santhanam, L., Christianson, D. y col. <sup>(13)</sup>).</b>	<b>5</b>
<b>Figura 3: Primeros intentos sintéticos de ABH (Fuente: Baggio, R. Y col <sup>(17)</sup>)</b>	<b>7</b>
<b>Figura 4: Síntesis estereoselectiva de ABH (Fuente: Belekou y col. <sup>(19)</sup>)</b>	<b>8</b>
<b>Figura 5: Alquilación</b>	<b>9</b>
<b>Figura 6: Hidroboración</b>	<b>10</b>
<b>Figura 7: Hidrólisis</b>	<b>10</b>
<b>Figura 8: Mecanismo de alquilación</b>	<b>25</b>
<b>Figura 9: Mecanismo de hidroboración de una olefina.</b>	<b>25</b>
<b>Figura 10: Ciclo catalítico de hidroboración utilizando complejos de Iridio y Rodio</b>	<b>26</b>
<b>Figura 11: Estructura de [Ir(cod)Cl]<sub>2</sub></b>	<b>27</b>
<b>Figura 12: Distintos tipos de ligandos de fosfina usados por Yasunori Yamamoto y col <sup>(33)</sup>.</b>	<b>28</b>
<b>Figura 13: Mecanismo de hidrólisis ácida del grupo éster.</b>	<b>29</b>
<b>Figura 14: Mecanismo de hidrólisis de una imina</b>	<b>30</b>
<b>Figura 15: Mecanismo de reacción de la hidrólisis del pinacolborano</b>	<b>30</b>

## INDICE DE TABLAS

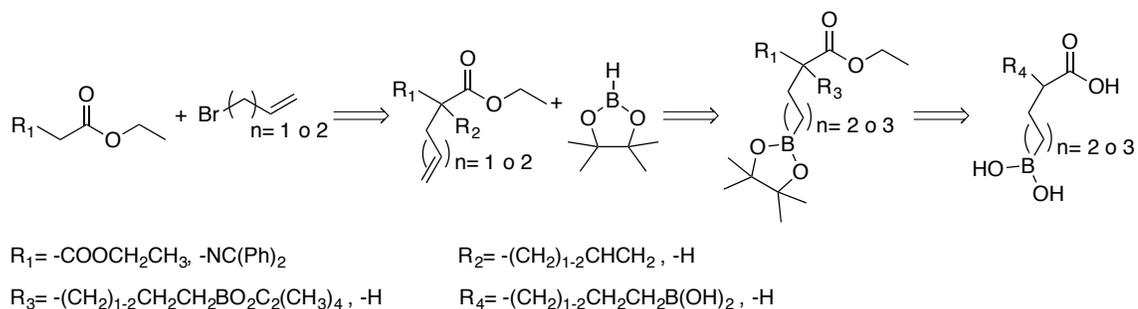
<b>Tabla 1: Resumen de los rendimientos por paso y globales de cada molécula expresados en porcentaje</b>	<b>42</b>
---	-----------

## ABREVIATURAS

- **ABH:** ácido-2-amino-5-boronoheptanoico
- **ABP:** ácido-2-amino-5-boronopentanoico
- **DCM:** diclorometano
- **DPPM:** 1,1-Bis(difenilfosfino)metano
- **eNOS:** endothelial nitric oxide synthase/ óxido nítrico sintasa endotelial
- **EtOH:** etanol
- **iNOS:** inducible nitric oxide synthase/ óxido nítrico sintasa inducible
- **[Ir(cod)Cl]<sub>2</sub>:** dicloruro bis(1,5-ciclooctadieno)diiridio(I)
- **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **nNOS:** neuronal nitric oxide synthase/ óxido nítrico sintasa neuronal
- **NOS:** nitric oxide synthase/ óxido nítrico sintasa
- **TLC:** Thin layer chromatography/ cromatografía de capa fina

## RESUMEN

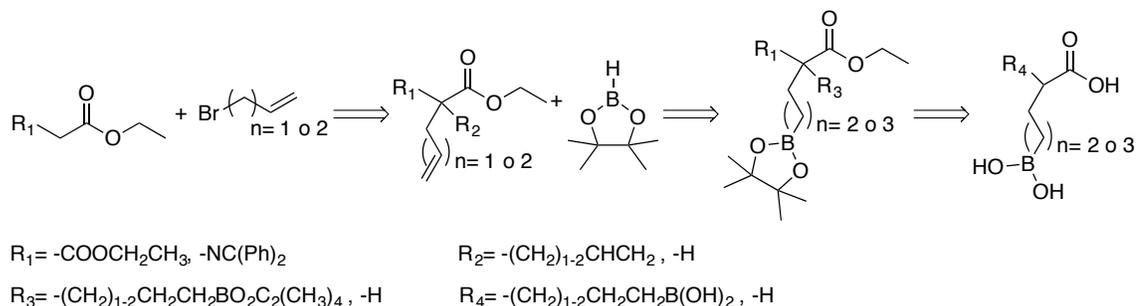
En este trabajo se estudió la síntesis de moléculas de estructura semejante al ácido 2(S)-amino-6-boronohexanoico (ABH), que al igual que este último pudieran tener algún efecto en la inhibición de la enzima arginasa, buscando una ruta sintética que utilice reactivos más económicos. Usando dos materiales de partida distintos, malonato de dietilo y *N*-(difenilmetilén)glicinato de etilo, se probaron diferentes condiciones para la alquilación con bromuro de alilo y 1-bromo-4-buteno, de modo de obtener ABH racémico, el homólogo inferior de ABH, y ácido 6-boronohexanoico, que no contiene el grupo amino. La hidroboración subsiguiente se ensayó de acuerdo a dos metodologías: reacción directa de adición de catecolborano, y adición de pinacolborano catalizada por una sal de iridio. La síntesis resultó más conveniente por el segundo método. Para acceder al producto final se realizó una hidrólisis y descarboxilación. La ruta sintética se muestra a continuación:



## ABSTRACT

### Synthesis of derivatives of acids and amino acids organoboronates with potential inhibitory activity towards arginases

In this work, the synthesis of a set of molecules with structures similar to that of 2-(S)-amino-6-boronohexanoic acid (ABH), with potentially similar effect in arginase enzyme inhibition, looking for a synthetic route that uses cheaper reagents, was studied. Using two different starting materials, diethyl malonate and ethyl *N*-(diphenylmethylene)glycinate, several conditions for their alkylation with allyl bromide and 1-bromo-4-butene were tested, in order to obtain racemic ABH, its lower homolog, and 6-boronohexanoic acid, lacking an amino group. The subsequent hydroboration was attempted using two different methods: direct addition of catecholborane, and an iridium salt-catalyzed addition of pinacolborane. The synthesis was more convenient by the second method. In order to obtain the final product, a hydrolysis and decarboxylation was held. The synthetic route is shown below:



# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Aspectos generales:**

La hipertensión arterial es el término utilizado para describir la presión arterial alta, que se produce contra las paredes de las arterias a medida que el corazón bombea sangre al cuerpo <sup>(1)</sup>. Se considera una persona hipertensa aquella cuyos valores están por sobre 140 y 90 mmHg de presión sistólica y diastólica, respectivamente <sup>(2)</sup>. Es una enfermedad que rara vez provoca síntomas y es un factor de riesgo clave en las enfermedades coronarias, en accidentes cerebrovasculares, en la insuficiencia cardíaca e insuficiencia renal <sup>(3)</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la hipertensión es una enfermedad que causa el 45% de las muertes por cardiopatías y el 51% de las muertes por accidente cerebrovascular, y se considera que anualmente 9,4 millones de personas fallecen por su causa <sup>(4)</sup>.

En Chile, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud (ENS) del año 2009-2010, esta enfermedad afecta a 28,7% de los hombres y a 25,3% de las mujeres, siendo la gente de menor nivel educacional la afectada, con más del 50% de los casos <sup>(5)</sup>.

Los principales factores hipertensiógenicos son: sobrepeso u obesidad, resistencia a la insulina, ingesta elevada de alcohol, tabaquismo, ingesta elevada de sal (en pacientes sensibles a esta), edad y sexo, sedentarismo, estrés y baja ingesta de calcio y potasio <sup>(6)</sup>.

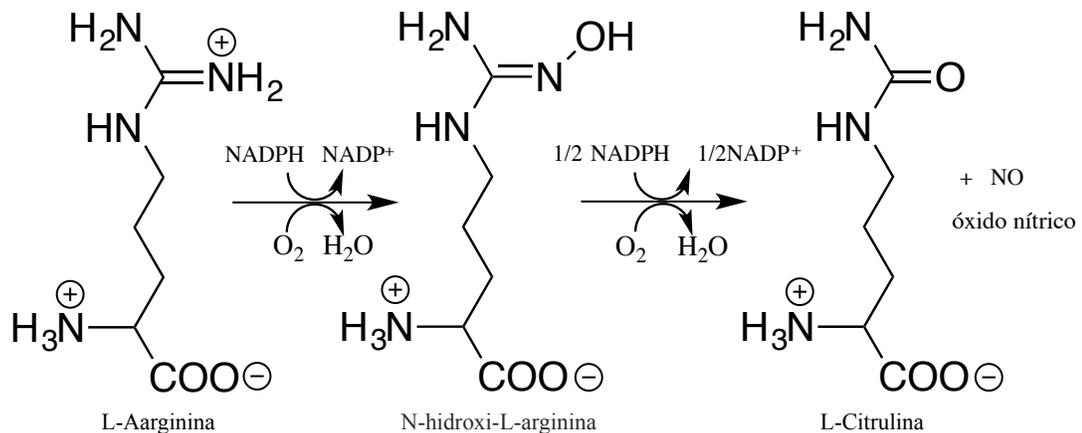
## 1.2. Regulación de la hipertensión

El organismo tiene una amplia variedad de sistemas fisiológicos que influyen en la presión sanguínea. Entre estos sistemas están incluidos los barorreceptores, que detectan cambios agudos en la presión en los vasos sanguíneos, los péptidos natriuréticos producidos por el cerebro y el corazón en respuesta al aumento de la presión en estos órganos, el sistema renina-angiotensina-aldosterona, que influye en la homeostasis del volumen vascular y del tono vascular, el sistema cinina-caliceína, que afecta el tono vascular y el manejo de la sal renal, el sistema receptor adrenérgico, que influye en la frecuencia cardíaca, la contracción cardíaca y el tono vascular, y los factores producidos por los vasos sanguíneos que causan vasodilatación, como el óxido nítrico <sup>(7)</sup>. Es precisamente el estudio de este último sistema el que le valió el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en el año 1998 a Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad <sup>(8)</sup>.

La mayoría de los organismos pueden sintetizar óxido nítrico enzimáticamente a partir del aminoácido L-arginina. Este proceso se efectúa por la enzima denominada óxido nítrico sintasa (NOS por sus siglas en inglés) mediante dos reacciones sucesivas que requieren de NADPH y O<sub>2</sub>. Hasta la fecha se han descrito tres isomorfos de NOS, es decir, tres proteínas similares que sintetizan el mismo producto, pero en diferentes tejidos. Una de las enzimas se encuentra en la cara interna de los vasos sanguíneos y se le denomina endotelial o eNOS, otra isomorfa se localiza en el tejido nervioso y se le conoce como nNOS. Hay una tercera isomorfa que sintetiza NO cuando las células reciben un estímulo y se le conoce como iNOS. Tanto la nNOS como la eNOS se localizan en el citoplasma y se producen continuamente, ambas son conocidas como enzimas constitutivas y requieren iones calcio. La eNOS y la nNOS liberan cantidades

muy pequeñas de NO por cortos periodos de tiempo. La iNOS se sintetiza en algunas células del sistema inmunológico, principalmente en los macrófagos y los neutrófilos. Esta enzima sintetiza cantidades mayores de NO por periodos de tiempo prolongados durante los procesos patológicos <sup>(9)</sup>.

Esta reacción enzimática es un proceso de óxido-reducción en el que el átomo de nitrógeno del grupo guanidinio de la arginina se oxida de  $-3$  a  $+2$  (el estado de oxidación formal del carbono no varía). El agente oxidante es el oxígeno molecular, cuyo estado de oxidación pasa de  $0$  a  $-2$ . El proceso es NADPH (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato) dependiente. La reacción transcurre en 2 etapas, con formación del intermediario  $N^{\omega}$ -hidroxi-L-arginina y cuyos productos son L-citrulina y una molécula de óxido nítrico <sup>(10)</sup> tal como se muestra en la figura 1:

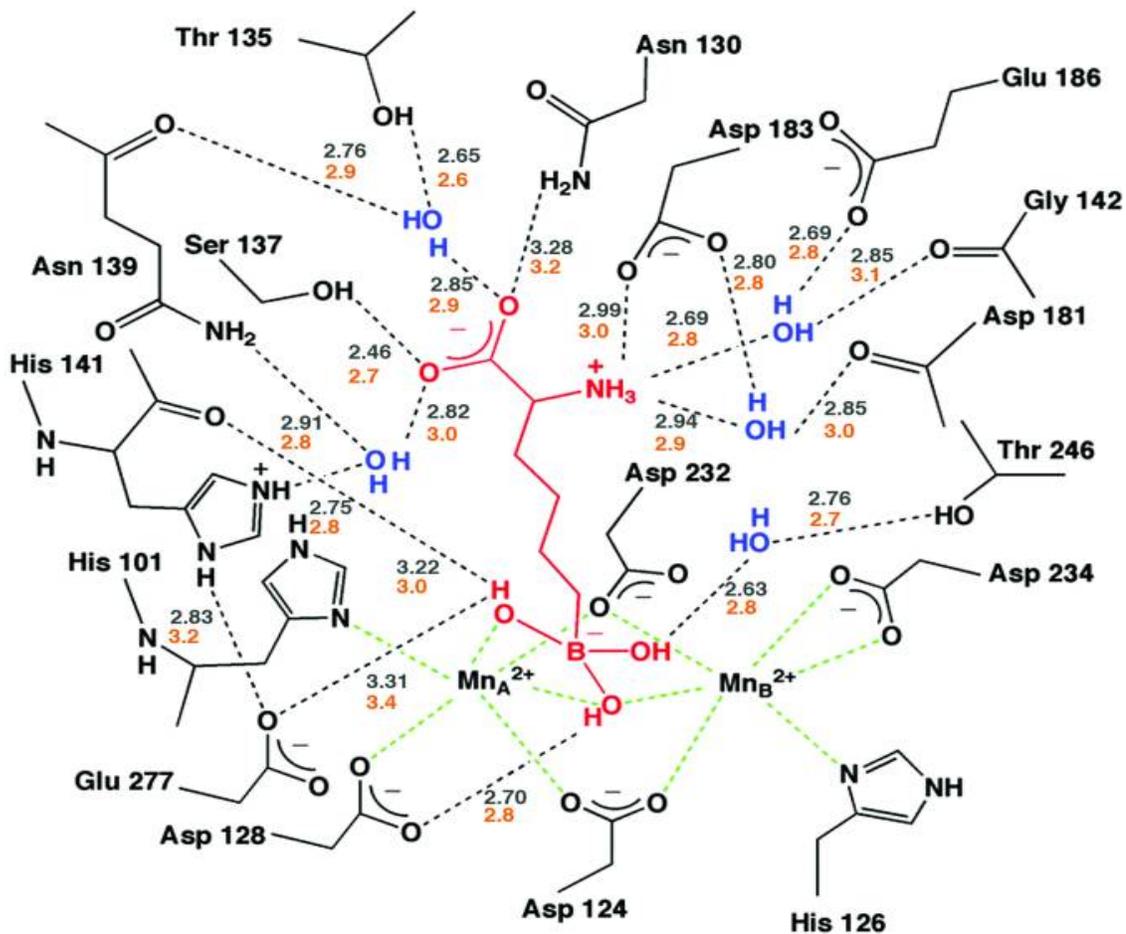


**Figura 1:** Producción biológica de óxido nítrico catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa. (Tenorio L y col <sup>(11)</sup>)

### 1.3. Arginasa y sus inhibidores

La arginasa es una enzima fundamental en el ciclo de la urea, también metaboliza la L-arginina, por lo que compite directamente con eNOS por su sustrato común, comprometiendo así la producción de NO. Por esta razón es que, desde la década de 1990, se han desarrollado inhibidores específicos de arginasa tales como *N*-hidroxi-guanidinio o *N*-hidroxi-nor-L-arginina, y derivados de ácido borónico, tales como ácido 2-(*S*)-amino-6-boronoheptanoico y 2-boronoetil-L-cisteína, que pueden unirse al sitio activo de la enzima formando un puente simétrico con el cluster binuclear de manganeso de la arginasa y así inhibir su actividad tal como se ilustra en la figura 2 <sup>(12)</sup>.

El ABH es el primer inhibidor sintético de la arginasa, y su estructura es un análogo borado, o isómero, de la arginina a la que se le ha reemplazado el grupo guanidino de la cadena lateral por un boronato <sup>(13)</sup>. Ya en el año 1936 se creía en que el boro tenía gran importancia médica pues a una concentración de 50 µg/g de tejido el boro llegaría a las células malignas y dejaría a los tejidos sanos con una toxicidad muy baja <sup>(14)</sup>. Además, el pKa de los ácidos bóricos borónicos se encuentra en un rango de 4,5 a 8,8 <sup>(15)</sup> por lo que se puede establecer que en condiciones fisiológicas la molécula pasaría desde un boro neutro trigonal planar  $sp^2$  a un boro aniónico tetrahédrico  $sp^3$ , el que formaría un complejo similar al complejo de transición de la enzima con el sustrato, para así inducir la inhibición de la enzima <sup>(16)</sup>.



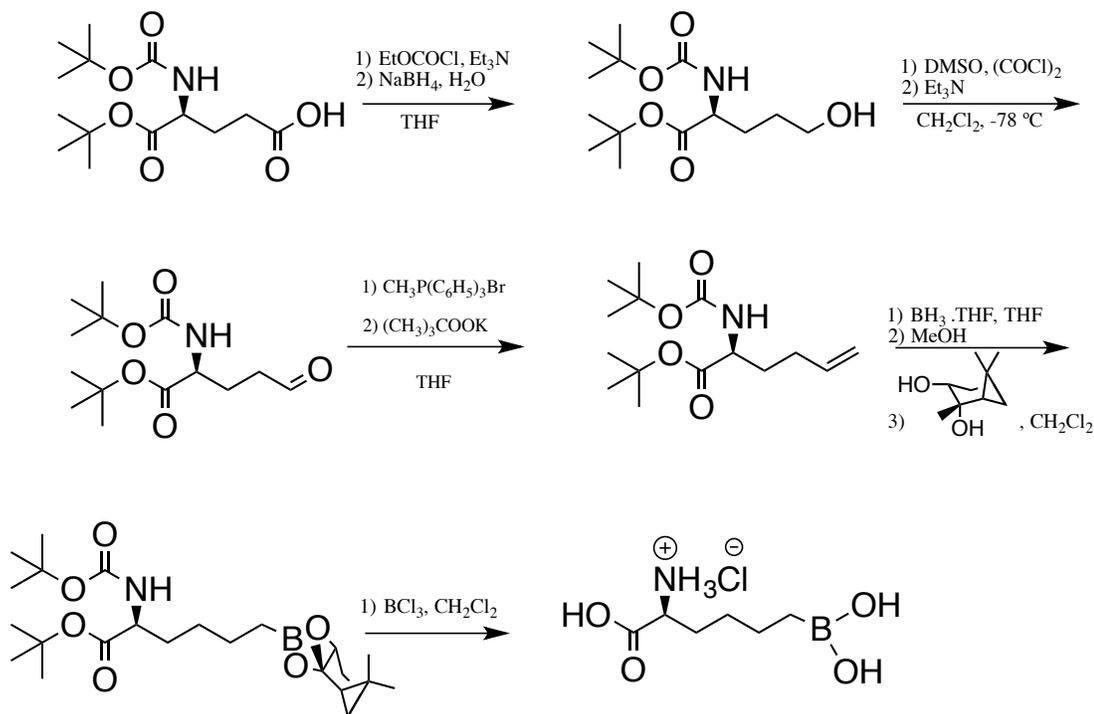
**Figura 2:** Esquema que ilustra las interacciones del inhibidor ABH de puentes de hidrógeno (líneas punteadas negras) y las interacciones de coordinación con el magnesio de la arginasa (Fuente: Santhanam, L., Christianson, D. y col. <sup>(13)</sup>).

La actividad inhibitoria del ABH se estudió analizando la estructura de rayos X del complejo ternario de arginasa-ornitina-borato, en el que se comprobó que el anión borato tetracoordinado imita el(los) estado(s) de transición tetrahédricos en la reacción catalítica <sup>(17)</sup>. Este trabajo de tesis es una continuación de dichos estudios, y se centra en la síntesis de moléculas de estructura semejante al ABH, con el foco en que se abaraten los costos de

producción y se facilite la ruta sintética, pero siempre intentando mantener la actividad inhibitoria.

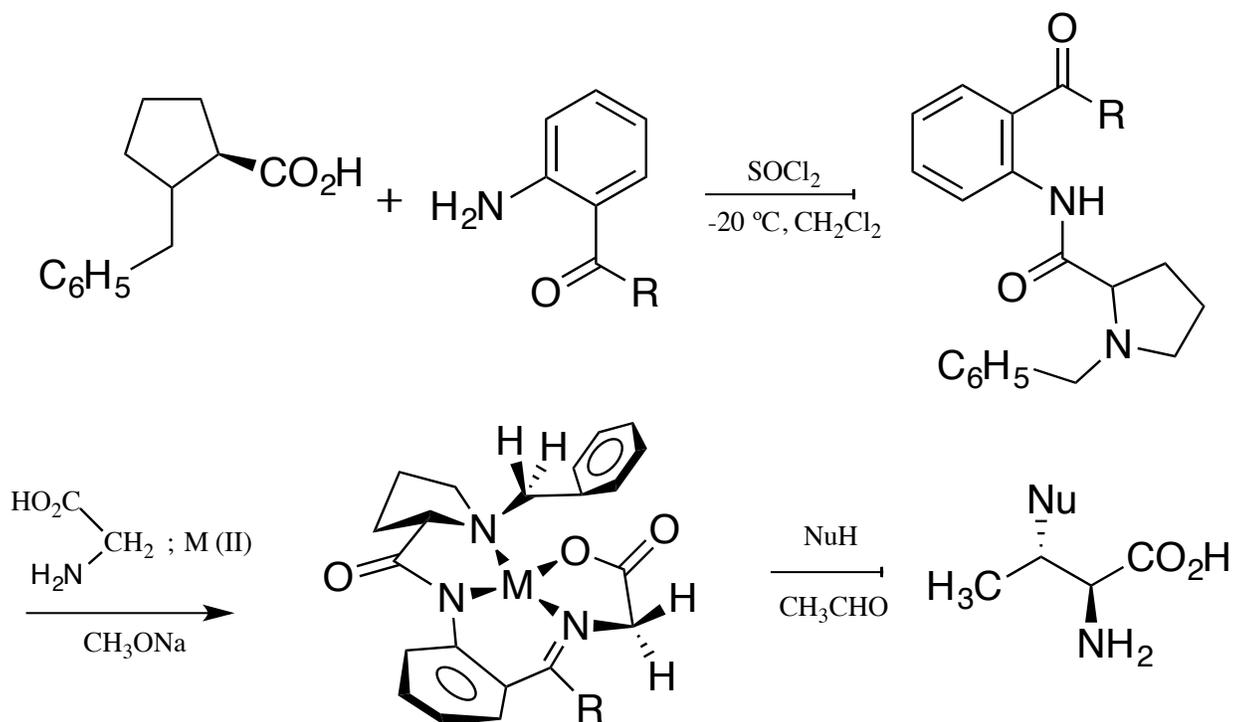
#### **1.4. Síntesis de ABH**

El primer intento de sintetizar este compuesto fue desarrollado en el año 1997 en la Universidad de Pennsylvania. Utilizando como material de partida éster de tert-butilo del ácido glutámico N-BOC protegido, al cual se le redujo su cadena lateral al correspondiente alcohol primario, para luego transformarla al aldehído mediante una oxidación de Swern, y de esta forma se obtuvo el alqueno correspondiente por medio de una reacción de Wittig. El alqueno así obtenido se sometió a una hidrobtoración con exceso de borano, que finalmente se convirtió en el pinadiol boronato, el cual se desprotegió con tricloruro de boro, para dar ABH; tal como se muestra en la figura 3. El rendimiento total de esa síntesis lineal llegó solo al 1,3% <sup>(17)</sup>.



**Figura 3:** Primeros intentos sintéticos de ABH (Fuente: Baggio, R. Y col <sup>(17)</sup>)

El segundo método reportado para la síntesis de ABH, se llevó a cabo mediante la alquilación del complejo entre Ni(II) y la base de Schiff derivada de glicina y (S)-2-[N-(N-bencilproil)amino]benzofenona (BPB), con un ω-bromoalqueno u ω-bromo-alquino <sup>(18)</sup>. Esta metodología general que se muestra en la figura 4, desarrollada por Belokon y col., proporcionó un buen exceso diastereoisomérico bajo condiciones de equilibrio termodinámico. Sin embargo, los propios autores hacen notar, que las metodologías utilizadas para la preparación de BPB no son las más adecuadas, y que serían un problema en la preparación de cantidades importantes de estos productos y sus derivados <sup>(19)</sup>.



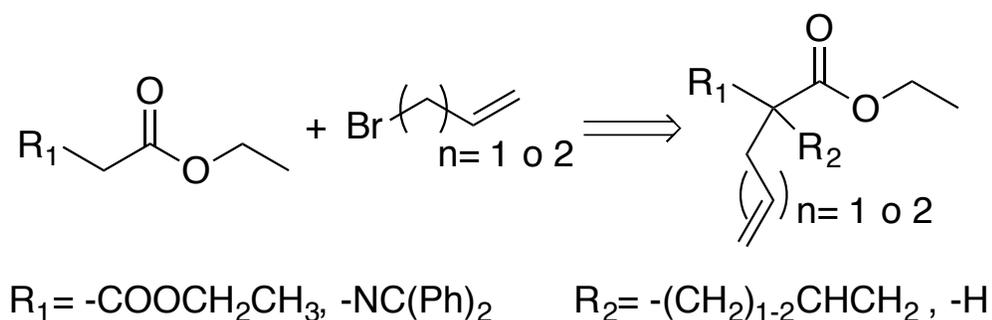
**Figura 4:** Síntesis estereoselectiva de ABH (Fuente: Belekou y col. <sup>(19)</sup>)

### 1.5. Ruta sintética propuesta

En este trabajo se tiene como objetivo sintetizar compuestos de estructura similar al ABH, para lo cual se hicieron síntesis de tipo linear que consistían en 3 pasos: alquilación, hidrobtoración e hidrólisis.

En el primer paso de alquilación, se usaron 2 materiales de partida distintos: malonato de etilo (fórmula química:  $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_4$ ; peso molecular: 160,17 g/mol; pto de ebullición:  $199\text{ }^\circ\text{C}$ ; densidad: 1,055g/mL) y N-(difenilmetiliden)-glicinato de etilo (fórmula química:  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ ; peso molecular: 267,32 g/mol; pto de ebullición  $110\text{ }^\circ\text{C}$ ) a los que mediante un tratamiento con base se desprotonó el carbono  $\alpha$  que está unido a dos grupos éster ( $\text{pK}_a = 13$ ). El carbanión resultante

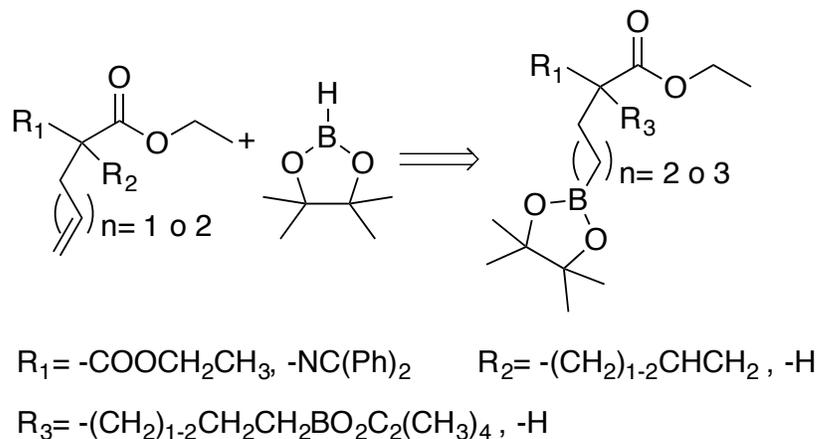
reaccionó con un Bromuro de alquilo primario (de 3 o 4 carbonos), que mediante un mecanismo  $S_N2$  formó un éster malónico sustituido en  $\alpha$  <sup>(20)</sup> como se muestra en la figura 5:



**Figura 5:** Alquilación

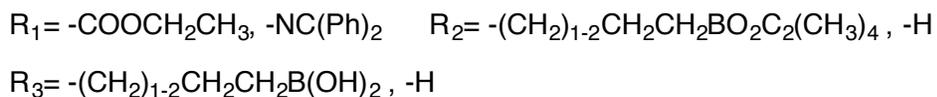
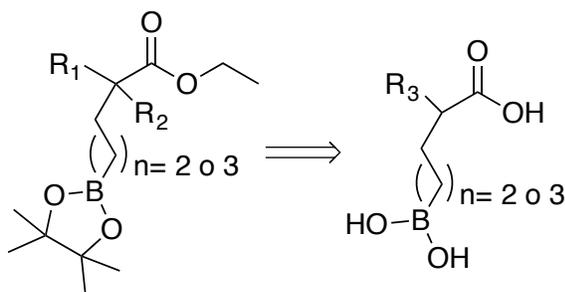
A pesar de que la alquilación es una reacción sencilla, hasta el día de hoy aún se intenta buscar nuevos métodos para así obtener mejores rendimientos; trabajos recientes reportan el uso de malonato de dietilo junto con  $K_2CO_3$  en fase sólida y el uso de un catalizador de transferencia de fase como el TEBAC (cloruro de trietilbenzilamonio) llegando a rendimientos de 87% <sup>(21)</sup>.

El segundo paso de hidroborcación es un método ampliamente utilizado para la obtención de alcoholes, que fue desarrollado por el Profesor Herbert C Brown <sup>(22)</sup>. Esta reacción ocurre en un solo paso, en donde tanto el boro como el hidrógeno (del compuesto borado) forman nuevos enlaces por la misma cara del doble enlace del alqueno, obteniendo así el producto de una adición syn-anti-Markovnikov, porque el enlace del boro está favorecido hacia el carbono de menor impedimento estérico del alqueno <sup>(23)</sup>. Se han estudiado diversos mecanismos de reacción catalizados principalmente por complejos de iridio y de rodio, usando principalmente catecolborano <sup>(24-25)</sup>. Sin embargo, tal como se ilustra en la figura 6, en este trabajo se prefirió usar pinacolborano debido a que es más sencilla su manipulación, y la de los productos obtenidos <sup>(26)</sup>.



**Figura 6:** Hidroboración

Finalmente, el paso de hidrólisis y descarboxilación es la etapa donde se eliminan los grupos protectores, como aparece en la figura 7, y así se obtiene el aminoácido o ácido que se quiere. En la hidrólisis ácida de los ésteres, se procede a través de un intermedio tetraédrico y la ruptura del acilo. Se ha llegado a la conclusión de que este mecanismo requiere dos moléculas de agua en el paso intermedio, una molécula que actúa como un donante de protones y otro como nucleófilo simultáneo<sup>(27)</sup>.



**Figura 7:** Hidrólisis

## **2. HIPÓTESIS:**

Se propone la síntesis de nuevas moléculas con estructura similar al ácido 2-(S)-amino-6-boronoheptanoico (ABH), que puedan servir como una alternativa menos costosa y de menor complejidad sintética. Haciendo algunas modificaciones con respecto al ABH, como usar una cadena lateral más corta, eliminando el grupo amino o reemplazándolo por otro grupo carboxilo.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo general:**

Sintetizar, purificar e identificar compuestos que contengan los grupos funcionales ácido carboxílico, amina y ácido borónico, que potencialmente mantengan las propiedades inhibitorias sobre la enzima arginasa.

### **3.2. Objetivos específicos:**

Estudio de síntesis y caracterización de los siguientes productos:

- ácido-4-borono-2-(2-boronoetil) butanoico
- ácido-2-(3-boronopropil) malónico
- ácido-2-amino-5-boronopentanoico
- ácido-2-amino-6-boronoheptanoico

## **4. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS**

### **4.1. Materiales:**

#### **4.1.1. Solventes**

Los solventes utilizados como medio de reacción fueron: ácido clorhídrico fumante 37% (Merck, p.a.), amoníaco 25% (Merck, p.a.) etanol (Merck, p.a.), metanol (Merck, p.a.), tetrahidrofurano (THF) (Merck, p.a).

Otros solventes de uso para cromatografía en capa fina y cromatografía en columna como hexano y acetato de etilo de grado técnico fueron destilados previo a su uso, de igual modo se usó diclorometano que fue mezclado con cloruro de calcio durante 18 horas y luego destilado con pentóxido de fósforo para secarlo.

#### **4.1.2. Reactivos**

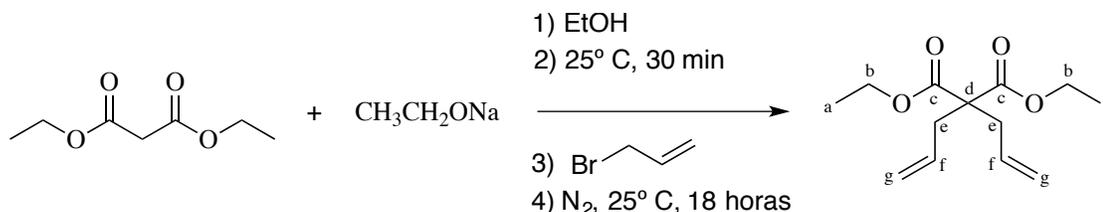
- Malonato de dietilo
- 4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolano, “Pinacol borano” (Sigma-Aldrich 97%)
- N-(difenilmetiliden)-glicinato de etilo (Sigma-Aldrich)
- 4-Bromo-1-buteno (Merck)
- tert-Butóxido de potasio (Merck 95%)
- Etóxido de sodio (Sigma-Aldrich 95%)

#### **4.1.3. Equipos**

Para la espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^{11}\text{B}$ -RMN se utilizaron espectrómetros Bruker modelo Avance 200 y Avance III HD 400. Para estos análisis se utilizó deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) y agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de purezas isotópicas del 99,9%. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm ( $\delta$ ). El estándar interno que se utilizó para la determinación de los espectros fue tetrametilsilano (TMS), o bien la señal residual del solvente. Para la espectroscopía de masas se utilizó un Equipo ABSCIEX triple cuadrupolo 4500 (fuente ionizante ESI).

## 5. PARTE EXPERIMENTAL:

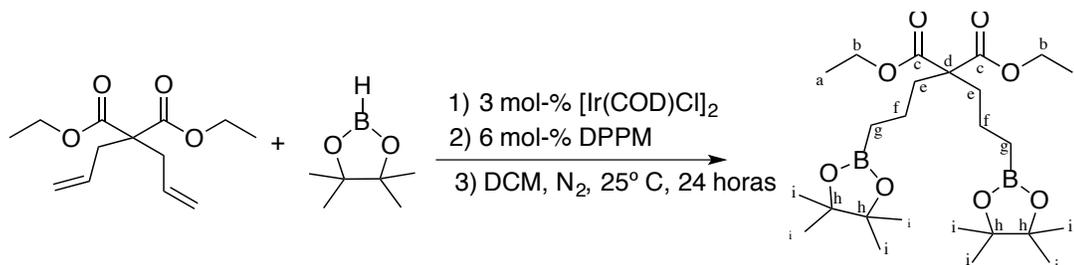
### 5.1. Síntesis de 2,2-dialilmalonato de dietilo (1a)



En un balón de 50 mL y con agitación de una barra magnética se disuelve etóxido de sodio (896 mg, 13,17 mmoles) en etanol, lo que resulta en una solución de color anaranjado. A continuación, se añade malonato de dietilo (1,055 g, 6,59 mmoles) y se deja con agitación magnética durante 30 min a una temperatura de 25 °C. Luego se añade bromuro de alilo (1,904 g, 15,74 mmoles) y la reacción se deja en agitación a temperatura ambiente y en una atmósfera de nitrógeno durante 18 horas. Para purificar el producto, se realiza una extracción por solvente con agua y DCM usando un embudo de extracción. La fase orgánica se seca utilizando sulfato de sodio anhidro, luego se filtra usando un embudo de vidrio y algodón y se concentra a presión reducida en un evaporador rotatorio. Finalmente, para quitar toda traza de solvente, el balón se conecta a una bomba mecánica de alto vacío directamente durante 30 minutos usando un baño de agua caliente para ayudar a la evaporación del solvente. El producto es un aceite opaco de tonalidad amarillo.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1,12 (t, J= 14,1 Hz, 6H, a-H), 2,51 (d, J= 7,5 Hz, 2H, e-H), 4,06 (c, J= 7,1 Hz, 4H, b-H), 4,956-4,99 (m, 4H, g-H), 5,48-5,59 (m, 2H, f-H) / <sup>13</sup>C RMN (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 14,09 (a-C); 36,76 (e-C); 57,22 (d-C); 61,15 (b-C); 119,031 (f-C); 132,369 (g-C); 170,63 (c-C) / Rendimiento: 71,3 %.

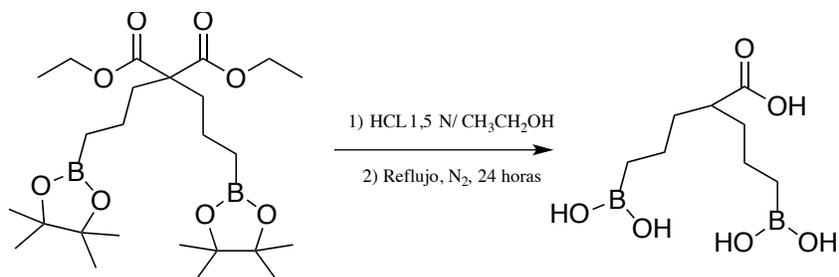
## 5.2. Síntesis de 2,2-bis(3-(3,3,4,4-tetrametilborolan-1-il)propil)malonato de dietilo (1b)



En un balón de 2 bocas de 50 mL en ambiente de  $\text{N}_2$ , provisto de agitación magnética, se añade  $[\text{Ir}(\text{cod})\text{Cl}]_2$  (4,2 mg, 0,208 mmoles), DPPM (0,48 mg, 0,208 mmoles) y 5 mL de diclorometano, la solución de color anaranjada se deja hasta completar la disolución. A continuación, se agrega pinacolborano (63,9 mg, 0,499 mmoles) mediante el uso de una jeringa de vidrio, y del mismo modo 2,2-dialilmalonato de dietilo (50mg, 0,208 mmoles). La reacción se deja a temperatura ambiente y atmósfera de  $\text{N}_2$  por 24 horas. Comprobado el término de la reacción mediante TLC, la mezcla se concentra a presión reducida en un evaporador rotatorio y se realiza una extracción por solvente usando diclorometano y agua. Para la purificación del compuesto, se utiliza una columna de sílica gel como fase estacionaria y diclorometano como fase móvil. Después se colectan las fracciones que tienen el producto de interés, se concentran en un balón conectado a un evaporador rotatorio y luego se deja durante 30 minutos conectado a una bomba mecánica de alto vacío en un baño de agua caliente hasta obtener un aceite color naranja.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0,68(t,  $J = 7,1$  Hz, 4H, g-H),  $\delta$  1,14 (s, 34H, a-H, f-H y i-H), 1,77-1,81 (m, 4H, e-H), 4,06-4,10 (m, 4H, b-H) /  $^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 11,42 (g-C); 14,05 (a-C); 24,79 (i-C); 34,37 (e-C); 57,59 (d-C); 60,79 (b-C); 82,89 (h-C); 171,89 (c-C) /  $^{11}\text{B}$  RMN (128,38 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 19,610 / Rendimiento: 81,54 %

### 5.3. Síntesis de ácido 5-borono-2-(3-boronopropil) pentanoico (1c)

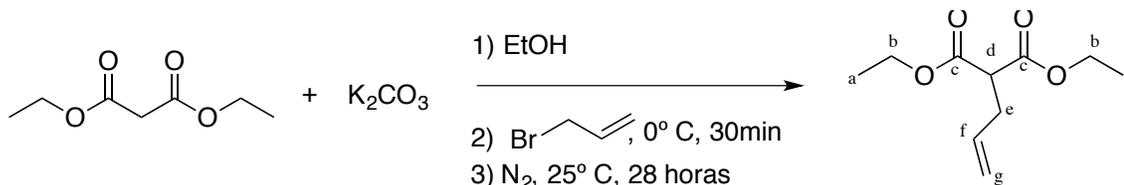


En un balón de 2 bocas se agrega el producto obtenido de la columna de purificación anterior (168,4 mg, 0,3393 mmoles). Se añade EtOH (5,8 mL) y HCl 1,5 N (3,8 mL), y la solución se deja en agitación a reflujo en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 24 horas. Para comprobar el avance de la reacción, se usa una mezcla de butanol: ácido acético: agua (en una razón de 4:1:1 respectivamente) como eluyente para las placas de cromatografía fina; este método se utiliza en todos los pasos de hidrólisis de esta investigación debido a la gran polaridad de la molécula objetivo. Para finalizar la reacción se agrega una solución de NH<sub>4</sub>OH hasta lograr un pH neutro.

Para la purificación de este producto se utiliza una columna de resina de intercambio iónico en la que se siembra la muestra (asegurándose que tenga un pH neutro) y se eluye con agua destilada. Se colectan fracciones hasta que no se detecte la presencia de cloruros cuando se agregan 2 gotas de solución acuosa de nitrato de plata al 1%, a continuación, se cambia la fase móvil a NH<sub>3</sub> 2 M y se colecta en un matraz de 500 mL. La fase amoniacal se evapora a sequedad en evaporador rotatorio. Finalmente se obtiene un sólido color café.

Espectroscopía de masas: 233 m/z (M<sup>+</sup>, 5,28 %), 215 m/z (100 %), 187 m/z (5,77 %), 169 m/z (9,62 %), 141,1 m/z (7,31 %). Rendimiento: 18,5%

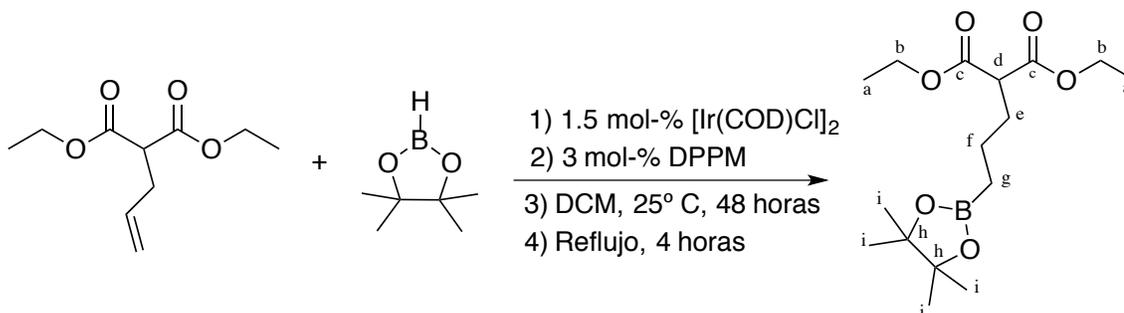
#### 5.4. Síntesis de 2-alilmalonato de dietilo (2a)



En un balón de 25 mL se añaden malonato de dietilo (0,2 g, 1,25 mmoles), 5 mL de etanol y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (173 mg, 1,25 mmoles) y se deja en agitación hasta que se disuelva la base. A continuación, se agrega bromuro de alilo (0,19 mL, 1,875 mmoles) y el sistema se sumerge en un baño de sal-hielo a 0°C durante 30 minutos. La reacción se deja durante 28 horas a temperatura ambiente y finalmente el producto se obtiene mediante extracción por solvente en un embudo de decantación utilizando diclorometano y agua. La fase orgánica se seca usando sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra en el evaporador rotatorio. Se obtiene un producto aceitoso anaranjado.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1,21 (t, J= 7,1 Hz, 6H, a-H), δ 2,58 (t, J= 6,8 Hz, 2H, e-H), 3,36 (t, J= 7,5 Hz, 1H, d-H), 4,14 (c, J= 7,1 Hz, 4H, b-H), 4,99-5,09 (m, 2H, g-H), 5,63- 5,78 (m, 1H, f-H) / <sup>13</sup>C RMN (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 14,17 (a-C); 32,95 (e-C); 51,78 (d-C); 61,44 (b-C); 117,53 (g-C); 134,24 (f-C); 168,97 (c-C)/ Rendimiento: 93,9 %

## 5.5. Síntesis de 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo (2b)



En un balón de 2 bocas de 25 mL y bajo atmósfera de argón se añaden los reactivos en el siguiente orden, primero [Ir(cod)Cl]<sub>2</sub> (3,3 mg, 0,00417 mmoles), segundo DPPM (3,8 mg, 0,0099 mmoles), luego se agregan 5 mL de diclorometano resultando en una mezcla de color anaranjado. A continuación, se adiciona pinacolborano (1,1 mL, 7,49 mmol) usando una jeringa de vidrio y finalmente 2-alilmalonato de dietilo (200 mg, 0,998 mmoles). La solución resultante se deja a temperatura ambiente durante 48 horas, pero al comprobar que no había cambios en el producto de partida mediante el uso de cromatografía de capa fina, se procede a calentar a reflujo durante 4 horas. El producto se aísla de una columna cromatográfica, usando como eluyente DCM. Una vez identificadas las fracciones que contienen el producto, se juntan y se les evapora el solvente con la ayuda de un evaporador rotatorio. Se obtiene un aceite de color amarillo.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0,71-0,78 (m, 2H, g-H), δ 1,19 (s, 20H, a-H, f-H y i-H), 1,82-1,86 (m, 2H, e-H), 3,28 (t, J= 7,5 Hz, 1H, d-H), 4,09-4,17 (m, 4H, b-H) / <sup>13</sup>C RMN (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 11,52 (g-C); 14,16 (a-C); 24,91 (i-C); 34,49 (e-C); 52,05 (d-C); 61,25 (b-C); 83,01 (h-C); 171,89 (c-C) / <sup>11</sup>B RMN (128,38 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 19,610. Rendimiento: 36,48 %.

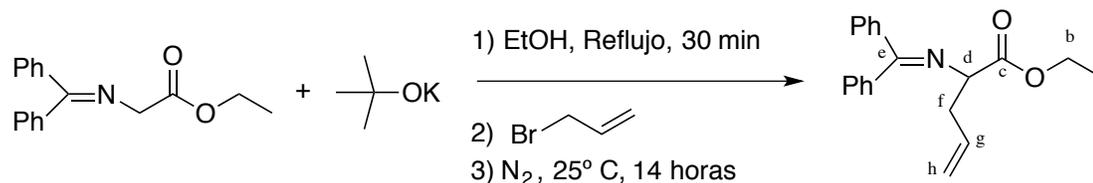
## 5.6. Síntesis de ácido-2-(3-boronopropil) malónico (2c)



Para el paso de la hidrólisis se utiliza un balón de 2 bocas de 25 mL y se agrega el compuesto a hidrolizar (50 mg, 0,152 mmoles) junto a 3 mL de ácido clorhídrico 6N y 3 mL de metanol. La reacción se deja a reflujo durante 18 horas revisando el progreso mediante cromatografía de capa fina. Como no hubo avance de la reacción se añaden 2 mL más de ácido clorhídrico 12N y se dejó durante 6 horas más a reflujo. Para separar el compuesto final se realiza una extracción por solvente empleando agua y DCM. Al comprobar que en la fase acuosa está la molécula de interés, se procede a remover el agua empleando un evaporador rotatorio y finalmente una bomba mecánica de alto vacío durante 30 minutos para asegurarse de remover cualquier traza de humedad. El producto obtenido es un sólido color café.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0,84(t,  $J= 7,1$  Hz, 2H, e-H),  $\delta$  1,41 (q,  $J= 7,5$  Hz, 2H, d-H), 1,87 (c,  $J= 7,6$  Hz, 2H, c-H), 3,38 (t,  $J= 7,1$  Hz, 1H, d-H) /  $^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14,49 (e-C); 22,10 (d-C); 31,03 (c-C); 52,86 (b-C); 170,47 (c-C) /  $^{11}\text{B}$  RMN (128,38 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 30,839/  
Rendimiento: 86,69 %.

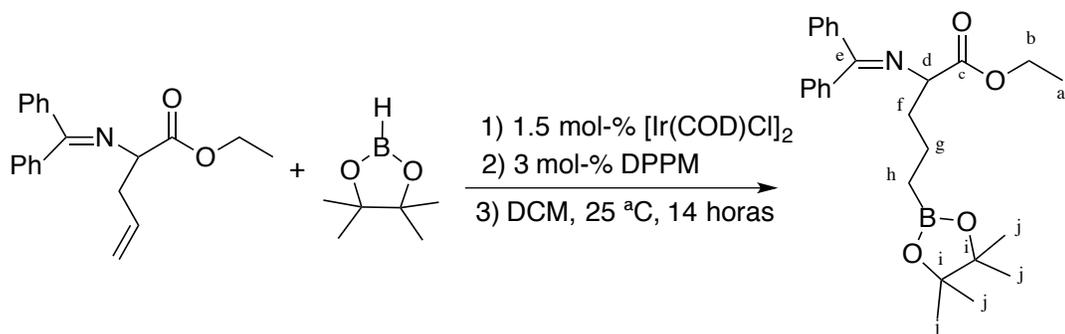
### 5.7. Síntesis de 2-((difenilmetilen)amino)-4-pentenoato de etilo (3a)



En un tubo de reacción se añade N-(difenilmetileno)-glicinato de etilo (300 mg, 1,122 mmoles), 3 mL de etanol, y a continuación la base (0,272 g, 0,0022 mmoles). La mezcla se deja a reflujo durante un lapso no mayor a 30 min, para luego añadir bromuro de alilo (0,204 mg, 0,0017 mmoles). La solución se adquiere de color amarillo al agregar el compuesto alquilante y se deja reaccionar durante 14 horas aproximadamente en condiciones de reflujo. Transcurrido el tiempo y utilizando la técnica de TLC para confirmar el avance de la reacción, se procede a extraer la muestra mediante el empleo de un embudo de decantación usando DCM y agua destilada. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora el solvente en un evaporador rotatorio. El resultado es un aceite opaco con una leve tonalidad amarilla.

<sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1,23 (t, J= 3H, a-H), 2,62-2,71 (m, 2H, f-H), 4,11-4,2 (m, 3H, b-H y d-H), 5 (t, J= 14,1 Hz, 2H, h-H), 5,59-5,80 (m, 1H, g-H), 7,15-7,79 (m, 10H)/ <sup>13</sup>C RMN (50,31 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 14,27; 38,16; 60,88; 65,34; 170,53; 171,74/ Rendimiento: 60,01 %.

### 5.8. Síntesis 2-((difenilmetilen)amino)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxaborolan-2-il) pentanoato de etilo (3b)



En un tubo de reacción se añaden cuidadosamente el catalizador  $[\text{Ir}(\text{cod})\text{Cl}]_2$  (1,29 mg,  $1,93 \times 10^{-3}$  mmoles), DPPM (1,43 mg,  $3,85 \times 10^{-3}$  mmoles), luego 3 mL de DCM, el alqueno (0,193 g, 0,964 mmoles) y finalmente pinacolborano (0,328 mL, 2,89 mmoles). Previo a cerrar el sistema, se intenta dejar una atmósfera inerte pasando una pequeña corriente de argón para desplazar el aire, tomando ventaja de la mayor densidad de este gas. El sistema se deja en agitación a temperatura ambiente durante 14 horas y se revisa el progreso de la reacción con TLC. Finalizado el tiempo, la muestra se evapora a sequedad, y se purifica en una columna de sílica gel usando como eluyente DCM. Se obtiene un aceite de color amarillo.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0,72 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H, h-H), 1,25 (s, 15H, a-H y j-H), 1,39-1,47 (m, 2H, g-H), 1,95 (q,  $J = 8$  Hz, 2H, f-H) 4,06 (t,  $J = 6,3$  Hz, 1H, d-H), 4,13-4,21 (m, 2H, b-H), 7,17-7,79 (10H) /  $^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 10,89; 14,15; 20,47; 24,46; 36,14; 60,58; 65,39; 82,84; 170,08; 172,29/  $^{11}\text{B}$  RMN (128,38 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 21,308/ Rendimiento: 95,84 %

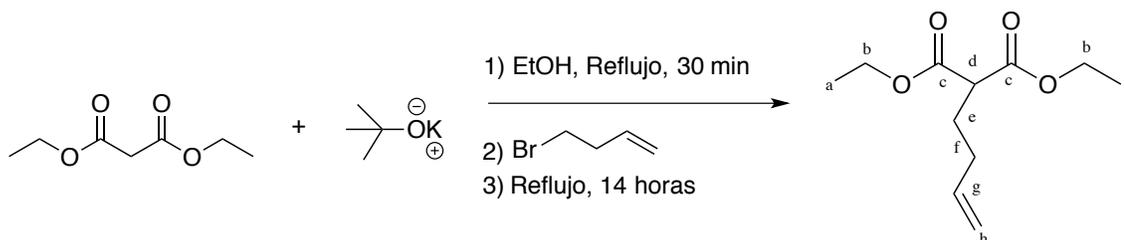
### 5.9. Síntesis ácido 2-amino-5-boronopentanoico (3c)



Dentro de un tubo de reacción con tapa roscada de teflón, se agregan el compuesto hidroborado (281 mg, 0,645 mmoles), 3 mL de MeOH y 3 mL de HCl 3N. La solución se deja a reflujo durante 2 horas, pero al realizar una placa de capa fina no se aprecia un cambio en el progreso de la reacción, por lo que se decide agregar 1 mL más de HCl 6N y dejarla durante 16 horas más. Finalizado el tiempo, la solución se neutraliza usando exceso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado y la solución amoniacal se purifica usando una columna de resina de intercambio iónico, eluyendo con hidróxido de amonio 2M. Las fracciones de interés se combinaron y concentraron en un evaporador rotatorio.

$^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0,72 (t,  $J=7,3$  Hz, 2H, e-H), 1,39-1,43 (m, 2H, d-H), 1,68-1,79 (m, 2H, c-H), 3,64 (t,  $J=6,1$  Hz, 1H, b-H) /  $^{13}\text{C}$  RMN (50,31 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 14,21; 19,65; 32,83; 54,95; 175,41/  $^{11}\text{B}$  RMN (64,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 19,24 ppm/ Rendimiento: 77,87 %

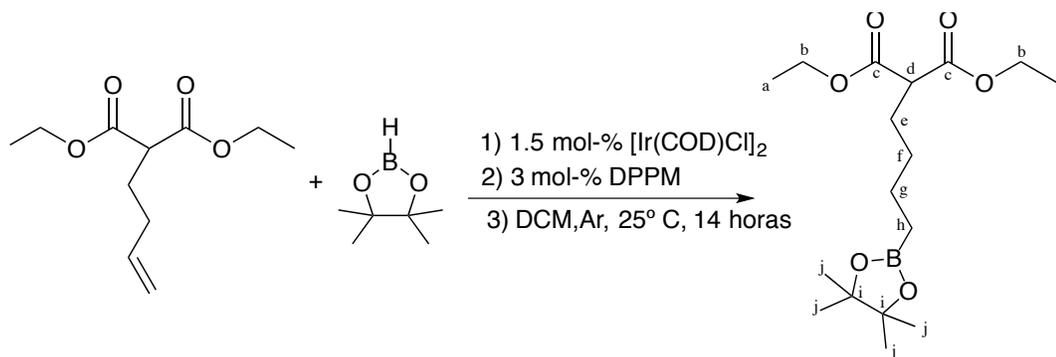
### 5.10. Síntesis 2-(3-buten-1-il) malonato de dietilo (4a)



Usando un tubo de reacción se masan el malonato de dietilo (0,4 mg, 2,49 mmoles), tertbutóxido (588,4 mg, 5,22 mmoles) y se agregan 3 mL de etanol; la solución se deja en condiciones de reflujo durante 30 minutos y luego se añade el alquilante (403 mg, 2,98 mmoles) tornando la solución de color amarillo. Se deja la reacción en condiciones de reflujo durante 14 horas más y se verifica la formación del producto final mediante TLC. El compuesto se aísla utilizando una columna cromatográfica, donde se juntan las fracciones de interés y se les remueve el solvente empleando un evaporador rotatorio. El producto final es de color amarillo y de aspecto aceitoso.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1,2 (t, J= 7,1 Hz, 6H, a-H), 1,94 (t, J= 7,4 Hz, 2H, e-H), 2,03 (t, J= 7,1 Hz, 2H, f-H), 3,27-3,30 (m, 1H, d-H), 4,12-4,15 (m, 4H, b-H), 4,93- 5,02 (m, 2H, g-H), 5,67-5,75 (m, 1H, h-H)/ <sup>13</sup>C RMN (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 14,19 (a-C); 27,97 (e-C); 31,41 (f-C); 51,31 (d-C); 61,39 (b-C); 116,04 (h-C); 137,01 (g-C); 169,49 (c-C)/ Rendimiento: 87,30 %

### 5.11. Síntesis de 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo (4b)



En un tubo de reacción se añade en una primera instancia los catalizadores de [Ir(cod)Cl]<sub>2</sub> (0,0293 mg, 4,36x10<sup>-2</sup> mmoles) y DPPM (0,0335 mg, 8,72x10<sup>-2</sup> mmoles) a continuación se agregan 3 mL de DCM previamente secados. Luego se añade pinacolborano (0,837 mg, 6,54 mmoles) y dietil 2-(3-buten-1-il) malonato (467,1 mg, 2,18 mmoles), se deja con agitación en una atmósfera inerte con argón por un periodo de 14 horas. Al constatar el avance de la reacción mediante TLC, el producto se purifica en una columna de sílica gel usando como fase móvil hexano y acetato de etilo. Las fracciones de interés se juntan en un balón y se les remueve el solvente utilizando un evaporador rotatorio y luego una bomba mecánica de alto vacío. Se obtuvo un producto aceitoso de color anaranjado.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0,72 (t, J= 7,4 Hz, 2H, h-H), 1,19 (s, 18H, a-H y j-H), 1,28 (q, J= 7,5 Hz, 2H, g-H), 1,39 (q, J= 7,5 Hz, 2H, f-H), 1,84 (c, J= 7,5 Hz, 2H, e-H), 3,26 (t, J= 7,5 Hz, 1H, d-H), 4,12-4,17 (m, 4H, b-H) / <sup>13</sup>C RMN (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10,88 (h-C); 14,11 (a-C); 23,67 (g-C); 24,84 (j-C); 28,53 (f-C); 29,89 (e-C); 51,93 (d-C); 61,05 (b-C); 82,90; 169,41 / <sup>11</sup>B RMN (128,38 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 19,610/ Rendimiento: 75,24 %

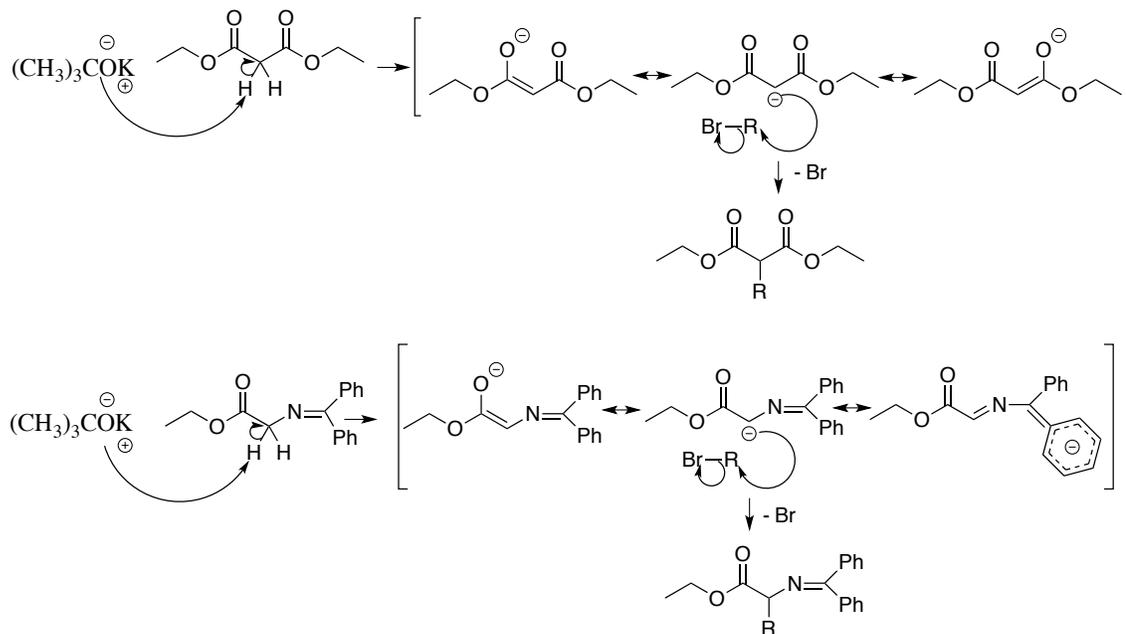
## 6. DISCUSIÓN

Al finalizar los experimentos es posible establecer que el objetivo primordial de sintetizar compuestos derivados de ácido 2(S)-amino-6-borohexanoico fue posible en su gran mayoría, lo que permitirá posteriormente realizar estudios sobre su potencial actividad biológica como inhibidor de la enzima arginasa. Los resultados de la espectroscopía RMN y de masa, ayudan a dilucidar el resultado obtenido y poder caracterizar los compuestos.

### 6.1. Mecanismos propuestos:

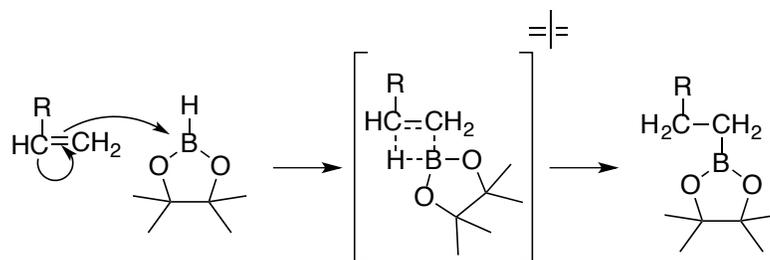
A continuación, se proponen los mecanismos que son comunes en las 4 síntesis:

Alquilación: El producto de partida (malonato de dietilo o N-(difenilmetilien)-glicinato de etilo) al ser tratado con una base origina un carbanión en el carbono  $\alpha$ , que genera estructuras resonantes, que luego ataca al haluro de alquilo para así formar el producto mediante una reacción  $SN_2$  <sup>(28)</sup>, tal como se ilustra en la figura 8:



**Figura 8:** Mecanismo de alquilación

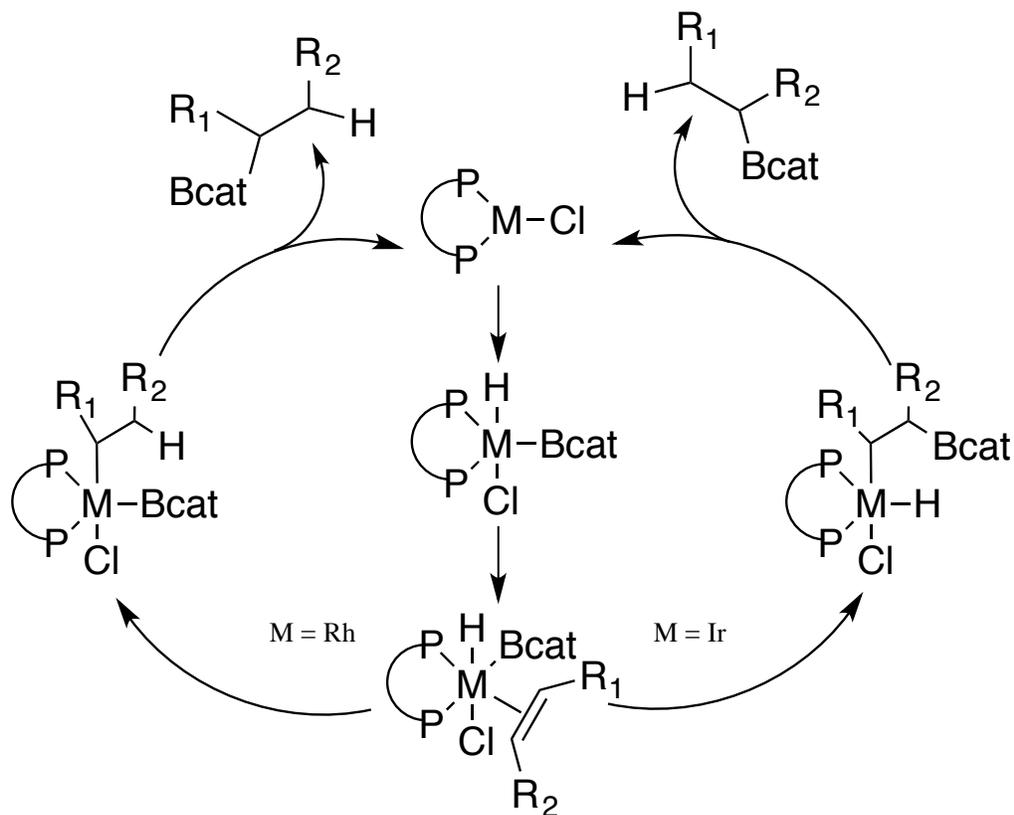
Hidroboración: La hidroboración de alquenos involucra un mecanismo de adición electrofílica de un solo paso a través de un estado de transición <sup>(29)</sup>, tal como se muestra en la figura 9:



**Figura 9:** Mecanismo de hidroboración de una olefina.

La reacción comienza cuando la olefina ataca al boro del pinacolborano formando el estado de transición, que luego da paso al producto *syn* anti-Markovnikov favorecido por el impedimento estérico presente en la molécula, que generan los grupos ésteres. Por otra parte, en este experimento se trabajó con un complejo de iridio, por lo que existen diferencias con el mecanismo anterior.

En la figura 10, es posible observar cómo se desarrolla la hidroborcación catalizada por iridio y además se realiza una comparación con un mecanismo de hidroborcación usando un complejo análogo de rodio.

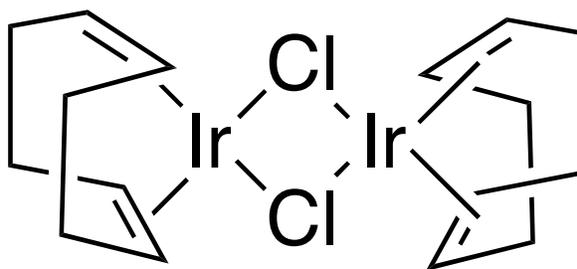


**Figura 10:** Ciclo catalítico de hidroborcación utilizando complejos de Iridio y Rodio

La bibliografía establece que los complejos de iridio poseen una regioselectividad superior que los complejos de rodio <sup>(30)</sup>. Al observar la figura 7, y asumiendo que R<sub>1</sub> es una cadena de hidrocarburos y R<sub>2</sub> un hidrógeno, el complejo de iridio catalizará y producirá la hidroborcación del carbono terminal llegando a obtener incluso a un 100% de rendimiento. Por el contrario, el resultado que se obtiene realizando una hidroborcación catalítica con complejos de rodio, resulta en una mezcla con una razón de 3:1 entre productos que se hidroboran siguiendo la regla de Markovnikov y los productos anti-Markovnikov.

Otra ventaja comparativa que poseen los catalizadores de iridio con respecto a otros, es su valor económico <sup>(31-32)</sup>. El precio de este catalizador es menos de la mitad de lo que cuesta su homólogo de rodio. Esta característica es de gran relevancia al momento de hacer una proyección de la síntesis a mayor escala, pues cumple con unos de los objetivos primordiales de este trabajo, que es el de abaratar los costos.

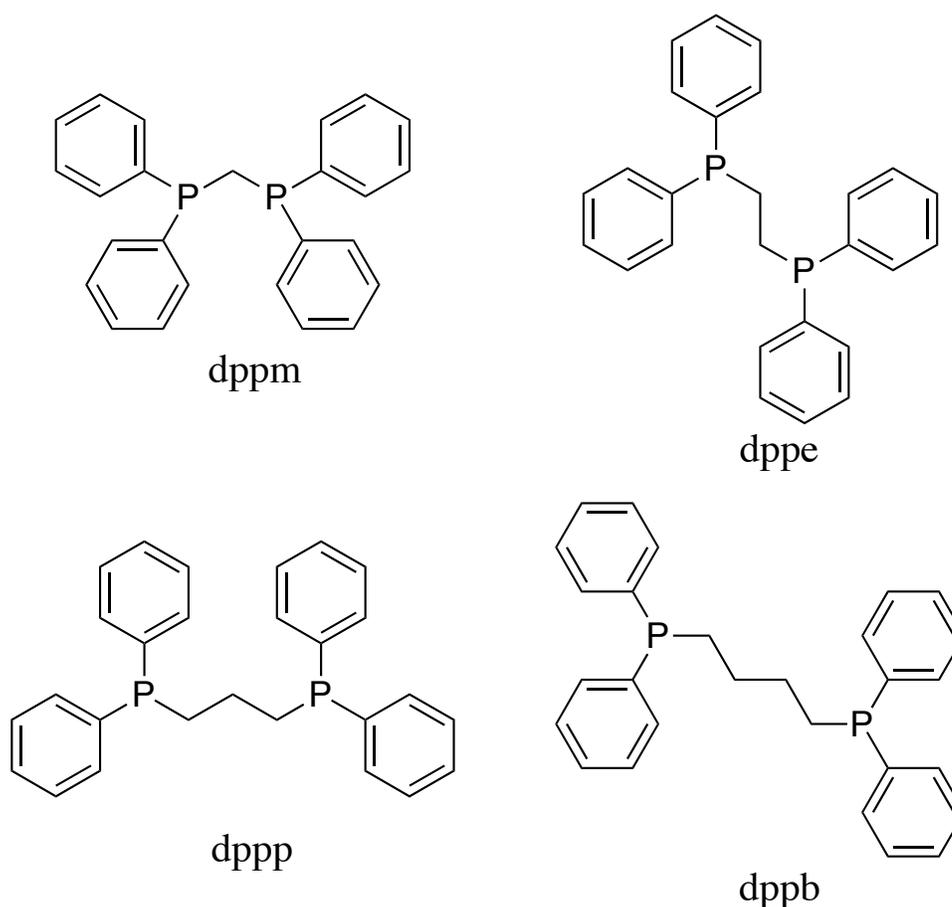
El catalizador ocupado en esta investigación fue el dicloruro de bis(1,5-ciclooctadieno)diiridio (I) que posee la siguiente estructura:



**Figura 11:** Estructura de [Ir(cod)Cl]<sub>2</sub>

Este catalizador es un dímero que se ocupa como precursor para la catálisis. Es un sólido de color naranja y es soluble en solventes orgánicos.

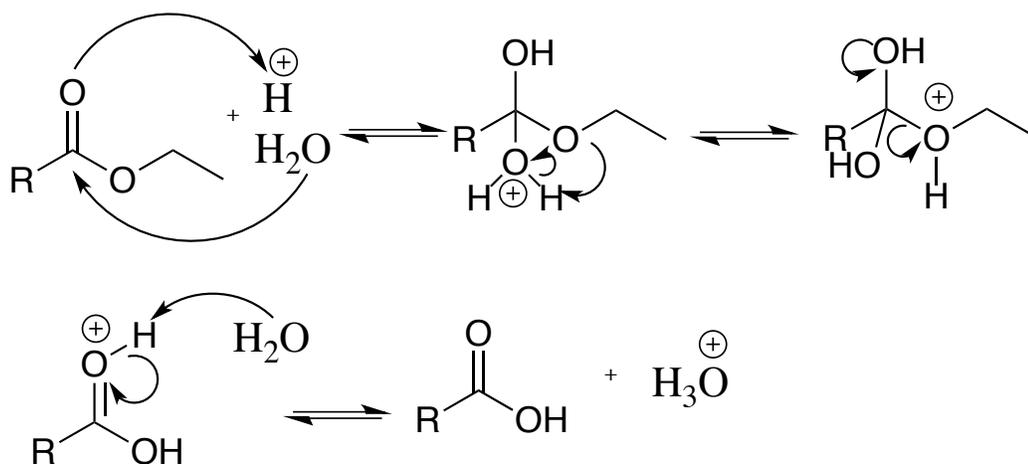
Además del catalizador, para poder llevar a cabo esta reacción es necesario un ligando. La elección del ligando se realizó según la experiencia de Yasunori Yamamoto y col. <sup>(33)</sup>, debido a que el mayor rendimiento de hidroboración se obtuvo al utilizar el complejo de  $[\text{Ir}(\text{cod})\text{Cl}]_2$  junto con dppm, aventajando con un 89% de rendimiento a otros ligandos de fosfina utilizados tales como: dppe, dppp y dppb que se muestran en la figura 12.



**Figura 12:** Distintos tipos de ligandos de fosfina usados por Yasunori Yamamoto y col <sup>(33)</sup>.

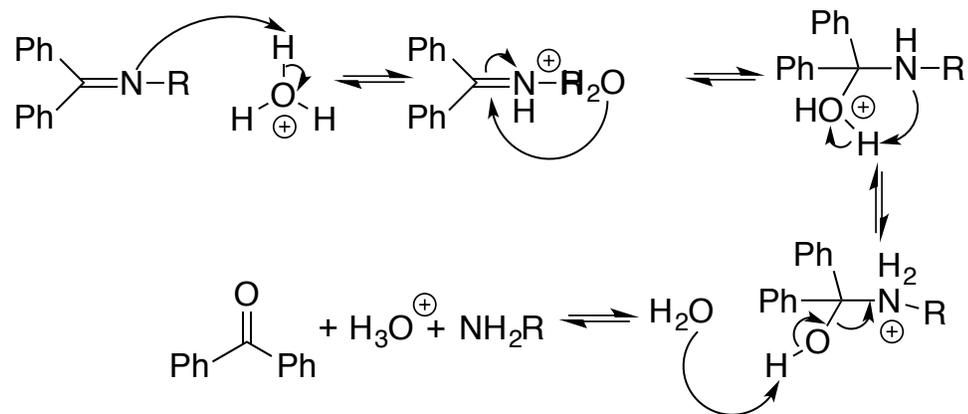
La adición de un ligando al proceso de hidroborcación catalítica tiene 2 propósitos importantes: i) garantizar un sitio de coordinación requerido para la adición oxidativa del pinacolborano y ii) desestabilizar el enlace Ir-B como consecuencia de su naturaleza electro-atractora y por tanto facilitar la formación del nuevo enlace C-B<sup>(30)</sup>.

Hidrólisis: En esta investigación se utilizó la hidrólisis ácida con etanol y ácido clorhídrico. El mecanismo hidrolítico procedería según se muestra en la figura 13<sup>(34)</sup>:



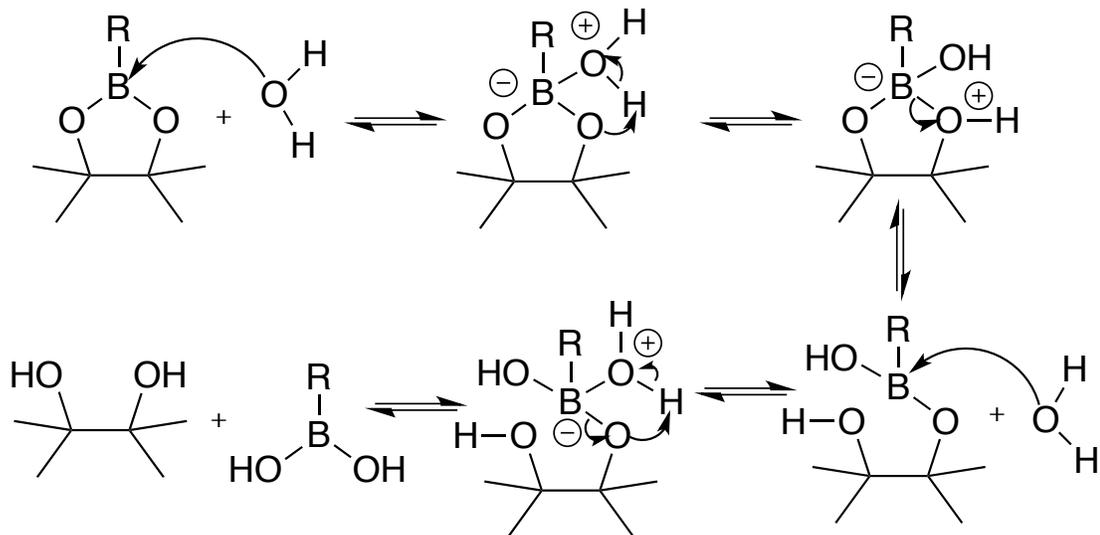
**Figura 13:** Mecanismo de hidrólisis ácida del grupo éster.

Para el caso de la hidrólisis de la imina que protege al aminoácido el mecanismo sería el que se ilustra en la figura 14<sup>(35)</sup>:



**Figura 14:** Mecanismo de hidrólisis de una imina

Por último, para la formación del ácido bórico, la hidrólisis procedería según se explica en la figura 15 <sup>(36)</sup>:



**Figura 15:** Mecanismo de reacción de la hidrólisis del pinacolborano

## 6.2. Síntesis:

### 6.2.1. Síntesis 2,2-dialilmalonato de dietilo (1a):

Esta síntesis teóricamente no representa gran complejidad, pues el tratamiento con etóxido de sodio en relación 2,2 : 1 con respecto al malonato de dietilo basta para hacer efectiva la dialquilación con bromuro de alilo se produzca sin problemas. Sin embargo, para esta síntesis se intenta replicar y por tanto seguir las mismas especificaciones que la síntesis de ABH previamente realizadas en el proyecto FONDEF D11/1098 <sup>(37)</sup>, y de este modo corroborar si esta condición es necesaria para una alquilación exitosa. La purificación de este compuesto también resultó sencilla, porque luego de haber realizado un seguimiento mediante placas de TLC y evidenciar que el material de partida desapareció, solo bastó una extracción con solvente para separar en la fase acuosa la base y en la orgánica el compuesto de interés.

Con la ayuda de la espectroscopía es posible verificar la existencia del compuesto. En la espectroscopía <sup>1</sup>H RMN, se aprecia la ausencia de la señal típica de los protones alfa del malonato de dietilo que poseen un desplazamiento químico en 3,4 ppm y que afecta también a la señal del carbono que pasa desde 41,6 ppm a 57,22 ppm, señal que en la espectroscopía DEPT no se ve pues pertenece a un carbono cuaternario, comprobando que la alquilación resultó. Otras señales que dan cuenta de la formación del producto, son las de los protones pertenecientes al alqueno, que integra para 2 y 4 protones y poseen un desplazamiento químico de 5,48-5,59 y 4,96-4,99 ppm respectivamente, siendo la prueba de que existe una dialquilación. Analizando el espectro <sup>13</sup>C, se aprecian las señales que confirman la presencia de los carbonos pertenecientes al doble enlace cuyos desplazamientos químicos son 119,03 y 132,37 ppm.

### 6.2.2. Síntesis de 2,2-bis(3-(3,3,4,4-tetrametilborolan-1-il)propil)malonato de dietilo (1b):

Para la obtención de este producto se siguieron los pasos ocupados en la literatura <sup>(33)</sup>. Empleando como catalizador un complejo de iridio, un ligando de fosfina, DCM (que se debía secar previamente dejándolo una noche con cloruro de calcio y luego destilarlo usando pentóxido de fósforo bajo una atmósfera de nitrógeno <sup>(38)</sup>) y pinacolborano se realizó una nueva síntesis, con reactivos distintos a los utilizados previamente en el proyecto FONDEF D11/1098 <sup>(37)</sup>. Uno de los reactivos que se cambió fue el catecolborano, debido a que es muy sensible al aire y suele descomponerse con facilidad resultando en una solución coloidal de coloración negra, y en su lugar se utilizó pinacolborano que no presenta este problema <sup>(39)</sup>.

Tal como indica Y. Yamamoto y col <sup>(33)</sup>, el compuesto se purificó con el uso de una columna de sílica gel y como fase móvil DCM donde finalmente se consiguió un aceite de color naranja que no estaba totalmente puro, razón atribuible a que solo se utilizó una elución que careció de una gradiente de polaridad.

Al analizar la espectroscopía <sup>1</sup>H RMN, se comprueba que el compuesto obtenido no presenta las señales de los protones del doble enlace, porque en su lugar la hidroboreación anti-Markovnikov deja señales características de un metileno a alto campo en 0,68 ppm. También es apreciable el aumento en la integral de los protones con desplazamiento en 1,14 ppm correspondiente a los metilos del pinacolborano. En la espectroscopía <sup>13</sup>C RMN las señales más importantes son las que corresponden a los carbonos cuaternarios del pinacolborano cuyo desplazamiento químico es de 82,89 ppm, y también los carbonos de los metilos del pinacolborano que poseen un desplazamiento de 24,79 ppm.

### 6.2.3. Síntesis de ácido 5-borono-2-(3-boronopropil) pentanoico (1c)

La hidrólisis del producto anterior se realizó con el fin de remover los grupos protectores de la molécula, es decir, el etilo y pinacol. Ambas remociones no deberían presentar mayor problema, sin embargo, bajo condiciones muy fuertes, el pinacolborano podría presentar los problemas antes mencionados y también podría ser reemplazado por un grupo hidróxilo, según experiencias previas en esta investigación para este mismo paso sintético.

Para intentar purificar este producto, no se puede utilizar una columna de sílica gel, pues el compuesto presenta gran polaridad y no eluye con ningún solvente orgánico. Es por esto que mediante el uso de una mezcla de: 1-butanol, ácido acético glacial y agua (en una relación 4:1:1 respectivamente) se eluyeron placas TLC para así lograr un mayor  $R_f$  del compuesto y compararlo con el precursor para comprobar el avance de la reacción. La obtención del producto final se intentó realizar en una columna de intercambio iónico con el fin de que los compuestos polares quedaran retenidos y los orgánicos eluyeran primero. El resultado final fue un rendimiento bastante bajo, por lo que se puede establecer que la metodología no fue la óptima.

Con tan poca cantidad de muestra, fue preferible realizar una espectroscopía de masas para identificar el compuesto. La masa del ión molecular coincide con el peso molecular del compuesto esperado, y el pico base corresponde a la ruptura de un grupo hidroxilo del compuesto, así como el que aparece en 169 m/z. El segundo pico secundario de 187 m/z corresponde a la pérdida de un grupo borónico, al igual que el correspondiente al pico que aparece en 141 m/z.

#### 6.2.4. Síntesis de 2-alilmalonato de dietilo (2a)

Para lograr la monoalquilación del malonato de dietilo, se utilizó una base con una equivalencia de 1:1 con respecto al material de partida y además se agregó un pequeño exceso de material alquilante. Utilizando una base débil se intenta la abstracción del protón alfa y lograr la formación del nucleófilo. También se limitó la cantidad de electrófilo para lograr el mismo objetivo de monoalquilar.

En este paso se logró un alto rendimiento, y además el producto se pudo verificar con los resultados de la espectroscopía RMN. Las señales más destacadas son: la señal que integra para 1 protón entre 3,36 ppm, corresponde al único protón en posición alfa que queda en el malonato de dietilo y cuyo carbono sufre un desplazamiento a 51,78 ppm; Las señales de bajo campo a 4,99- 5,09 y 5,63- 5,78 ppm indican la presencia de protones del alqueno que integran para 2 y 1 protones respectivamente, que en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN aparecen en 11,53 y 134,24 ppm.

En la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  RMN DEPT es posible apreciar que en 51,77 ppm existe una señal correspondiente a un metino, que sería el carbono  $\alpha$ . También se aprecia la existencia un pico que apunta hacia arriba 134,22 ppm y otro hacia abajo en 117,52 ppm correspondientes al metino y metileno del doble enlace.

### 6.2.5. Síntesis de 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil) malonato de dietilo (2b)

Este paso de hidroborcación tuvo un mal rendimiento pese a tomar todas las medidas necesarias, como haber secado previamente el DCM a utilizar y haber agregado el pinacolborano pinchando con una jeringa de vidrio a través del frasco contenedor y luego agregándolo al sistema que se encuentra purgado con argón. Otro posible factor que haya afectado el resultado, es la utilización de la columna de sílica con una elución única de DCM.

Las principales señales de espectroscopía a analizar en esta molécula son: la desaparición del enlace  $\pi$  del doble enlace que fueron reemplazados por un enlace con un protón y a con grupo borado. Las señales de los protones del carbono terminal de la cadena unido a boro, tienen un desplazamiento químico de 0,71- 0,78 ppm y en la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN este carbono tiene una señal de forma gaussiana en 11,52 ppm. El aumento de la integral en la señal de 1,19 ppm es la suma de los protones de los metilos del malonato de dietilo, del pinacolborano y al metileno vecino al carbono enlazado al boro; que en conjunto completan los 20 protones de la integral.

En la espectroscopía  $^{11}\text{B}$  RMN se puede observar la aparición de una señal en 19,61 ppm, corroborando la adición del pinacolborano a la estructura.

### 6.2.6. Síntesis de ácido-2-(3-boronopropil)malónico (2c)

En base a la experiencia anterior, se realizó la hidrólisis aumentando la concentración de ácido en el medio y se procuró no terminar con la reacción hasta que los resultados que reveló el TLC no fueran los esperados. Luego de comprobar que lo antes mencionado se cumpliera, se decidió realizar una extracción por solvente con agua y DCM. Este hecho probablemente pudo haber influido positivamente en el rendimiento final de la molécula, ya que, con la extracción se evitó una mayor pérdida de lo que podría provocar en la columna de resina de intercambio iónico.

En este caso, la primera señal de interés para revisar si las condiciones de mayor acidez en el medio no afectaron al grupo boronato, es la que arroja la espectroscopía del  $^{11}\text{B}$  RMN en 30,84 ppm, que confirma la existencia del grupo de interés. La ausencia de las señales de los metilos (1,19 ppm y 14,16 ppm para la espectroscopía  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN respectivamente) y metilenos (4,9-4,17 ppm y 61,25 ppm en  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN respectivamente) confirman la hidrólisis de los grupos éster del malonato de dietilo, y que en el caso del pinacolborano la desprotección se evidencia en la desaparición de los carbonos cuaternarios en 83,01 ppm.

En la espectroscopía  $^{13}\text{C}$  RMN DEPT se puede apreciar con mayor notoriedad la presencia de 3 señales de  $\text{CH}_2$ , una en 14,49 ppm, otra en 22,10 ppm y otra en 31,03 ppm que pertenecen a la cadena lateral con que se alquiló en un principio. La señal que apunta hacia arriba en 52,88 ppm indica la persistencia del metino en la molécula, y que por lo tanto solo hubo hidrólisis y no una descarboxilación posterior.

### 6.2.7. Síntesis 2-((difenilmetileno)amino)-4-pentenoato de etilo (3a)

En la síntesis de este aminoácido (ABP) se utilizó un compuesto que posee como grupo protector un etilo para el ácido carboxílico y una imina para la amina. Se agregó una base débil para lograr la abstracción de solo un protón. Aunque se agregó en exceso, la monoalquilación se logró dejando como reactivo limitante el bromuro de alilo. La muestra se dejó durante el tiempo suficiente para que reaccionara todo el material de partida. El bajo rendimiento podría haber mermado debido a un posible impedimento estérico que afectara a la base al abstraer el protón  $\alpha$ , pues se encuentra cercano a una gran nube electrónica dada por el doble enlace de la imina y los grupos fenilos.

Analizando los resultados de la espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN, se puede ver una señal que integra para 3 protones en 4,11-4,2 ppm pertenecientes al metilo del grupo etilo y al protón alfa remanente en la molécula de partida; otras señales importantes para esta molécula son las del grupo alilo, que se diferencian de las aromáticas porque aparecen en 5 y 5,59-5,8 ppm.

#### 6.2.8. Síntesis 2-((difenilmetileno)amino)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxaborolan-2-il)pentanoato de etilo (3b)

Para este paso se utilizó un exceso de pinacolborano bastante considerable con el fin de asegurarse de que la hidrobioración se produzca. Por última vez en esta síntesis se intentó purificar el compuesto con una elución sin gradiente de DCM en una columna de sílica gel, y se obtuvieron mejores resultados pues el pinacol sobrante de la reacción eluyó primero dejando el producto de interés para el final.

Al igual que los otros casos de hidrobioración previos, las señales que son las más importantes son: la que aparece a alto campo para la espectroscopía  $^1\text{H}$ RMN en 0,72 ppm (y 10,89 ppm para la  $^{13}\text{C}$  RMN) perteneciente a los protones unidos al carbono terminal de la cadena vecino al boro del pinacol borano; la presencia de este grupo en la síntesis también es apreciable debido a las señales en 1,25 ppm que integran para todos los protones de los metilos de la molécula, pero que en  $^{13}\text{C}$  RMN se diferencian, ya que, la señal del grupo etilo es de 14,15 ppm y en el pinacolborano esta señal de los metilos se encuentra con un desplazamiento químico de 24,46 ppm.

En la espectroscopía  $^{13}\text{C}$  RMN DEPT se pueden ver las señales que apuntan hacia abajo pertenecientes a los metilenos de la cadena lateral de 3 carbonos, en 10,89 ppm, 20,46 ppm y 36,14 ppm que van desde el carbono adyacente al grupo boronato hasta el carbono  $\beta$  al carbonilo.

Por último, la señal de  $^{11}\text{B}$  RMN en 21, 31 ppm es la que termina por confirmar la hidrobioración del alqueno.

### 6.2.9. Síntesis ácido -2-amino-5-boronopentanoico (3c)

Durante esta hidrólisis se decidió partir de una concentración de ácido más baja para no provocar alguna reacción no deseada, sin embargo, transcurrido el tiempo y al comprobar mediante TLC que la reacción aún no concluía, se decidió agregar mayor concentración de ácido. Luego de la etapa de purificación mediante una columna de resina de intercambio iónico, la muestra parece estar limpia, pero al revisar los espectros obtenidos se demuestra que también tiene impurezas.

Partiendo por el ácido borónico, el espectro  $^{11}\text{B}$  RMN revela la presencia de este al mostrar una señal en 19,24 ppm. El metileno adyacente a este grupo se manifiesta con un triplete en 0,72 ppm para los protones y en 14,21 ppm para el carbono. El grupo carbonilo de este aminoácido tiene una señal característica en 175,41 ppm en la espectroscopía  $^{13}\text{C}$  RMN y el carbono que se encuentra en medio del grupo amino y ácido presenta una señal de 54,95 ppm y en 3,64 ppm para su único protón. Finalmente, los grupos metilenos restantes se diferencian por tener un desplazamiento químico singular debido a la cercanía a distintos grupos; el más cercano al ácido bórico se encuentra menos desprotegido por lo que sus protones tienen una señal en 1,39-1,43 ppm y su carbono en 19,65 ppm, mientras que los protones más desapantallados del otro grupo metileno aparecen en 1,68-1,79 ppm.

#### 6.2.10. Síntesis 2-(3-buten-1-il)malonato de dietilo (4a)

Esta reacción en un principio presentó algunas dificultades pues no se lograba realizar la alquilación, incluso añadiendo más base o elevando significativamente la temperatura, se pensó que tal vez se estaba formando el 1,3-butadieno y que por lo tanto la reacción carecía de un electrófilo. Sin embargo, cuando se reemplazó la base por la misma, pero de un frasco recién abierto, la reacción funcionó. El paso de purificación, se logró de mejor manera y esto permitió que el rendimiento de la reacción aumentara considerablemente.

Al observar los espectros obtenidos, se puede apreciar la alquilación mediante la señal que hay en 3,27-3,30 ppm y que integra para 1 protón perteneciente al protón  $\alpha$ . En la espectroscopía  $^1\text{H}$  RMN existe una señal en 2,03 ppm que integra para 4 protones correspondientes a los dos grupos metílicos del bromobuteno, que se diferencian en las señales de  $^{13}\text{C}$  RMN, pues el más cercano al doble enlace posee un desplazamiento químico en 31,41 ppm y el otro en 27,97 ppm. Y por último el metino del doble enlace tiene una señal que integra para 1 en 5,67- 5,75 ppm y el metileno unido tiene una señal que integra para 2 protones en 4,93- 5,02 ppm; los carbonos aparecen en 137,01 y 116,04 ppm respectivamente.

### 6.2.11. Síntesis 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil) malonato de dietilo (4b)

Con ayuda de un tubo de reacción tapado con una tapa rosca de teflón se quiso lograr un sellado óptimo que lograra mantener una atmósfera inerte de argón. A diferencia del resto de las hidroboraciones realizadas, la purificación se hizo con una gradiente de eluciones de acetato de etilo y hexano, obteniendo mejores resultados; esta nueva forma de purificación no se había realizado antes principalmente porque la bibliografía sugería la utilización de DCM, para evitar que cualquier traza de agua que existiera en el acetato pudiese reemplazar el pinacolborano por un grupo hidroxilo.

Como evidencia de que la hidroboración pudo concretarse, primero se analizan las señales de  $^1\text{H}$  RMN, se puede observar que aparece una señal que presenta un singulete a alto campo, que integra para 2 protones y cuyo desplazamiento químico es de 0,72 ppm, correspondiente al metileno que se encuentra unido a pinacolborano y cuyo carbono tiene un desplazamiento químico de 10,88 ppm. El carbono con posición  $\beta$  con respecto al boro ahora integra para 2 protones con un quinteto cuyo desplazamiento químico es de 1,28 ppm y su carbono aparece en 23,67 ppm.

Al igual que las hidroboraciones anteriores es importante fijarse en las señales pertenecientes al pinacolborano, donde la espectroscopía  $^{11}\text{B}$  RMN, muestra una clara señal en 33,98 ppm. Para el caso de la espectroscopía  $^{13}\text{C}$  RMN, las señales correspondientes a los metilos aparecen en 24,84 ppm y las referentes a los carbonos cuaternarios aparecen en 82,90 ppm. Finalmente, en la espectroscopía de  $^1\text{H}$  RMN, los metilos aparecen a alto campo y superpuestos con los metilos del grupo etilo del malonato de dietilo con un desplazamiento de 1,19 ppm.

### 6.3. Comparación de los pasos sintéticos de cada molécula objetivo

A continuación, en la tabla 1 se muestran los porcentajes de rendimiento de cada paso sintético realizado durante la investigación. Estos datos permiten realizar una comparación entre cada molécula estudiada y ayudan a ver cuáles son las falencias y ventajas que presentó cada paso.

**Tabla 1: Resumen de los rendimientos por paso y globales de cada molécula expresados en porcentaje (%):**

	<b>Alquilación</b>	<b>Hidroboración</b>	<b>Hidrólisis</b>	<b>Global</b>
<b>ácido -4-borono-2-(2-boronoetil)butanoico</b>	71,3	81,54	18,5	10,76
<b>ácido-2-(3-boronopropil)malónico</b>	93,9	36,48	86,69	29,69
<b>ácido -2-amino-5-borono-pentanoico</b>	60,01	95,84	77,87	44,79
<b>ácido 6-borono-hexanoico</b>	87,3	75,24	X	65,68

Al analizar esta tabla se pueden establecer algunos puntos:

- El paso de alquilación es donde se obtuvo el mayor rendimiento. Sin embargo, es posible apreciar que el menor valor se obtuvo al ocupar la imina como compuesto de partida. Tal vez como se ocupó una base más débil (tertbutóxido de potasio) y con una nube electrónica más voluminosa que el

etóxido de sodio, presentó algún problema al intentar abstraer el protón, además que los grupos fenilos también podrían haber influido en un posible impedimento estérico que perjudicó la reacción. Por otro lado, la base que ayudó a mejorar el rendimiento fue el  $K_2CO_3$ ; pero se debe notar que las cantidades que se utilizaron para este fin, fueron muy superiores a la empleada en los otros casos.

- En la hidrobtoración, no se variaron las condiciones de reacción entre las distintas síntesis. Pero se observa de la tabla 1, que el menor rendimiento se obtuvo cuando se requería hidrobtorar dos grupos alquenos en la misma molécula. Tal vez es necesario más tiempo de reacción y/o agregar mayor cantidad de catalizador. También es importante notar que una elución con gradiente de acetato de etilo y hexano, también fue útil al momento de realizar la purificación.
- La hidrólisis ácida realizada en las moléculas fue un paso bastante complejo de realizar. Cuando se agregaron mayores cantidades de ácido clorhídrico y se mantuvo en condiciones de reflujo durante mucho tiempo, ocurrió la hidrólisis esperada de los esteres o del grupo imina, pero existió la posibilidad de que el pinacolborano fuera desplazado por un grupo hidroxilo. Además, el paso final de la purificación es bastante complejo, ya que, las moléculas deseadas tienen una gran polaridad y separarlas mediante TLC no es factible. Finalmente, la hidrólisis del ABH no se pudo concretar debido a la posible contaminación de algún reactivo, que se evidenció al comprobar que en los espectros RMN de  $^1H$  existían señales que indicaban la presencia de señales aromáticas y no aparecían las señales correspondientes a los metilenos.

#### 6.4. Efectos esperados en medición de actividad biológica

Antes de discutir sobre resultados de bioactividades, es preciso aclarar que el enfoque de esta investigación era la síntesis orgánica de nuevas moléculas que fueran potenciales inhibidores de arginasa, es por esta razón que se discutirá de modo hipotético que es lo que se esperaría de los ensayos biológicos.

Previamente, Preite y col. <sup>(37)</sup>, analizaron las bioactividades de dos moléculas: el ABP y el ABH, cuyos los resultados aparecen en la figura 16:

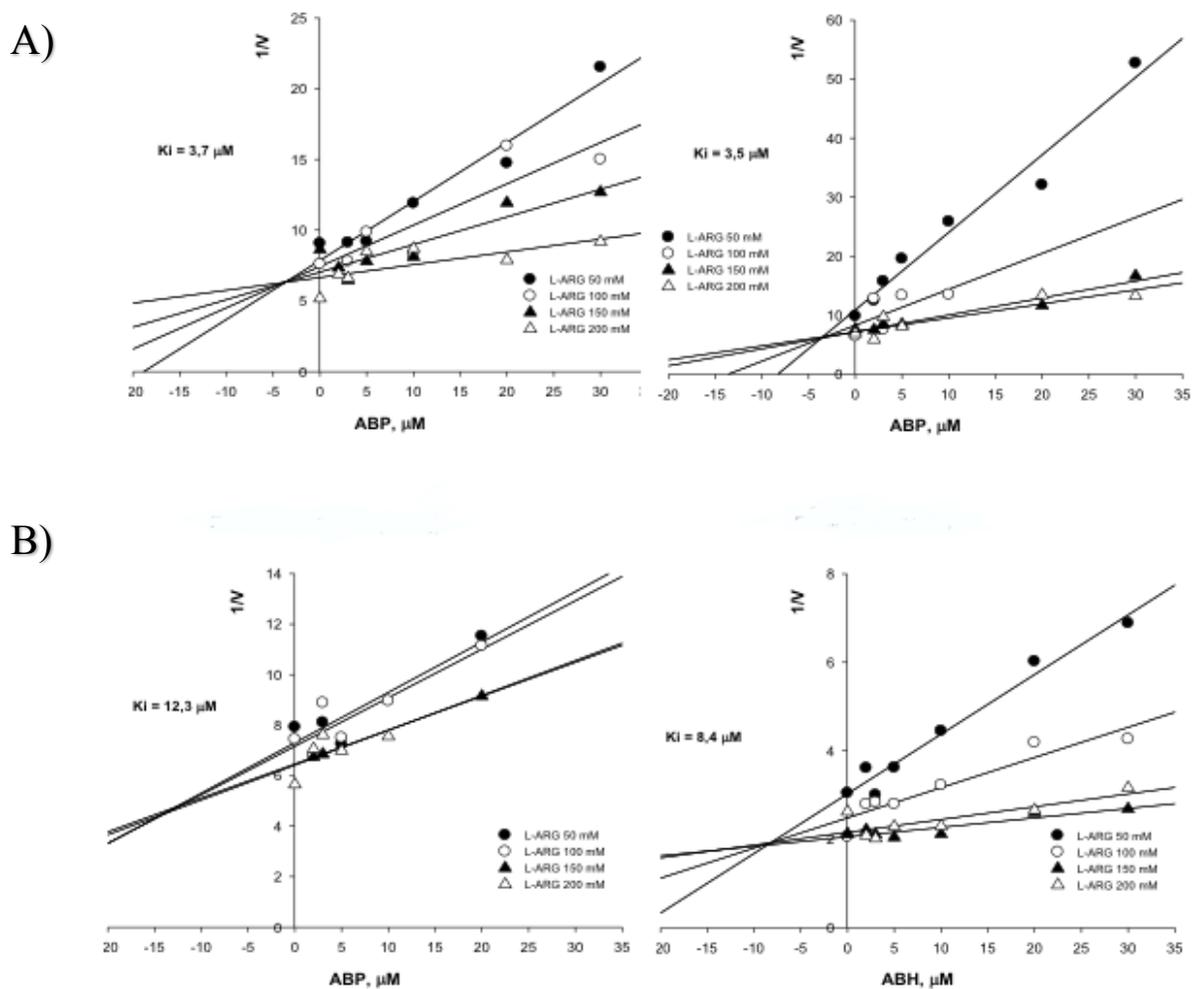


Figura 16: Gráficos de Dixon para las moléculas de A) ABP y B) ABH

La primera observación que se puede hacer es que los gráficos de Dixon coinciden con un mecanismo de inhibición enzimática competitiva <sup>(40)</sup>. Este resultado es de gran importancia para corroborar que las moléculas objetivo estarían cumpliendo su rol de inhibidoras y a su vez compiten con el sustrato (que en este caso es la arginina) por el sitio activo de la enzima arginasa.

Un segundo análisis tiene que ver con el valor de  $K_i$  (constante de inhibición) de cada molécula. Se sabe que un menor valor de  $K_i$  implica una mayor afinidad de la molécula por el sitio activo y en consecuencia se necesita una menor concentración de la droga para lograr el efecto inhibidor en la enzima <sup>(41)</sup>. En vista de la característica antes descrita, es posible observar que el ABP posee un menor  $K_i$  con respecto al ABH, este hecho estaría dando a entender que el largo de la cadena afecta el modo cómo el inhibidor se acopla en el sitio activo de la enzima. Por esta razón es que se hace interesante estudiar si las otras moléculas que se alquilaron con bromuro de alilo, también mejoran su afinidad al tener un largo de cadena más corta.

Una inquietud que también se podría aclarar con los bioensayos, es sobre la importancia del grupo amino en la molécula. Esto podría resolverse utilizando el ácido-2-(3-boronopropil) malónico, y ver como se afecta el valor de  $K_i$ . Tal vez el tener 2 grupos ácidos le dé la opción de interactuar con otros residuos aminoacídicos del sitio activo y afectar de modo positivo o negativo la inhibición.

Finalmente, el ácido-4-borono-2-(2-boronoetil) butanoico podría entregar información si la adición de un nuevo grupo boronato a la molécula potencia sinérgicamente al inhibidor y ayuda a formar nuevas interacciones de coordinación con el cluster de magnesio dentro de la arginasa.

Con estas nuevas interrogantes planteadas, y sabiendo que una cadena de 5 carbonos parece ser la adecuada, se tendrían que realizar los nuevos bioensayos

para determinar el valor de  $K_i$  y en base a los resultados saber cuál es la molécula que con una menor concentración logra inhibir la enzima arginasa y de este modo, se podría elaborar un nuevo fármaco con un menor costo, ya que, una dosis más baja abarataría los costos de producción y se cumpliría el objetivo de este trabajo.

## 7. CONCLUSIONES:

- Se logró la síntesis del ácido-4-borono-2-(2-boronoetil) butanoico con un rendimiento global de 10,76%, donde el paso de hidrólisis fue el que presentó mayores problemas.
- El ácido-2-(3-boronopropil) malónico se sintetizó con un rendimiento global de 29,69%. El paso de menor rendimiento fue la hidrobtoración de los 2 grupos alquenos.
- En el caso del ácido -2-amino-5-boronopentanoico, la alquilación fue el paso sintético que mermó el rendimiento global que llegó al 44,79%.
- El ácido-2-amino-6-boronohexanoico no pudo sintetizarse, ya que, durante la hidrólisis ocurrió una contaminación que impidió obtener el producto deseado.
- Fue posible cumplir con 3 de los 4 objetivos específicos, sin embargo, en trabajos posteriores, se podría realizar una síntesis convergente con el fin de mejorar el rendimiento global de la reacción. Para lograr esto, primero se debería hidrobtorar la cadena que posee el alqueno, y luego alquilar el ácido o aminoácido correspondiente. Sin embargo, se deberían estudiar bien las condiciones para no hidrolizar accidentalmente el pinacolborano durante el proceso.
- Según estudios realizados previamente en el proyecto FONDEF D11/1098 en el que se enmarca esta tesis, el ABP tendría una mayor afinidad por el sustrato que el ABH. Esta nueva evidencia establecería la importancia del largo de la cadena con la que se realizó el paso de alquilación. Se hace interesante entonces saber que ocurrirá con las nuevas moléculas sintetizadas, para poder establecer que grupos funcionales son los que poseen una mayor influencia en el efecto inhibitor de la enzima, y de este modo lograr la síntesis de una molécula mejorada.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Zieve, D., Ogilvie, I. (2016). Hipertensión arterial. Enciclopedia Ilustrada de Salud de A.D.A.M. p.1–8.
- 2) MacGill M. Hypertension: causes, symptoms and treatments. (2016) [en línea] <<http://www.medicalnewstoday.com/articles/150109.php>> [visitado 15 de abril 2017]
- 3) Marin, M. J., Fábregues, G., Rodríguez Pablo, Días Mónica, Páez Olga, & Alfie J. (2012). Registro nacional de hipertensión arterial. Conocimiento, tratamiento y control de la hipertensión arterial. Estudio RENATA. Revista Argentina de Cardiología, 80. p.121–129.
- 4) OMS. (2013). Información general sobre la hipertensión en el mundo. Oms. p.1–39.
- 5) Ministerio de Salud de Chile. (2012). Encuesta Nacional de Salud 2009-2010. p.17.
- 6) Bellido, C., Fernández, E., & López, J. (2003). Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. Monocardio, 3(V). p.141–160.
- 7) Lifton, R. P., Gharavi, A. G., Geller, D. S., & Hughes, H. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. Cell, 104(4). p.545–556.
- 8) SoRelle, R. (1998). Nobel prize winners heralded for work with nitric oxide. American Heart Association Incorporated, 98(22). p.2365–2366.
- 9) Mata, P. C., Olivia, M., Martínez, S., Sánchez, C., María, R., Nieto, G., & Negrete, S. A. (2010). El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes. Acta Universitaria, 20(929). p. 24–33.
- 10) Centelles, J. J., Esteban, C., & Imperial, Y. S. (2004). Óxido nítrico: Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. Ámbito Farmacéutico. Bioquímica OFFARM, 23. p.96–102.
- 11) Tenorio L., Fermín A.; Torres N., Juan C.; Zarco O., Julieta A.; Pastelín H., Gustavo; Valle M., L. del. (2008). El óxido nítrico y las enfermedades cardiovasculares: cardioprotección versus cardiotoxicidad. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 39(3). p.39–48.
- 12) Steppan, J., Nyhan, D., & Berkowitz, D. E. (2013). Development of

novel arginase inhibitors for therapy of endothelial dysfunction. *Frontiers in Immunology*, 4. p.1–7.

**13)** Santhanam, L., Christianson, D. W., Nyhan, D., & Berkowitz, D. E. (2008). Physiology of the aging vasculature arginase and vascular aging. *Journal of Applied Physiology*, 105(5). p.1632–1642.

**14)** Yang, W., Gao, X., & Wang, B. (2003). Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(3). p.346–368.

**15)** Liu X-C, Hubbard JL, Scouten WH. Synthesis and structural investigation of two potential boronate affinity chromatography ligands catechol [2-(diisopropylamino)carbonyl]phenylboronate and catechol [2-(diethylamino)carbonyl, 4-methyl]phenylboronate. *J Organomet Chem*. 1995;493(1-2):91-94. doi:10.1016/0022-328X(94)05337-B.

**16)** Zoltan, F. Kanyo, Laura R. Scolnick, D. E. A. y W. C. (1996). Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*, 383. p.554–557.

**17)** Baggio, R., Elbaum, D., Kanyo, Z. F., Carroll, P. J., Cavalli, R. C., Ash, D. E., April, R. V. (1997). Inhibition of  $Mn^{+2}$  -Arginase by Borate Leads to the Design of a Transition State Analogue Inhibitor, 2 (S) -Amino-6-borono-hexanoic Acid. *Journal of American Chemistry Society*, 2(8). p.8107–8108.

**18)** Collet, S., Carreaux, F., Boucher, J.-L., Pethe, S., Lepoivre, M., Danion-Bougot, R., & Danion, D. (2000). Synthesis and evaluation of  $\omega$ -borono- $\alpha$ -amino acids† as active-site probes of arginase and nitric oxide synthases. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (2). p.177–182.

**19)** Belokon, Y. N. (1992). Chiral complexes of Ni(II), Cu(II), and Cu(I) as reagents, catalysts and receptors for asymmetric synthesis and chiral recognition of amino acids. *Pure & Applied Chemistry*, 64(12). p.1917–1924.

**20)** Yurkanis, P. (2008). *Química orgánica*. (Editorial Pearson) (Quinta edición). p.886-887.

**21)** Raskildina, G. Z., Borisova, J. G., & Zlotsky, S. S. (2016). Synthesis of gem-dichlorocyclopropylmethylmalonates and decarboxylation. *Revue Roumaine de Chimie*, 61(1). p.29–33.

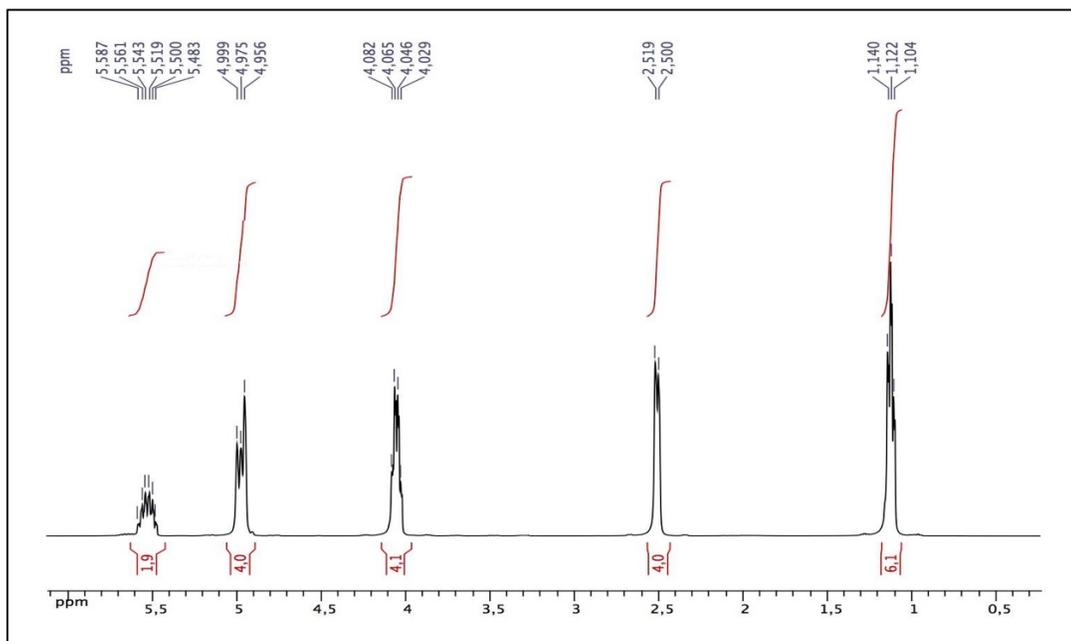
**22)** Carey, Francis A.; Giuliano, R. M. (2011). *Organic Chemistry* (Editorial McGraw-Hill) (Octava Edición). p.245.

- 23)** McMurry J. *Organic Chemistry*. Novena edi. Learning, CENGAGE; 2016.
- 24)** Beletskaya, I.; Pelter, A. (1997). Hydroborations catalysed by transition metal complexes. *Tetrahedron*, 53(14). p.4957–5026.
- 25)** Knorr J. R., & Merola, J. S. (1990). Synthesis and structure of a [(1,2-phenylenedioxy)boryl]iridium hydride complex: a model system for studying catalytic hydroboration. *Organometallics*, 9(12). p.3008–3010.
- 26)** Roy, C. D., & Brown, H. C. (2007). Stability of boronic esters: Structural effects on the relative rates of transesterification of 2-(phenyl)-1,3,2-dioxaborolane. *Journal of Organometallic Chemistry*, 692(4). p.784–790.
- 27)** March, J. (1977). *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure*. (Editorial McGraw-Hill) (Segunda edición). p.349-353.
- 28)** Ege, S. (2000). *Química Orgánica: estructura y reactividad*. (Editorial Reverté S. A.) (Tercera edición). p.701.
- 29)** Madan, R. I. (2008). *Organic reactions, conversions, mechanisms and problems*. (Editorial S. Chand & Company PVT. LTD) (Primera edición). p.221.
- 30)** Oro, L. A; Claver, C. (2009). Iridium complexes in organic synthesis. (Editorial WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA). p. 173-191.
- 31)** Sigma-Aldrich. Catálogo de productos [en línea] <[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/683094?lang=es&region=CL&cm\\_sp=Insite\\_-\\_prodRecCold\\_xviews\\_-\\_prodRecCold10-2.>](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/683094?lang=es&region=CL&cm_sp=Insite_-_prodRecCold_xviews_-_prodRecCold10-2.>) [Consulta: 4 enero 2017].
- 32)** Catálogo de productos [en línea] <[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/683132?lang=es&region=CL&cm\\_sp=Insite\\_-\\_prodRecCold\\_xviews\\_-\\_prodRecCold10-6.>](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/683132?lang=es&region=CL&cm_sp=Insite_-_prodRecCold_xviews_-_prodRecCold10-6.>) [Consulta: 4 enero 2017].
- 33)** Yamamoto, Y., Fujikawa, R., Umemoto, T., & Miyaura, N. (2004). Iridium-catalyzed hydroboration of alkenes with pinacolborano. *Tetrahedron* 60. p.10695–10700.
- 34)** Caglieri, S. C., Macaño, H. R. (2010). Estudio teórico de la hidrólisis de ésteres alifáticos y aromáticos. *Información Tecnológica*, 21(4). p.67–73.
- 35)** Cordes, E. H., & Jencks, W. P. (1963). The mechanism of hydrolysis of Schiff bases derived from aliphatic amines. *Journal of the American Chemical Society*, 85(18). p.2843–2848.

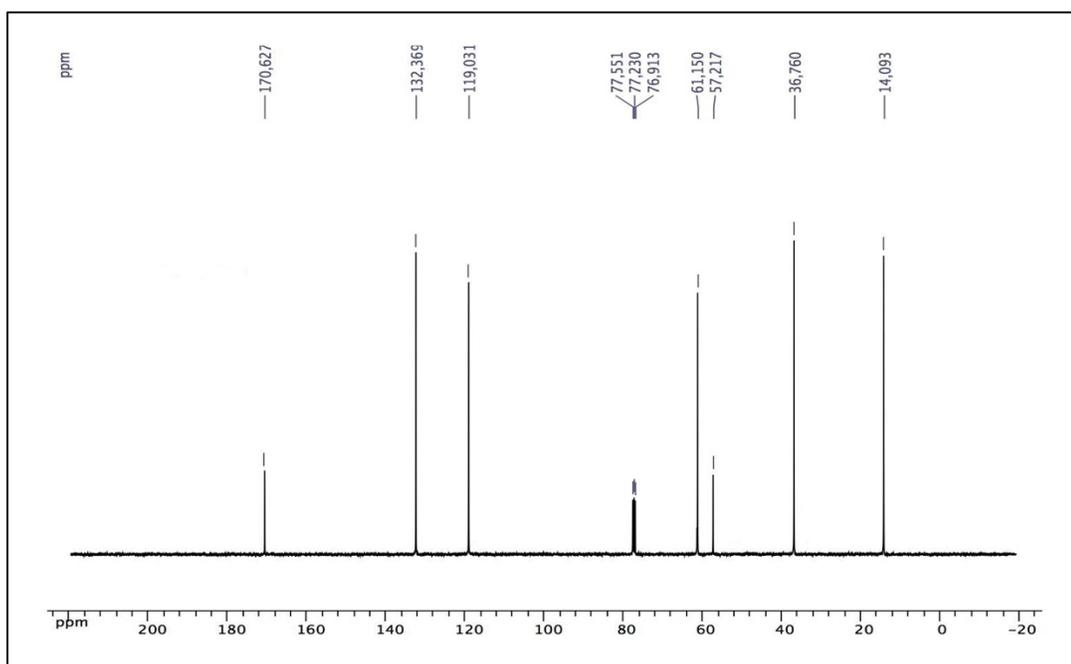
- 36)** Ji, Jie. J. (2009). Name Reactions. Editorial Springer. (Quinta edición). p 472.
- 37)** Preite, M. D.; Manríquez Mujica, J. M.; Correa Vargas, J. M.; Iturriaga Agüera, R. M; Casanello Toledo, P. C.; Krause Leyton, B. J. (2014). Procedimiento para la síntesis enantioselectiva y purificación del ácido 2(S)-amino-6boronohexanoico (ABH) e intermedios claves sintéticos. Patente: PCT/CL2015/050035 WO 2016037298. p 10-15.
- 38)** Armarego, W.L.F.; Li Lin Chai, C. (2013). Purification of laboratory Chemicals. (Editorial Elsevier Incorporated) (Séptima edición). p.141.
- 39)** Hleba Yonek B. (2016). Transition metal catalyzed hydroborations with pinacolborano: New applications and mechanistic investigations. p 18–23.
- 40)** Lee, H., Zhu, T., Patel, K., Zhang, Y. Y., Truong, L., Hevener, K. E., Johnson, M. E. (2013). High-Throughput Screening (HTS) and Hit Validation to Identify Small Molecule Inhibitors with Activity against NS3/4A proteases from Multiple Hepatitis C Virus Genotypes. PLoS ONE, 8(10). p. 1-12.
- 41)** Busti, A. J. (2015). The inhibitory constant ( $K_i$ ) and its use in understanding drug interactions. [en línea] <<http://www.ebmconsult.com/articles/inhibitory-constant-ki-drug-interactions>> [Consulta: 24 enero 2017].

## 9. ANEXO:

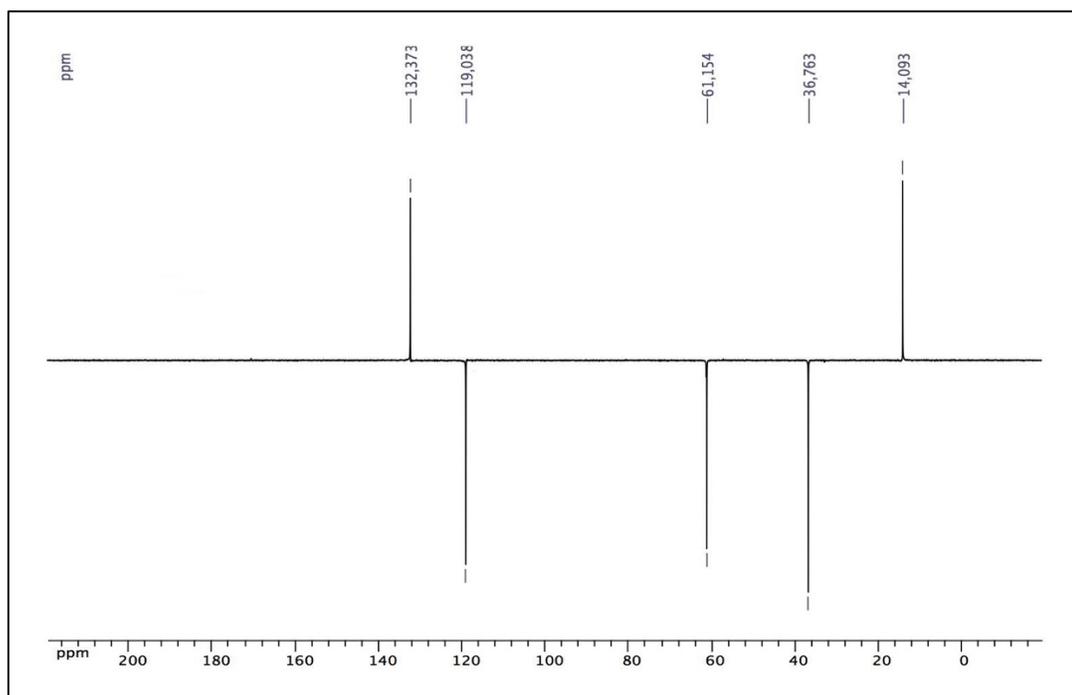
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2,2-dialilmalonato de dietilo (**1a**)



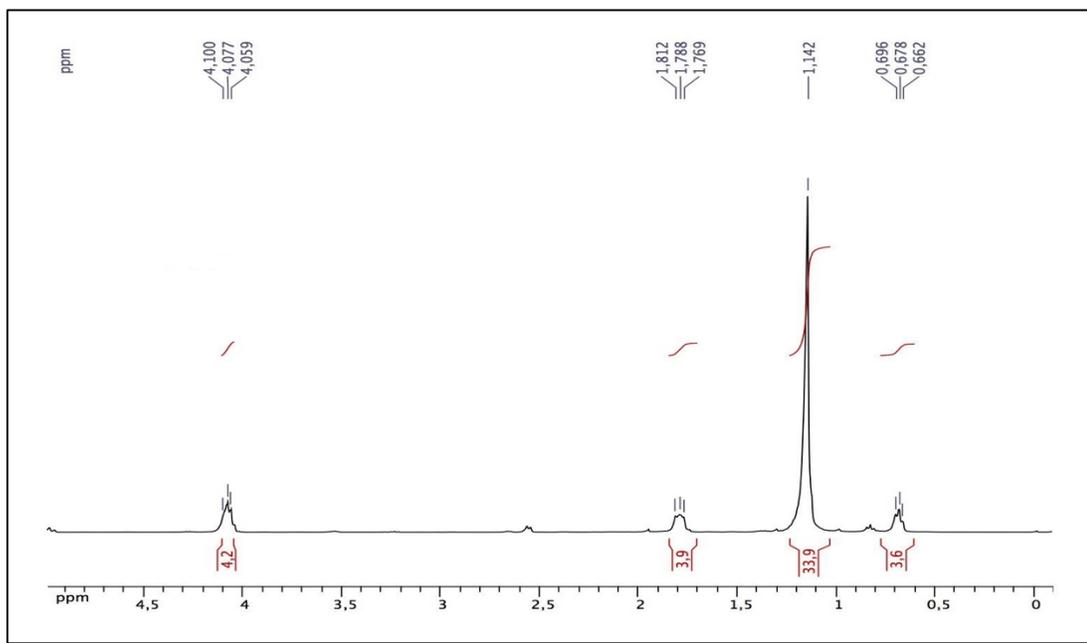
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dietil -2,2-dialilmalonato



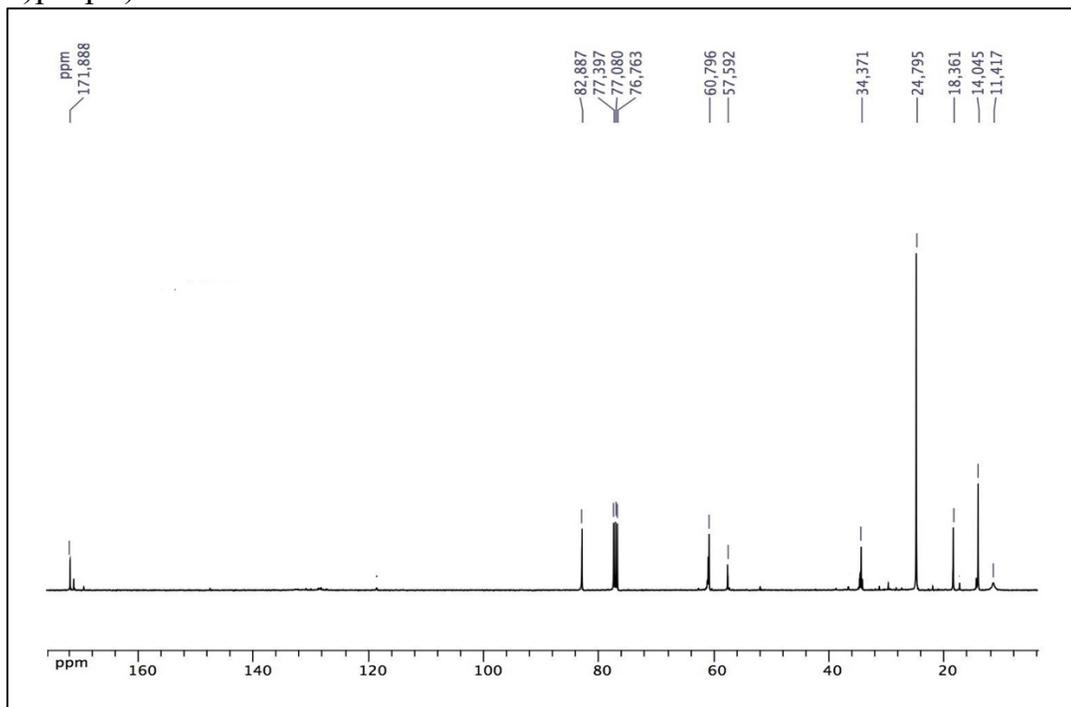
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2,2-dialilmalonato de dietilo



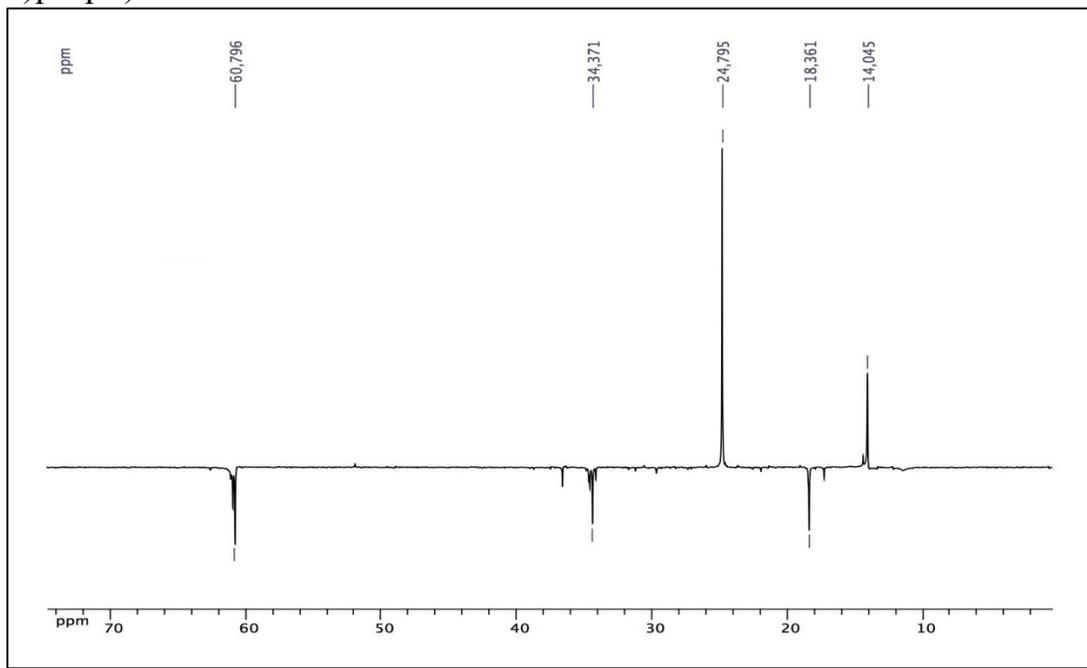
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2,2-bis(3-(3,3,4,4-tetrametilborolan-1-il)propil)malonato de dietilo (**1b**)



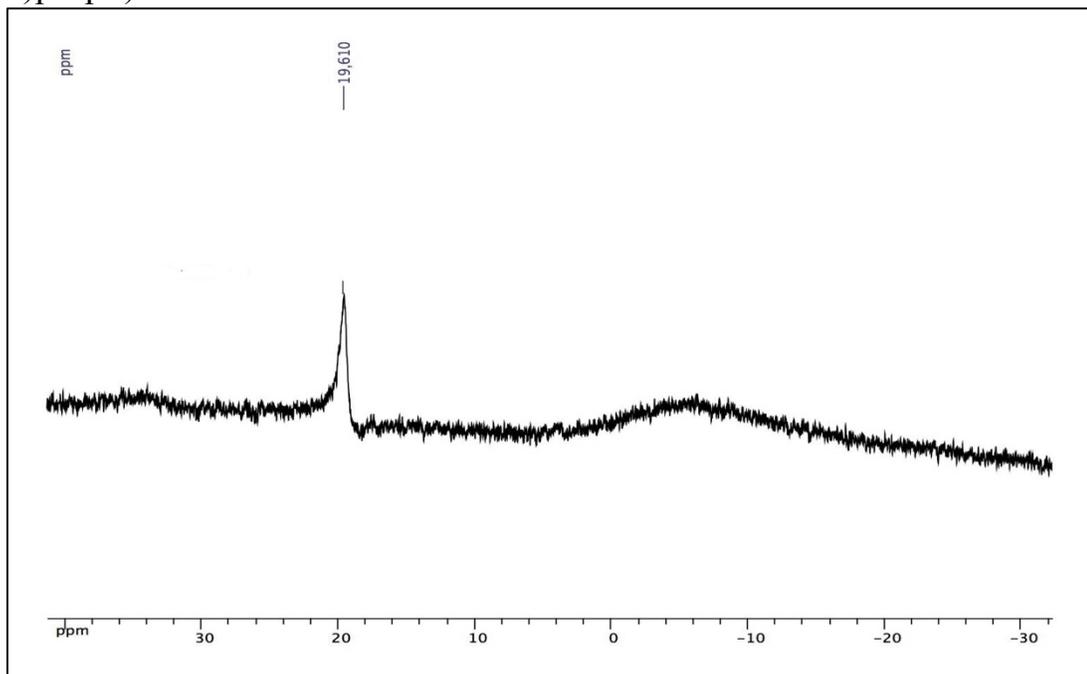
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2,2-bis(3-(3,3,4,4-tetrametilborolan-1-il)propil)malonato de dietilo



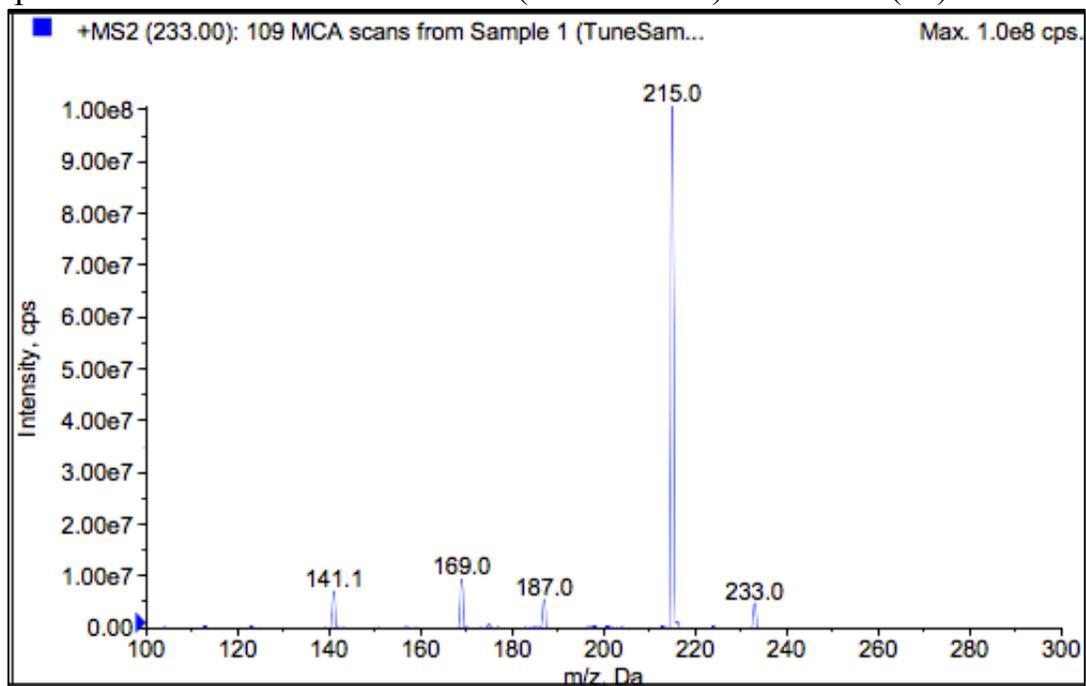
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2,2-bis(3-(3,3,4,4-tetrametilborolan-1-il)propil)malonato de dietilo



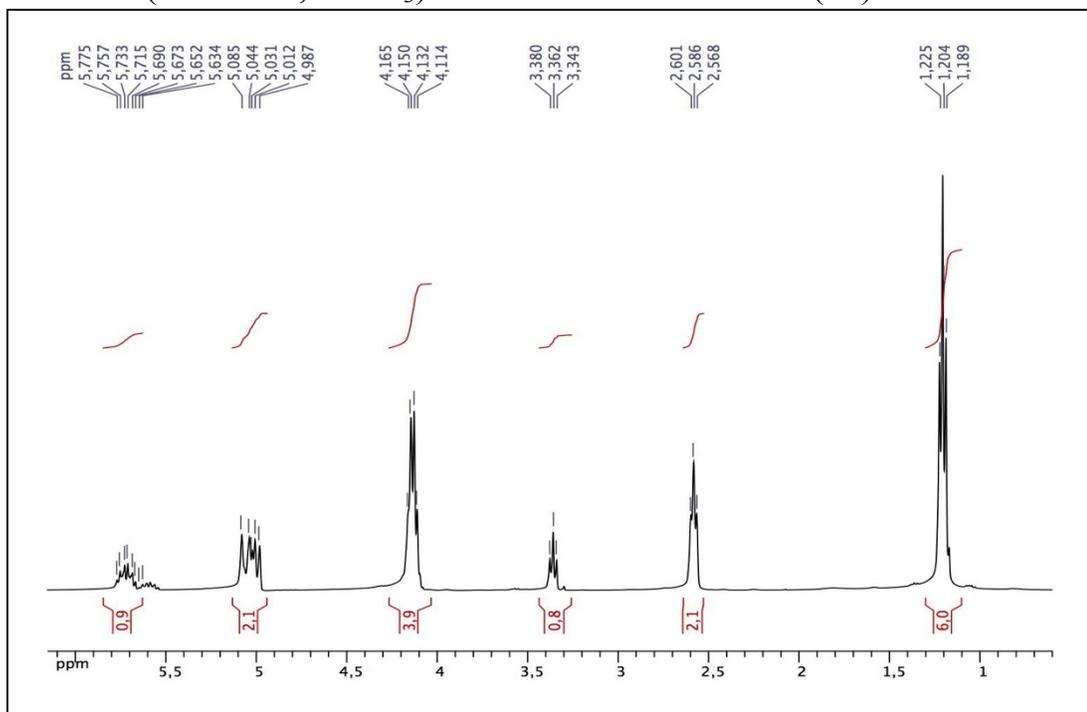
$^{11}\text{B}$  RMN (128,38 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2,2-bis(3-(3,3,4,4-tetrametilborolan-1-il)propil)malonato de dietilo



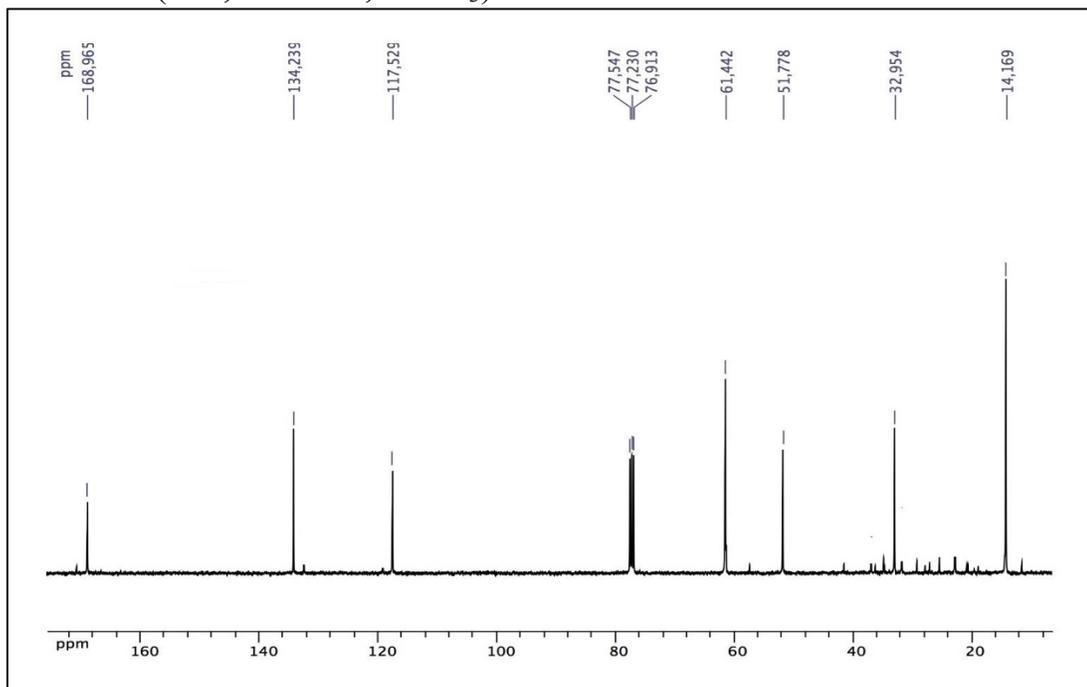
Espectro de masa ácido 4-borono-2-(2-boronoetil) butanoico (**1c**)



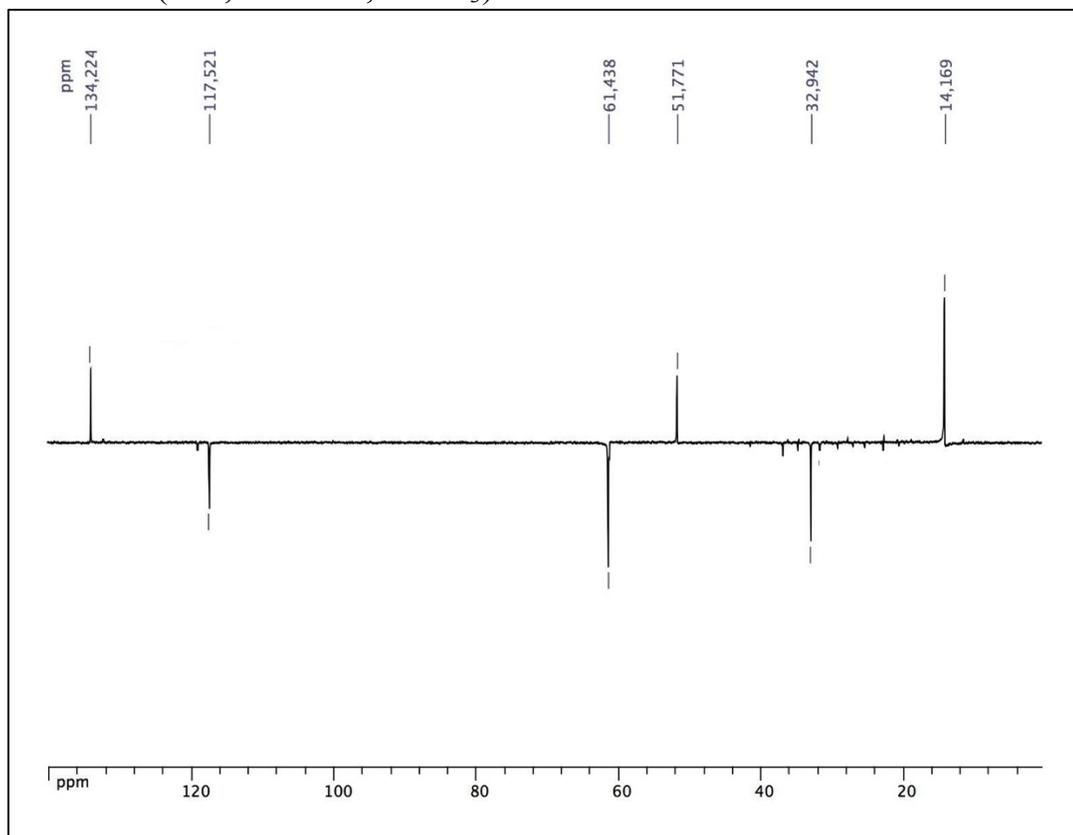
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-alilmalonato de dietilo (**2a**)



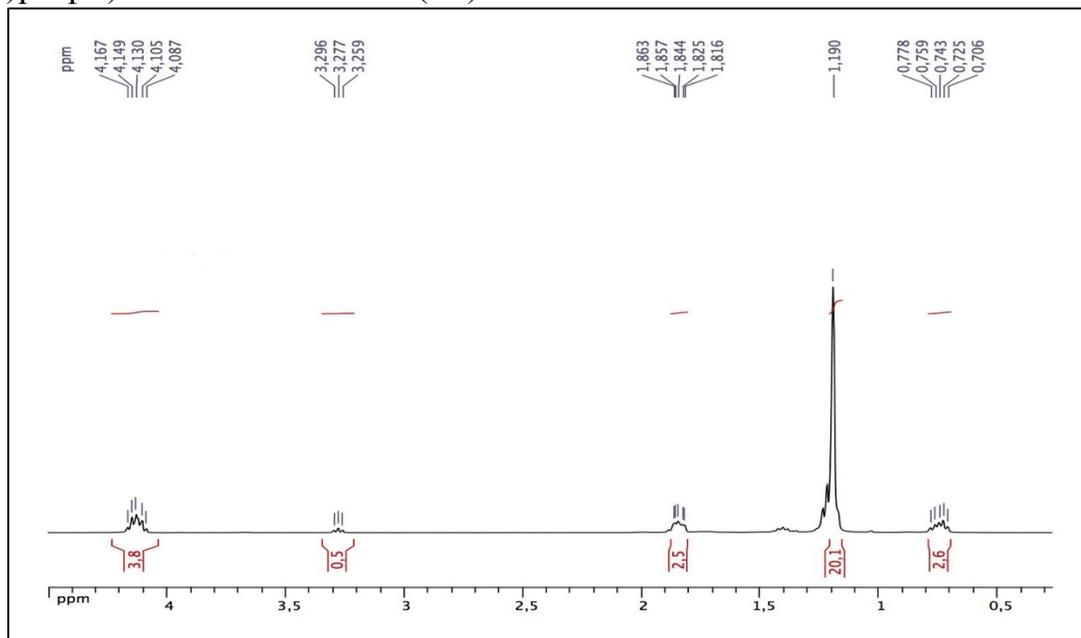
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-alilmalonato de dietilo



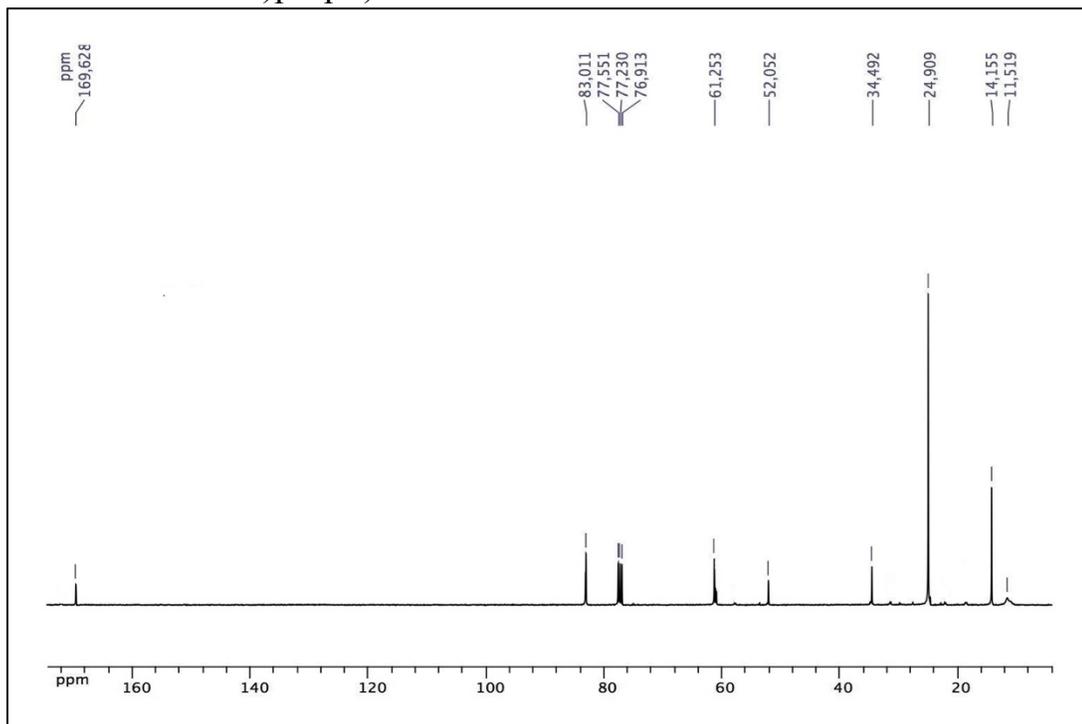
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-alilmalonato de dietilo



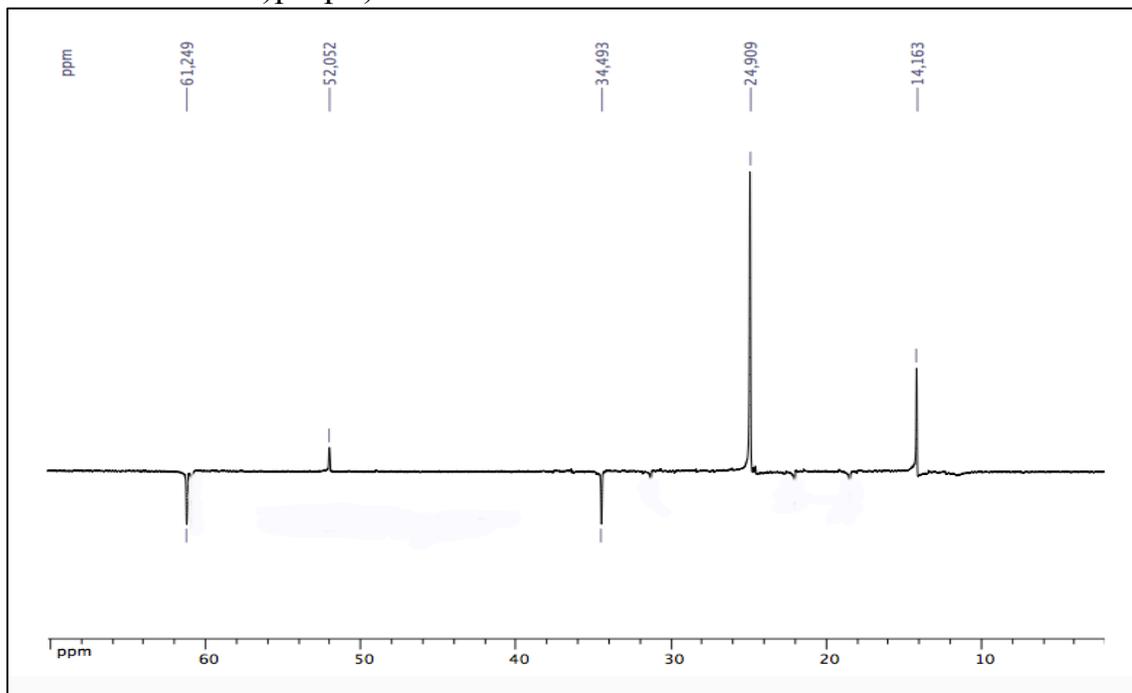
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo (**2b**)



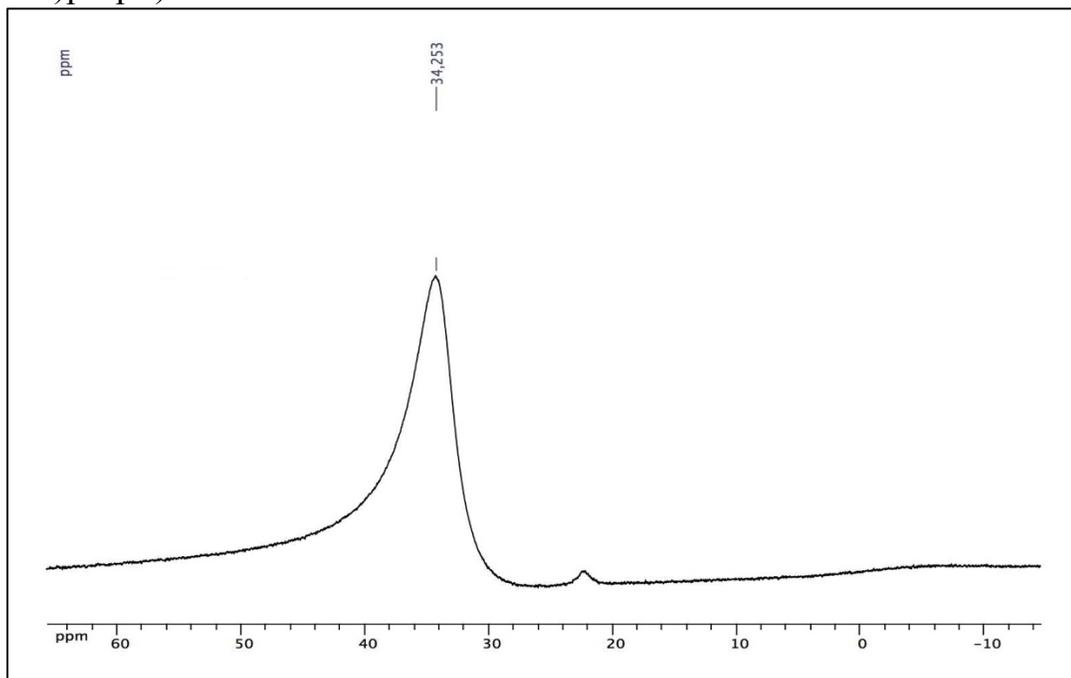
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo



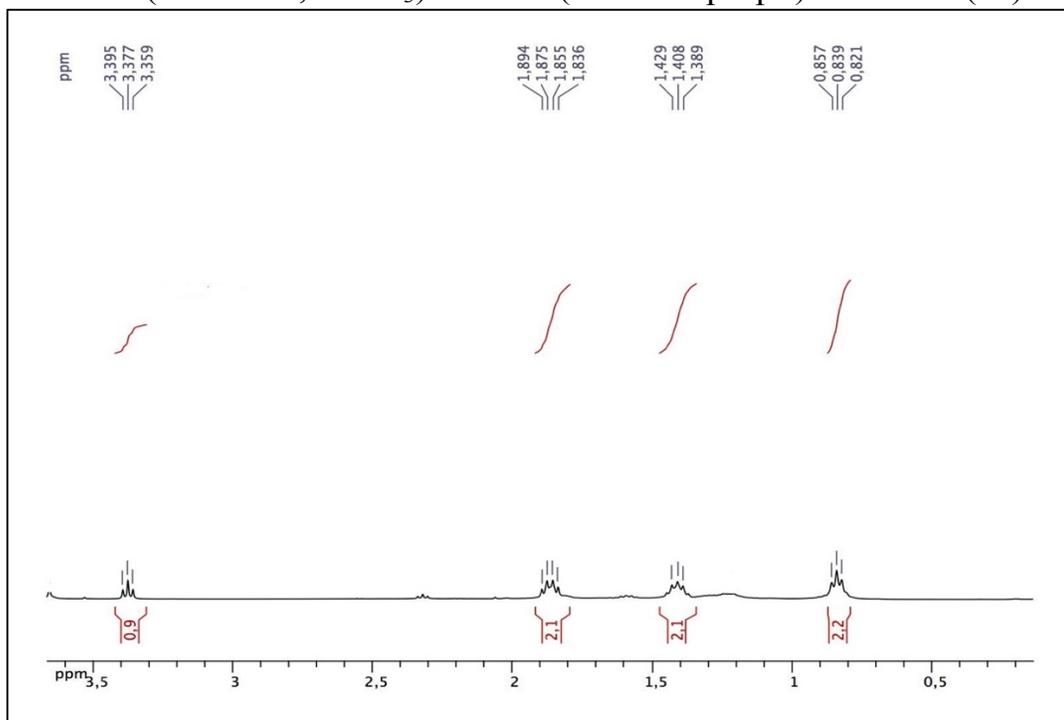
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo



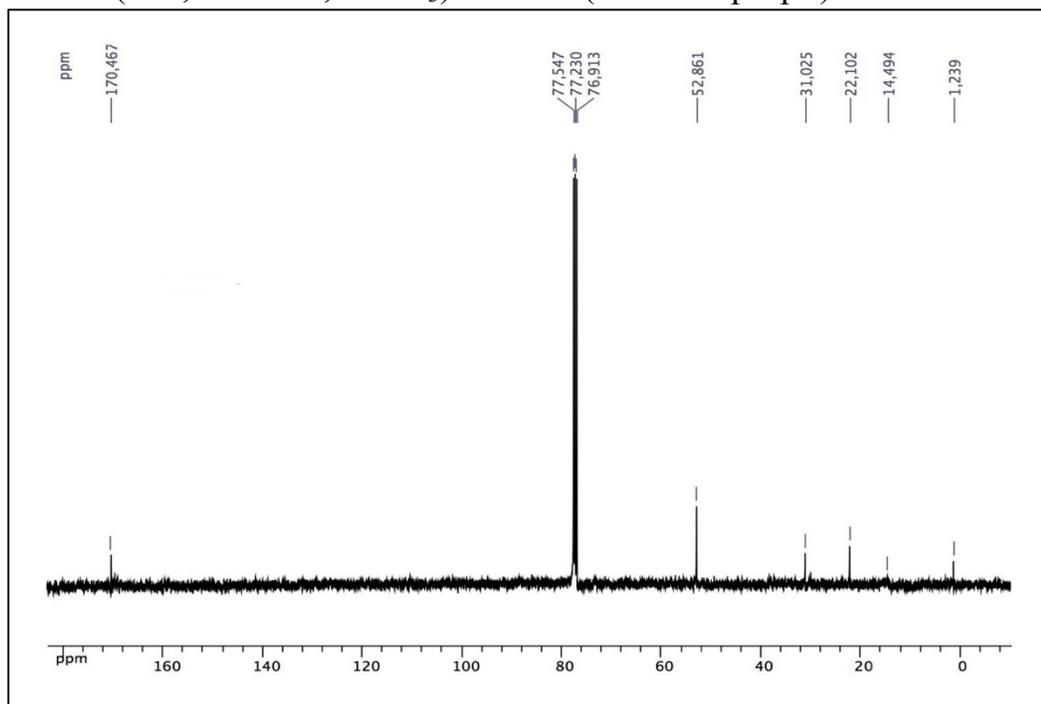
$^{11}\text{B}$  RMN (64,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo



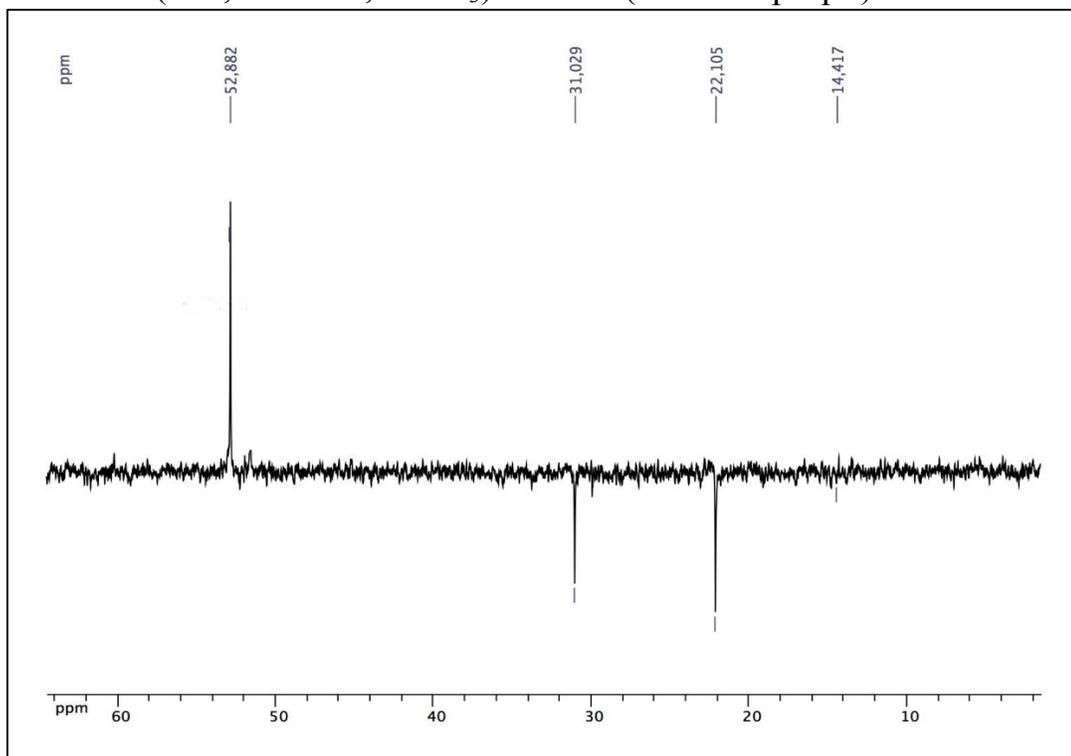
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ácido 2-(3-boronopropil) malónico (**2c**)



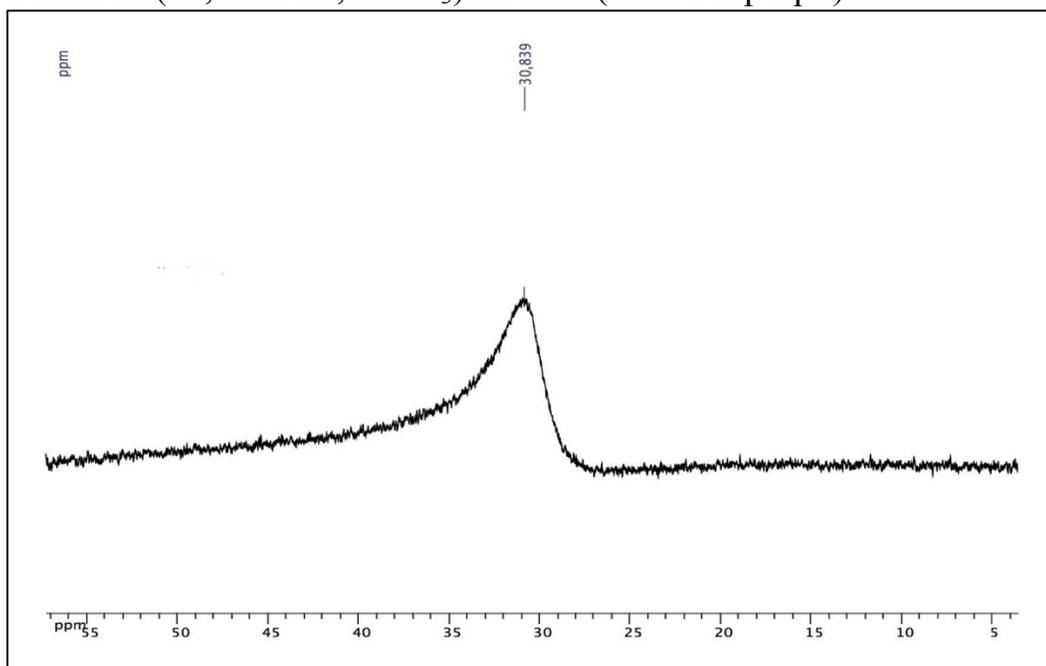
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ácido 2-(3-boronopropil)malónico



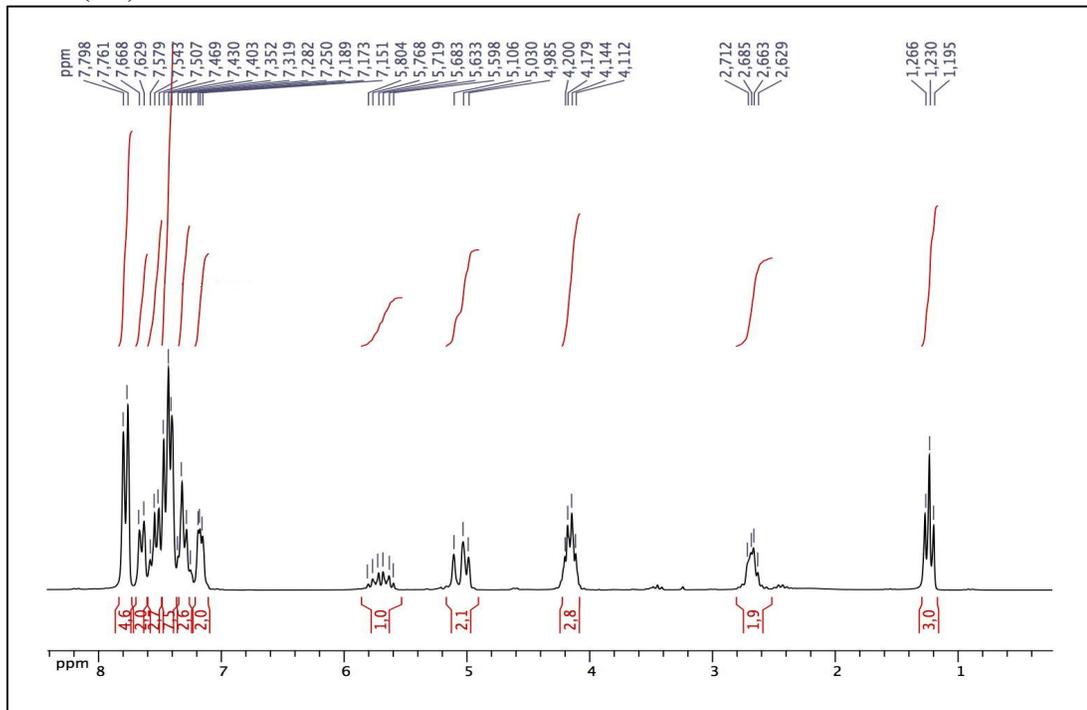
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ácido 2-(3-boronopropil)malónico



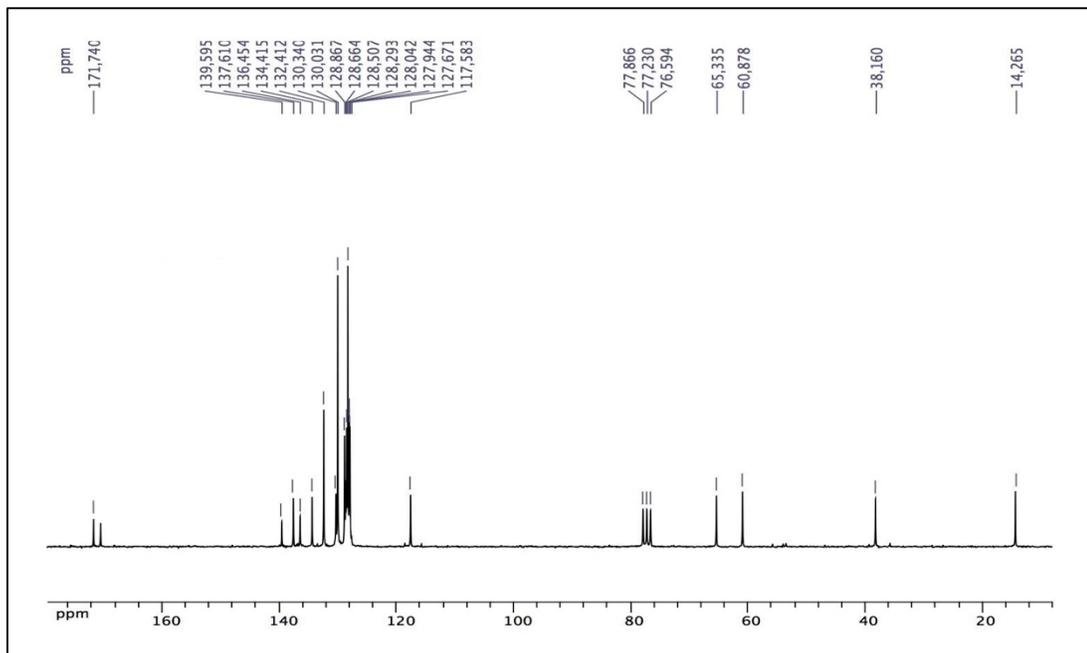
$^{11}\text{B}$  RMN (64,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ácido 2-(3-boronopropil)malónico



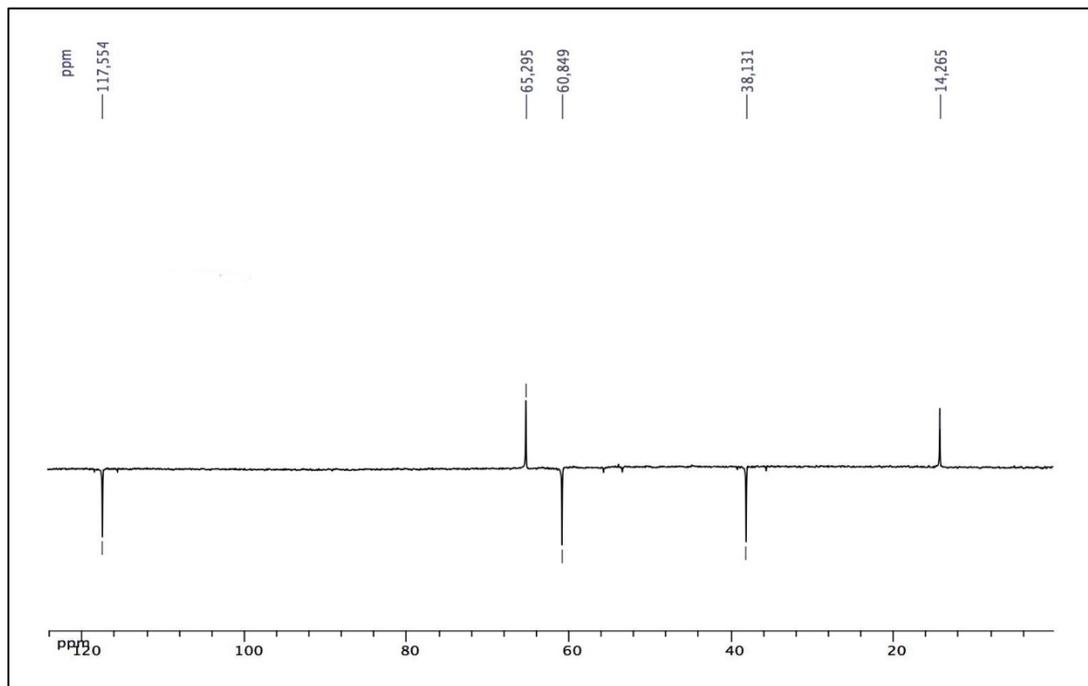
$^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-((difenilmetilen)amino)-4-pentenoato de etilo (**3a**)



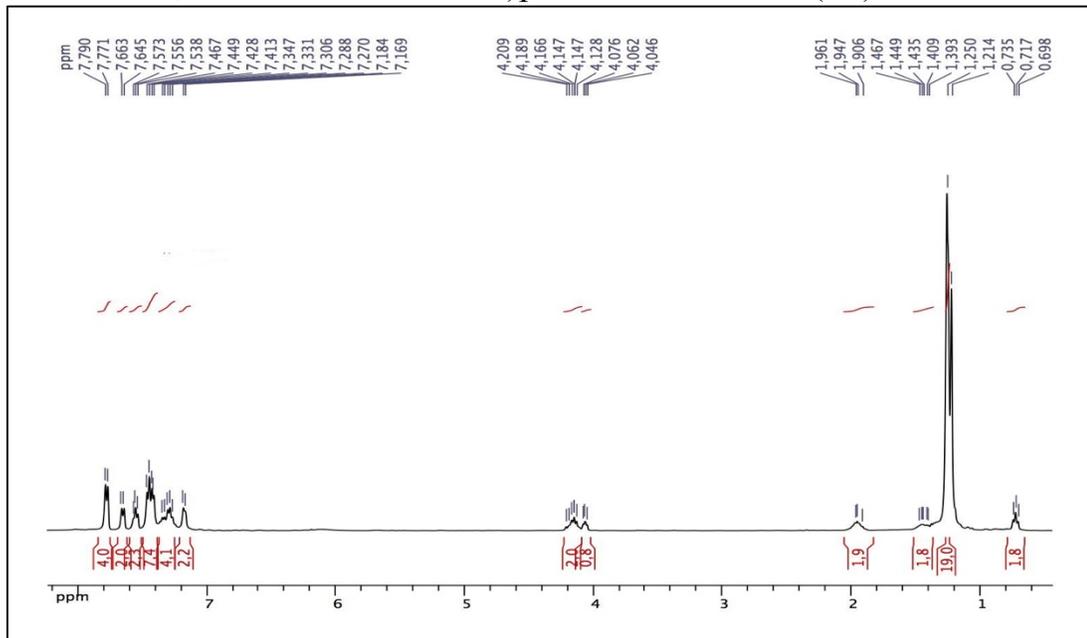
$^{13}\text{C}$  RMN (50,31 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-((difenilmetilen)amino)-4-pentenoato de etilo



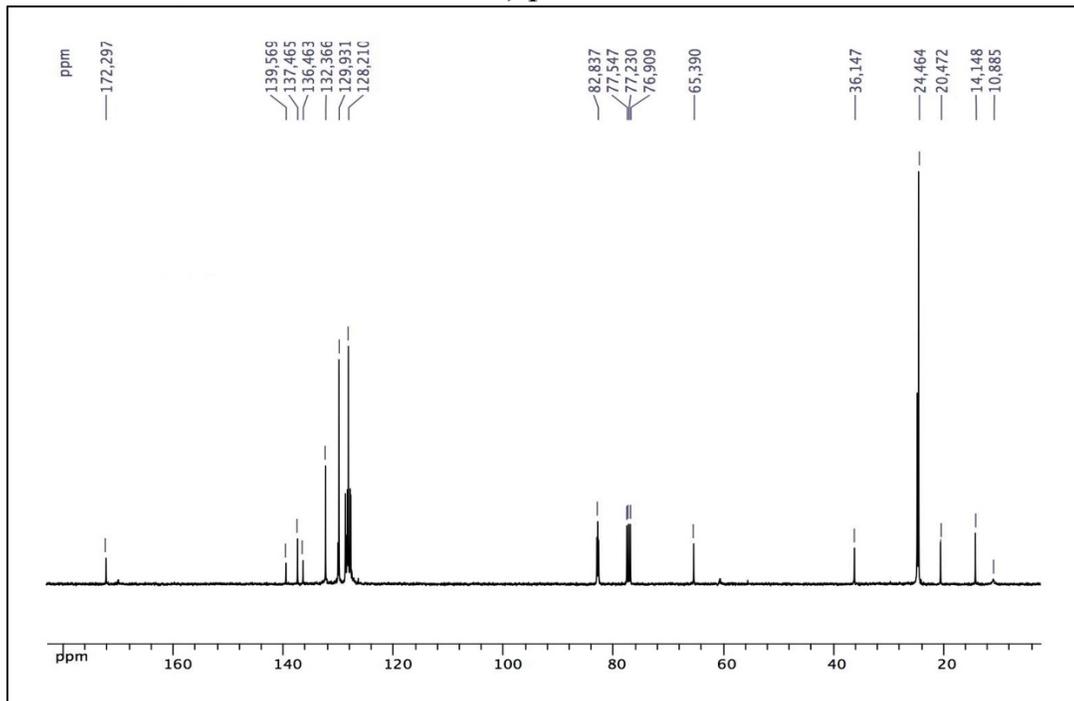
$^{13}\text{C}$  RMN (50,31 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-((difenilmetilen)amino)-4-pentenoato de etilo



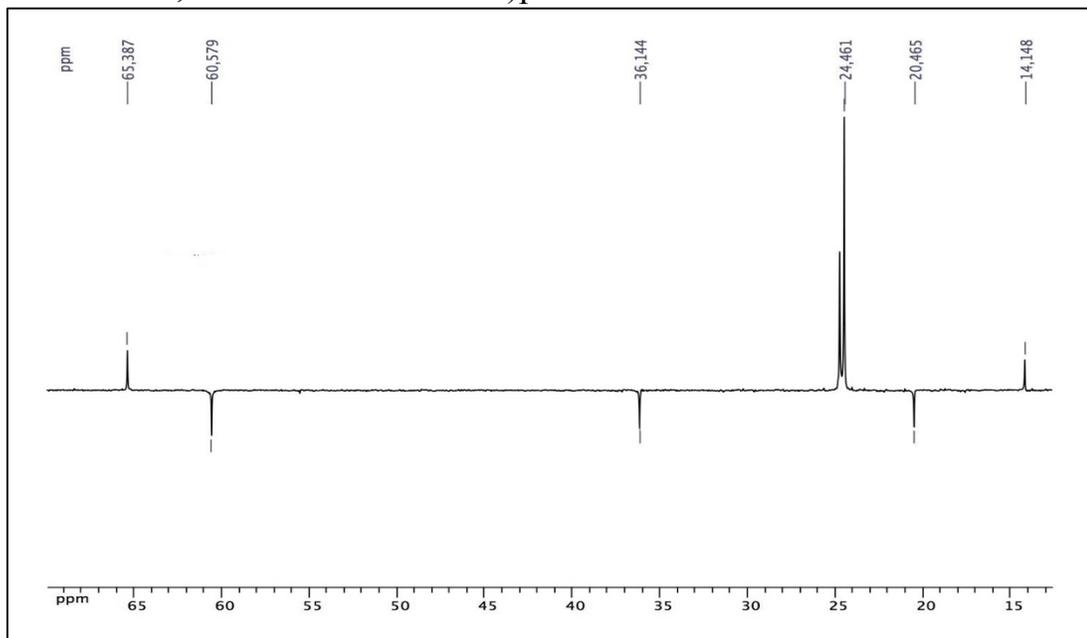
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-((difenilmetilen)amino)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxaborolan-2-il)pentanoato de etilo (**3b**)



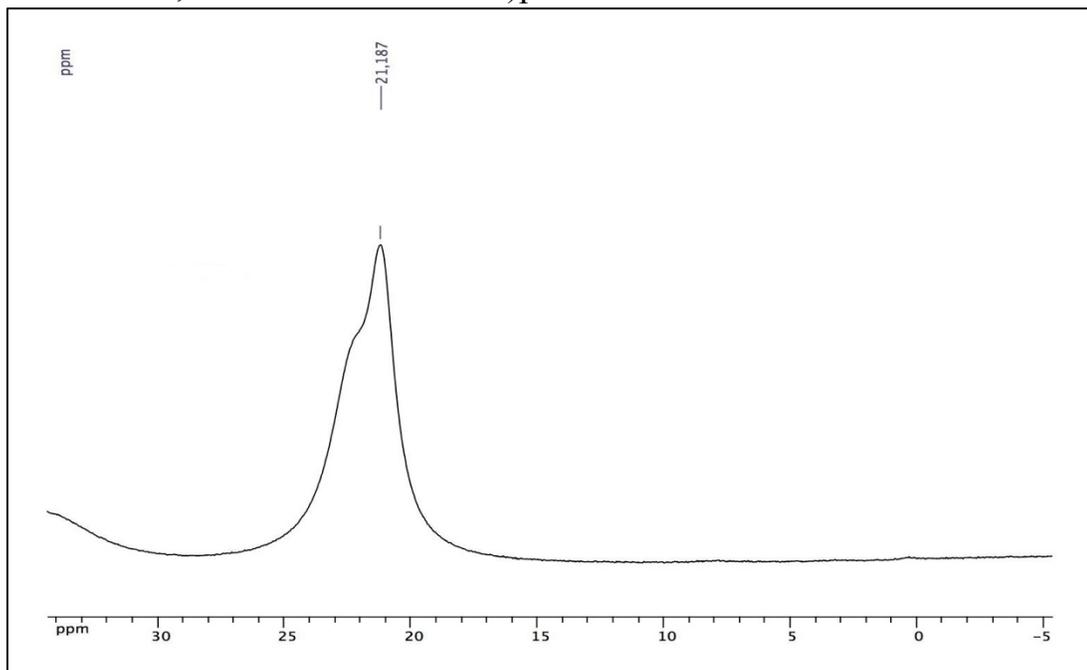
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-((difenilmetilen)amino)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxaborolan-2-il) pentanoato de etilo



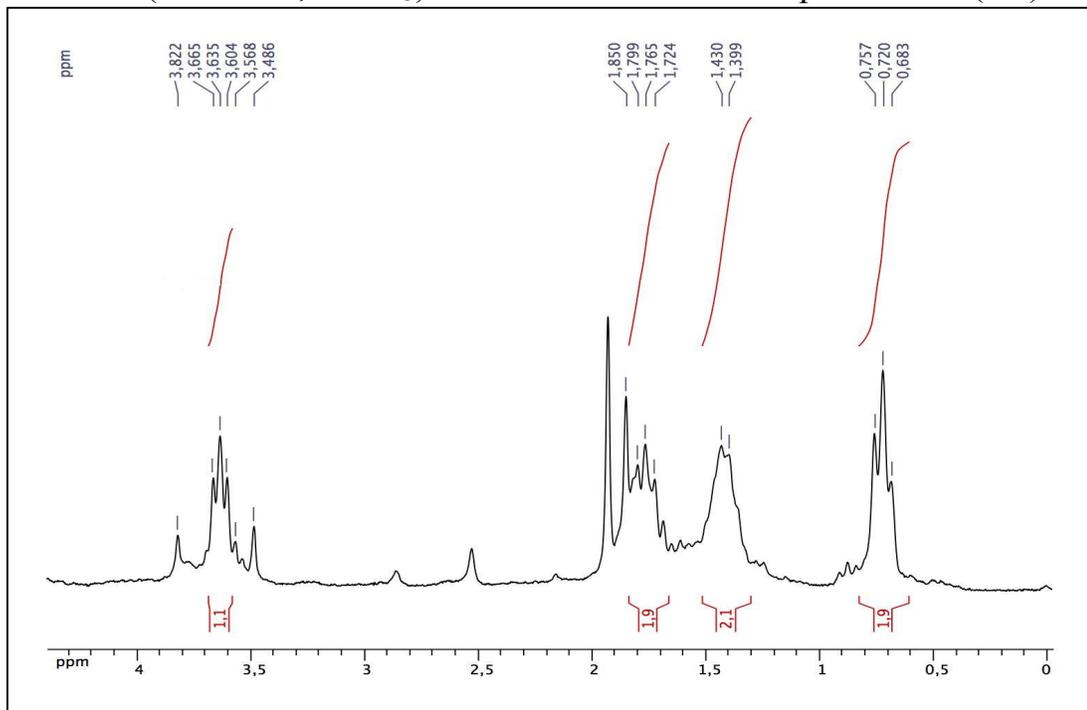
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-((difenilmetilen)amino)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxaborolan-2-il)pentanoato de etilo



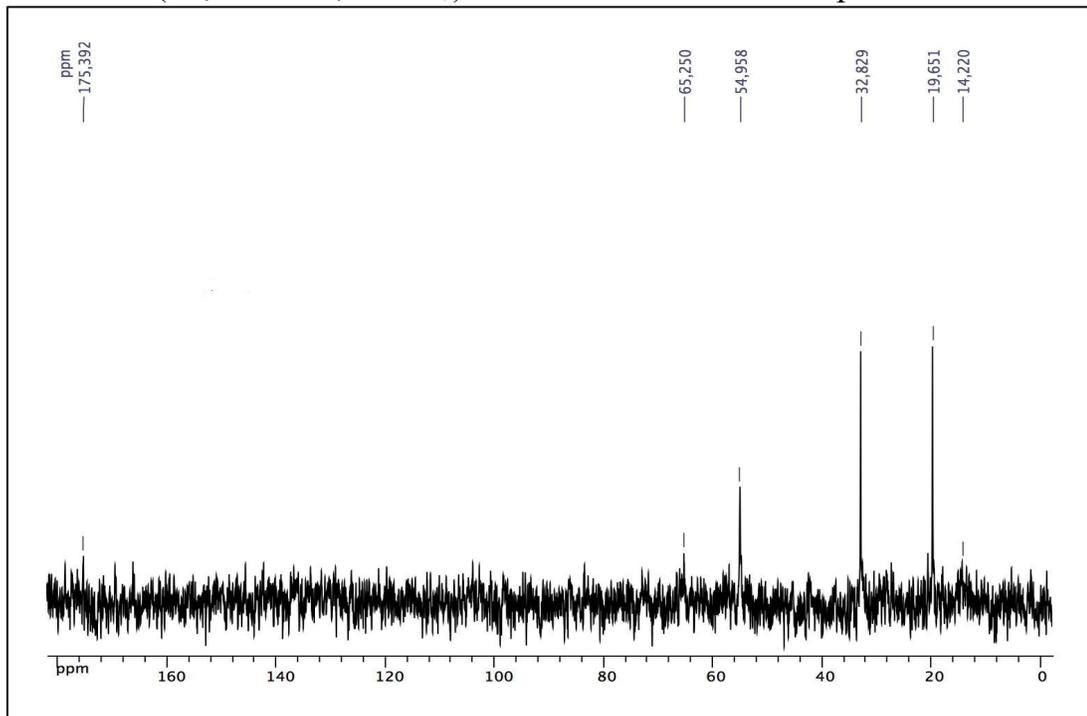
$^{11}\text{B}$  RMN (128,38 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-((difenilmetilen)amino)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxaborolan-2-il)pentanoato de etilo



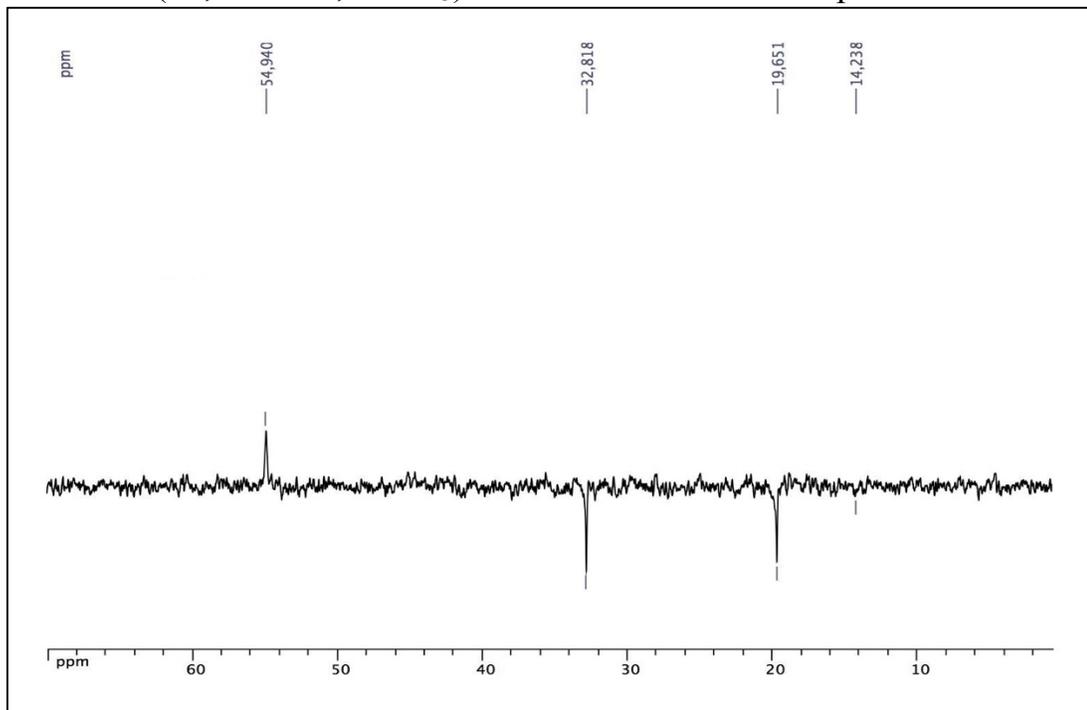
$^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ácido 2-amino-5-boronopentanoico (**3C**)



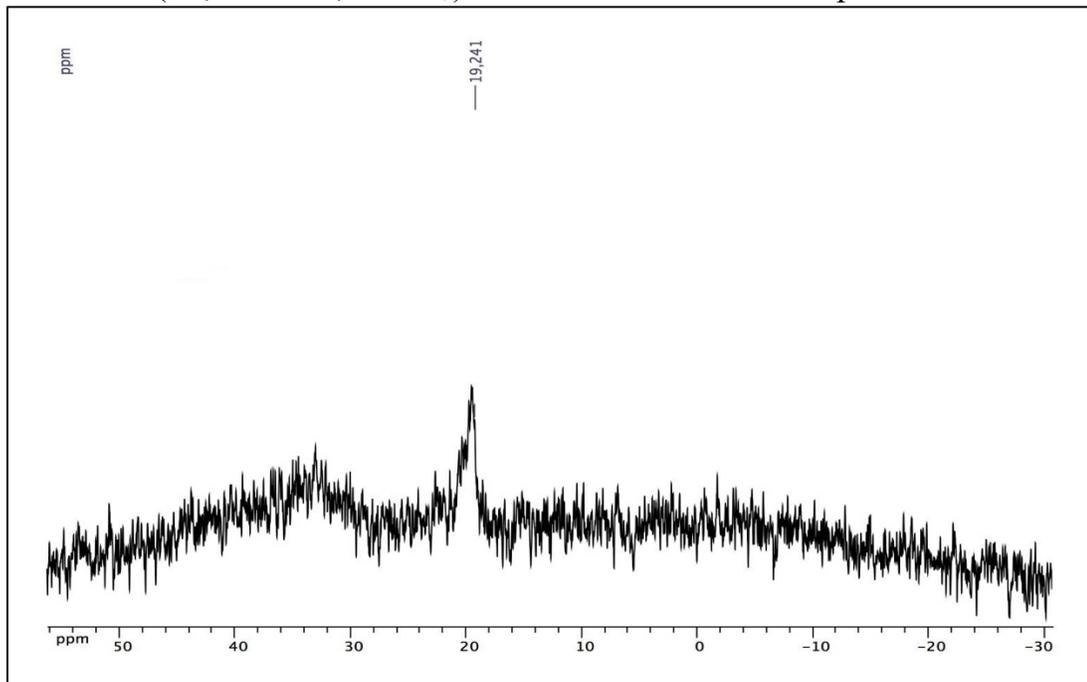
$^{13}\text{C}$  RMN (50,31 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ácido 2-amino-5-boronopentanoico



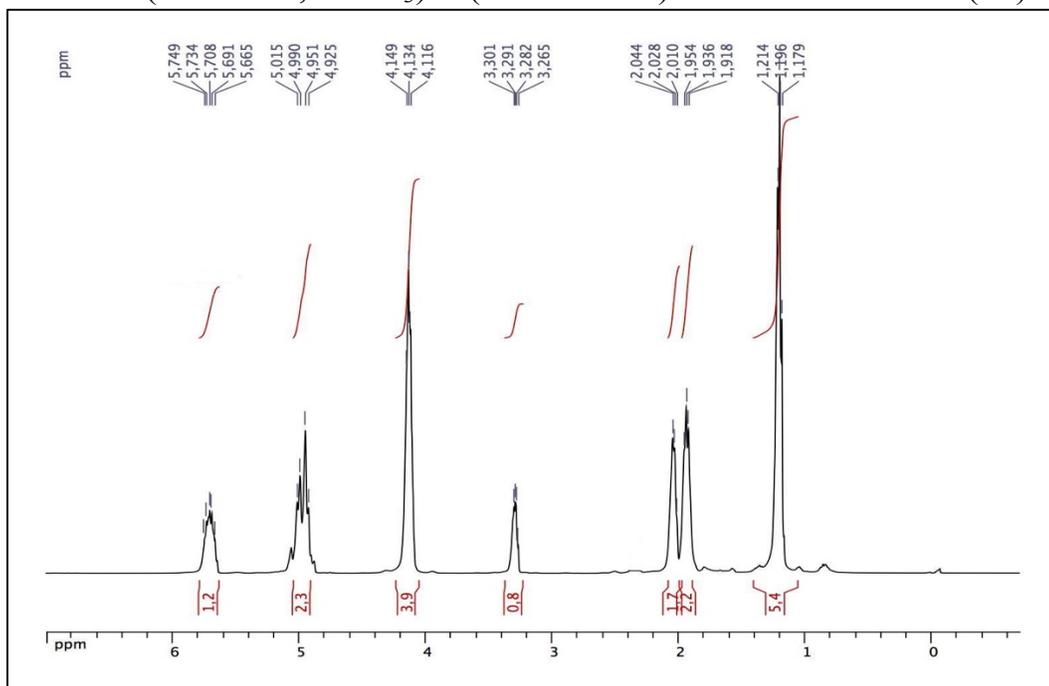
$^{13}\text{C}$  RMN (50,31 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ácido 2-amino-5-boronopentanoico



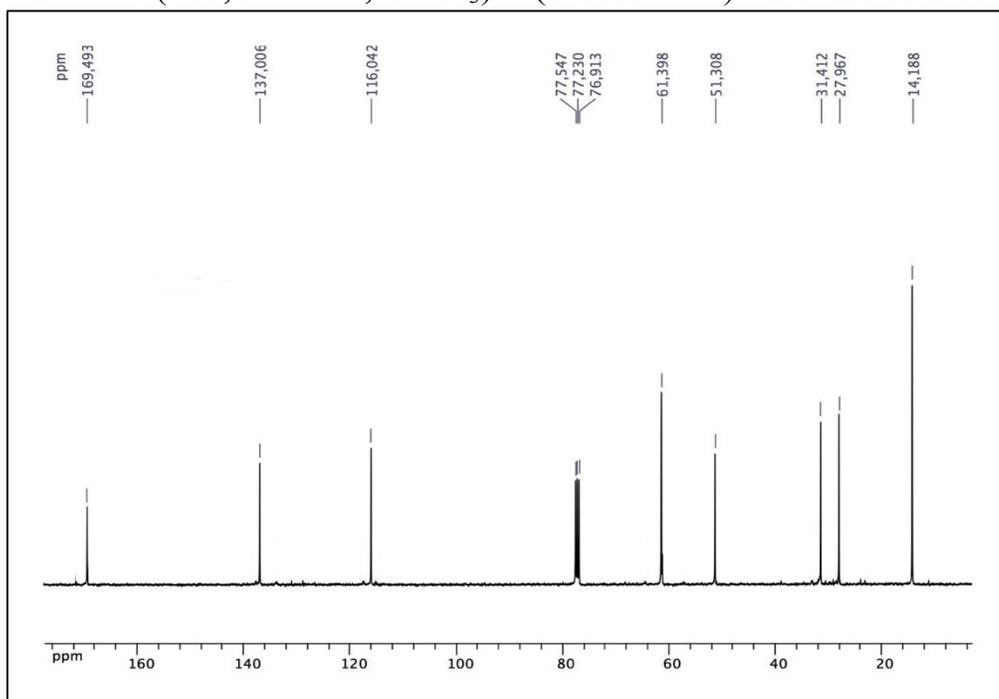
$^{11}\text{B}$  RMN (64,19 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ácido 2-amino-5-boronopentanoico



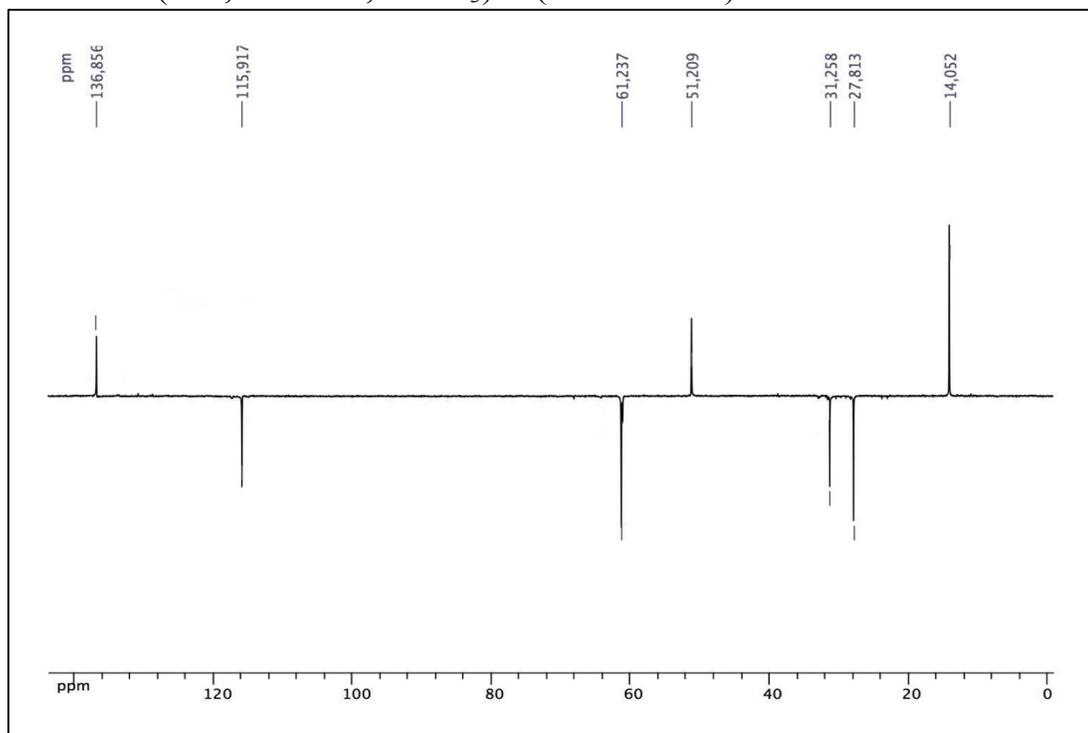
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-buten-1-il)malonato de dietilo (**4a**)



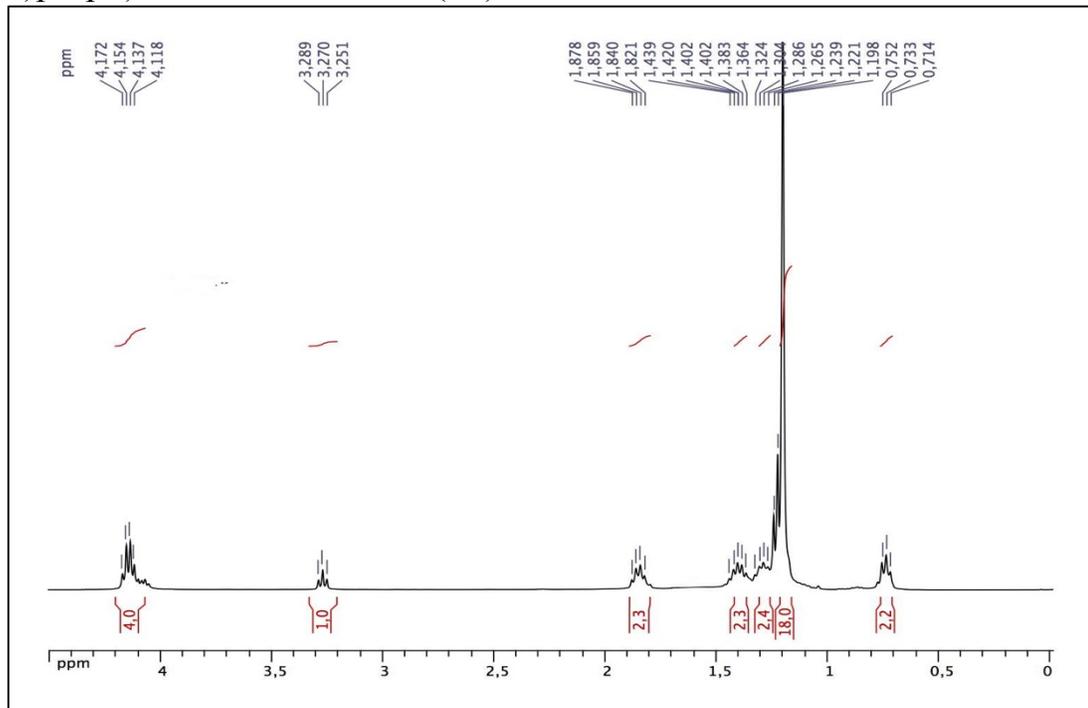
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-buten-1-il)malonato de dietilo



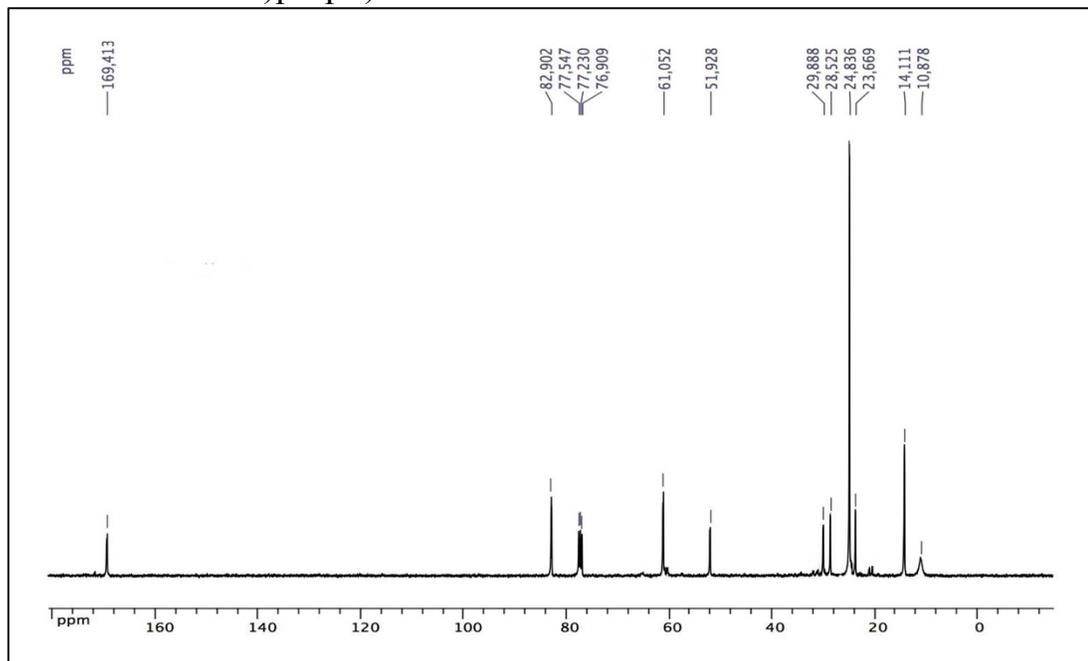
$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-buten-1-il) malonato de dietilo



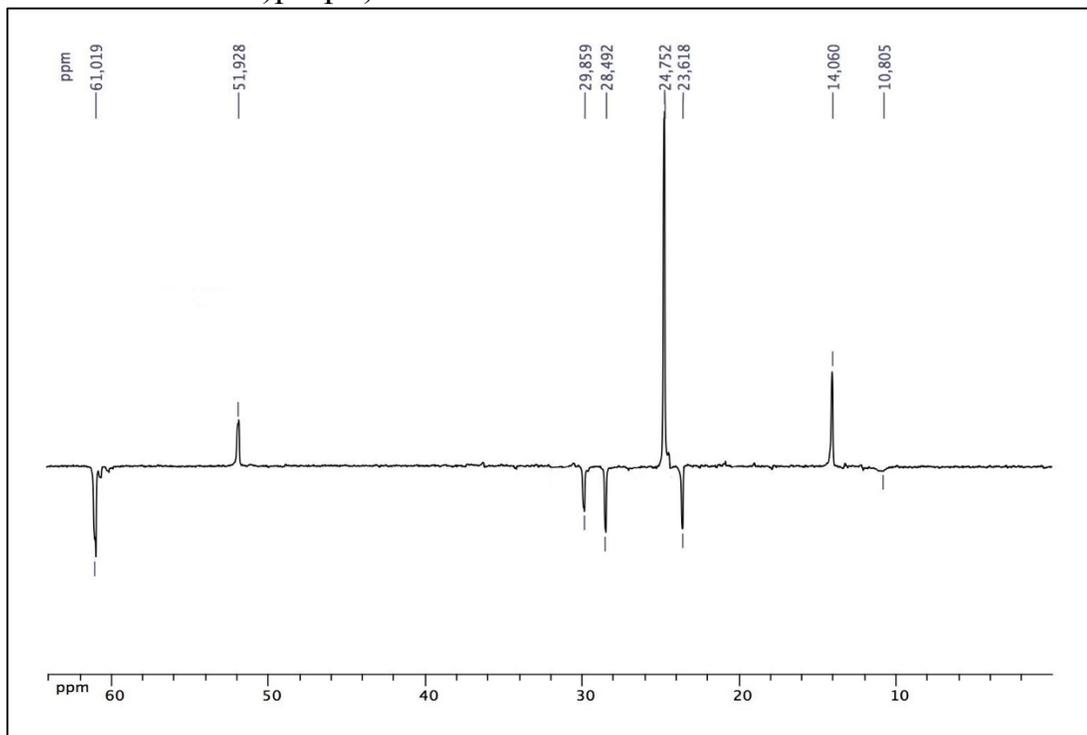
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo (**4b**)



$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo



$^{13}\text{C}$  RMN (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo



$^{11}\text{B}$  RMN (128,38 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propil)malonato de dietilo

