

Síntesis de *p*-tiramina a partir de L-tirosina, utilizando N-Bromoftalimida (NBP) como agente oxidante

Alejandro Mejía Ruales

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS
APLICADAS

Química con Énfasis en Bioquímica

Santiago de Cali

2024

Síntesis de *p*-tiramina a partir de L-tirosina, utilizando N-Bromoftalimida (NBP) como agente oxidante

Alejandro Mejía Ruales

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO
DE PREGADO EN QUÍMICA

Tutores

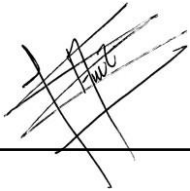
Ruby Lizeth Pérez Muñoz, Ph.D.

Jaime Martín Franco, Ph.D.

Santiago de Cali

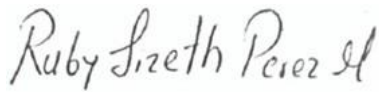
2024

Firma del estudiante:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Alejandro Mejía Ruales', written over a horizontal line.

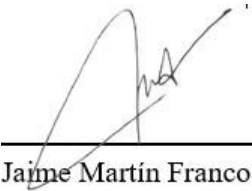
Alejandro Mejía Ruales

Firma del tutor:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ruby Lizeth Pérez Muñoz', written over a horizontal line.

Ruby Lizeth Pérez Muñoz

Firma del co-tutor:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Jaime Martín Franco', written over a horizontal line.

Jaime Martín Franco

Síntesis de *p*-tiramina a partir de L-tirosina, utilizando N-Bromoftalimida (NBP) como agente oxidante

Alejandro Mejía¹, Ruby L. Perez² y Jaime M. Franco³.

^{1,2}Química, Facultad de Ingeniería, Diseño y Ciencias Aplicadas, Universidad Icesi, Cali, Colombia

³Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de Educación. Departamento de Química. Universidad del Cauca, Colombia.

Resumen: En el presente estudio se desarrolló una metodología para la reacción de amino-reducción de L-tirosina (**1**) a *p*-tiramina (**2**) utilizando N-Bromoftalimida (NBP). Para ello, se llevó a cabo la síntesis de Ftalimida (**4**) y NBP con rendimientos del 76.9% y 59.2% respectivamente. Además, se destaca la síntesis del compuesto O-benzoil-L-tirosina (**6**) con un rendimiento moderado del 34.7%, y también de un derivado protegido de **1** utilizando cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo como agente protector (**7**), con un rendimiento del 9.98%. Finalmente, se realizó la oxidación de **6** con NBP, sin embargo, los resultados de esta etapa no fueron concluyentes.

1. introducción

En los últimos años, se ha observado un aumento en la demanda comercial de aminoácidos, especialmente para su uso en la síntesis de fármacos y suplementos dietéticos. La síntesis enzimática se presenta como una alternativa prometedora, permitiendo una producción más eficiente. Aunque, enfrenta desafíos como elevados costos y dificultades en el almacenamiento de enzimas catalizadoras. En un estudio reciente publicado en el Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, describe un proceso de fermentación que utiliza piruvato crudo como sustrato. La enzima tirosina fenol-liasa cataliza la conversión de este sustrato en el compuesto **1**. Posteriormente, con la participación de enzimas inmovilizadas de tirosina carboxilasa, se completa la reacción en dos pasos, alcanzando un rendimiento aproximado de 86%¹. Las desventajas de este proceso se manifiestan en el elevado costo del piruvato crudo mediante el uso de células recombinantes y los gastos relacionados con la técnica de inmovilización y el montaje de los biorreactores, lo que limita su viabilidad en la investigación. Otra alternativa explorada es la fermentación a partir de microorganismos, como la metodología presentada por Gale en 1940. En este método, se emplea *Enterococcus faecalis* para la producción del compuesto **2**, aprovechando la

presencia de la enzima tirosina descarboxilasa (TDC) en esta bacteria. La especificidad de la TDC por el compuesto **1** facilita el proceso de producción, pero se enfrenta a la limitación del proceso de separación del producto y la biomasa².

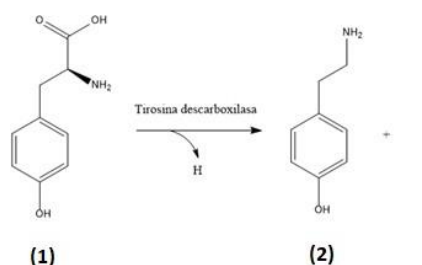


Figura 1. Descarboxilación del aminoácido **1** al compuesto **2**.

Además de los enfoques biológicos, se han propuesto estrategias de síntesis química para la obtención del **2**. Una de las más sencillas parte de fenol y acrilonitrilo, utilizando una transposición de Curtius. Sin embargo, esta metodología presenta desafíos, como un rendimiento relativamente bajo del 30.2% y la formación de subproductos tóxicos³. Otro procedimiento, desarrollado por Barger y Walpole, parte de fenilacetónitrilo mediante una secuencia de reacciones que incluyen nitración, reducción e hidrogenación. Si bien este método evita los problemas de los subproductos, se enfrenta al costo de los reactivos de partida. Por ende, se plantea estudiar las reacciones mediadas por agentes oxidantes como la N-bromosuccinimida (NBS) y la NBP que han demostrado favorecer los

procesos de descarboxilación en aminoácidos como la lisina, treonina y serina^{4,5}. Sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción. Estudios previos han caracterizado los alfa-aminoácidos oxidados mediante **NBS** y **NBP** a partir de análisis cinéticos, evaluando la velocidad de reacción, así como las fracciones positivas y negativas de la mezcla con respecto al solvente utilizado⁶. Los N-halocompuestos, como la **NBS** y la **NBP**, son de gran relevancia en la actualidad, ya que funcionan en reacciones redox no catalizadas⁶⁻⁹ y tienen la capacidad de actuar como base, nucleófilo, agente halogenante^{10,11} y como fuente de aniones de nitrógeno¹². La **NBP**, en particular, se ha utilizado en diversas aplicaciones, como la oxidación de cetonas¹³, benzhidrilos¹⁴, determinación de sulfonamidas^{15,16} y el estudio cinético de la oxidación de la aspirina¹⁷. Entre sus propiedades más importantes se encuentra su fotosensibilidad, baja solubilidad en agua y un equilibrio químico que, después de la oxidación, forma ftalimida, un compuesto con baja toxicidad¹⁸. Un estudio previo en el grupo de investigación de la Universidad Icesi sobre la síntesis de **2** a partir de **NBS** sugirió que la bromación ocurrió en el anillo aromático, en lugar del grupo amino, posiblemente debido a la presencia del grupo hidroxilo activador en **1**, lo que generó una disminución en el rendimiento de la reacción. Para solventar este problema, se planteó la protección del grupo hidroxilo de **1** mediante la acilación con cloruros de acilo. Kristensen¹⁹ ha explicado la facilidad de proteger hidroxiaminoácidos a partir de cloruros de acilo y anhídridos carboxílicos en condiciones ácidas. En el caso de **1**, se utilizaron cloruros de etanoilo, pentanoilo y hexanoilo, obteniendo rendimientos del 70%, 60% y 65%, respectivamente, en la O-acilación²⁰. Además, se diseñó un procedimiento más sencillo, utilizando ácido trifluoroacético y cloruro de etanoilo a temperatura ambiente, lo que resultó en un rendimiento del 70% y facilitó la separación del producto en forma de clorhidrato²¹.

Los derivados O-acetilados de **1** presentan una menor polaridad en el grupo funcional fenólico, lo que inactiva el anillo aromático y favorece la reacción sobre el grupo amino de la cadena principal, aumentando el rendimiento. Por lo tanto, se propone la síntesis de los derivados protegidos de **1** a partir de cloruro de benzoilo (Bz) y cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo (BZ-NO₂) para llevar a cabo la reacción de oxidación a tiramina.

2. Metodología

2.1 Instrumentación

Análisis de espectrometría de masas

Los análisis mediante espectrometría de masas se realizaron en el equipo MS Waters AQUITY del laboratorio de instrumentación química (LIQ) de la Universidad Icesi mediante el método de infusión-MS.

Análisis espectroscópico de infrarrojo

El análisis mediante la técnica de espectrometría de infrarrojo medio (IR) se realizó en el equipo FT-IR Nicolet 6700 de la casa Thermoscientific perteneciente al laboratorio de instrumentación química (LIQ) de la universidad Icesi mediante el método de transmisión ESP utilizando pastilla de KBr.

Análisis de propiedades mediante fusiómetro

La determinación de los puntos de fusión se realizó mediante un fusiómetro marca Electrothermal IA 9000.

Técnica de cromatografía de capa delgada (CCD)

El análisis cromatográfico se efectuó en placas de aluminio con recubrimiento de sílice 60 F₂₅₄ de la casa comercial Supelco. Los solventes más utilizados para la fase móvil fueron diferentes proporciones de hexano, diclorometano, acetato de

etilo y metanol en la mayoría de los casos. Además, se utilizaron la ninhidrina y una lámpara de ultravioleta de 254 nm como reveladores.

Técnica de cromatografía de columna

Se empleó esta técnica como fase de purificación de los compuestos obtenidos utilizando sílice 60 (0.040-0.063 mm).

Diseño del estudio

Se plantea un estudio de las rutas para la síntesis de tiramina mediante la descarboxilación oxidativa de **1** usando como agente oxidante **NBP**. Para ello y teniendo en cuenta la problemática abordada de bajos costos de producción se realiza la siguiente metodología.

2.2 Desarrollo experimental

2.2.1 Síntesis de Ftalimida (**4**)

Mezclar 1.00 g (6.75 mmol) de anhídrido ftálico **3** y 0.200 g (3.30 mmol) de úrea y agitar hasta alcanzar homogeneidad en la mezcla. Calentar entre 130 °C a 135 °C. Monitorear efervescencia debido a la producción de dióxido de carbono, un subproducto de reacción. Finalizando la efervescencia agitar durante diez minutos y enfriar a temperatura ambiente. Filtrar al vacío realizando lavados con un volumen mínimo de agua y secar a 100°C. La reacción se recrystalizó en etanol durante 24 h. Esta reacción se realizó siguiendo el protocolo de Volguel's²².

2.2.2 Síntesis de N-bromoftalimida (**NBP**)

Mezclar 0.900 mL de H₂O (50.0 mmol), 0.582 mL de H₂SO₄ al 98% (11.1 mmol) y 490 mg de KBr (4.76 mmol). Posteriormente, adicionar gota a gota 1.10 mL de H₂O₂ (47.0 mmol) para generar Br₂ in situ. En otro recipiente agregar 250 mg de **4** (1.70 mmol)

junto a una solución de 80.0 mg de NaOH en 1 mL de H₂O.

2.2.3 Síntesis de la L-tirosina protegida con cloruros de benzoilo.

Se plantean dos procedimientos para la obtención de un derivado protegido de **1**.

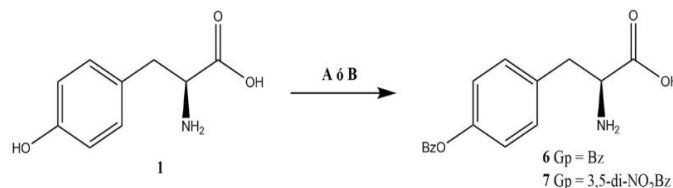


Figura 2. Protección de **1** con BzCl y 3,5-diNO₂-BzCl.

2.2.3.1 Metodología A: protección de **1** con cloruros de benzoilo en ácido trifluoroacético (TFA)

Mezclar 300 mg (1.65 mmol) de **1**, disueltos en 1.50 mL de ácido trifluoroacético anhidro. Posteriormente, agrega 600 µL de cloruro de benzoilo y se agita a temperatura ambiente durante treinta minutos. Una vez terminada la reacción, se adicionan 150 µL de etanol hasta observar la generación de un crudo. Luego la solución se debe evaporar a presión reducida. La purificación del producto se realizó mediante cromatografía de columna fase móvil en diferentes mezclas de metanol/diclorometano.

2.2.3.2 Metodología B: Protección de **1** con cloruros de benzoilo en HClO₄.

En un balón de reacción, se adiciona 100 mg (0.550 mmol) de **1**, 1.10 mmol del cloruro de benzoilo (Gp), 25.0 µL (0.295 mmol) de HClO₄ al 70% en 1.30 mL de acetato de etilo. El cloruro de benzoilo se debe agregar lentamente por goteo, y una vez adicionada toda la cantidad, se deja la mezcla de reacción en reflujo durante doce horas. Luego, dejar

enfriar la mezcla de reacción y se lleva a pH neutro utilizando una solución de NH_3 en agua. Por último, se filtra al vacío y conservar la fase líquida donde precipita el compuesto de interés. La purificación del producto se realizó mediante cromatografía de columna fase móvil en diferentes mezclas de metanol/diclorometano²⁰.

2.2.4 Síntesis de la *p*-tiramina

Adicionar 400 mg de **1** (2.42 mmol) en una mezcla de EtOH (40 mL), H_2O (2 mL) y 1.50 mL de una disolución saturada de NH_4Cl . Mientras se realiza agitación agregar 1.07g de **NBS** (6.05 mmol) en 5 mL de dimetilformamida (**DMF**) a temperatura ambiente. Después de 20 minutos, disolver 2.30 g de dicloruro de níquel (II) hexahidratado (9.68 mmol) en la mezcla de reacción y añadir lentamente 915 mg de NaBH_4 (24.2 mmol) en porciones con agitación vigorosa. Finalmente, después de 30 min a temperatura ambiente, la reacción se filtra para eliminar el etanol. Al residuo líquido, agregar 20 mL de agua y basificar a pH 10 con NaOH 1.0 M acuoso. Extraer la solución acuosa con hexano. Lavar los extractos orgánicos combinados con una solución acuosa de NaHCO_3 (20 mL) y secar sobre MgSO_4 ²³.

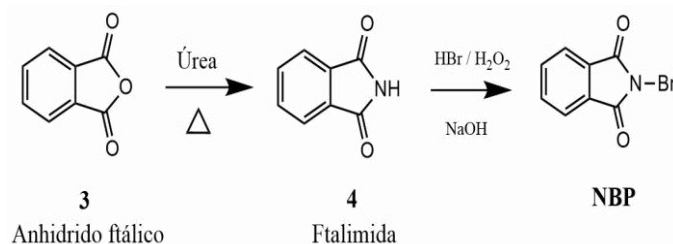
3. Resultados y discusión.

3.1 Síntesis de N-Bromoftalimida (**NBP**), purificación y caracterización.

La **NBP** es un agente oxidante y bromante capaz de realizar procesos de oxidación-reducción en compuestos con baja densidad electrónica, en

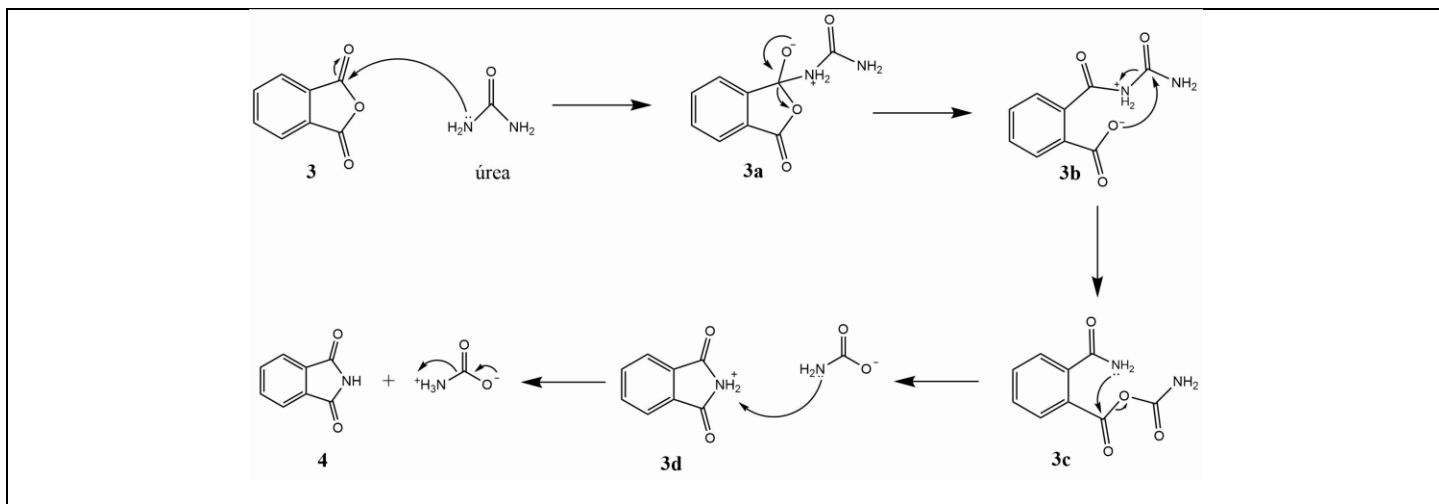
comparación con otros halógenos como el bromo. Los estudios cinéticos en la oxidación de aminoácidos han ganado relevancia debido a la baja peligrosidad de la **NBP** y su capacidad para no generar subproductos tóxicos. Además, su equilibrio químico permite su conversión a **4**, aumentando la recuperación del material de partida y permitiendo su reutilización en reacciones en cadena.

Por lo anterior, se planteó la síntesis del agente oxidante **NBP** mediante dos etapas. Primero, la formación de **4** a partir de anhídrido **3**, y posteriormente, una reacción de bromación en medio alcalino.



Esquema 1. Reacción general para la obtención de **NBP** a partir de **3**.

Para la primera etapa se realizó un tratamiento térmico de **3** con urea, sin necesidad de disolvente, a una temperatura de 130 °C. Este incremento de temperatura favorece el desplazamiento del equilibrio químico hacia la formación de **4** debido a aumento de la reactividad del ataque nucleofílico de la amina al grupo carbonilo de **4**. Además, se promueve la formación de dióxido de carbono como subproducto en lugar de agua. El mecanismo de reacción que describe la reacción de mejor manera se encuentra a continuación:



Esquema 1. Mecanismo de reacción para formar **4** a partir de **3** y urea.

El mecanismo de reacción involucra el ataque nucleofílico (S_N2) del par de electrones libres del grupo amino de la urea al carbonilo del anhidrido **3**, formando un intermedio tetraédrico (**3a**). Este intermedio facilita el rompimiento del ciclo mediante la deslocalización de electrones hacia el oxígeno. Luego, el oxígeno cargado negativamente ataca al carbonilo menos impedido, neutralizando la carga positiva (**3b**). Se produce un nuevo ataque nucleofílico del nitrógeno de la amina al carbonilo más cercano, lo que genera el cierre del ciclo (**3d**). Finalmente, se observa el ataque de uno de los hidrógenos de la imida, dando lugar a un intermediario que, por estabilidad, deslocaliza los electrones del oxígeno, facilitando la liberación de dióxido de carbono (CO_2) y amoníaco (NH_3) (Esquema 1).

El seguimiento de la reacción se hizo mediante cromatografía de capa delgada (**CCD**), donde se observó un valor de R_f de 0.80 diferente a **3**, lo cual fue corroborado con el punto de fusión experimental de $237.1\text{ }^\circ C$, que se encuentra dentro del rango reportado para **4** con un grado de pureza $>95\%$ ($236\text{--}238\text{ }^\circ C$). La recristalización en etanol al 96% durante 24 horas permitió obtener unos cristales blancos filamentosos con un rendimiento del 76.9% . Posteriormente se tomó un espectro infrarrojo a los cristales obtenidos.

Del análisis de los espectros de infrarrojo que se muestran en la Figura 3, se puede concluir que se obtuvo el compuesto de interés, la ftalimida **4**.

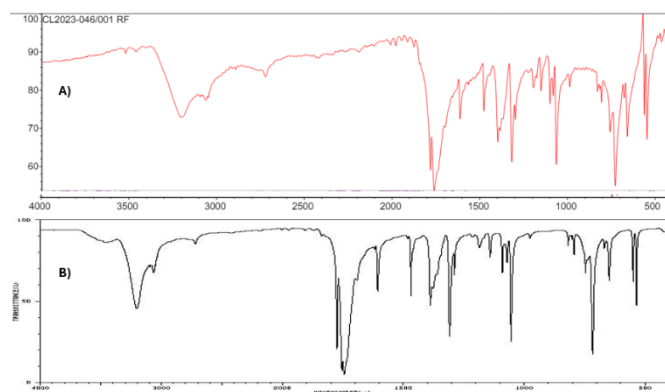


Figura 3. A) Espectro IR de **4** experimental y B) Espectro IR de **4** extraído de SDBS.

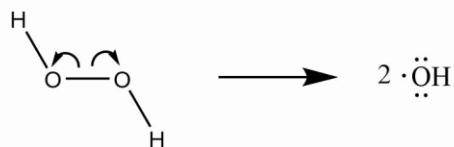
Todas las bandas observadas en el espectro coinciden con las esperadas para este producto. Se destaca la banda en 3202 cm^{-1} , característica de imidas cíclicas y aminas secundarias. Además, se observan dos bandas en 1752 y 1774 cm^{-1} que corresponden a los estiramientos de los dos grupos carbonilo presentes en la estructura.

Una vez identificado el compuesto **4**, se procedió con la segunda etapa para la generación de **NBP**. En este caso, se obtuvo un rendimiento del 59.2% utilizando un protocolo adaptado de la obtención de **NBS**, el cual requiere ácido bromhídrico (HBr)²⁴. El producto sólido de apariencia beige se obtuvo después de una filtración a vacío. El seguimiento de la reacción por CCD mostró un valor de R_f de 0.40 similar al observado para el compuesto **4**, indicando la formación del producto deseado. El punto de fusión del producto fue de $214.4\text{ }^\circ C$ mientras que el

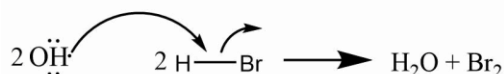
experimental reportado según su grado de pureza puede oscilar entre 194 – 210 °C, lo que sugiere la necesidad de mejorar el proceso de purificación en próximas síntesis.

La optimización de este paso metodológico dependió del montaje de reacción ya que se utilizó una destilación simple con la finalidad de generar Br₂ in situ a partir de HBr. Lo anterior es posible por el uso de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que posee un mecanismo de reacción radicalario.

Paso 1: Iniciación



Paso 2: Generación de Br₂



Esquema 2. Mecanismo de reacción radicalario para la obtención de Br₂

En el apartado 2.2.2 de la metodología, se detalla el procedimiento para obtener NBP a partir de KBr, H₂O y H₂SO₄, generando HBr in situ mediante un balón de reacción conectado por destilación simple a la mezcla de ftalimida en medio básico. Esto asegura que el Br₂, formado por condensación al iniciar la reacción con peróxido, se adicione lentamente, gota a gota sobre la mezcla de reacción.

3.2 Protección de **1** utilizando cloruros de benzoilo

Una vez sintetizado el agente oxidante, es necesario proteger el compuesto de partida. Esto se debe a que la metodología de oxidación propuesta para promover la descarboxilación en la molécula **1** se basa en obtener feniletilamina a partir del aminoácido fenilalanina, utilizando **NBS** y posterior reducción con NaBH₄²³. Sin embargo, la diferencia estructural entre la fenilalanina y **1** es que la última posee un grupo fenólico en su estructura, lo cual activa el anillo aromático y lo hace susceptible a halogenación por parte de agentes oxidantes como

NBS o **NBP**, esto puede conllevar a la generación de productos mono y disustituídos. Por lo anterior que se planteó la protección de **1** con cloruros de benzoilo.

Los cloruros de acilo son ampliamente utilizados para la protección de hidroxiaminoácidos reportando altos rendimientos y bajo costo de producción. Específicamente, se utilizaron cloruro de benzoilo (BzCl) y cloruro de 3,5-di-NO₂-Bz (BzNO₂Cl) empleando catálisis ácida con ácido perclórico (HClO₄) y ácido trifluoroacético (TFA). Estos protocolos han mostrado buenos rendimientos en **1** con cloruro de etanoilo en TFA (70%) y HClO₄ (91%)^{23,24}. El uso en medio ácido se debe a que los aminoácidos presentan un equilibrio ácido-base. Al disminuir el pH, el grupo amino se protona formando la especie (-NH₃⁺), disminuyendo su reactividad y favoreciendo el ataque nucleofílico del oxígeno fenólico al carbonilo del cloruro de acilo. El mayor rendimiento observado en HClO₄ se debe a que este es un ácido más fuerte (pKa alrededor de -7) en comparación con el TFA (pKa de 0.3), lo que reduce aún más la reactividad del grupo amino.

A continuación, se presenta el mecanismo de reacción general para la protección de **1** mediante sustitución nucleofílica con cloruros de acilo.

Se llevó a cabo un diseño experimental para evaluar los rendimientos obtenidos al variar el ácido y el grupo protector. Los resultados se encuentran registrados en la siguiente tabla.

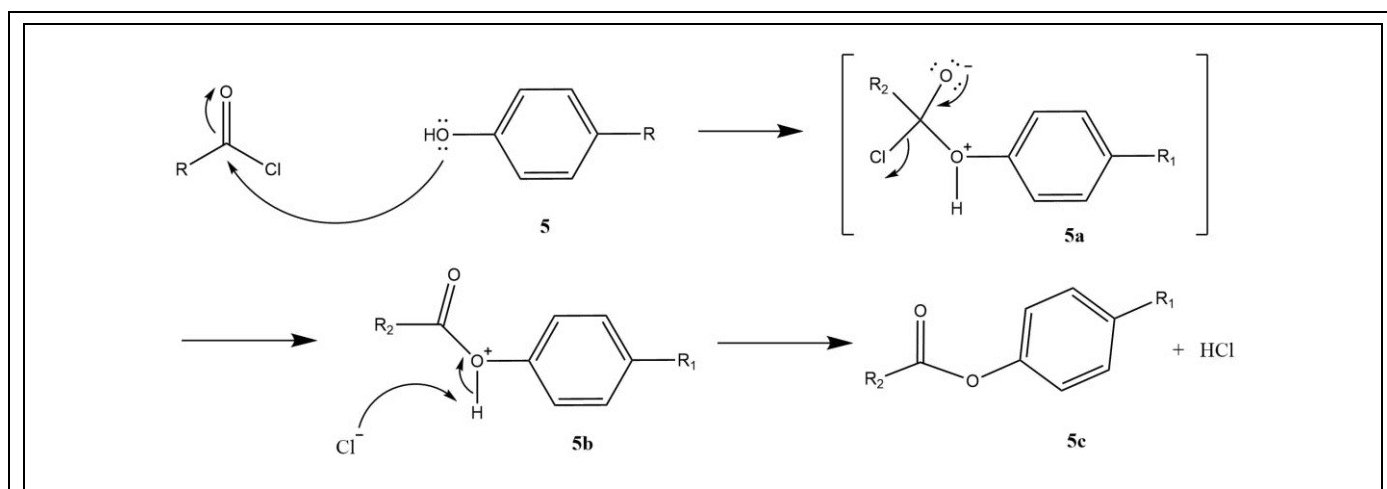
Tabla 1. Resultados obtenidos para la síntesis de los compuestos protegidos.

Ensayo	GP	Producto	Rf	Ninhidrina	P.f (°C)	%
A	BzCl	6	0.45	+	209.3	34.9
	BzNO ₂ Cl	NRx	0	-----	-----	-----
B	BzCl	NRx	0	-----	-----	-----
	BzNO ₂ Cl	7	0.41	+	76.9	9.98

Como se puede observar en la Tabla 1, los resultados que arrojaron un posible derivado protegido de **1** fue el producto **6** mediante el ensayo con TFA y BzCl tal como se reporta en la metodología del numeral 2.2.3.1. En el ensayo con TFA y BzCl, se observaron dos bandas por CCD, una con Rf de 0.45 y otra con Rf de 0.80. El compuesto de interés fue la banda con Rf de 0.45, ya que esta reveló positivamente con ninhidrina, indicando la presencia de aminoácidos, aminas primarias o secundarias. Al comparar el punto de

fusión experimental del compuesto aislado con los datos reportados en la literatura, se encontró que el producto **6** no está descrito. Específicamente, al contrastar con el punto de fusión del compuesto protegido en el grupo amino (163 °C a 167 °C), se observa una diferencia.

Finalmente, se llevaron a cabo análisis espectroscópicos de IR y Masas para confirmar y caracterizar el compuesto aislado, cuyos resultados se presentan a continuación.



Esquema 3. Mecanismo de reacción general mediante acilación al grupo fenólico de un hidroxiaminoácido. **5)** ataque nucleofílico al carbonilo del cloruro de acilo da como resultado un intermedio cuaternario que deslocaliza la carga negativa para estabilizar la estructura dando como resultado la salida del cloro (**5a**). Posteriormente el cloruro ataca al hidrógeno del oxígeno neutralizando la carga positiva (**5b**) para dar lugar a (**5c**) y HCl.

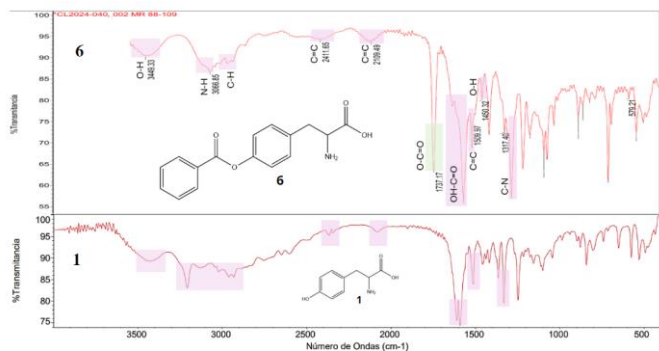


Figura 4. **6)** Espectro IR del compuesto protegido y **1)** Espectro IR del compuesto de partida.

Según se muestra en la Figura 4, las señales presentes en el espectro de infrarrojo corresponden compuesto **6**. Entre estas se destaca la presencia de

señales en 3450 cm^{-1} pertenecientes a la tensión O-H y también a la tensión del grupo amino. Adicionalmente, se observan señales en 3070 cm^{-1} características de las tensiones de anillos aromáticos, junto con los sobretonos en el rango de $2100\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$. Asimismo, se aprecia una señal alrededor de 1560 cm^{-1} , que pertenece a la tensión del grupo carbonilo del ácido carboxílico. En el caso particular del compuesto **6**, se identifica una banda de gran intensidad en 1737 cm^{-1} , característica de la tensión C=O de grupos carbonilos de éster. Esto confirma que en el compuesto **1** la protección se llevó a cabo a través del grupo fenólico, y no el grupo amino, ya que de

lo contrario se habría observado una señal de carbonilo perteneciente amida en el rango de 1650-1680 cm^{-1} . Finalmente, se realizó el análisis mediante espectro de masas utilizando la técnica de

ionización por electrospray (ES/MS). Las posibles fragmentaciones se muestran a continuación en la Figura 6.

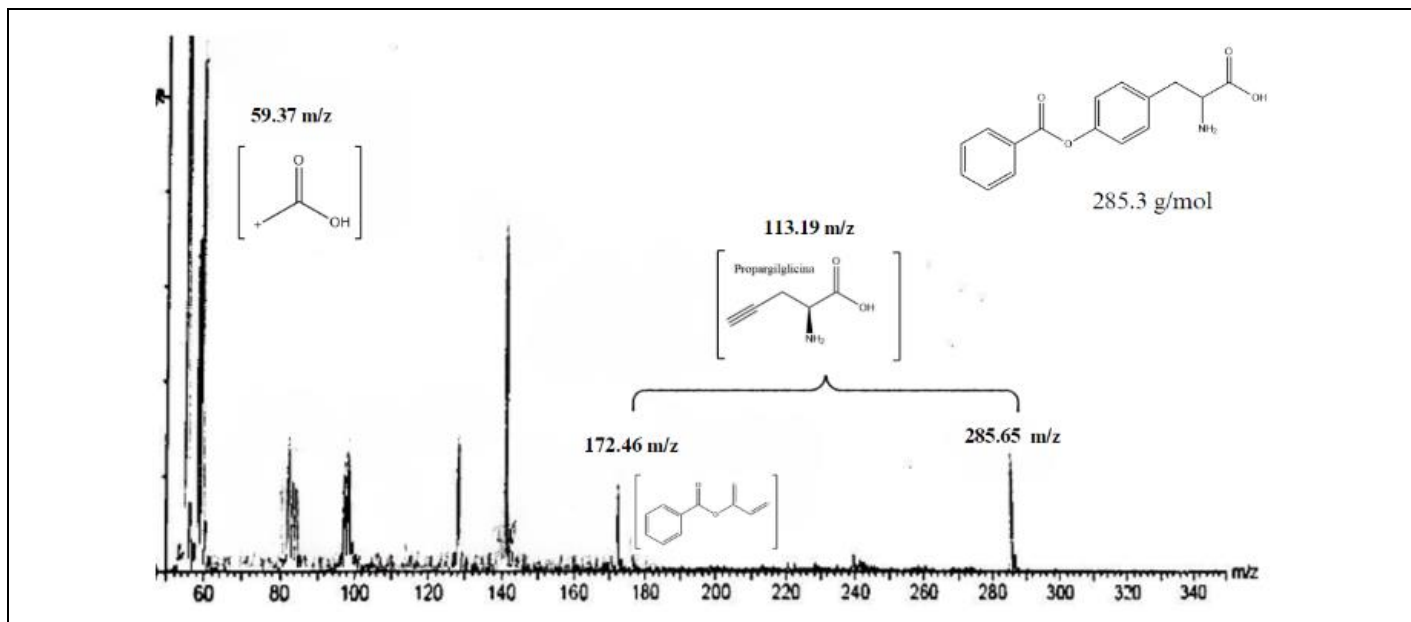


Figura 5. Espectro de masas del compuesto 6 mediante la técnica de ionización por electrospray (ES/MS).

En Figura 5, se evidencia la presencia del ion molecular, el cual es muy cerca del valor de la masa molar del compuesto 6. Además, se identifican dos fragmentaciones: una que resulta de la pérdida de un grupo carboximetilio con una relación m/z de 59.37, y otra que corresponde a la fragmentación del anillo aromático, producto de una posible retro Diels Alder,

En conclusión, los análisis de espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas permitieron confirmar la estructura del compuesto 6 obtenido en el proceso de síntesis.

Adicionalmente, se identificó el compuesto aislado mediante columna de cromatografía con un R_f de 0.80 en la CCD. Este compuesto solo reveló en ultravioleta, sin dar resultado positivo con ninhidrina. Conocer la estructura de este subproducto podría facilitar la optimización del proceso de síntesis. Por lo tanto, se realizaron análisis espectroscópicos adicionales para su caracterización.

con una señal en 172.46 m/z. Es importante destacar que esta última fragmentación es probable ya que el fragmento restante de la molécula tendría una masa de 113.19 g/mol, lo cual es característico de los rearrreglos estructurales pertenecientes en compuestos derivados de aminoácidos, como es el caso de la propargilicina

En este caso, se comparó el espectro IR y el espectro de masas del compuesto aislado con el del ácido benzoico. El punto de fusión del compuesto (115°C) y su aspecto cristalino eran acordes con las propiedades físicas del ácido benzoico. Además, todas las bandas en el espectro de IR y masas son las mismas, lo que permitió deducir que posiblemente el BzCl estaba siendo hidrolizado a ácido benzoico por las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción o se hidrolizo durante el proceso de extracción.

La Tabla 3 muestra la obtención de un compuesto derivado del ensayo B utilizando BzNO_2Cl . Una de las

principales dificultades que se presentó en esta reacción y a la que se atribuye el bajo rendimiento fue la baja solubilidad del del cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo en acetato de etilo, el disolvente utilizado. Este reactivo se encuentra en estado sólido, lo que dificultaba su interacción con los demás componentes de la matriz de reacción. Para mejorar la solubilidad, se realizaron pruebas de solubilidad con diferentes solventes, siendo la N,N - Dimetilformamida (**DMF**) el único que solubilizó completamente el compuesto. Sin embargo, el uso de **DMF** puede no ser muy útil, ya que es un disolvente de alto punto de ebullición, lo cual puede complicar su posterior separación.

El compuesto **7** fue sintetizado siguiendo la metodología 2.2.3.2 en catálisis ácida con HClO₄. Esta reacción requería de reflujo a la temperatura de ebullición del disolvente. Se adaptó el procedimiento de Kimura, et al²⁰, modificando el tiempo de reacción de 5 a 24 horas. Además, se omitió el paso de neutralización con NH₃ en solución debido a que se presentaron problemas en la fase de separación del compuesto.

El proceso de extracción se realizó de manera análoga para los cuatro ensayos del diseño experimental, utilizando acetato de etilo y agua como método de separación líquido-líquido. El compuesto de interés **7** presentó un factor de retención (Rf) de 0.41 en CCD y reveló positivamente con ninhidrina. Los resultados espectroscópicos de este compuesto se muestran a continuación en la Figura 9 y 10.

Aparece una señal en 1738 cm⁻¹ característica del carbonilo de éster. Adicionalmente, se identificó una señal en 1295 cm⁻¹ que no se observaba en el reactivo de partida, la cual se atribuye a señales de tensión N-O en anillos aromáticos. En el caso de este compuesto, se observa de manera más pronunciada la señal correspondiente a la tensión N-H del grupo amino en 3350 cm⁻¹.

Posteriormente, se realizó la caracterización del compuesto mediante espectrometría de masas por ionización por electrospray. Sin embargo, este análisis no fue concluyente, ya que aparentemente no se obtuvo el ion molecular deseado. El compuesto presentó una relación masa/carga experimental de 363.35 m/z, mientras que el ion molecular esperado tenía una masa de 375.35 m/z.

Los resultados espectroscópicos obtenidos son consistentes con la estructura esperada del producto de interés, brindando evidencia sobre su identidad y grado de pureza. Estos datos analíticos complementan la información cromatográfica previamente reportada, permitiendo una caracterización más completa de este compuesto.

Por otro lado, se identificó un subproducto de la reacción que presentó un Rf de 0.95. Al evaporar la fase orgánica se obtuvo una mezcla oleosa, que posteriormente se dejó recristalizando en metanol a -20°C durante 48 horas, lo que permitió obtener un compuesto sólido de color amarillo opaco. Además de la recristalización, también se realizó cromatografía de columna para la purificación del subproducto, lo que resultó en un rendimiento del 9.98%. Aunque se obtuvieron los espectros de IR y masas de este subproducto los resultados espectroscópicos de este compuesto se muestran a continuación.

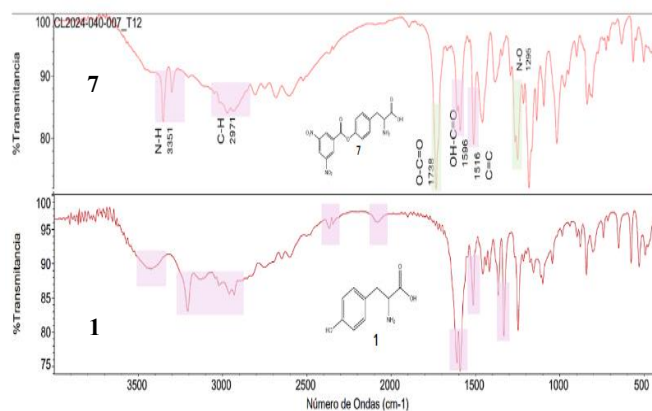


Figura 6. 7) Espectro IR del compuesto protegido y 1) Espectro IR del compuesto de partida.

Aunque se obtuvo una cantidad relativamente baja del compuesto **7**, se requieren más pruebas de caracterización para confirmar su estructura. Los subproductos de la reacción, asociados con un Rf de 0.95, no se identificaron, pero el seguimiento de la reacción permitirá establecer un protocolo de purificación y recristalización para mejorar el proceso. La estrategia de desprotección requiere futuras investigaciones. Sin embargo, se pueden seguir protocolos establecidos para compuestos estructuralmente similares, como el cloruro de bencilo, que se desprotege mediante una reacción con hidroxilamina en medio básico o utilizando luz ultravioleta.

Finalmente, una vez obtenido el compuesto **7**, se realizó la reacción de oxidación para establecer las condiciones generales de reacción a **2**. Se sugiere un seguimiento de la reacción mediante CCD antes y después de la adición de NBP, así como una estrategia para cuantificar indirectamente la producción de dióxido de carbono resultante de la descarboxilación. Dicha reacción solo se ejecutó con el compuesto protegido **6**, debido a que las cantidades obtenidas de **7** eran muy bajas.

4. Conclusiones

Se sintetizó con éxito los compuestos ftalimida y **NBP** con rendimientos del 76.9% y 59.2% respectivamente, demostrando la efectividad de los procedimientos desarrollados. Adicionalmente, se logró proteger el aminoácido **1** con BzCl, aunque con un rendimiento moderado de 34.7%. Por otro lado, se logró la protección de **1** con el grupo protector dinitrado, aunque el análisis del EM para este no fue concluyente y puede ser un derivado protegido diferente. A pesar de no haber logrado la síntesis de **2**, se ha realizado un avance significativo en el desarrollo de la metodología propuesta.

En cuanto a la metodología de protección de **1** es posible aumentar el rendimiento de reacción utilizando atmosfera inerte como estrategia para

evitar la hidrólisis del cloruro de benzoilo. Además, estudiar a fondo la desprotección basándose en protocolos de cloruros de acilo que ya hayan sido utilizados para aminoácidos estructuralmente parecidos a la tirosina.

5. Agradecimientos

Este trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda de mis tutores Ruby Lizeth Pérez y Jaime Martín Franco, a quienes les agradezco por su dedicación y entrega con el proyecto de investigación. Extiendo mis agradecimientos a la profesora Paola Caicedo por brindarme la oportunidad de pertenecer al proyecto liderado por el grupo de investigación de biotecnología, como también a todas las personas que hicieron parte de mi proceso de aprendizaje. A el profesor Diego Enríquez por extenderme su ayuda durante todo el semestre y en especial a mis compañeros que hacen parte del semillero de Norbeladina (Daniel, Nicolas y Arley).

6. Referencias

1. Zhang, H. et al. Two-step enzymatic synthesis of tyramine from raw pyruvate fermentation broth. *J Mol Catal B Enzym* 124, 38–44 (2016).
2. Marcobal, A., de las Rivas, B., Landete, J. M., Tabera, L. & Muñoz, R. Tyramine and Phenylethylamine Biosynthesis by Food Bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 52, 448–467 (2012).
3. Yang, Y., Pan, X. & Wang, S. Improved Preparation of Tyramine by Curtius Rearrangement. *Chinese Journal of Chemistry* vol. 27 (2009).
4. Katre, Y., Goyal, N. & Kumar Singh, A. Effect of CTAB micelle on the oxidation of L-Leucine by N-Bromophthalimide: A kinetic study. *Zeitschrift fur Physikalische Chemie* 225, 107–124 (2011).
5. Kumar, K. G. & Indrasenan, P. Titrimetric determination of para-aminobenzoic acid using N-bromophthalimide and IV-bromosaccharin. *Journal*

- of Pharmaceutical & Biomedical Analysis vol. I (1989).
6. Jain, B., Negi, R. & Singh, A. K. Oxidative behavior of N-bromophthalimide for organic compounds: a review. *SN Applied Sciences* vol. 1 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s42452-018-0100-1> (2019).
 7. Fujisaki, S., Hamura, S., Eguchi, H., & Nishida, A. (1993). Organic Synthesis Using Sodium Bromate. II. A Facile Synthesis of N-Bromo Imides and Amides Using Sodium Bromate and Hydrobromic Acid (or Sodium Bromide) in the Presence of Sulfuric Acid. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 66(8), 2426–2428. doi:10.1246/bcsj.66.2426
 8. Wei, Y., Liang, F. & Zhang, X. N-bromoimide/DBU combination as a new strategy for intermolecular allylic amination. *Org Lett* 15, 5186–5189 (2013).
 9. Anjaiah, B., Prameela, K., Srinivas, P. & Rajanna, K. C. Synthesis, kinetics, and mechanism of bromophenols by N-bromophthalimide in aqueous acetic acid. *Int J Chem Kinet* 50, 804–812 (2018).
 10. Mohana Das, C. & Indrasenan, P. N-Bromosaccharin as an Oxidimetric Titrant: Direct Potentiometric & Visual Titrations of Some Typical Reductants in Aqueous Acetic Acid Medium. *Indian Journal of Chemistry* vol. 26 (1987).
 11. Anjaiah, B., Kumar, M. S., Srinivas, P. & Rajanna, K. C. Bromination of Anisoles Using N-Bromophthalimide: A Synthetic and Kinetic Approach. *Int J Chem Kinet* 48, 98–105 (2016).
 12. Eraković, M. et al. Halogen Bonding of N-Bromophthalimide by Grinding and Solution Crystallization. *Cryst Growth Des* 18, 1182–1190 (2018).
 13. Bharat Sinch, R. & Shrivastav, R. KINETICS AND MECHANISM OF OXIDATION OF SOME KETONES BY. *Tetrahedron* vol. 42 (1986).
 14. Bharad, J. et al. Oxidation of benzhydrols by N-bromophthalimide A kinetic and mechanistic study. *J. Indian Chem. Soc* vol. 86 (2009).
 15. Abou: El-Ashry, Evaluation of Certain Pharmaceuticals. Google Académico.
 16. Kumar, K. G. & Indrasenan, P. Titrimetric Methods for the Determination of Some Sulpha Drugs Using N-Bromophthalimide and N-Bromosaccharin. *ANALYST* vol. 113 (1988).
 17. Ramachandrapa, R., Puttaswamy, Mayanna, S. & Gowda, N. Kinetics and mechanism of oxidation of aspirin by bromamine-T, N-bromosuccinimide, and N-bromophthalimide. *Int J Chem Kinet* (1998) doi:10.1002/(SICI)1097-4601(1998)30:6.
 18. Jain, B., Negi, R., & Singh, A. K. Oxidative behavior of N-bromophthalimide for organic compounds: a review. *SN Applied Sciences*, 1(1). doi:10.1007/s42452-018-0100-1. (2018).
 19. Kristensen, T. E. (2015). Chemoselective O-acylation of hydroxyamino acids and amino alcohols under acidic reaction conditions: History, scope and applications. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 11, 446–468. doi:10.3762/bjoc.11.51
 20. Huang, C. H., Kimura, R., Bawarshi-Nassar, R., & Hussain, A. Mechanism of Nasal Absorption of Drugs II: Absorption of l-Tyrosine and the Effect of Structural Modification on its Absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(12), 1298–1301. doi:10.1002/jps.2600741210. (1985).
 21. Previero, A., Barry, L.-G., & Coletti-Previero, M.-A. Specific O-acylation of hydroxylamino acids in presence of free amino groups. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 263(1), 7–13. doi:10.1016/0005-2795(72)90154-7. (1972).
 22. Vogel practical organic chemistry 5th edition. P. 1065-1066.
 23. Golding, B. T., & Laval, G. One-pot Sequence for the Decarboxylation of α -Amino Acids. *Synlett*, (4), 0542–0546. doi:10.1055/s-2003-37512. (2003).

24. Fujisaki, S., Hamura, S., Eguchi, H., & Nishida, A. Organic Synthesis Using Sodium Bromate. II. A Facile Synthesis of N-Bromo Imides and Amides Using Sodium Bromate and Hydrobromic Acid (or Sodium Bromide) in the Presence of Sulfuric Acid. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 66(8), 2426-2428. (1993).