



*Estudios sintéticos, estructurales y de  
bioactividad de compuestos combinados  
de tiazol, oxazol e indol.*

Trabajo presentado por Lic. Verónica Martínez para aspirar al  
título de Magíster en Química

Director de Tesis: Dr. Danilo Davyt

Tribunal: Dra. Graciela Mahler

Dr. Ignacio Carrera

Dr. Enrique Pandolfi

Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química  
Orgánica, Facultad de Química, UdelaR.

Diciembre 2014



*A mi familia*



*“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”*

*Marie Curie*



## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todas las personas que de una forma u otra me acompañaron en este camino y me ayudaron en la realización de esta tesis.

A mis padres, mis abuelos, y mi tía Fátima por el amor y el apoyo incondicional que me dieron, y por la confianza que siempre depositaron en mí. A mi madre por ser una mujer maravillosa y ser un ejemplo y un modelo a seguir cuando se trata de perseverancia y sacrificio a la hora de superarnos y conseguir lo que queremos. A mi padre que de donde esté, seguro me esta iluminando y apoyando como siempre lo hizo....

A mi hermana Vir, por ser mi mejor amiga y estar conmigo siempre, y darme a mi sobri Lolo que junto a Ezequiel son lo más lindo que nos ha pasado.

A Leo, por todos estos años juntos, por su apoyo, su paciencia y fundamentalmente por la fuerza y el amor de siempre.

A Danilo por darme la oportunidad de trabajar en la cátedra, y ser mi director de tesis, por su apoyo, su paciencia, por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por sus conocimientos y por estar siempre de buen humor.

A los pibes de farmacia, Ceci, Chiara, Stella, Carlos, Guille, Cathe, Valerie, Jaime, Lucia y otros que alguna vez formaron parte de este grupo como Caro, Pablo, Flor, Guille Moyna, Carmela, etc., por todos los momentos compartidos durante estos años, por estar siempre, por las charlas de la sobremesa, las meriendas, los consejos y por hacer que el trabajo sea más ameno y divertido.

A Gloria, Laurita y Graciela, por sus consejos, sus enseñanzas y siempre darme para adelante.

A Horacio, por enseñarme a usar el equipo de RMN, y por ser un muy buen compañero.

A la gente de orgánica, por la disponibilidad y la buena onda de siempre.

A Alejandra Rodríguez por los espectros de Masa, y por todas las veces que la llame para ir a medir las actividades ópticas.

A Jenny Saldaña y a José M. Padrón por los ensayos biológicos.

A CSIC grupos por la financiación a congresos.



# INDICE

## Capítulo 1 Introducción y objetivos generales

1.1. Introducción.....	3
1.2. Objetivos.....	10

## Capítulo 2 Síntesis del bloque tiazol

2.1. Antecedentes.....	15
2.2. Resultados y discusión.....	18
2.2.1. Síntesis de tiazol a partir de un $\beta$ -amino alcohol.....	18
2.2.2. Síntesis de tiazol a partir de cisteína y nitrilo.....	23
2.3 Parte experimental.....	41

## Capítulo 3 Síntesis de Bacillamida C y Neobacillamida A

3.1. Antecedentes.....	59
3.2. Resultados y discusión.....	64
3.2.1. Síntesis de bacillamida C .....	64
3.2.2. Síntesis de neobacillamida A.....	70
3.3. Parte experimental.....	73

**Capítulo 4** Preparación de análogos de bacillamida C y neobacillamida A con el anillo oxazol

4.1. Antecedentes.....	93
4.2. Resultados y discusión.....	95
4.2.1. Preparación de análogos de bacillamidas con el anillo oxazol.....	95
4.2.2. Preparación de análogos de bacillamidas con triptófano y fenilalanina.....	100
4.3. Parte experimental.....	103

**Capítulo 5** Actividad biológica

5.1. Antecedentes.....	117
5.2. Resultados y discusión.....	118
5.2.1 Actividad citotóxica.....	118
5.3. Actividad antihelmíntica.....	121

**Capítulo 6** Conclusiones finales y perspectivas a futuro

6.1. Conclusiones finales.....	125
6.2. Perspectivas a futuro.....	126

**Anexo**

Publicación.....	131
------------------	-----

## Abreviaturas.

Boc<sub>2</sub>O: di-terc-butil dicarboxilato

br s: Singulete ancho

<sup>13</sup>C-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Protón

*c*: Concentración (g/100mL)

CD: Dicroísmo Circular

m-CPBA: Ácido para-amino benzoico

d: doblete

DAST: Trifluoruro de N, N-dietilaminosulfuro

DBU: 1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-ene

DCC: Diciclohexil carboimida

DCU: Diciclohexil urea

DDQ: 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DMSO: Dimetilsulfóxido

DIPEA: Diisopropil étil amina

4-DMAP: 2,4-dimetilaminopiridina

EP: Éter de petróleo

FM: Fase Móvil

g: gas

GI: Crecimiento Celular

GP: Grupo Protector

HBTU: *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance

<sup>1</sup>H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Protón

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución

IR: Espectrometría Infraroja

*J*: Constante de acoplamiento

m: Multiplete

mM: Milimolar

MeOD: Metanol Deuterado

MS ID: Espectroscopía de masas de baja resolución

MW: Microondas

$\mu\text{M}$ : Micromolar

ppm: Partes por Millón

Py: Piridina

q: Cuarteto

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

t: triplete

T.A.: Temperatura ambiente

TFAA: Anhídrido Trifluoroacético

TLC: Cromatografía en capa fina

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



# Capítulo 1: Introducción y objetivos generales

## 1.1 *Introducción*

Los productos naturales son una continua fuente de compuestos y de inspiración para la búsqueda y el desarrollo de nuevos fármacos, ya sea por su diversidad estructural así como por su amplio espectro de actividades biológicas.

Aunque los valores varían dependiendo de la definición de lo que se considera un fármaco derivado de un producto natural, es seguro decir que entre el 25 y el 50% de los fármacos que se comercializan actualmente derivan directa o indirectamente de productos naturales. En el caso de agentes anticancerígenos y antiinfecciosos la proporción es aún mayor, y una estimación es que casi dos tercios de estos agentes son derivados de productos naturales<sup>1</sup>.

Muchos de estos medicamentos derivados de productos naturales son alcaloides, un tipo de metabolito secundario. Las principales fuentes de estos metabolitos son especies microbianas especialmente en el área de antiinfecciosos, plantas (morfina, vinblastina, quinina, etc) y cada vez más se originan en algas, esponjas y microorganismos marinos<sup>2</sup>. Los alcaloides que han demostrado tener interesantes actividades biológicas, incluyendo actividad antitumoral, antibacteriana, e inmunosupresora entre otras<sup>3</sup>, contienen en su estructura los heterociclos imidazol, indol, oxazol y tiazol.

El arreglo de heterociclos oxazol-indol es un fragmento que está presente en varios productos naturales de origen marino y ha sido objeto de extensos estudios sintéticos. Algunos ejemplos con una potente actividad antitumoral

---

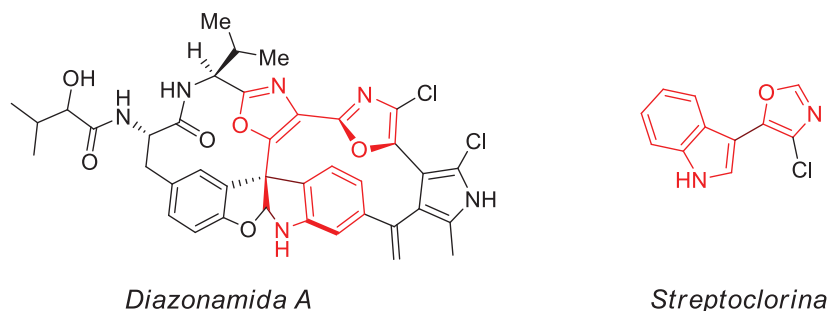
<sup>1</sup> Kingston, D. G. I., *J Nat Prod.*, **2011**, 74(3), 496–511

<sup>2</sup> Zhong, J., *Nat. Prod. Rep.*, **2013**, 30(6), 869–915

<sup>3</sup> Davyt D., Serra G., *Mar. Drugs* **2010**, 8, 2755-2780

son la streptoclorina<sup>4</sup> producida por un actinomicete marino del genero *Streptomyces sp.*, con un arreglo oxazol-indol y la Diazonamida A<sup>5</sup> obtenida del invertebrado marino *Diazona chinensis*, que posee el fragmento dicloro bis-oxazol indol. (Figura 1.1)

**Figura 1.1.** Productos bioactivos con el rearrreglo oxazol-indol



El motivo tiazol-triptamida se puede observar en varios péptidos cíclicos que poseen interesantes actividades biológicas (Figura 1.2), como es el ejemplo del zelvokamycin un antibiótico aislado en 1998 de una actinobacteria del género *Streptomyces sp.*<sup>6</sup>, el Argyrin B con actividad inmunosupresora aislado de la micobacteria *Archangium gephyra*<sup>7</sup> y los antibióticos A-21459 A y B producidos por un actinomicete del genero *Actinoplanes Sp*<sup>8</sup>.

<sup>4</sup> Shin, H. J., Jeong, H. S., Lee, H-S., Park, S-K., Kim, H. M., Kwon, H. J., *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, 17, 1403-1407

<sup>5</sup> Lindquist, N., Fenical, W., Van Duyne, G. D., Clardy, J., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2303-2304.

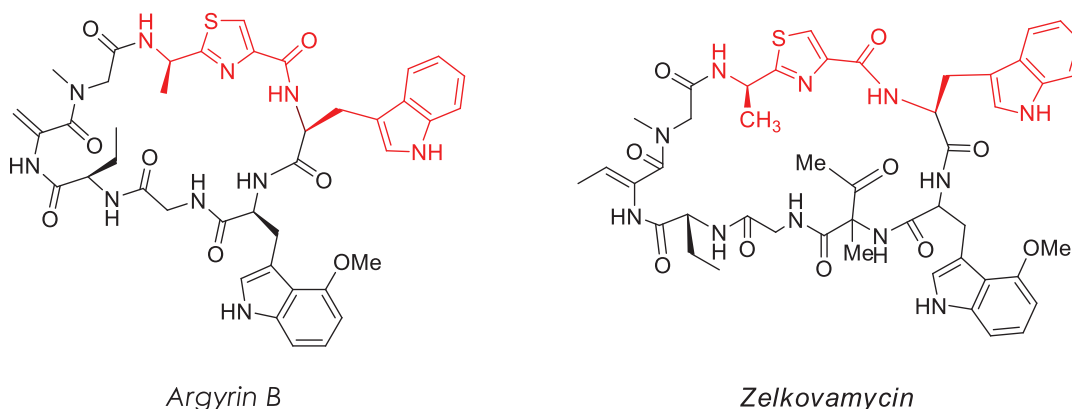
<sup>6</sup> Tabata, N., Tomoda, H., Zhang, H., Uchida, R., Omura, S., *J. Antibiot.*, **1999**, 52, 34-39.

<sup>7</sup> Vollbrecht, L., Steinmetz, H., Hofle, G., *J. Antibiot.*, **2002**, 55, 715-721.

<sup>8</sup> Ferrari, P., Vekey, K., Galimberti, M., Gallo, G., Selva E., Zerilli, L. F., *J. Antibiot.*, **1996**, 49, 150-154.

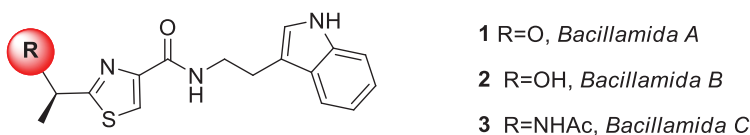


**Figura 1.2** Productos bioactivos con el rearrreglo tiazol-triptamida



El motivo tiazol-triptamida presente en estos compuestos también se puede observar en alcaloides más sencillos como lo son las bacillamidas. (Figura 1.3)

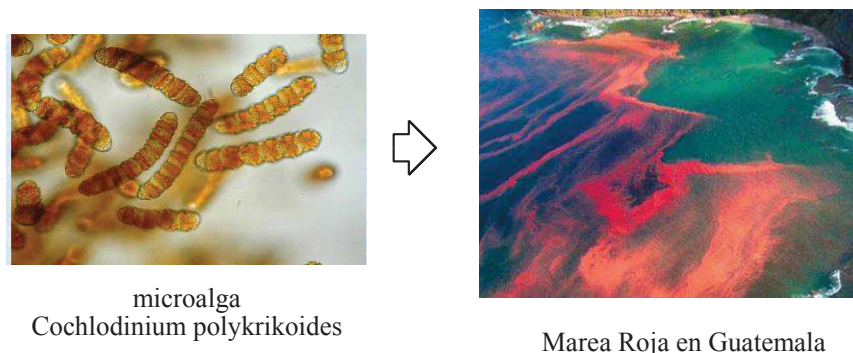
**Fig. 1.3** Estructuras de las bacillamidas



La bacillamida A (**1**) aislada en 2003 de una bacteria de origen marino *Bacillus sp.* SY-1, es un compuesto con actividad alguicida sobre *Cochlodinium polykrikoides*<sup>9</sup>, una especie de micro alga dinoflagelada causante de la marea roja, en aguas de Corea, Japón, México y EE.UU. entre otros países. Esto provoca gran mortandad de peces y grandes pérdidas económicas (Figura 1.4).

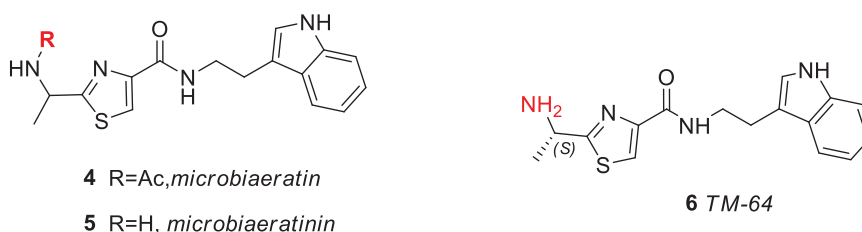
<sup>9</sup> Jeong, S-Y., Ishida, K., Ito, Y., Okada, S., *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 8005-8007

Figura 1.4. Marea roja causada por *Cochlodinium polykrikoides*.



En 2007 el estudio del *Bacillus endophyticus* extraído de un material microbiano hipersalino de las Bahamas condujo al aislamiento de la bacillamida B **2** y bacillamida C **3**<sup>10</sup>, estas bacillamidas no fueron testeadas como alguicidas por no haberse obtenido suficiente material. También en 2007 Ivanova *et al.*<sup>11</sup> aislaron dos compuestos de una muestra de la isla Levingston en la Antártida del microorganismo *Microbispora aerata* strain IMBAS-11A. Los compuestos aislados microbiaeratin **4** y microbiaeratinin **5**, fueron elucidados por espectroscopía de RMN y masa, pero no se reportaron sus configuraciones absolutas. El metabolito **4** presenta la misma estructura que la bacillamida C **3**, y **5** coincide con la estructura del alcaloide TM-64 **6** aislado en 1976 del actinomicete termófilo *Thermoactinomyces strain*, el cual presentó actividad anestésica (Figura 1.5)<sup>12</sup>.

Figura 1.5. Compuestos aislados por Ivanova *et al.* y alcaloide TM-64



<sup>10</sup> Socha, A. M., Long, A. Rowley, D. C., *J Nat. Prod.*, **2007**, 70, 1793-1795.

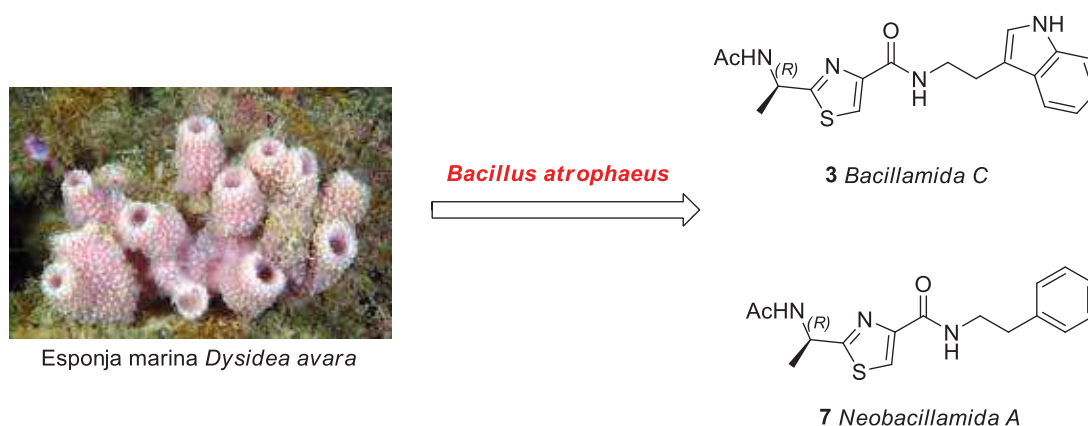
<sup>11</sup> Ivanova, V., Kolarova, M., Aleksieva K, Gräfe U., Dahse HM., Laatsch H., *Prep Biochem Biotechnol* **2007**, 37, 161-168.

<sup>12</sup> Konda, Y., Suzuki, Y., Omura, S., Onda, M., *Chem. Pharm. Bull.*, **1976**, 24, 92-96.

Al compuesto microbiaeratin 4 se le estudió la actividad citotóxica frente a las líneas celulares L-929 (célula fibroblástica de ratón), K-562 (célula de leucemia humana), y HeLa (célula de carcinoma cervical humana) para las cuales no mostró tener actividad. El estudio de actividad antimicrobiana a concentraciones de 50µg/mL contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, y *Mucor miehei*, mostró que no tiene actividad antimicrobiana. Tampoco demostró actividad alguicida contra las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus subspicatus* a concentraciones de 100µg/mL.

En 2009 la bacillamida C (**3**) junto a un nuevo compuesto, la neobacillamida A (**7**), fueron aislados de una bacteria marina *Bacillus atrophaeus*<sup>13</sup>, asociada a la esponja marina *Dysidea avara* del sur de China. La neobacillamida A (**7**) (Figura 1.6) se convierte en el primer alcaloide tiazolínico que contiene el motivo feniletilamina en lugar de la triptamina. Ambos compuestos fueron evaluados con respecto a su actividad citotóxica frente a la línea celular HL60 (célula de leucemia humana), resultando ambos inactivos.

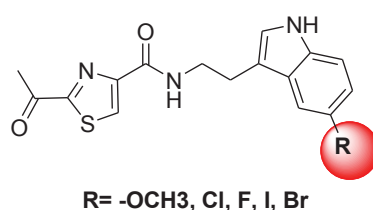
**Figura 1.6:** Compuestos aislados de *bacillus atrophaeus*.



<sup>13</sup> Yu, L. L., Li, Z. Y., Peng, C. S., Li, Z. Y., Guo, Y. W., *Helv Chim Acta*, **2009**, 92, 607-611.

La diversidad en la distribución y origen de las bacillamidas, junto con la toxicidad que presentan hacia las especies formadoras de floración algales, los convierte en compuestos prometedores para usar como alguicidas selectivos. En este sentido Sam-bento *et al.*<sup>14</sup> en 2008 estudiaron la actividad frente a algunas especies de cianobacterias y algas eucariotas de diferentes derivados sintéticos de la bacillamida A. Estos derivados fueron preparados a partir de diferentes derivados de la triptamina (Figura 1.7).

**Figura 1.7.** Derivados de la bacillamida A



Los derivados sintéticos 4-metoxi-bacillamida A, 4-bromo-bacillamida A, 4-cloro-bacillamida A, 4-flouro-bacillamida A y 4-yodo-bacillamida A, presentaron actividad contra la proliferación de algunas especies de cianobacterias. La 4-iodo-bacillamida A además puede actuar como un agente alguistático contra algas eucariotas, dependiendo de su concentración.

En muchas ocasiones la obtención de productos naturales en grandes cantidades resulta difícil puesto que se suelen aislar de fuentes naturales en muy pequeñas proporciones, de ahí la importancia de obtener en forma sintética mayores cantidades de estos productos naturales para profundizar y ampliar los estudios de actividad biológica. En nuestro grupo se han desarrollado estudios de aislamiento, elucidación estructural, síntesis y estudios de actividad biológica de diferentes productos naturales de origen

---

<sup>14</sup> Churro, C., Alverca, E., Sam-Bento, F., Paulino, S., Figueira, V. C., Bento, A. J., Prabhakar, S., Lobo, A. M., Calado, L., Pereira, P., *J. Appl. Phycol.*, **2009**, 21, 429-442.

marino. En particular se han desarrollado varios estudios de aislamiento y de síntesis de productos conteniendo heterociclos indol, tiazol y oxazol.<sup>15</sup>

Siguiendo esta línea, se eligió trabajar sobre la familia de las bacillamidas, ya que estas resultan interesantes como bloques de construcción para preparar diversos derivados que contengan tiazol, oxazol e indol. En estos estudios se buscó desarrollar entonces metodologías de síntesis que permitieran sintetizar en forma enantioespecífica la bacillamida C y la neobacillamida A. También se buscó preparar diferentes análogos de ambos productos naturales, para ser probados como potenciales antitumorales y como antihelmínticos.

---

<sup>15</sup> a) Davyt, D., Entz, W., Fernández, R., Mariezcurrena, R., Saldaña, J., Domínguez, L., Coll, J., Manta E., *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 1560-1563; b) Serra, G., Mahler, G., Manta, E., *Heterocycles*, **1998**, 48, 2035-2048; c) Scarone, L., Sellanes, D., Manta, E., Wipf, P., Serra, G., *Heterocycles*, **2004**, 63, 773-778.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es preparar de forma enantioméricamente pura los productos naturales bacillamida C y neobacillamida A, y utilizarlos como bloque de construcción para generar distintos compuestos que contengan en su estructura los heterociclos tiazol, oxazol e indol. Una vez obtenidos estos compuestos se les estudiará su actividad biológica como antiparasitarios y como potenciales citotóxicos frente a diferentes líneas de neoplasias humanas.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este trabajo se pueden resumir en los siguientes puntos:

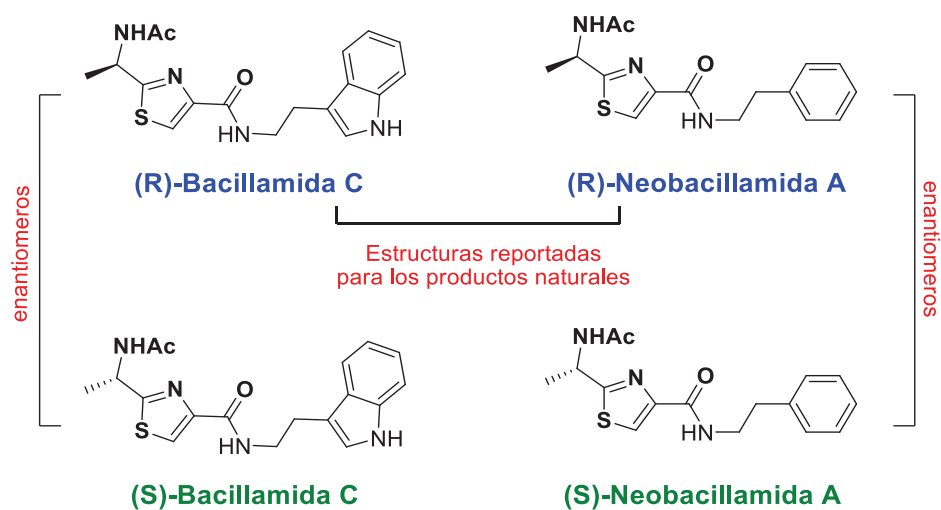
1. **a-** Se plantea preparar el bloque tiazol a partir de alanina y ensayar distintas metodologías para su síntesis.
- b-** Estudiar la pureza enantiomérica por HPLC quiral de los productos obtenidos en cada una de ellas (Figura 1.8).

**Figura 1.8** Estructura del bloque tiazol a sintetizar



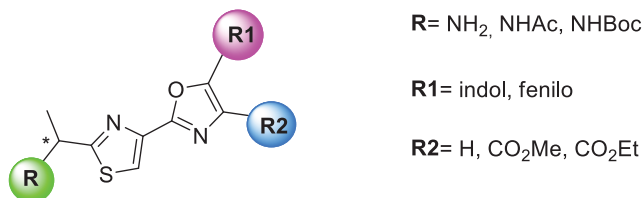
2. Sintetizar los productos naturales (-)-bacillamida C y (-)- neobacillamida A enantioméricamente puros, y realizar su confirmación estructural mediante distintas técnicas espectroscópicas. Sintetizar sus respectivos enantiómeros partiendo de los bloques tiazoles preparados anteriormente (Figura 1.9).

**Figura 1.9** Estructuras reportadas para bacillamida C y neobacillamida A y sus respectivos enantiómeros



3. Preparar distintos análogos de las bacillamidas obtenidas, incorporando en su estructura el heterociclo oxazol con la estructura general que se muestra en la Figura 1.10

**Figura 1.10** Estructura de derivados de las bacillamidas



4. Evaluación de la actividad biológica de todos los compuestos sintetizados.

a- Actividad antihelmíntica evaluada contra *Nippostrongylus brasiliensis*. Estos ensayos serán realizados por la Dra. Jenny Saldaña en el laboratorio de experimentación animal, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay

b- Actividad citotóxica sobre las líneas de neoplasias humanas A2780, SW1573, WiDr, T-47D, HBL-100 y HeLa *in vitro*. Para la realización de estos ensayos se cuenta con la colaboración del Dr. José M. Padrón BioLab del Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio Gonzalez” (IUBO-AG).



**CAPÍTULO 2**  
**SÍNTESIS DEL BLOQUE TIAZOL**



## Capítulo 2. Síntesis del bloque tiazol

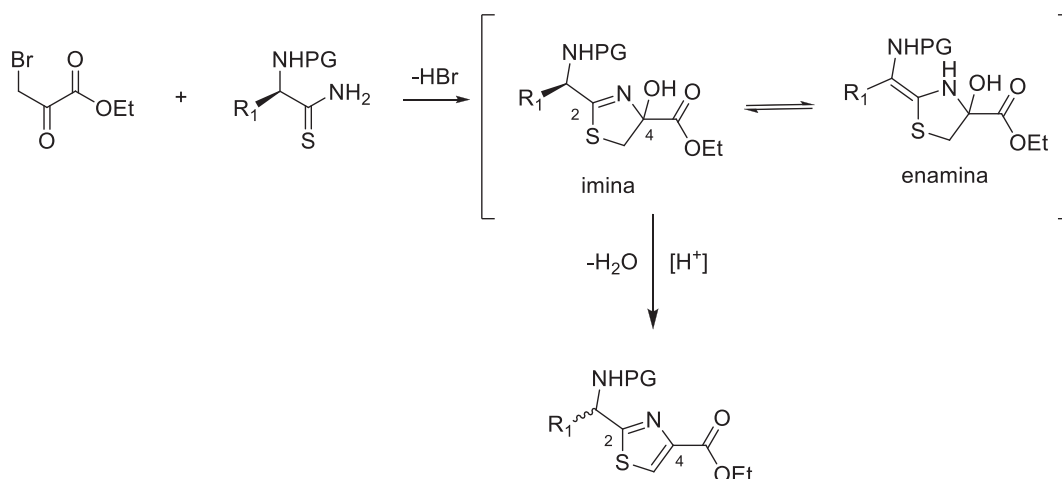
### 2.1. Antecedentes

#### 2.1.1. Síntesis de tiazoles

El anillo 1,3-tiazol ha recibido mucha atención recientemente, debido a su presencia en numerosos productos naturales y metabolitos secundarios microbianos, con interesantes actividades biológicas. Para la preparación de este anillo han sido reportadas una amplia gama de metodologías sintéticas.

Una de las metodologías más citada para la preparación del anillo tiazol es la síntesis de Hantzsch. Esta metodología se basa en la condensación de un compuesto  $\alpha$ -bromocarbonílico y una tioamida primaria en condiciones de reflujo en EtOH<sup>16</sup>.

**Esquema 2.1.** Síntesis de Hantzsch para el anillo tiazol



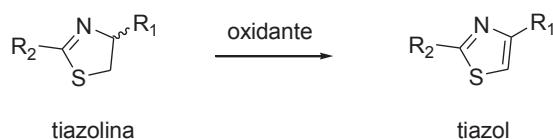
Aunque la utilización de esta metodología genera el anillo con buenos rendimientos, también conduce a la racemización del centro estereogénico  $\alpha$

<sup>16</sup> Hantzsch, A., *Ann. Chem.*, **1888**, 249(1), 54-65.

al carbono 2 del tiazol. Esta racemización se debe a un equilibrio del tipo enamina-imina dado por la formación concomitante de un equivalente de ácido bromhídrico (Esquema 2.1). Para evitar esta racemización se han reportado varias modificaciones a este método, como las realizadas por Meyers, Holzapfel y Nicolaou<sup>17</sup>.

Los tiazoles también pueden obtenerse mediante deshidrogenación (oxidación) de tiazolinas. (Esquema 2.2) Como las tiazolinas resultan inestables frente a la presencia de oxidantes fuertes como oxone® (monopersulfato de potasio), *m*-CPBA, KMnO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, perácidos y oxaziridinas<sup>18</sup>, es importante hacer una elección cuidadosa del oxidante y de las condiciones de reacción para llevar a cabo la conversión de las tiazolinas a tiazoles. Los oxidantes más usados en la preparación de tiazoles a partir de tiazolinas son el óxido de manganeso (MnO<sub>2</sub>) activado y el método de Williams<sup>19</sup> usando BrCCl<sub>3</sub>/DBU.

### Esquema 2.2 Deshidrogenación de tiazolinas



#### 2.1.2. Síntesis de tiazolinas

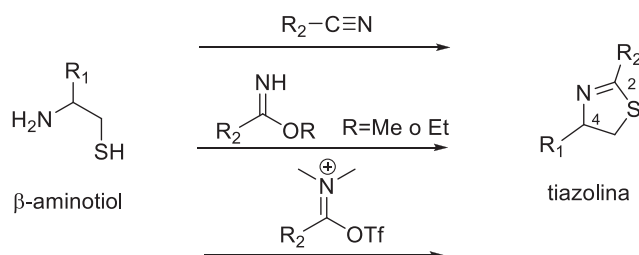
Existen varios métodos para la preparación de tiazolinas. Los dos métodos más usados son a partir de β-aminoalcoholes y β-aminoalcoholes.

<sup>17</sup>Merritt, E. A., Bagley, M. C., *Synthesis*, **2007**, 22, 3535–3541.

<sup>18</sup>Aitken, R. A., Armstrong, D. P., Galt, R. H. B., Mesher, S. T. E., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 935-944.

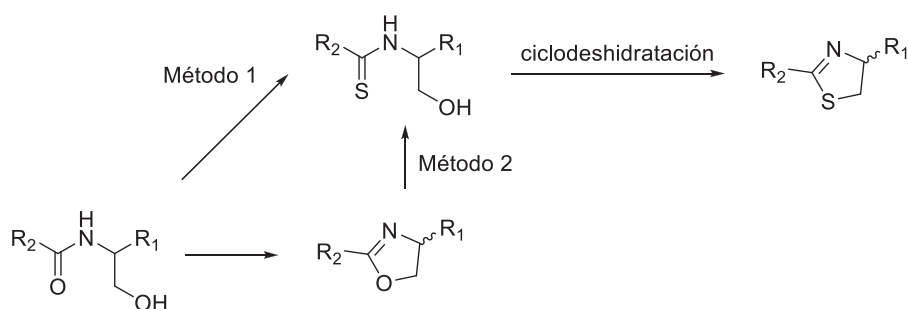
<sup>19</sup>Williams, D. R., Lowder, P., Gu, Y-G., Brooks, D. A., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38(3), 331-334.

### Esquema 2.3 Preparación de tiazolinas a partir de $\beta$ -aminotioles



En el caso de los aminotioles el átomo de azufre proviene del aminotiol (cisteaminas, cisteína), y las tiazolinas se obtienen por condensación de estos con nitrilos, imino éteres<sup>20</sup> o iminio triflatos<sup>21</sup> (Esquema 2.3). En el caso de los aminoalcoholes el azufre es introducido a través de un agente tionante o el uso de ditioésteres como agentes tioacilantes. En este caso la formación de la tioamida es el paso clave para la síntesis del anillo tiazolina<sup>22</sup>. Existen dos métodos principales para la formación de esta tioamida (Esquema 2.4). El primer método es la tionación de un dipéptido de serina, usando agentes tionantes como pueden ser el  $\text{P}_4\text{S}_{10}$ <sup>23</sup> o el reactivo de Lawesson<sup>24</sup>. El segundo método fue reportado por Wipf *et al.*<sup>25</sup> y consiste en obtener la tioamida a partir de la correspondiente oxazolina por tiolisis con  $\text{H}_2\text{S}$  gas.

### Esquema 2.4 Formación de tioamida a partir de un $\beta$ -aminoalcohol



<sup>20</sup> North, M., Pattenden, G., *Tetrahedron* **1990**, 46, 8267.

<sup>21</sup> Charette, A., Chua, P., *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 908-909

<sup>22</sup> Jagodziński, T. S., *Chem. Rev.*, **2003**, 103(1), 197-227.

<sup>23</sup> Wenker, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57(6), 1079-1080.

<sup>24</sup> Scheibye, S.; Pederson, B. S.; Lawesson, S. O., *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1978**, 87, 229.

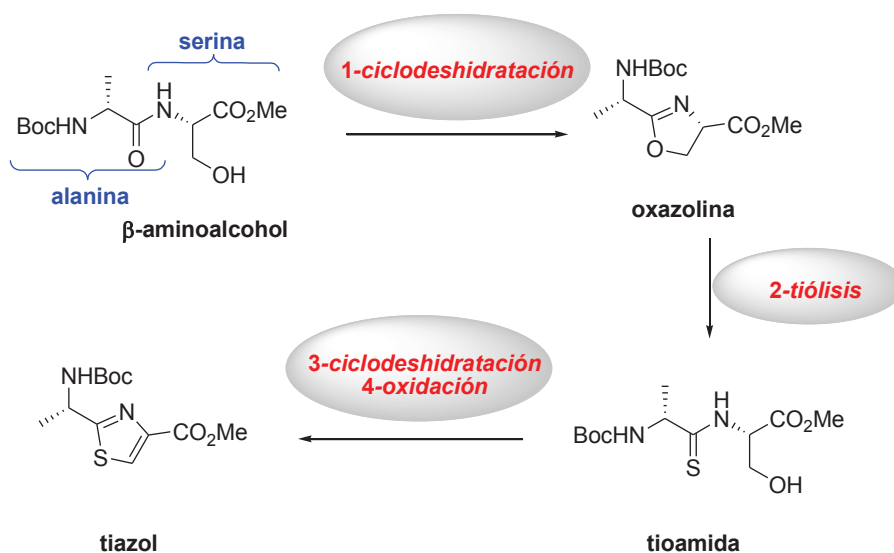
<sup>25</sup> Wipf, P., Miller, C. P., Venkatraman, S., Fritch, P. C., *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6395-6398.

## 2.2. Resultados y discusión

### 2.2.1. Síntesis del bloque tiazol a partir de un $\beta$ -amino alcohol

La primera estrategia sintética que se planteó para la obtención del anillo tiazol, implica partir de un  $\beta$ -amino alcohol (dipéptido alanina-serina) usando el método de tiólisis<sup>23</sup> del anillo oxazolina para la formación de la tioamida y posterior ciclodeshidratación y oxidación. (Esquema 2.6)

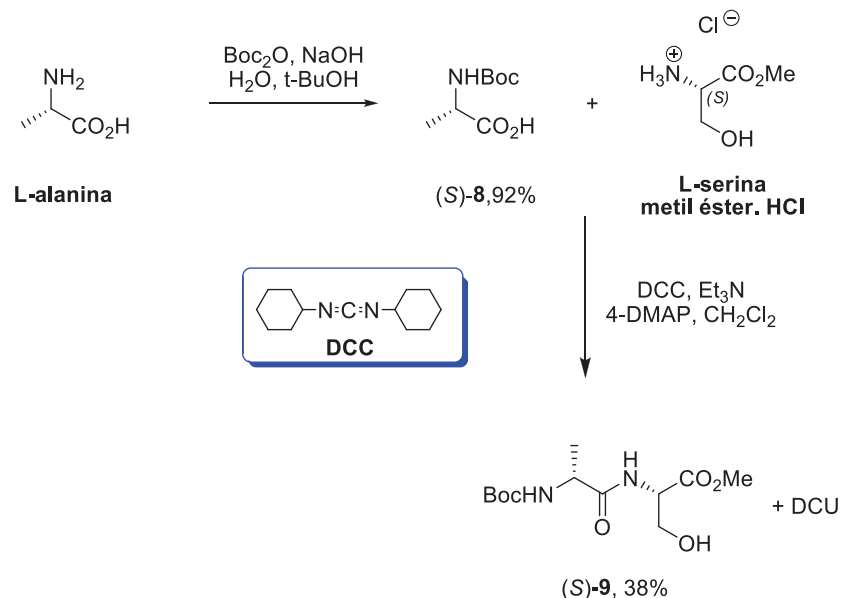
**Esquema 2.6** Ruta sintética para la síntesis de tiazol a partir de un  $\beta$ -aminoalcohol



La preparación del  $\beta$ -aminoalcohol **9** se hizo en dos pasos (Esquema 2.7). El primer paso correspondió a la protección del extremo amino terminal de la L-alanina para evitar la polimerización de la misma. Para ello se usó como grupo protector el terc butiloxicarbonil (Boc). La reacción se llevó a cabo haciendo reaccionar la alanina con  $\text{Boc}_2\text{O}$  en medio básico acuoso y t-BuOH, y se obtuvo **8** con un 92% de rendimiento. En un segundo paso, el compuesto **8** se acopló con L-serina metil éster clorhidrato, usando como agente acoplante DCC obteniéndose **9** con un rendimiento del 38%. Este bajo

rendimiento puede deberse a la dificultad de purificación de nuestro producto en presencia de DCU, un producto generado por la DCC.

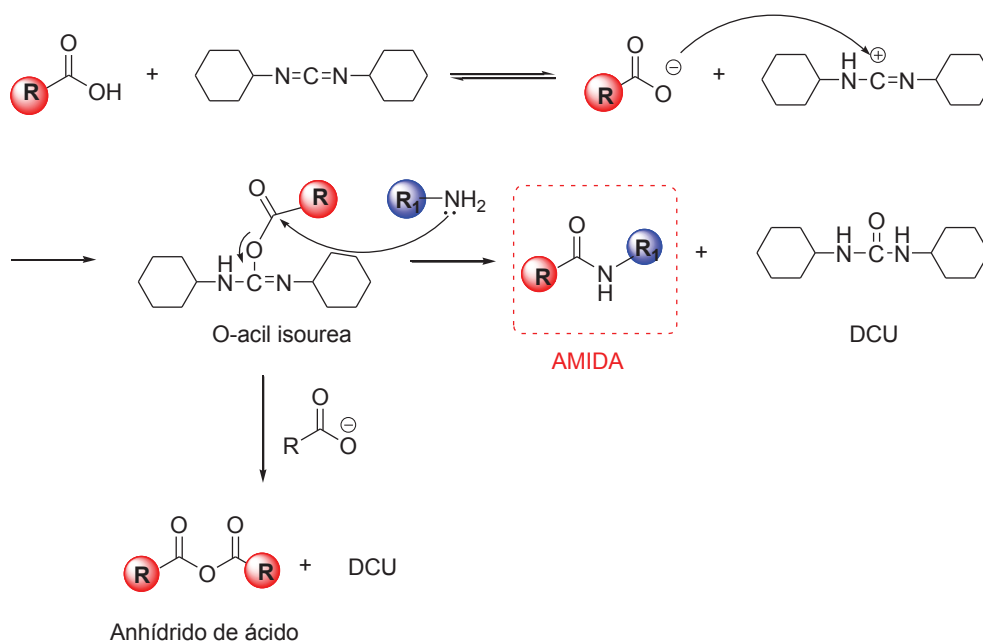
### Esquema 2.7 Preparación del β-aminoalcohol 9



El mecanismo de la reacción de acoplamiento con DCC<sup>26</sup> se muestra en el Esquema 2.8. El ácido reacciona con la carbodiimida en medio básico para dar el intermedio O-acilisourea. Este intermedio es altamente electrofílico, lo cuál favorece el ataque nucleofílico del grupo amino, obteniéndose la amida correspondiente y DCU como producto secundario. La O-acilisourea también puede ser atacada por un exceso del carboxilato para dar un anhídrido de ácido, el cual también puede dar la amida ante el ataque de la amina.

<sup>26</sup> Sheehan, J. C., Hess, G. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 4, 1067–1068

**Esquema 2.8** Mecanismo involucrado en la formación del enlace amida utilizando DCC

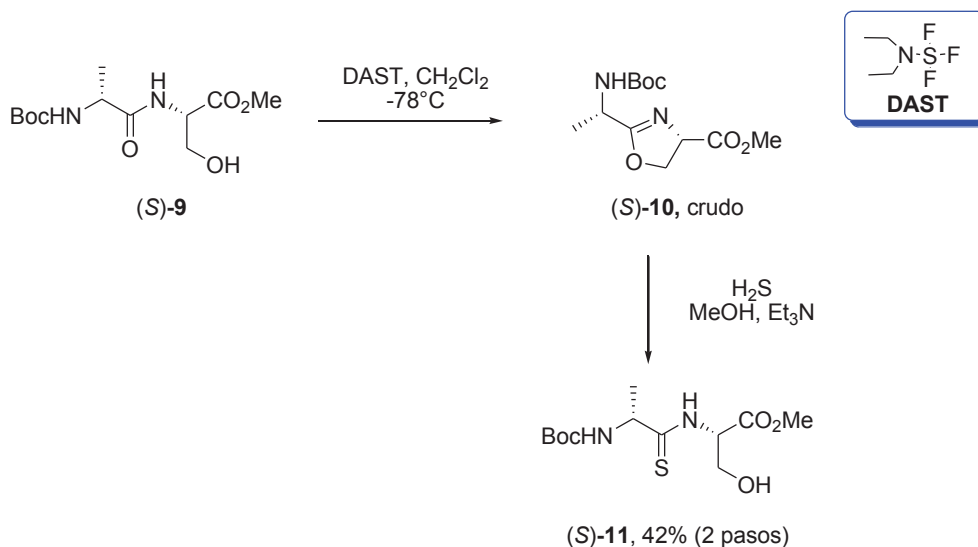


Una vez obtenido el dipéptido **9** se prepara la tioamida **11** en dos pasos con un 42% de rendimiento (Esquema 2.9). El primer paso implicó la obtención de la oxazolina **10** a través de una ciclodeshidratación, utilizando DAST como agente ciclodeshidratante en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a -78°C<sup>27</sup>. Para la tiolisis se usó la metodología descrita por Wipf *et al.*<sup>25</sup>, para lo cual se saturó con una corriente de H<sub>2</sub>S gas una solución de oxazolina en MeOH / Et<sub>3</sub>N (2:1). La producción de H<sub>2</sub>S gas se realizó goteando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aq sobre Na<sub>2</sub>S en baño de hielo, donde no siempre se consiguió una buena generación de gas, y resultó muy difícil de reproducir.

<sup>27</sup> Phillips, A. J., Uto, Y., Wipf, P., Reno, M. J., Williams, D. R., *Org. Lett.*, 2 (8), **2000**, 1165-1168

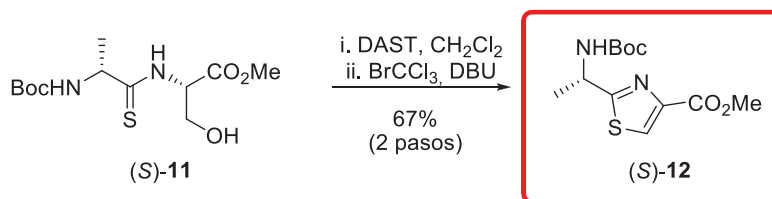


### Esquema 2.9 Preparación de la tioamida (S)-11



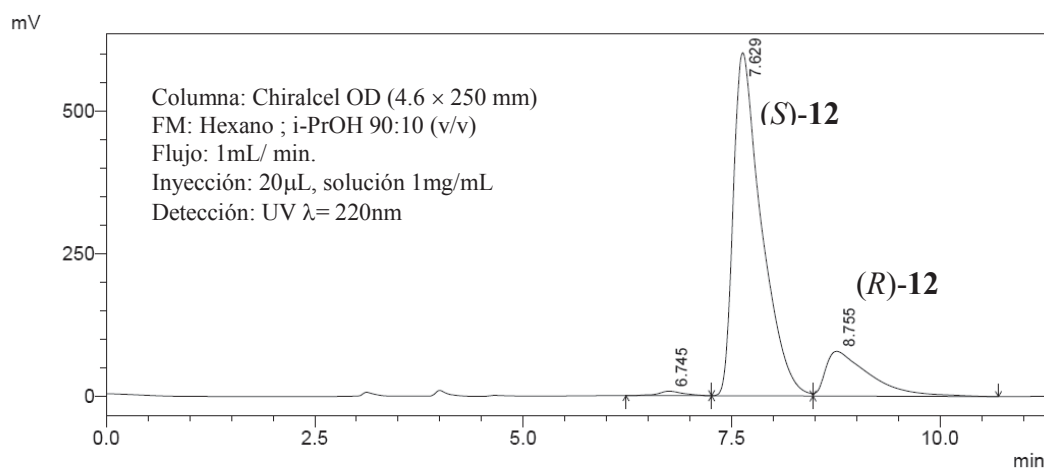
El anillo tiazolina se obtiene mediante la ciclación intramolecular de la tioamida **11**, para lo cual se vuelve a usar DAST como agente ciclodehidratante. El crudo de esta reacción se oxidó inmediatamente con BrCCl<sub>3</sub> y DBU<sup>19</sup> a -20°C, y se obtuvo el bloque tiazol **12** con un rendimiento moderado del 67% en los dos pasos (Esquema 2.10).

### Esquema 2.10 Preparación del tiazol (S)-12 a partir de la tioamida



La pureza enantiomérica del tiazol (S)-**12** obtenido por esta ruta se estudió por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna quiral. Las condiciones que se utilizaron para este análisis, se muestran en la Figura 2.1 junto con el cromatograma obtenido.

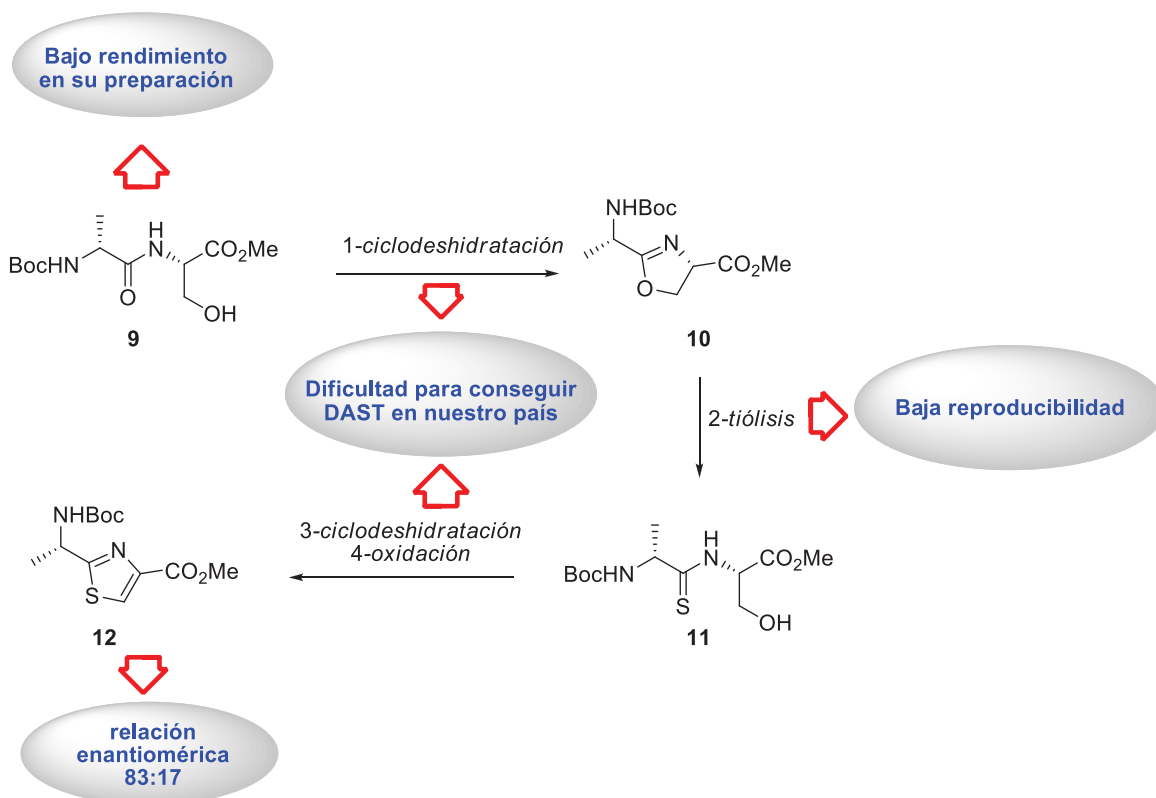
**Figura 2.1.** HPLC quiral del tiazol (*S*)-12



El cromatograma muestra que el producto obtenido no es enantioméricamente puro. Como para la síntesis de este bloque se partió de L-alanina podemos suponer que el enantiómero (*S*) es el que eluyó con un tiempo de retención de 7.63 minutos y el compuesto con un tiempo de retención de 8.75 minutos su enantiómero (*R*). Por lo tanto se obtuvo el tiazol (*S*)-12 con una relación enantiomérica (*S/R*)= 83:17, la cual fue calculada a partir de sus áreas.

En conclusión, el rendimiento global para la obtención del anillo tiazol por esta metodología fue de 7,5 %. Este bajo rendimiento global se debe a los bajos rendimientos obtenidos en los pasos de formación del β-aminoalcohol, y tiolisis. Aunque se podría trabajar en la optimización de estos pasos, la dificultad de adquirir el ciclodeshidratante DAST dado que este compuesto organosulfurado se dejó de importar a nuestro país, es otra razón por las que se decide abandonar esta ruta y probar otra metodología para la obtención de este bloque. Las desventajas del uso de esta ruta se pueden resumir en el Esquema 2.11.

## Esquema 2.11 Desventajas que presenta la ruta sintética 1



### 2.2.2. Síntesis de tiazol a partir de cisteína y nitrilo

La condensación de nitrilo con cisteína usualmente se realiza en metanol o etanol, tanto en presencia como ausencia de base ( $\text{Et}_3\text{N}$ <sup>28,29</sup>,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ <sup>30</sup>). Otra de las condiciones para llevar a cabo esta condensación fue descrita por Yamakuchi *et al.*<sup>31</sup> donde utiliza como catalizador un ácido de Lewis ( $\text{ZnCl}_2$ ), en clorobenceno. La condensación de nitrilo con cisteína también está reportada en medio buffer fosfato pH 5.95,  $\text{NaHCO}_3$  y metanol a  $70^\circ\text{C}$ <sup>32</sup>, y en

<sup>28</sup> Boyce, R. J.; Mulkueen, G. C.; Pattenden, G. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5705.

<sup>29</sup> Ramasamy, K. S.; Bandaru, R.; Averett, D. J. *Org. Chem.* **2000**, 65, 5849.

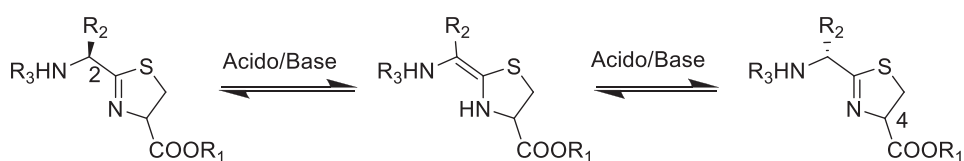
<sup>30</sup> Kwiatkowski, S.; Crocker, P. J.; Chavan, A. J.; Imai, N.; Haley, B. E.; Watt, D. S.; Ho, R.-J., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31(15), 2093-2096.

<sup>31</sup> Yamakuchi, M., Matsunaga, H., Tokuda, R., Ishizuka, T., Nakajima, M., Kunieda, T., *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 4019.

<sup>32</sup> Seiser, S., Kamena, F., Cramer, N., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 6483-6485

medio buffer fosfato 6.4 y metanol a 60°C<sup>33</sup>. El acoplamiento del éster metílico de L-Cisteína con nitrilo para la formación de la tiazolina, puede dar en cierta medida la racemización del centro estereogénico en el carbono 4 de la tiazolina, pero este centro quiral se pierde al formar el tiazol, por lo que en nuestro caso no le daremos importancia. Sabemos por bibliografía que existe también la tendencia a epimerizar del carbono  $\alpha$  exocíclico al anillo, y esto sí nos afecta ya que usaremos nitrilos quirales. La epimerización de este carbono probablemente se da por un mecanismo de desprotonación-protonación como se muestra en el Esquema 2.12 por lo que depende del pH y de las condiciones de reacción<sup>34</sup>

**Esquema 2.12** Epimerización del carbono exocíclico de la tiazolina



Recientemente se reportó la preparación de tiazolinas partiendo de benzonitrilo y cisteína en presencia de una cantidad equivalente de NaHCO<sub>3</sub>, relativa a la cisteína y con adición de una cantidad catalítica de NaOH aq. (5%) a temperatura ambiente. En estas condiciones obtuvieron la tiazolina con rendimientos y pureza altos, sin observar la racemización del carbono en posición 4 y sin hidrólisis de esta<sup>35</sup>.

La ruta sintética que se planteó para la preparación del anillo tiazol partiendo de nitrilo y cisteína se detalla en el Esquema 2.13. Esta ruta implica primero la formación de tiazolina a partir de cisteína y los nitrilos quirales de la alanina y luego la oxidación de estas con DBU y BrCCl<sub>3</sub>. Para la obtención de las tiazolinas a partir de estos precursores se estudiaron

<sup>33</sup> Rodriguez-Lucena, D., Gaboriau, F., Rivault, F., Schalk, I. J., Lescoat, G., Mislin, G. L. A., *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 689–695

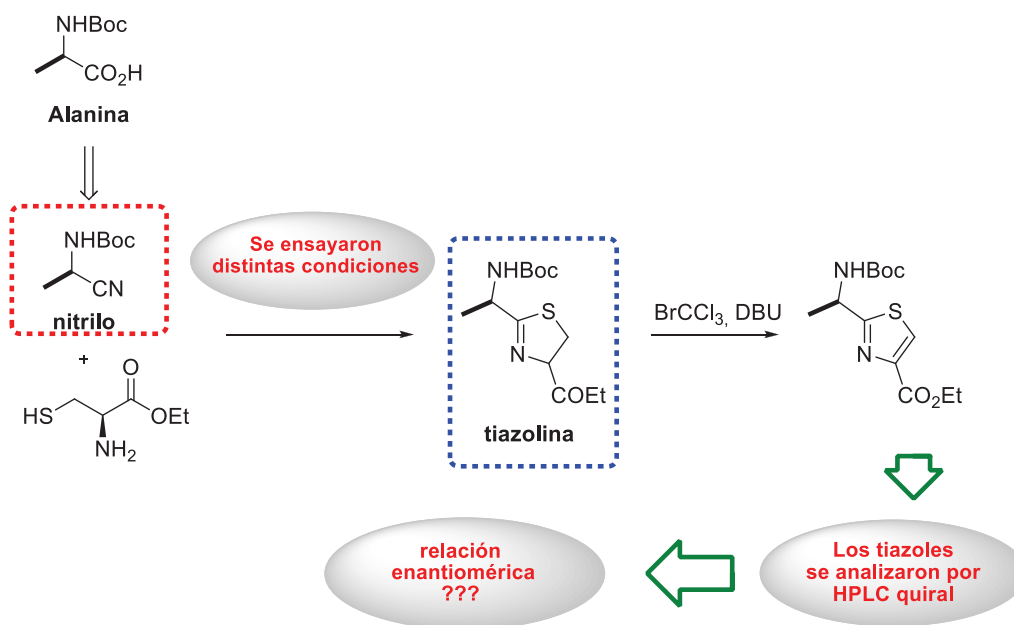
<sup>34</sup> Wipf, P., Fritch, P. C., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 30, 5397-5400

Yonetani, K., Hirotsu, Y., Shiba, T.,

<sup>35</sup> Maltsev, O. V., Walter, V., Brandl, M. J., Hintermann, L., *Synthesis*, **2013**, 45(19), 2763-2767

distintas condiciones y metodologías. Los tiazoles obtenidos en las distintas condiciones, fueron analizados por HPLC quiral para determinar sus purezas enantioméricas.

**Esquema 2.13** Ruta para la obtención del tiazol a partir de nitrilo y cisteína

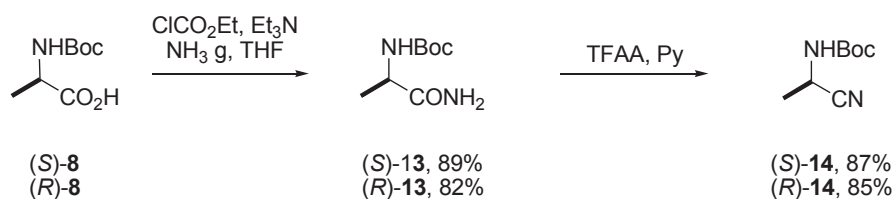


### 2.2.2.1 Preparación de nitrilo

Los nitrilos quirales de la alanina (*S*)-**14** y (*R*)-**14** se prepararon partiendo de los dos isómeros ópticos de la alanina (L y D respectivamente). Como primer paso para la obtención de estos nitrilos se convirtió el grupo ácido carboxílico de la alanina N-Boc **8** en amida **13**. Esto se realizó mediante la formación del anhídrido mixto de dicho ácido con cloroformiato de etilo y una posterior aminación con  $\text{NH}_3$  gas. La deshidratación de la amida **13** a nitrilo **14** se realizó con un sistema anhídrido trifluoroacético (TFAA) y piridina (1:2)<sup>36</sup>, obteniéndose los nitrilos **14** con muy buenos rendimientos, 71% en el caso del (*S*) y 68% en el caso del (*R*) (Esquema 2.14).

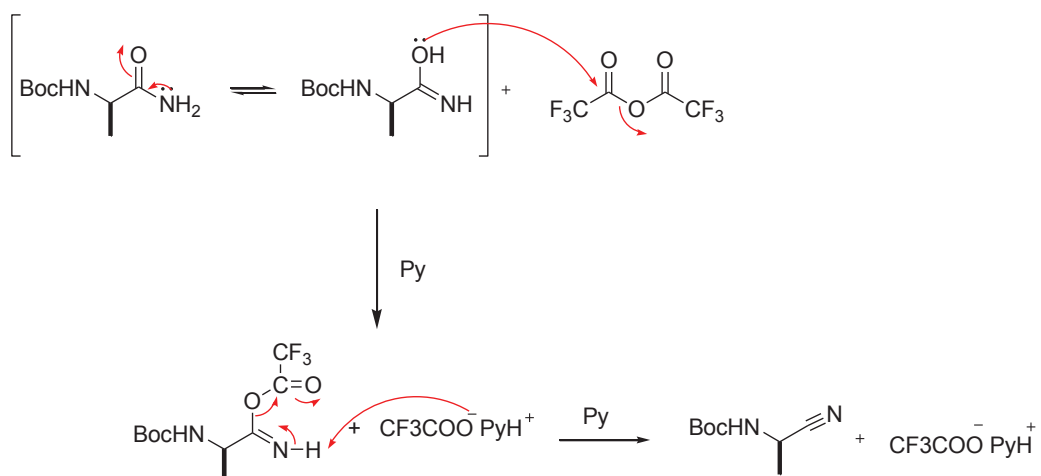
<sup>36</sup> Campagna, F., Carotti, A., Casini, G., *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 21, 1813-1816.

### Esquema 2.14 Preparación de los nitrilos (*S*)-14 y (*R*)-14



El mecanismo involucrado en la deshidratación de la amida se detalla en el Esquema 2.15. El mismo implica el ataque del átomo de oxígeno de la amida al TFAA para formar un buen grupo saliente, seguido de una eliminación para dar el nitrilo correspondiente.

### Esquema 2.15 Mecanismo involucrado en la deshidratación de amida a nitrilo



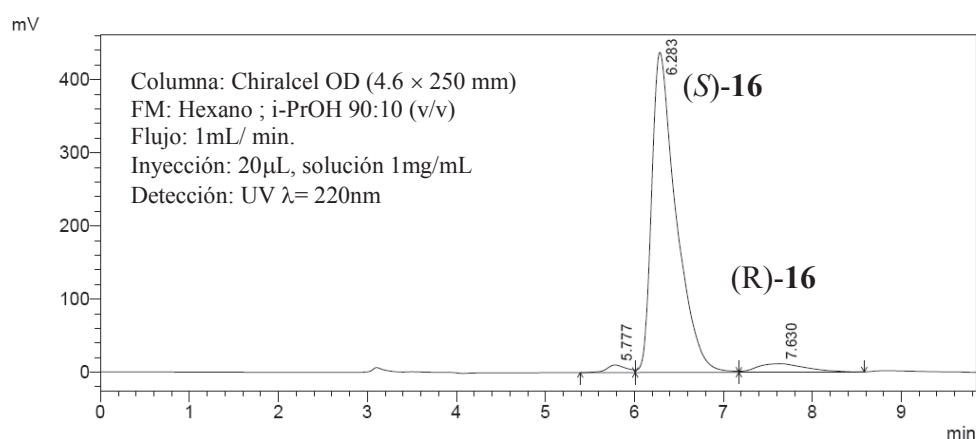


observándose por TLC la formación de la tiazolina. El crudo de esta reacción se oxidó para obtener el tiazol con un 11% de rendimiento en los dos pasos.

En la entrada 2 se usaron condiciones idénticas a la entrada 1, sustituyendo cisteína zwitterión por cisteína etil éster, en este caso se obtuvo la tiazolina etil éster con un 24% de rendimiento, y un 10% de tiazolina metil éster por transesterificación con metanol. La tiazolina etil éster se oxidó y se obtuvo el tiazol etil éster con un 15% de rendimiento en los dos pasos. En la entrada 3 la reacción se llevó a cabo utilizando el mismo medio de reacción que en la entrada 1. Las condiciones fueron cambiadas por temperatura ambiente y 12 horas de reacción. El seguimiento de esta reacción por TLC mostró la formación de varios productos además del material de partida, y no se observó la formación de tiazolina. En la entrada 4 se usó como medio de reacción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en lugar de MeOH, manteniéndose la trietilamina como base. La reacción se llevó a cabo en condiciones de temperatura ambiente por el período de 2 horas. En este tiempo de reacción el seguimiento por TLC no reveló ningún avance y se recuperó el material de partida.

El tiazol etil éster obtenido en la entrada 2 se analizó por HPLC quiral. Las condiciones utilizadas para su análisis y el cromatograma obtenido se muestran en la Figura 2.2

**Figura 2.2.** HPLC quiral del tiazol 16





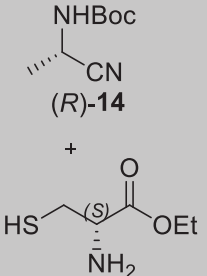
Como se observa en el cromatograma, el enantiómero (S)-16 del tiazol eluye con un tiempo de retención de 6.28 minutos y el enantiómero (R) con un tiempo de retención de 7.63 minutos, la relación enantiomérica para este tiazol es (S/R)=95:5, calculada a partir de sus áreas.

### 2.2.2.3 Preparación de tiazolina utilizando microondas (MW)

La síntesis orgánica asistida por microondas es una herramienta poderosa y se usa cada vez más en la síntesis de heterociclos<sup>37</sup>, especialmente cuando se busca reducir los tiempos de reacción y llevar a cabo reacciones sin solventes.

Se decidió probar la condensación de L-cisteína etil éster y el nitrilo (R)-14 usando trietilamina como base y sin la adición de solvente en las condiciones de irradiación por microondas que se muestran en la Tabla 2.2.

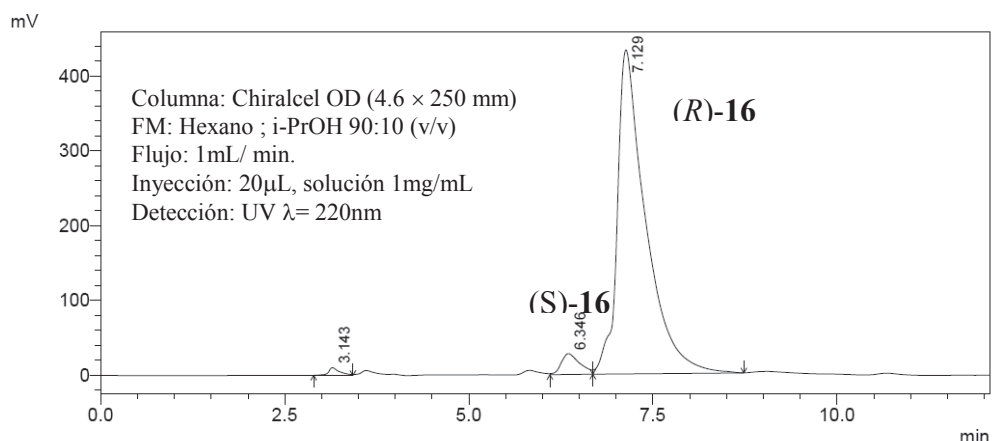
Tabla 2.2. Condiciones de MW para preparar tiazolina

Entrada	[R]	Condiciones	Tiazolina	Tiazol
	Et <sub>3</sub> N	T=60°C, P=200W t=10 min x 4	Se obtiene la tiazolina (crudo)	17% (2 pasos)

El seguimiento de esta reacción por TLC mostró la formación de la tiazolina y el crudo se oxidó con DBU y BrCCl<sub>3</sub>. El tiazol correspondiente se obtuvo con un 17% de rendimiento en los dos pasos. El tiazol obtenido se analizó por HPLC quiral (Figura 2.3), mostrando una buena relación enantiomérica (R/S)= 96:4 calculada respecto a sus áreas.

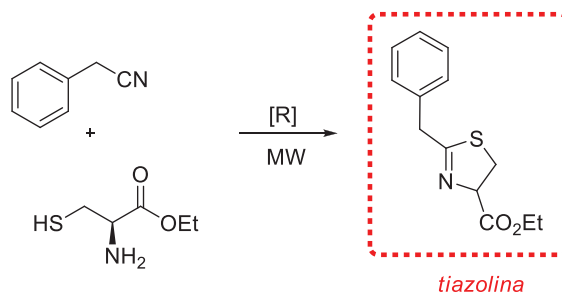
<sup>37</sup> Bagley, M.C., Lubinu, M.C., *Top Heterocycl Chem*, 2006, 1, 31–58

**Figura 2.3.** HPLC del tiazol (*R*)-16 obtenido por MW



Para optimizar la formación de tiazolina en las condiciones de irradiación por microondas, y dado que el nitrilo de la alanina conlleva un esfuerzo sintético, se resolvió utilizar en su lugar un nitrilo disponible comercialmente como es el fenilacetnitrilo (Esquema 2.16). Los resultados para las distintas condiciones ensayadas se muestran en la Tabla 2.3.

**Esquema 2.16** Preparación de tiazolina por MW a partir de fenilacetnitrilo



**Tabla 2.3** Condiciones ensayadas en MW

Entrada	[R]	Condiciones	Tiazolina
1	ZnCl <sub>2</sub>	MW, T°=100°C, P=200W, t=10 min.	No hay reacción
2	ZnCl <sub>2</sub>	MW, T°=200°C, P=200W, t=10 min.	Se descompone
3	4-DMAP	MW, T°=100°C, P=200W, t=15 min.	No hay reacción
4	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	MW, T°=100°C, P=200W, t=10 min x3.	No hay reacción
5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeOH	MW, T°=60°C, P=200W, t=15 min x3.	Se descompone
6	Et <sub>3</sub> N	MW, T°=100°C, P=200W, t=10 min.	No hay reacción
7	Et <sub>3</sub> N	MW, T°=60°C, P=200W, t=10 min x4.	Se descompone

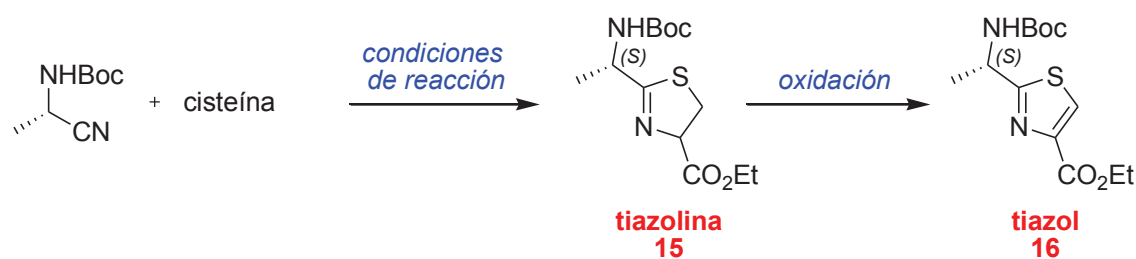
De la entrada 1 a la 7 se ensayaron distintos reactivos y distintas condiciones de reacción como por ejemplo la temperatura y los tiempos de exposición en el microondas. Las reacciones de las entradas 1, 3, 4 y 6 se siguieron por TLC, y en todas ellas no se observó avance de la reacción y se recuperó el material de partida. En los ensayos de las entradas 2, 5 y 7 se observó la descomposición del material de partida, en todos ellos se obtuvo un sólido negro. Los resultados obtenidos para el fenilacetnitrilo muestran que este no reacciona con la cisteína en las condiciones de MW ensayadas. Si observamos las condiciones de la entrada 7, son las mismas que se usaron con el nitrilo de la alanina, sin embargo el fenilacetnitrilo no reaccionó. Esto se puede explicar basándonos en el estudio reportado por Oballa *et al.* donde mediante cálculos computacionales relaciona la reactividad de los

nitrilos con su electrofilia<sup>38</sup>. Mayor electrofilia del nitrilo, mayor reactividad con la cisteína. Según lo reportado los aminoacetonitrilos (en nuestro caso el nitrilo de la alanina) tienen una electrofilia intermedia entre los benzonitrilos que presentan una electrofilia pobre y los nitrilos unidos a heterociclos como por ejemplo la 2-cianopiridina que son muy buenos electrófilos.

A pesar de que este procedimiento mostró un grado de racemización muy bajo (8%), una desventaja que se encontró fue la escala de trabajo. El equipo disponible puede trabajar con miligramos y el objetivo es preparar el tiazol en una escala de gramos ya que será usado como bloque de construcción de los demás compuestos planteados.

#### 2.2.2.4 Preparación de tiazolina en medio acuoso

Se decidió probar también la formación de la tiazolina en medio acuoso buffer fosfato (BP) a pH 6-8. Las condiciones de reacción y sus resultados se muestran en la Tabla 2.4



<sup>38</sup> Oballa, R. M., Truchon, J-F., Bayly, C., Chauret, N., Day, S., Crane, S., Berthelette, C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 998–1002.

**Tabla 2.4** Condiciones ensayadas usando medio BP/MeOH

<b>Entrada</b>	<b>Condiciones de reacción</b>	<b>Tiazolina S-15</b>	<b>Tiazol S-16</b>
1 <sup>a,c</sup>	BP (0.1 M) pH 6 / MeOH (1:2), NaHCO <sub>3</sub> (3.1 eq) 70°C, 3 hrs	Se obtiene la tiazolina (crudo)	4% (2 pasos)
2 <sup>b,d</sup>	BP (1 M) pH 6 / MeOH (10:1), 60°C, 3hrs	62% tiazolina pura	57% (2 pasos)
3 <sup>b,d</sup>	BP (1 M) pH 7 / MeOH (10:1); 60°C, 3hrs	80% tiazolina pura	71% (2 pasos)
4 <sup>b,d</sup>	BP (1 M) pH 8 / MeOH (10:1); 60°C, 3hrs	78% tiazolina pura	44% (2 pasos)

a-se usa cisteína zwitterión (R=H). b-se usa cisteína étil ester clorhidrato (R=Et). c-El crudo de la tiazolina se oxida con DBU, BrCCl<sub>3</sub>. d-La tiazolina se purifica por columna y se oxida con DBU, BrCCl<sub>3</sub>

En la entrada 1, la condensación se llevó a cabo en un medio buffer fosfato 0.1 M pH 6 / MeOH (1:2), en presencia de NaHCO<sub>3</sub> (3.1 eq) a 70°C por 3 horas, la reacción se siguió por TLC donde se observó la formación de la tiazolina. El crudo de esta reacción se oxidó para obtener el tiazol con un 4% de rendimiento en ambos pasos.

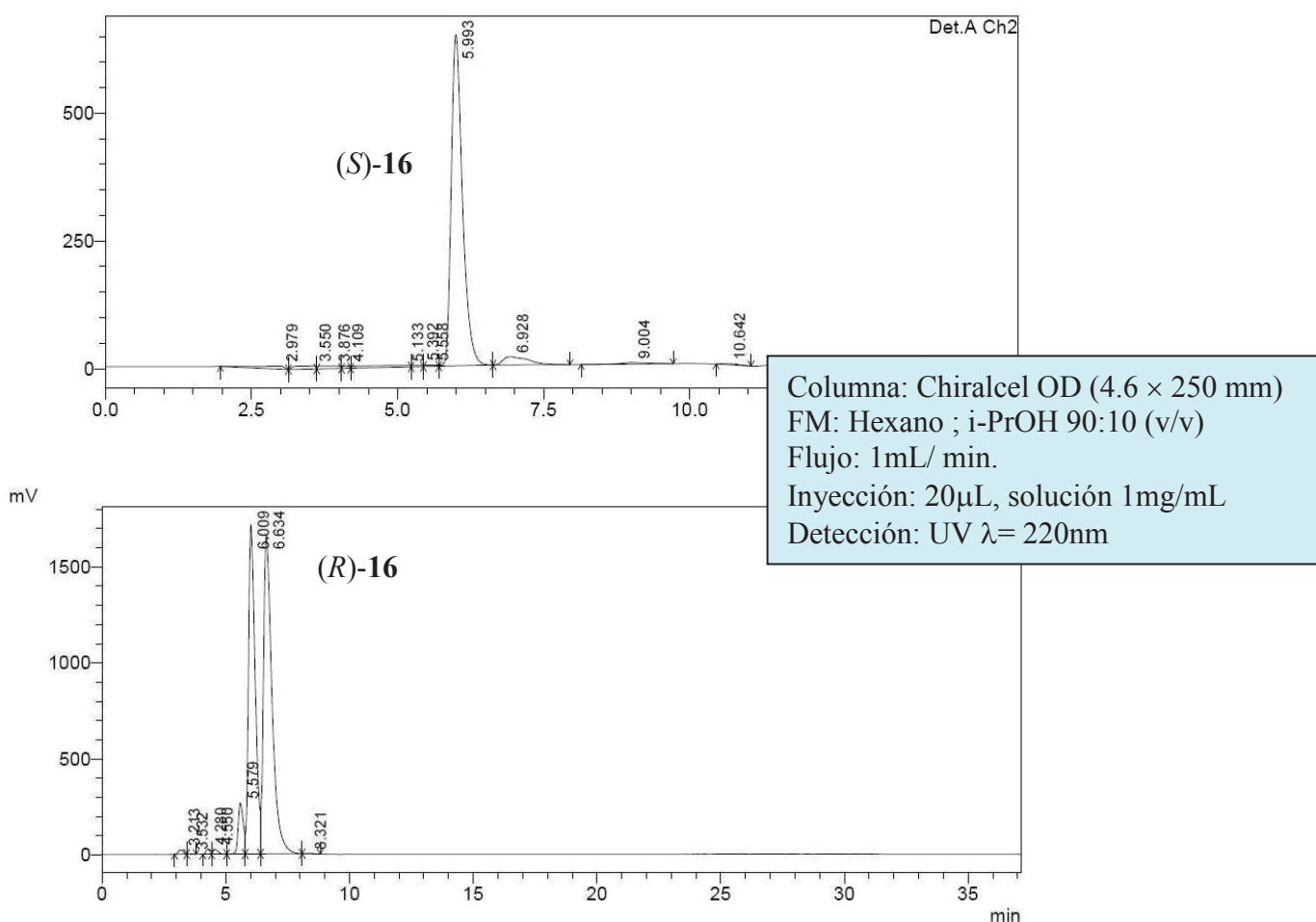
En las entradas 2 a 4, se probó variar el pH del buffer fosfato en el rango de 6 a 8 con una concentración 1 M, y se observó en los tres casos buenos rendimientos en la obtención de la tiazolina pura que van de 62 a 80%. En los tres casos la tiazolina se purificó por cromatografía en columna, usando como fase móvil una mezcla (AcOEt: EP 50:50).

De estos resultados se puede observar mayor rendimiento a la hora de obtener la tiazolina pura utilizando un buffer fosfato 1 M pH 7. A la hora de

obtener el tiazol, se puede observar que la reacción de oxidación de la tiazolina, no es reproducible en cuanto a su rendimiento.

Se prepararon los enantiómeros (*R*) y (*S*) del tiazol **16** a partir de los nitrilos (*R*)-**14** y (*S*)-**14** respectivamente. Las condiciones utilizadas son las ensayadas en la entrada 3. Los tiazoles obtenidos por esta metodología se analizaron por HPLC quiral en las condiciones y con los resultados que se muestran en la Figura 2.4

**Figura 2.4** HPLC quiral de los tiazoles obtenidos en medio buffer fosfato



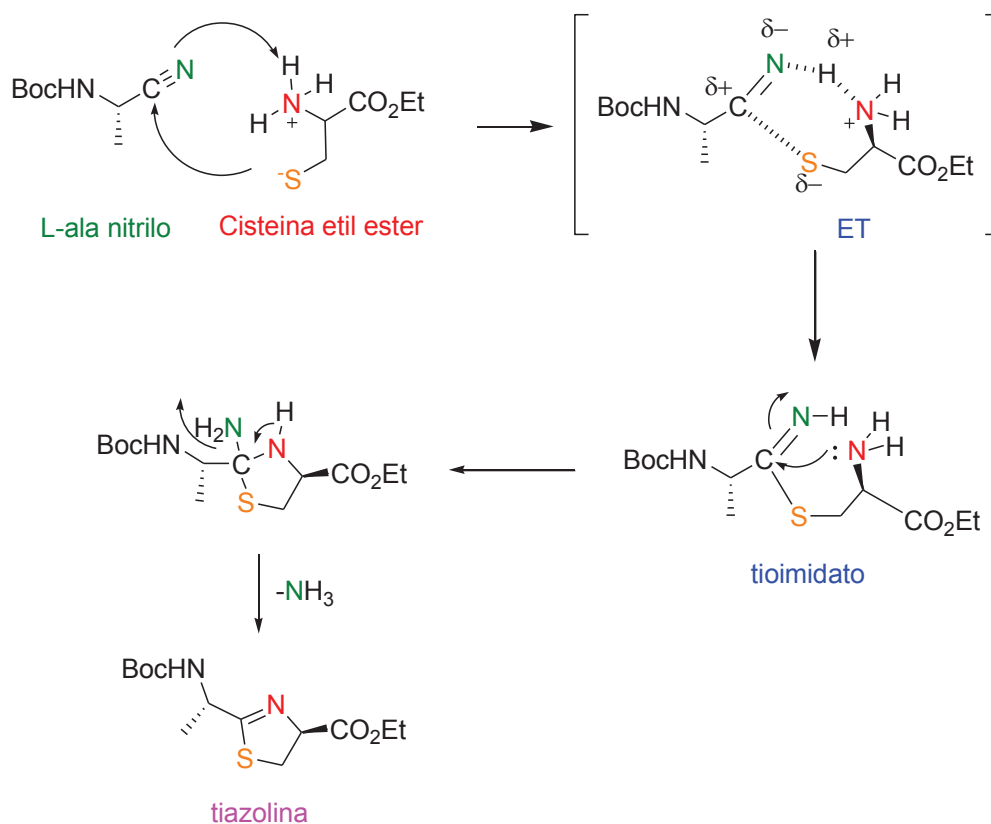
Los cromatogramas muestran que el tiazol (*S*)-**16** se obtuvo con una relación enantiomérica S/R = 86/14, y el tiazol (*R*)-**16** con una relación enantiomérica R/S= 55/45, lo que significa casi un 100% de racemización de este último.

Una forma de explicar porque utilizando las mismas condiciones la relación enantiomérica de los tiazoles obtenidos es tan distinta dependiendo si partimos del nitrilo de L-alanina o D-alanina, sería analizando el mecanismo de formación de la tiazolina. En bibliografía se encontró el mecanismo planteado por Cavalli *et al.*<sup>39</sup> en donde estudian la reactividad de distintos nitrilos a pH 7,4. Este mecanismo aplicado a nuestro caso se muestra en el Esquema 2.17. Donde se plantea que a pH=7 el carbono del nitrilo ( $-\text{C}\equiv\text{N}$ ) sufre el ataque nucleofílico del azufre del tiolato ( $\text{S}^-$ ) y subsecuentemente el nitrógeno del nitrilo abstrae un protón del grupo amino cargado de la cisteína formando un estado de transición (ET). Una vez formado el tioimidato hay ataque 5-exo-trig del nitrógeno de la cisteína al carbono del imidato para formar el ciclo de cinco, con una nueva transferencia de protón. En la etapa final se da la protonación de la amina exocíclica y pérdida de amoníaco. Según las condiciones del medio esta eliminación para dar la tiazolina final, podría proceder por dos vías, por la generación de un carbocatión a pH ácido, o por asistencia del nitrógeno tiazolidínico, de ahí la importancia de controlar el pH del medio de reacción para evitar la racemización.

---

<sup>39</sup> Berteotti, A., Vacondio, F., Lodola, A., Bassi, M., Silva, C., Mor, M., Cavalli, A., *Med. Chem. Lett.*, **2014**, 5, 501-505.

**Esquema 2.17.** Mecanismo sugerido para la formación de la tiazolina



Se volvió a preparar la (*R*)-tiazolina **15**, ensayando varias condiciones donde se ajustó y controló la fuerza molar del buffer, la relación utilizada del mismo con respecto al alcohol, así como la temperatura y el tiempo de reacción. Las tiazolinas obtenidas se oxidaron y se estudió la relación enantiomérica R/S de los tiazoles correspondientes por HPLC quiral (Tabla 2.5).



**Tabla 2.5.** Condiciones ensayadas para mejorar la pureza enantiomérica de (*R*)-tiazolina **15** en medio buffer fosfato (BP).

Entrada	Molaridad BP pH=7	Relación BP/alcohol (mL)	Temperatura/tiempo	Tiazolina Pura (%)	Relación R/S tiazol <sup>d</sup>
1	1 M	4/1 <sup>a</sup>	60°C/2hrs	52	52/48
2	1 M	3/1 <sup>a</sup>	60°C/4hrs	79	78/22
3	2 M	5/3.5 /1 <sup>a</sup>	60°C/3hrs	77	90/10
4*	1 M	5/3/1 <sup>b</sup>	25°C/5hrs	42	85/15
5*	1 M	5/3/1 <sup>b</sup>	25°C/3hrs.	36	97/3
6	1 M	12/4/1 <sup>c</sup>	25°C/5.5hrs	58	93/7

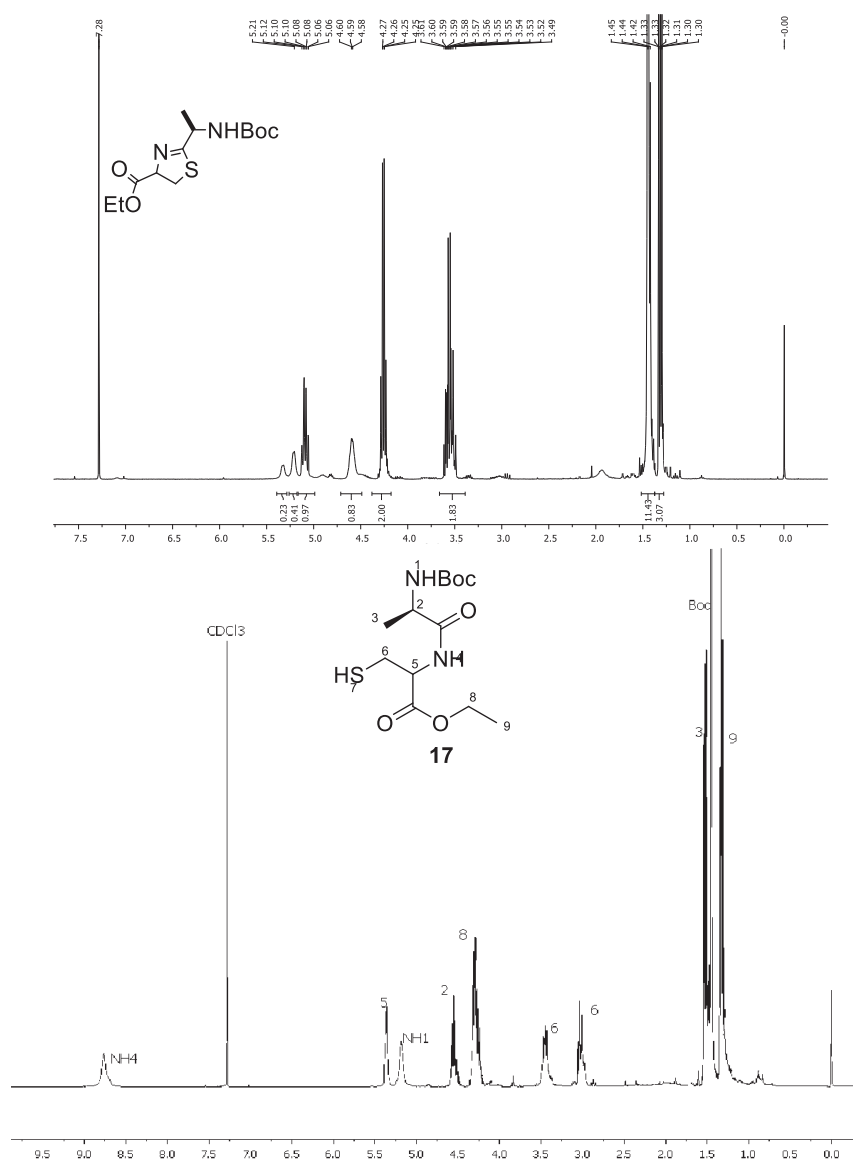
a-buffer/MeOH. b-buffer/*t*-BuOH/MeOH. c-buffer/*t*-BuOH/EtOH. d-los tiazoles fueron obtenidos por oxidación con DBU y BrCCl<sub>3</sub> de las tiazolinas correspondientes y la relación enantiomérica se calculó por HPLC quiral, \* se observa el producto de hidrólisis de la tiazolina

Conservando la temperatura de reacción en 60°C (Entrada 1 y 2), y variando la relación buffer metanol y las horas de reacción, la relación enantiomérica aumenta pero sigue no siendo buena, sin embargo en el rendimiento se ve un aumento de 50 a casi 80 %. En la entrada 3 se aumento la molaridad del buffer fosfato a 2M y se agregó *t*-BuOH al medio de reacción en una relación buffer/*t*-BuOH/MeOH de 5/3.5/, esto llevó a mejorar notoriamente la relación enantiomérica R/S (90/10), y la tiazolina se obtuvo con un rendimiento del 77%.

Cuando probamos variar la temperatura de reacción a 25°C (Entrada 4 y 5), los rendimientos obtenidos fueron menores al 50%, pero en la entrada 5 se logró una buena relación enantiomérica R/S de 97/3, sin embargo a las dos horas de reacción se observó por TLC la aparición de una mancha con R<sub>f</sub> mayor a la tiazolina que aumentaba con el tiempo de reacción. El compuesto correspondiente a esta mancha se aisló y se analizó por RMN. El experimento de <sup>1</sup>H-RMN obtenido del compuesto (compuesto 17, Figura 2.5) se comparó con el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la tiazolina. En el espectro de <sup>1</sup>H-

RMN del compuesto se observa una señal en 8.7 ppm que correspondería al protón amida y señales entre 3.04 y 3.29 ppm que son señales características de un metileno unido a un tiol, por lo que se puede concluir que se trata del producto abierto de la tiazolina (amida-tiol), el cuál se da por la hidrólisis de esta.

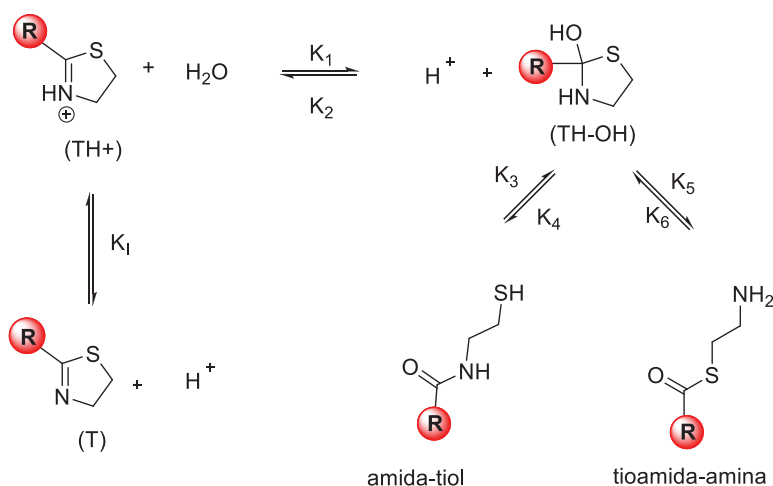
**Figura 2.5** Comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de (*R*)- tiazolina **15** y el compuesto **17**



La hidrólisis de la tiazolina en función del pH fue estudiada por Martin *et al.* en 1959, donde observaron que la hidrólisis de esta es máxima a pH cercanos a 3 y muy lenta en soluciones neutra. La reacción de hidrólisis

propuesta se muestra en el Esquema 2.18, donde se propone la existencia de hidroxitiazolidina (TH-OH) como un intermedio entre la tiazolina (T) y las dos formas abiertas posibles amida-tiol y tioamida-amina.

**Esquema 2.18** Mecanismo de hidrólisis de tiazolinas propuesto por Martin *et al.*



De los resultados obtenidos de la Tabla 2.5, se puede observar que al trabajar a temperatura ambiente se logró mejorar la relación enantiomérica R/S, pero se puede dar la hidrólisis de la tiazolina. Como esta hidrólisis depende del pH y es muy lenta a pH cercanos a 7, se logró evitarla aumentando la proporción de buffer fosfato al doble respecto a un sistema t-BuOH/EtOH como se muestra en la Entrada 6. Por lo tanto estas condiciones serán las utilizadas de ahora en más para preparar el anillo tiazol.

En resumen se probaron dos rutas de síntesis para el anillo tiazol. Para la segunda ruta se probaron varias condiciones en la preparación de la tiazolina, entre ellas las condiciones clásicas de MeOH y Et<sub>3</sub>N, condiciones de irradiación por microondas y condiciones en medio buffer fosfato. Se estudió la pureza enantiomérica de los tiazoles obtenidos en las distintas condiciones de reacción por HPLC quiral. Se logró optimizar la preparación de los tiazoles en medio buffer fosfato, mejorar los rendimientos y la pureza

enantiomérica de estos. Los tiazoles obtenidos serán usados como bloques de construcción para la síntesis de los productos naturales (*R*)-bacillamida C, (*R*)-Neobacillamida A y sus distintos análogos.

*Parte experimental*

**Capítulo 1**



## 2.3 Parte experimental

### Consideraciones generales

- Los reactivos y solventes utilizados fueron adquiridos comercialmente. Los solventes anhidros fueron destilados y secados según lo descrito por Perrin *et al.*<sup>40</sup>
- Las reacciones en microondas se realizaron en un equipo CEM Discover, equipado con viales de 10 ml.
- Los experimentos de RMN monodimensionales (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) y bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC), fueron realizados en el equipo Bruker Avance 400, en los solventes deuterados correspondientes. Como referencia para informar los desplazamientos químicos se tomo la señal residual del solvente utilizado o la del tetrametilsilano.
- Los espectros de IR se realizaron en el espectrofotómetro FT-IR 8101A Shimadzu en film sobre pastilla de NaCl.
- Los espectros de masa de alta resolución (HRMS) fueron realizados en un espectrómetro MicroOTOF-Q (Bruker Daltonics) con ionización por electrospray (ESY). Los espectros de masa de baja resolución fueron realizados en el espectrómetro de impacto electrónico Shimadzu QP 2010.
- Los cromatogramas de HPLC fueron realizados en un equipo Shimadzu con un sistema binario de bombas LC-10, detector de 1 variable, utilizando una columna Chiralcel OD (4.6 - 250 mm).

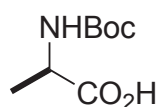
---

<sup>40</sup> Perrin, D., Amarengo, W. "Purification of Laboratory Chemicals" Pergamon Press, Oxford, 1988.

- El seguimiento de las reacciones fue hecho por TLC usando placas de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> (Macherey-Nagel). La detección de los productos se realizó con luz UV a  $\lambda=254\text{nm}$ , como revelador se usó vapores de I<sub>2</sub> o solución de ninhidrina al 5% en BuOH.
- La purificación de los productos se hizo por cromatografía en columna, usando como fase estacionaria Sílica Gel flash (Merck grado 60, 230-400 mesh).

### 2.3.1 Procedimientos sintéticos.

- *Preparación de 2- (terc-butoxicarbonilamino) propanoico 8*



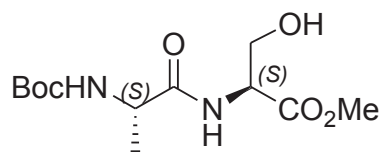
En baño de hielo se disuelve alanina (90 mmoles) en H<sub>2</sub>O (20 ml), se agrega NaOH (135 mmoles) y una solución de (Boc)<sub>2</sub>O (99 mmoles) en t-BuOH(10 ml) . La reacción se agita a temperatura ambiente toda la noche. Se acidifica con HCl concentrado hasta pH=2 aproximadamente. Se extrae con AcOEt (5x25 ml), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida. Se obtiene el producto como un sólido blanco. **TLC:** (AcOEt) R<sub>f</sub>=0.9.

**(R)-8: Rendimiento: 99%**

**(S)-8: Rendimiento: 92%**



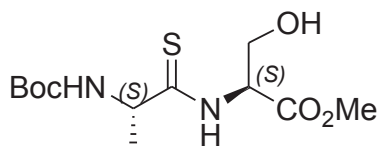
- *Preparación de (S) metil 2 - ((S) -2- (terc-butoxicarbonilamino) propanamido) -3-hidroxiopropanoato 9*



En un balón bajo corriente de N<sub>2</sub>, se agrega una solución de (S)-alanina-Boc (4.76 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se enfría a 0°C y se agrega Et<sub>3</sub>N (4.76 mmoles), el clorhidrato del éster metílico de la L-serina (4.76 mmoles) y 4-DMAP (0.48 mmoles). Se agita por 30 minutos y se agrega DCC (5.22 mmoles). La mezcla de reacción se deja agitando a temperatura ambiente 24 horas. Se filtra, la DCU formada con papel de filtro y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de lavado se junta con el filtrado y se elimina a presión reducida el solvente, se agregan 30 ml de H<sub>2</sub>O y se lava con Et<sub>2</sub>O. La fase acuosa se extrae con AcOEt, se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida. El producto se purifica por cromatografía en columna (FM AcOEt), y se obtiene como un aceite transparente.

**TLC** (AcOEt) R<sub>f</sub>=0.48, **Rendimiento:** 38%, **<sup>1</sup>H-RMN**(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.08 (d, *J* 7.8 Hz, 1H), 5.22 (d, *J* 7.1 Hz, 1H), 4.66(m, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.96 (br s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.47 (br s, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.39 (d, *J* 7.1 Hz, 3H); **<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 173.03, 170.82, 155.80, 80.50, 62.74, 54.85, 52.74, 50.44, 28.29, 18.03.

- *Preparación de (S) metil 2 - ((S) -2- (terc-butoxicarbonilamino) propanotioamida) -3-hidroxiopropanoato 11*

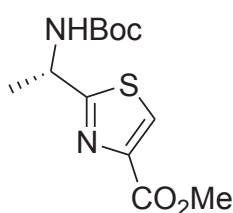


En un balón bajo corriente de N<sub>2</sub>, se disuelve el dipéptido (0.55 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Se enfría a -78°C y se agrega gota a gota trifluoro dietilamino

sulfuro (DAST) (0.61 mmoles). Se agita por una hora y se agrega  $K_2CO_3$  (0.82 mmoles), se lleva la reacción a temperatura ambiente. Luego se lava con  $H_2O$  (15 ml) y se extrae con  $CH_2Cl_2$ . La fase orgánica se seca con  $Na_2SO_4$ , se filtra y se concentra el solvente a vacío obteniéndose la oxazolina (crudo).  $R_f = 0.54$  (AcOEt). A una solución del crudo anterior en MeOH:Et<sub>3</sub>N (2:1), se la satura con corriente de  $H_2S$ , con agitación continua a temperatura ambiente, la reacción se sigue por TLC hasta que se consume totalmente el reactivo de partida. Luego se elimina el solvente a presión reducida y el producto se purifica por cromatografía en columna (FM AcOEt:EP 50:50) obteniéndose como un aceite marrón.

**TLC** (AcOEt)  $R_f=0.65$ , **Rendimiento:** 42%, **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.87 (d,  $J$  7.4 Hz, 1H), 5.43 (d,  $J$  6.3 Hz, 1H), 5.28 (m, 1H), 4.51 (m, 1H), 4.06 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 1.49 (m, 3H), 1.44 (s, 9H), **<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz,  $CDCl_3$ ) 206.24, 170.29, 159.87, 80.66, 71.36, 59.91, 54.44, 52.91, 28.25, 21.16.

- *Preparación de (S)-2-(1-(terc-butoxicarbonilamino)etil) tiazol-4-carboxilato de metilo 12*

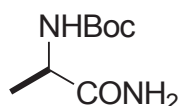


En un balón bajo corriente de  $N_2$ , se disuelve la tioamida **11** (1.12 mmoles) en  $CH_2Cl_2$  seco. Se enfría a  $-78^\circ C$  y se agrega gota a gota trifluoro dietilamino sulfuro (DAST) (1.34 mmoles) y se agita por dos horas. Se lleva la solución a  $-20^\circ C$  y se agrega  $BrCCl_3$  (4.25 mmoles), se agita por 20 minutos y se agrega DBU (4.25 mmoles). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente toda la noche. Se agrega 30 ml de una solución saturada de  $Na_2HCO_3$ , se filtra el precipitado que se forma y se extrae con

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x15 ml). Se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida. El producto se purifica por cromatografía en columna (FM AcOEt: EP 50:50), obteniéndose el producto como un aceite color caramelo.

**TLC** (AcOEt:EP 50:50) R<sub>f</sub>= 0.55, **Rendimiento:** 67% , **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.11 (s, 1H), 5.21 (br s, 1H), 5.11 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 1.63 (d, *J* 6.8 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H); **<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 161.86, 146.82, 127.47, 80.22, 52.49, 49.01, 28.31, 21.90, 19.18.

- *Preparación de (R) terc-butil-1-amino-1-oxo 2-propanoil carbamato 13*

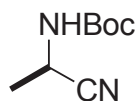


En un balón bajo corriente de N<sub>2</sub> se disuelve alanina N-Boc **8** (26.4 mmoles) en THF seco (40 ml), se lleva a -10°C y se agrega Et<sub>3</sub>N (21.12 mmoles, 3 ml) y cloroformiato de etilo (26.4 mmoles, 2.5 ml). La reacción se agita por 1 hora y se burbujea NH<sub>3</sub> (g) por 1.5 horas. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente toda la noche. Se concentra a vacío el THF, al crudo obtenido se le agregan 40 ml de una solución saturada de NaCl y se extrae con AcOEt (5x40ml). La fase orgánica se lava con HCl 0.5N (2x30 ml), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida. Se obtiene la amida como un sólido blanco. **TLC** (AcOEt) R<sub>f</sub>=0.43.

**(R)-13: Rendimiento:** 82%, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>24</sup> = +36.6 (*c* 0.74, CHCl<sub>3</sub>); **<sup>1</sup>H-RMN** (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6.52 (br s, 1H), 6.10 (br s, 1H), 5.30 (br s, 1H), 4.21 (br s, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.35 (d, *J* 7.07 Hz, 3H); **<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 175.32, 155.54, 80.18, 59.45, 28.28, 18.25

**(S)-13: Rendimiento:** 89%, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>24</sup> = -37.5 (*c* 0.77, CHCl<sub>3</sub>); Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN son idénticos a los obtenidos para **(R)-13**.

- *Preparación de (R) terc-butil-1-cyano etil carbamato 14*

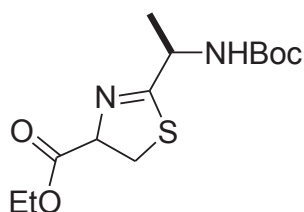


Bajo corriente de N<sub>2</sub> se disuelve la amida **13** (15.94 mmoles), en THF seco (30 ml). Se agrega piridina seca (63.76 mmoles, 5.15 ml), se enfría en baño de hielo y se gotea el anhídrido trifluoroacético (31.87 mmoles, 4.4 ml). La mezcla de reacción se agita por 2 horas, se concentra a vacío el THF. El crudo obtenido se disuelve en AcOEt (40 ml) y se lava con HCl 0.5N (2x20 ml), NaHCO<sub>3</sub> (20ml), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida. Se obtiene el producto como un sólido blanco. **TLC** (AcOEt) R<sub>f</sub>=0.77.

**(R)-14: Rendimiento:** 85%, <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4.81 (br s, 1H), 4.61 (br s, 1H), 1.54 (d, *J* 7.2 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H); <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 154.04, 119.49, 81.27, 37.58, 28.20, 19.59.

**(S)-14: Rendimiento:** 87%. Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN son idénticos a los obtenidos para (R)-14.

- *Preparación de 2 - ((R) -1- (terc-butoxicarbonilamino) etil) -4,5-dihidrotiazol-4-carboxilato de etilo 15*



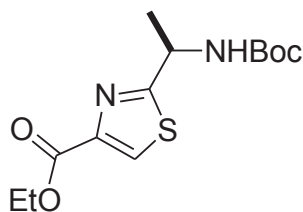
A una solución de buffer fosfato 1M pH=7 (12 ml) previamente desgaseada con N<sub>2</sub> por 10 minutos, se le agrega el nitrilo **14** (6.63 mmoles) y el clorhidrato de la cisteína etil éster (8.68 mmoles) disueltos en 5 ml de un sistema t-BuOH/MeOH (4/1). La reacción se agita a temperatura ambiente por aproximadamente 3 horas. Se extrae con AcOEt (3x20ml), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida. El producto se

purifica por cromatografía en columna (FM: AcOEt:EP 40:60) y se obtiene como un aceite de color caramelo. **TLC** (AcOEt:EP 50:50) Rf=0.4. (Como revelador se usa UV y ninhidrina)

**(R)-15: Rendimiento:** 47%, **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm 5.21 (br, s, 1H), 5.09 (m, 1H), 4.60 (br s, 1H), 4.25 (m, 2H), 3.56 (m, 2H), 1.44 (m, 12H), 1.31 (m, 3H); **<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm)177.65, 170.60, 154.84, 79.84, 78.06, 61.76, 49.34, 35.28, 28.32, 20.30, 14.13.

**(S)-15: Rendimiento:** 45%. Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN son idénticos a los obtenidos para **(R)-15**

- *Preparación de etil 2- (1- (terc-butoxicarbonilamino) tiazol-4-carboxilato de etilo 16*



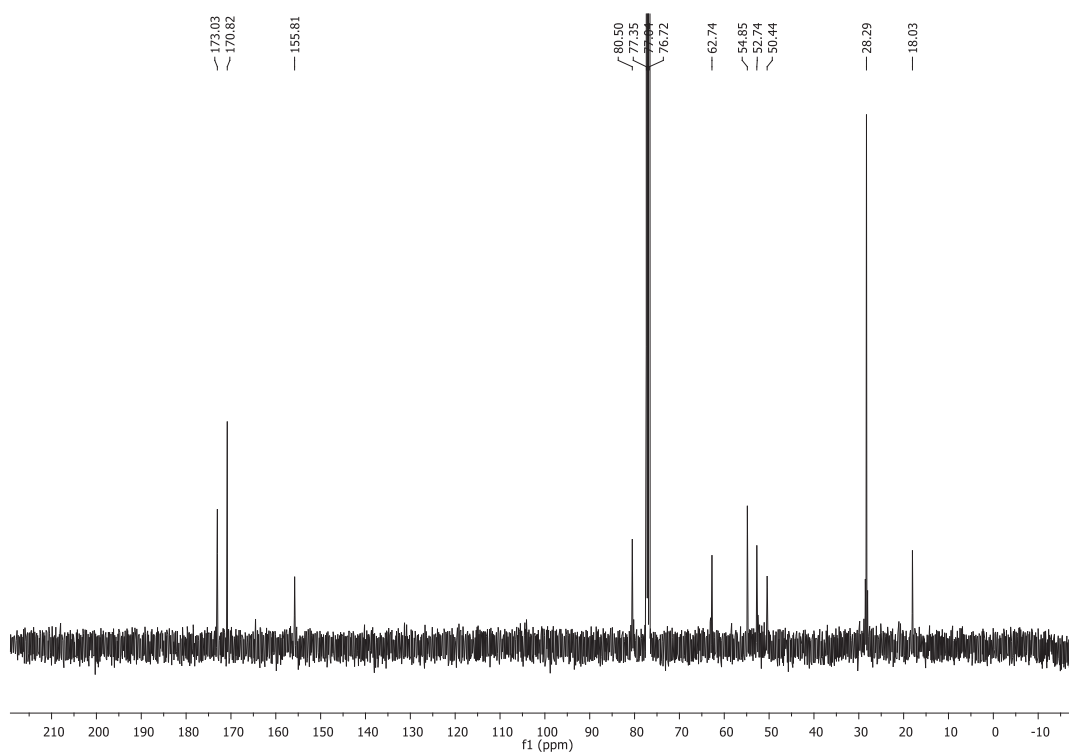
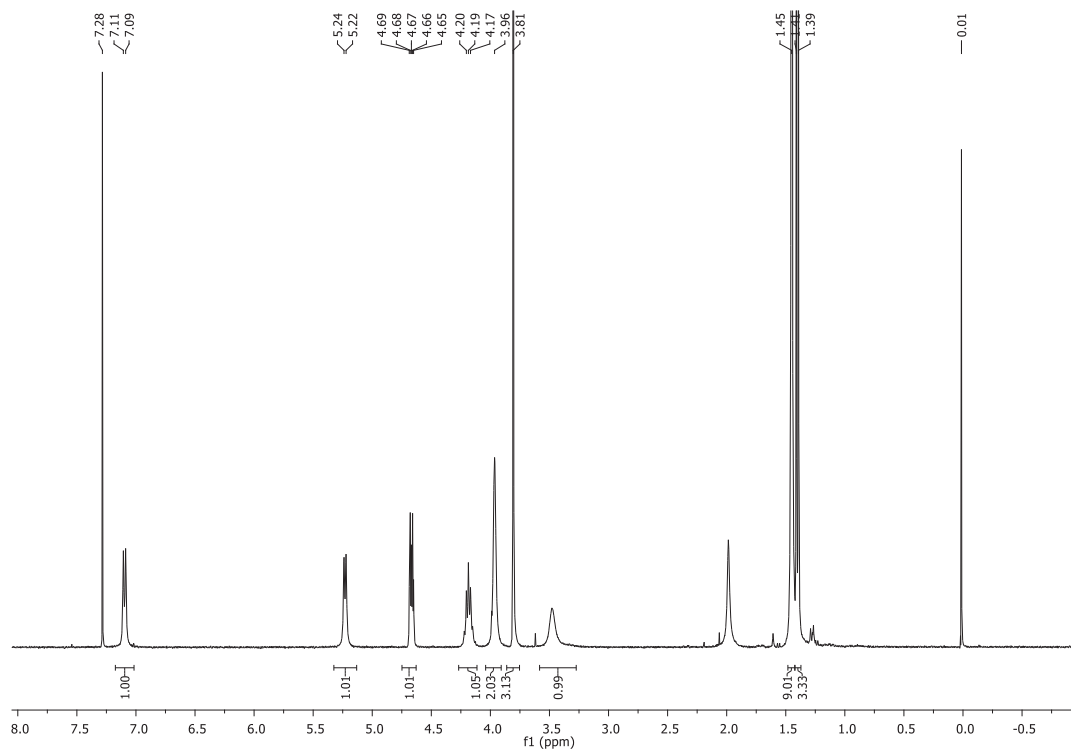
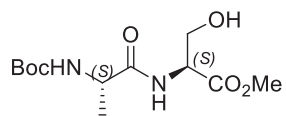
Bajo una corriente de N<sub>2</sub>, se disuelve la tiazolina **15** (4.46 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (20ml) y se lleva a -20°C. Se agrega BrCCl<sub>3</sub> (16.96 mmoles, 1.7ml) y a los 15 minutos se agrega DBU (16.96 mmoles, 2.5 ml), la mezcla de reacción se agita por 2 horas. Se elimina a presión reducida el solvente y el producto se purifica por cromatografía en columna (FM: AcOEt:EP 40:60) y se obtiene como un aceite marrón. **TLC** (AcOEt:EP 50:50) Rf=0.5.

**(R)-16: Rendimiento:** 79%, **[α]<sup>24</sup><sub>D</sub>** = +11.3 (c 0.65, CHCl<sub>3</sub>); **<sup>1</sup>H-RMN**(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.06 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.39 (q, J= 7.12 Hz, 2H), 1.60 (d, J=6.91 Hz, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.37 (t, J=7.13 Hz, 3H); **<sup>13</sup>C-RMN** (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 174.93, 161.35, 154.88, 147.17, 127.16, 80.24, 61.43, 48.92, 28.30, 21.75, 14.36; **MS ID** encontrada 300.10 , calculada para C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 300.11

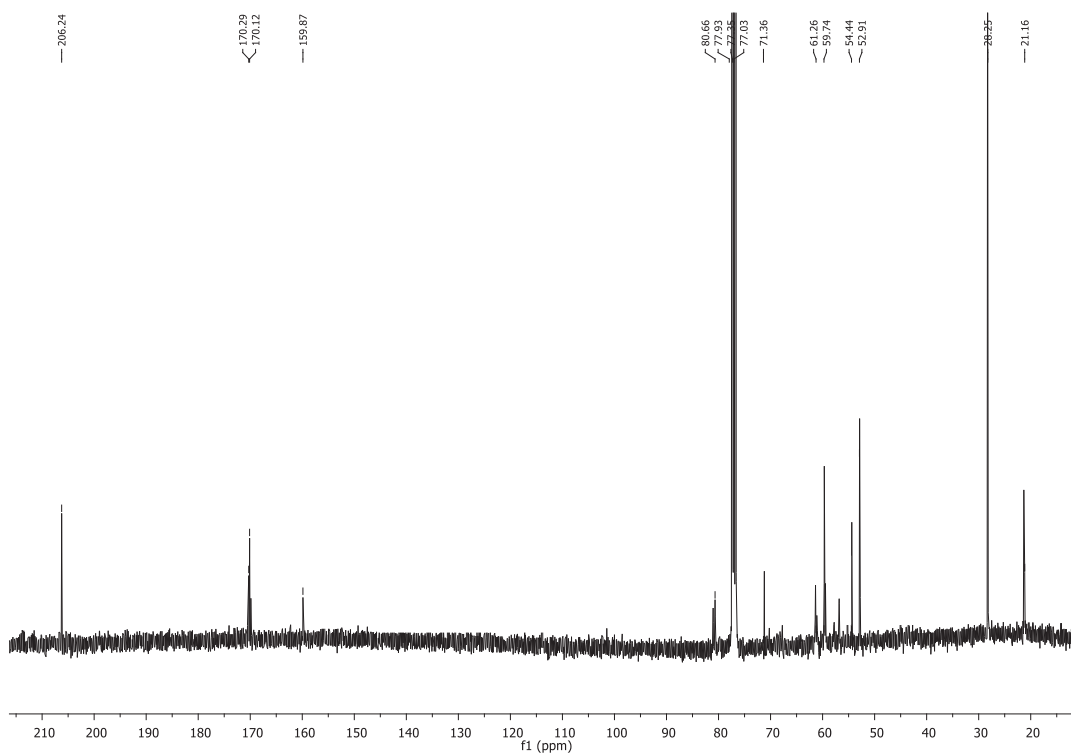
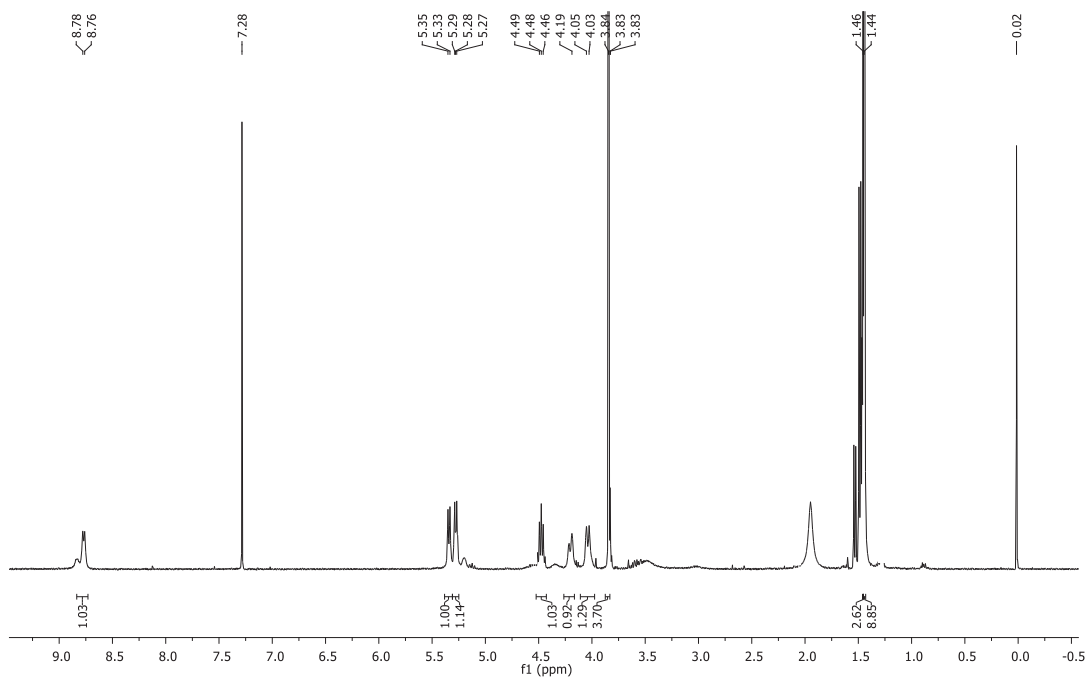
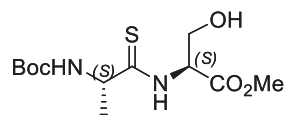
**(S)-16: Rendimiento:** 95%, **[α]<sup>24</sup><sub>D</sub>** = -11.7 (c 1.05, MeOH); Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN son idénticos a los obtenidos para **(R)-16**.

## 2.3.2 Espectroscopía de RMN

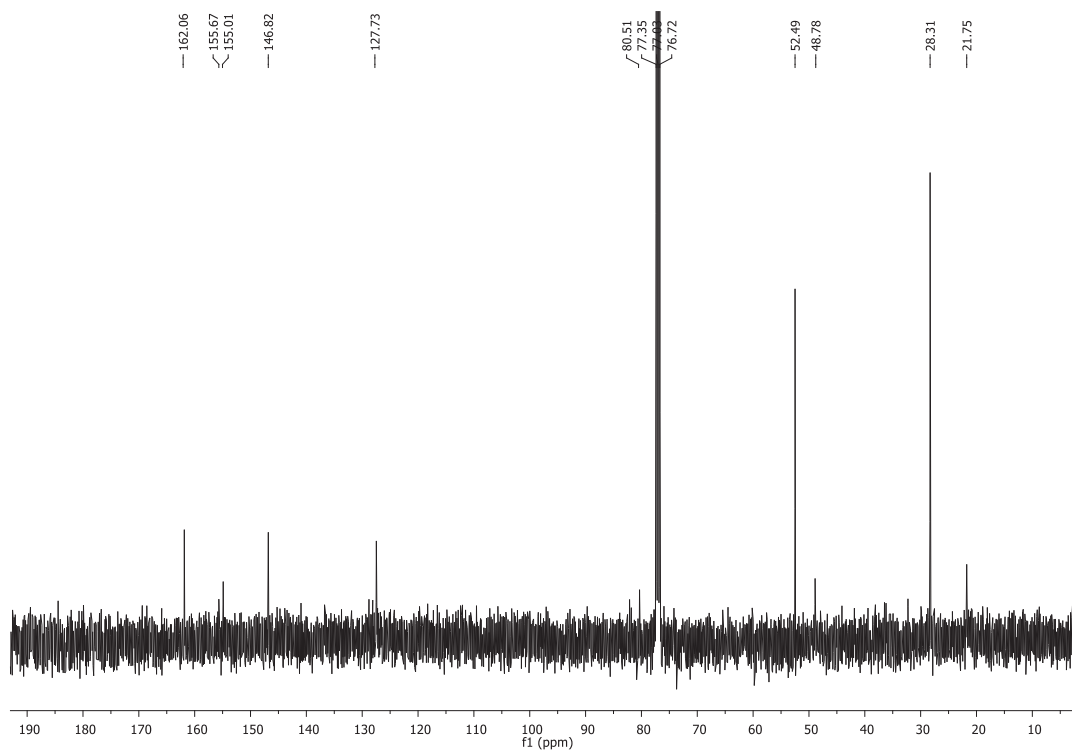
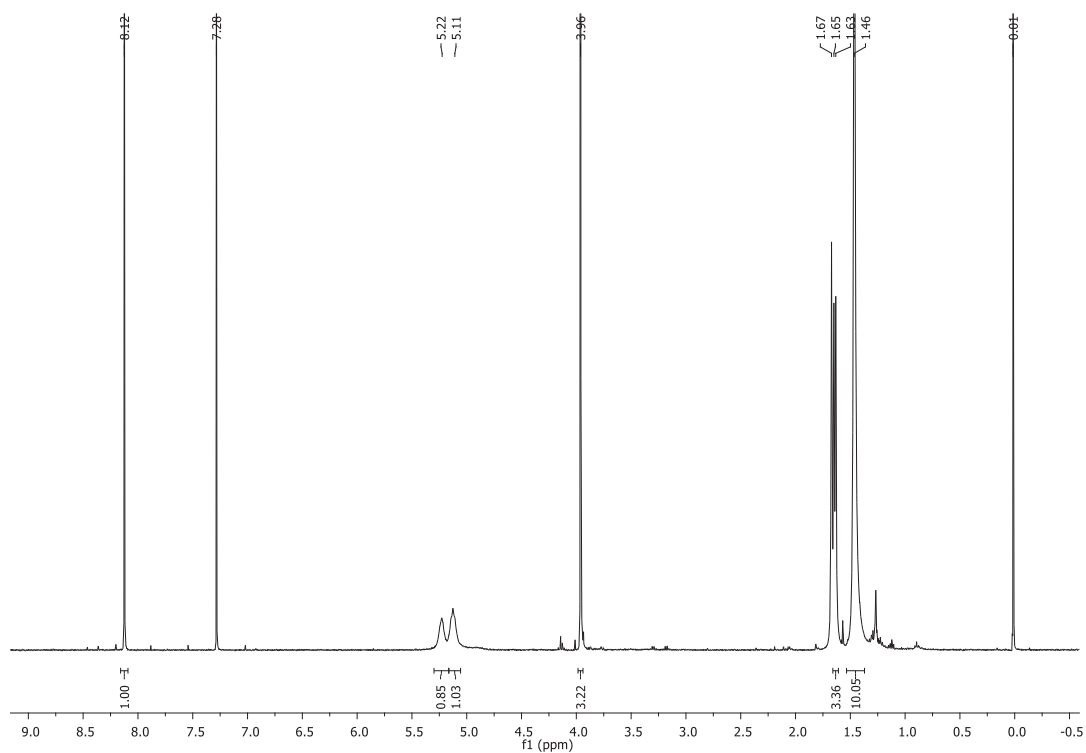
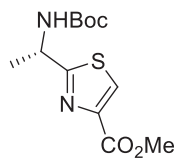
Compuesto **9**



# Compuesto 11

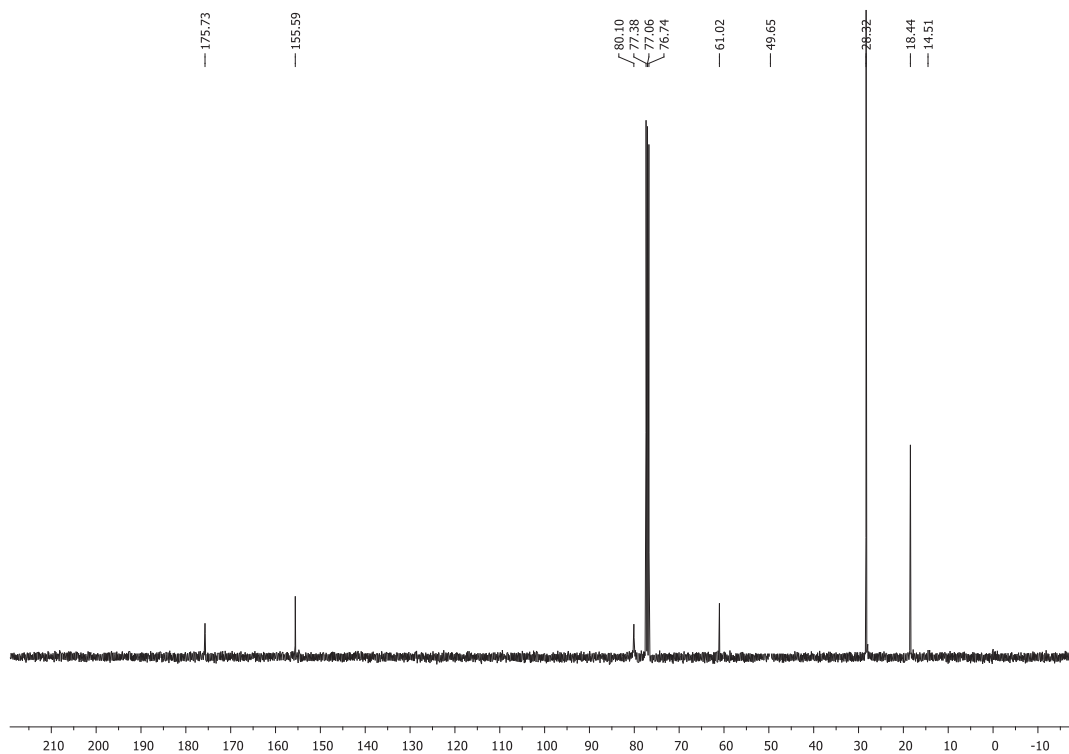
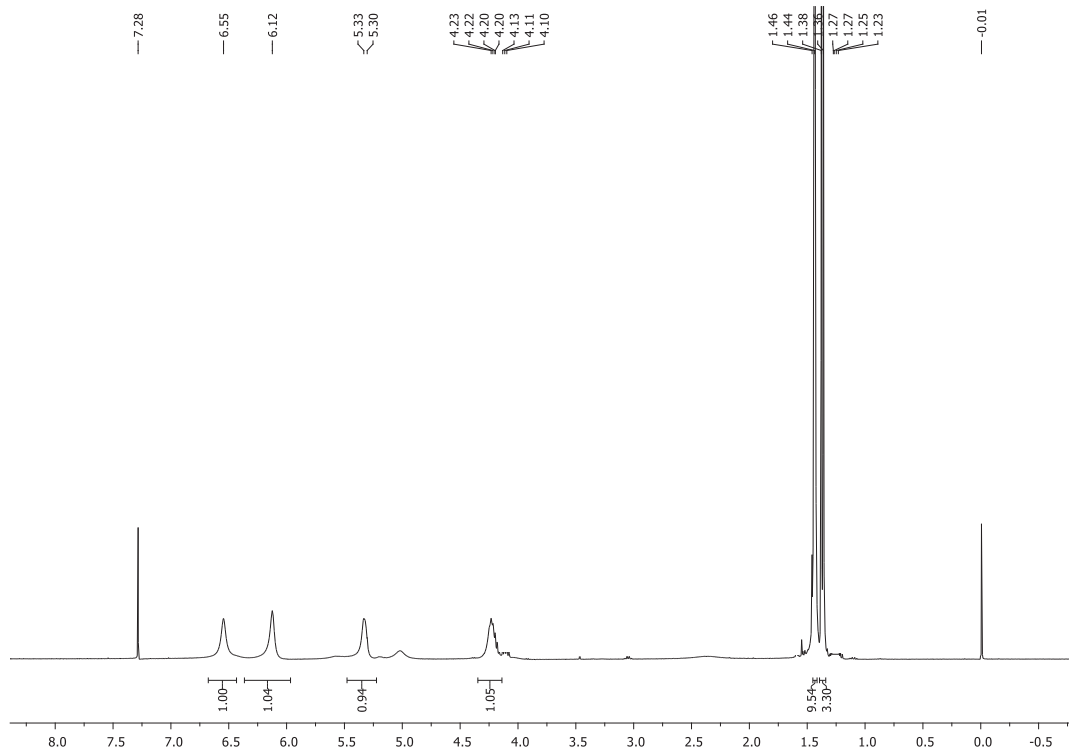
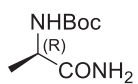


Compuesto 12

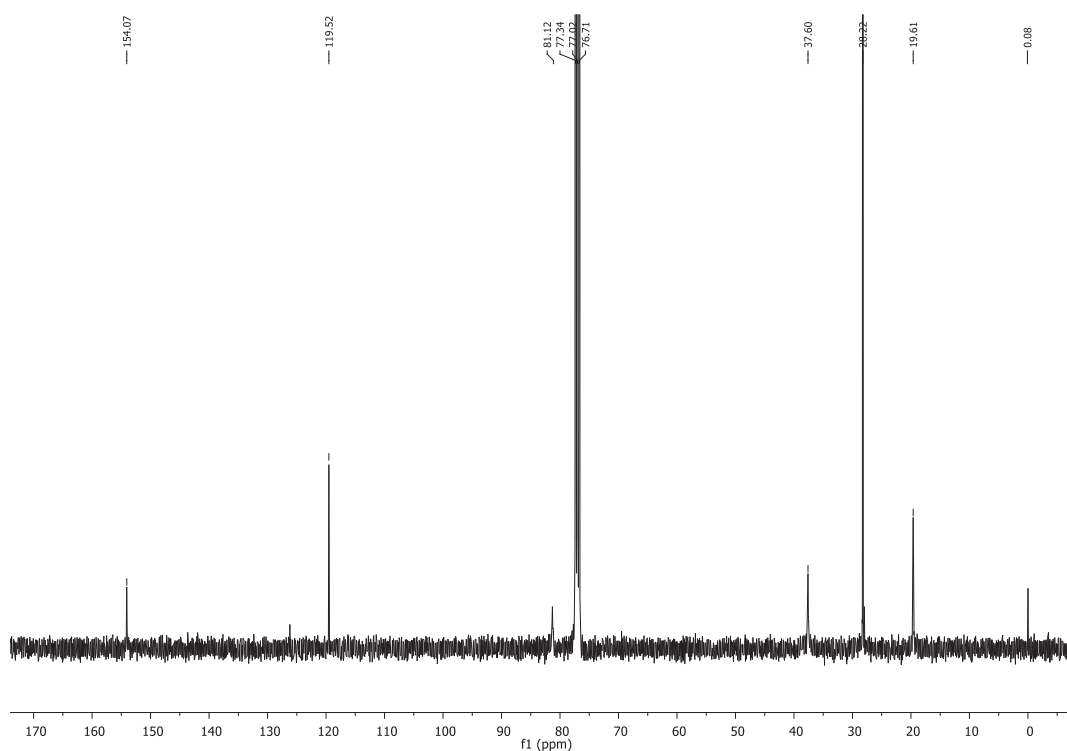
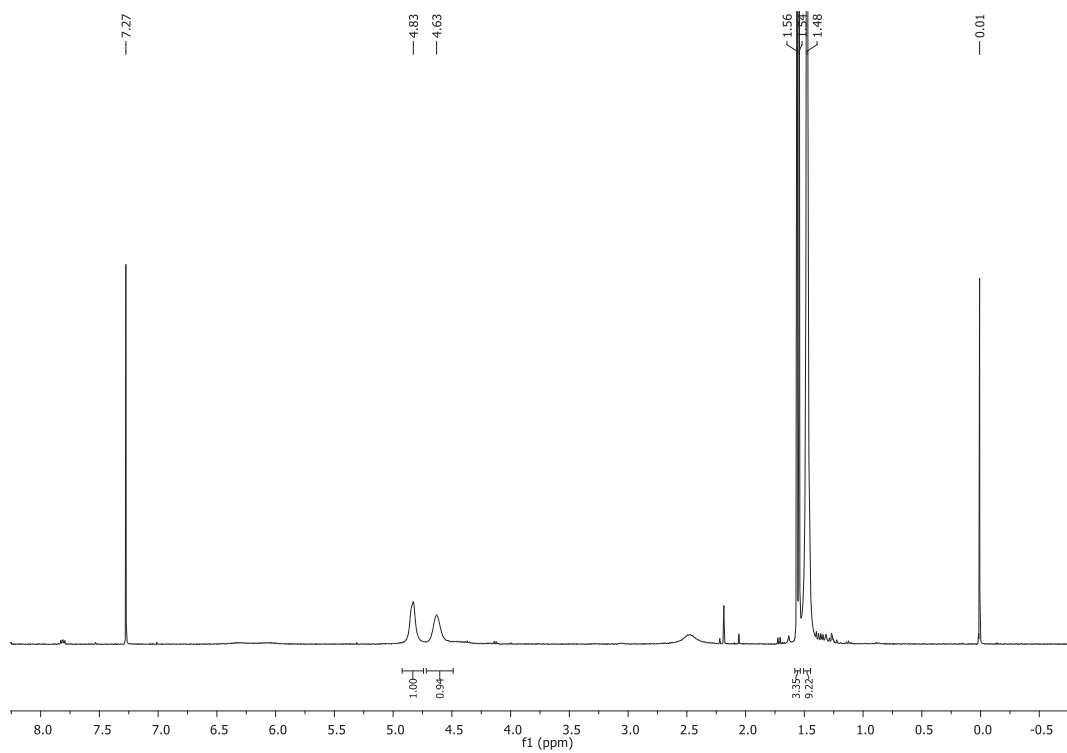
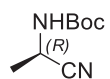




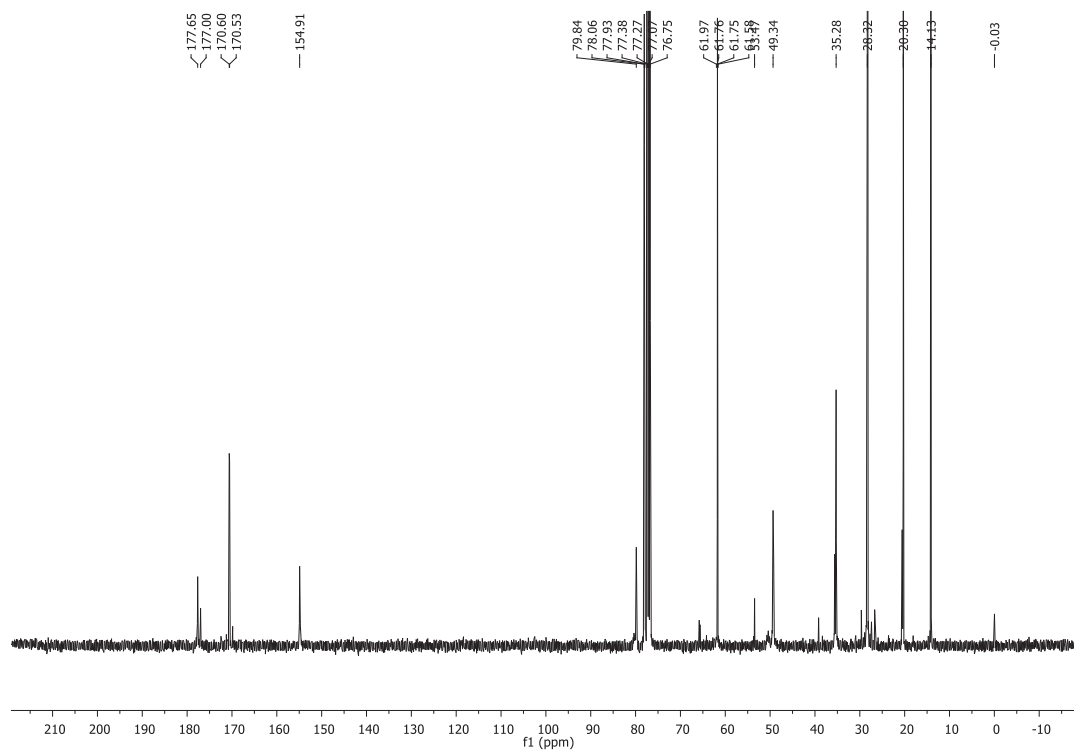
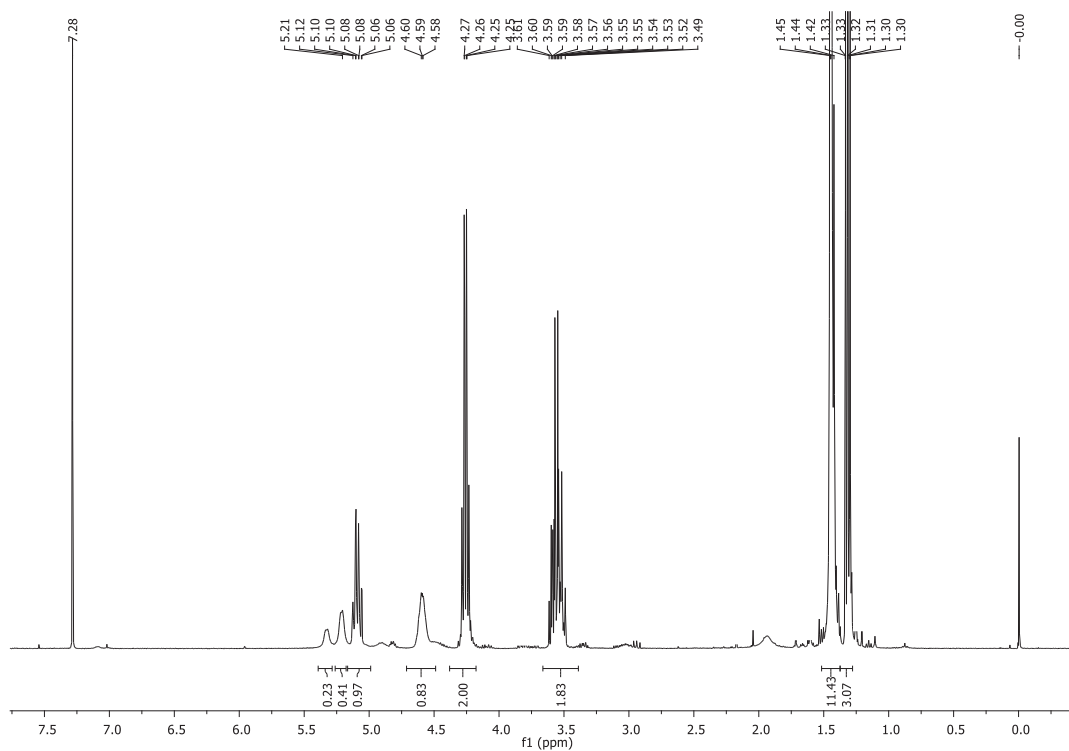
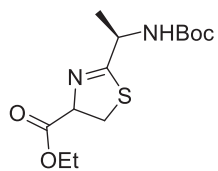
Compuesto 13



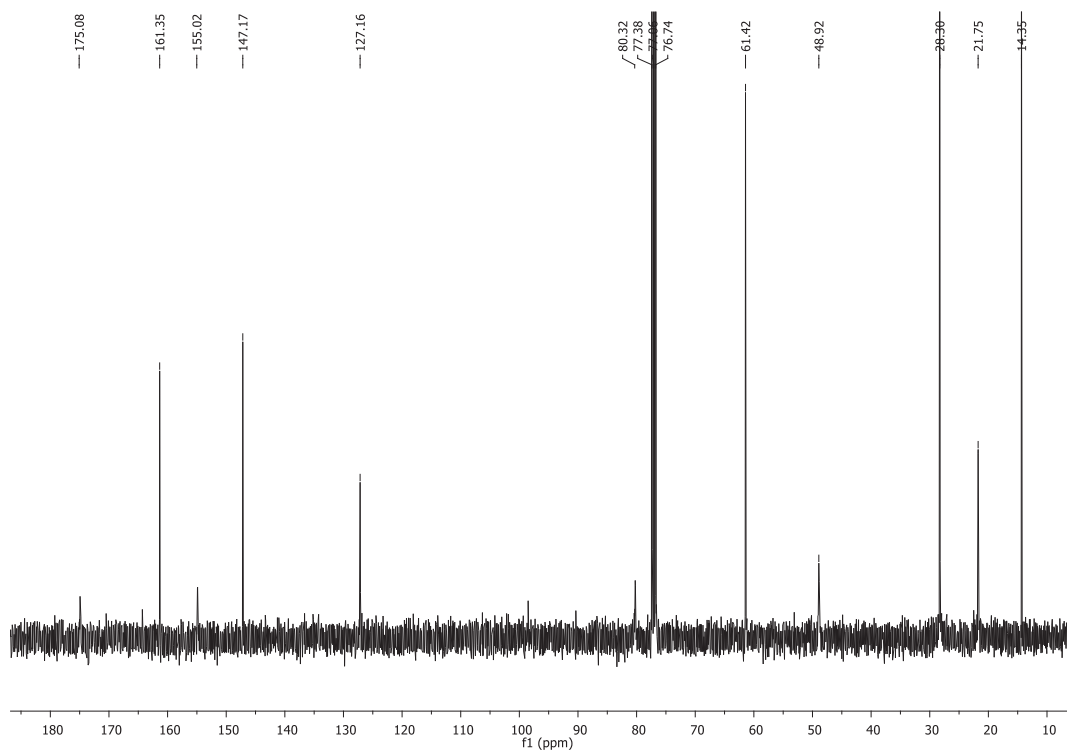
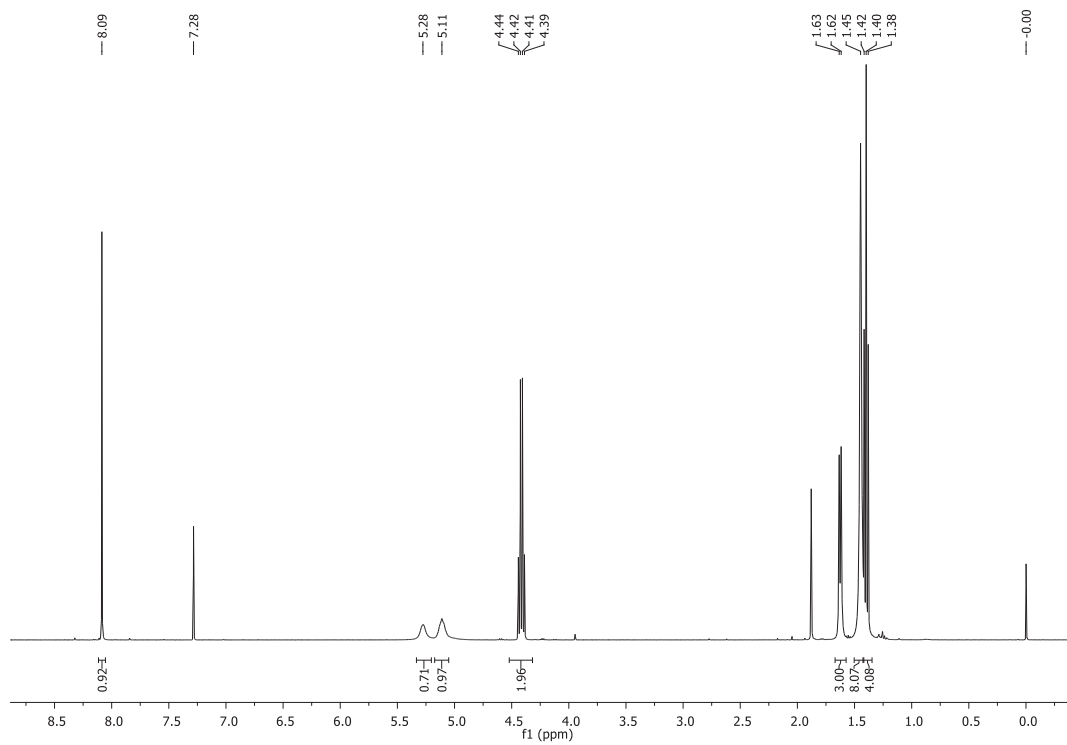
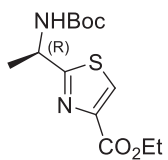
# Compuesto 14



# Compuesto 15



# Compuesto 16



**CAPÍTULO 3**  
**SÍNTESIS DE BACILLAMIDA C Y**  
**NEOBACILLAMIDA A**



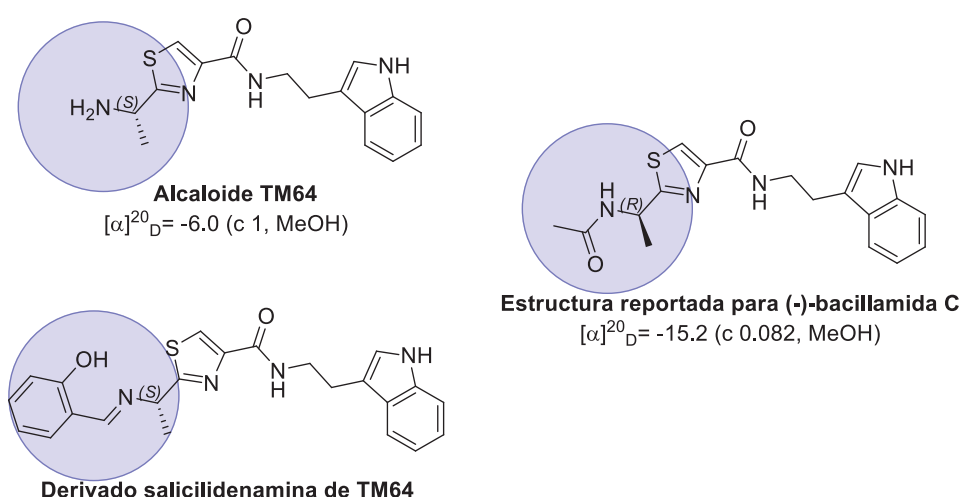
# Capítulo 3. Síntesis de Bacillamida C y de Neobacillamida A

## 3.1. Antecedentes

### 3.1.1 Síntesis de Bacillamida C

La bacillamida C fue reportada en 2007 por Socha y colaboradores<sup>11</sup>, aislada de la bacteria *Bacillus endophyticus* extraída de un material microbiano hipersalino de las Bahamas. La actividad óptica reportada para el producto natural es  $[\alpha]^{20}_D = -15.2$  (c 0.082, MeOH). La configuración absoluta fue asignada por comparación de los espectros de dicroísmo circular (CD) obtenidos del producto natural con el CD reportado para el derivado salicilidenamina<sup>41</sup> del alcaloide TM-64. Como los espectros de la bacillamida C resultaron inversos a los reportados para el derivado de TM64 y este alcaloide tiene asignada una configuración (S), la configuración de la bacillamida C fue asignada como (R). Ver Figura 3.1

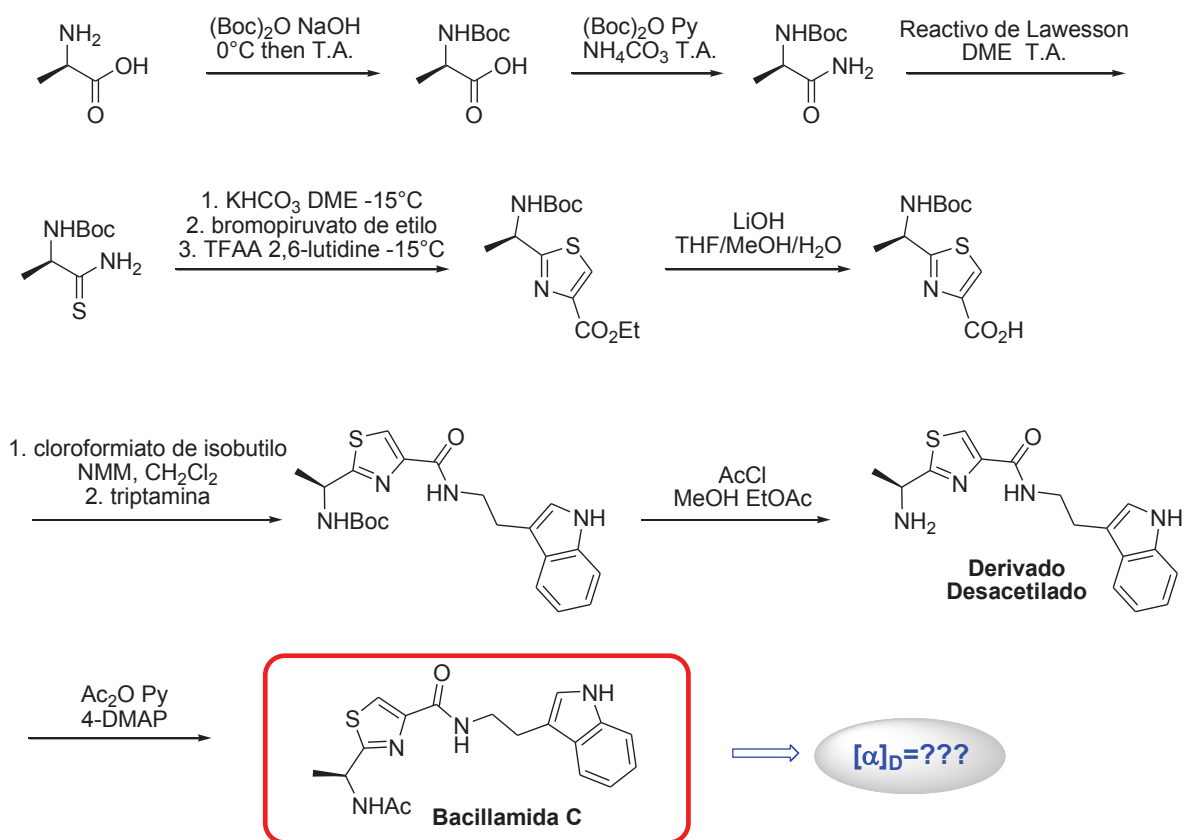
Figura 3.1.



<sup>41</sup> Smith, H., E., *Tetrahedron*, **1946**, 22, 813 10 824.

Se han reportado dos síntesis totales para la bacillamida C. La primer síntesis de este producto natural y su análogo desacetilado fue reportada en 2009 por Duo Li *et al.*<sup>42</sup> con 22.8% (8 pasos) y un 26.7% (7 pasos) de rendimiento respectivamente (Esquema 3.1). La síntesis del anillo tiazol la realizaron a partir de D-alanina. En primer lugar obtienen la tioamida correspondiente a través de una tionación con el reactivo de Lawesson, y en segundo lugar realizan la condensación con 3-bromopiruvato por el método de Hantzsch para formar el tiazol. El enlace amida entre el tiazol y la triptamina lo realizan usando isobutil cloroformiato como activante del grupo ácido del tiazol. (Esquema 3.1) Ambos productos fueron confirmados por RMN y HRMS pero no reportan la actividad óptica de la *Bacillamida-C* ni de su derivado; por lo que no confirman la configuración absoluta de estos productos.

**Esquema 3.1.** Síntesis de Duo Li *et al.* de bacillamida C.

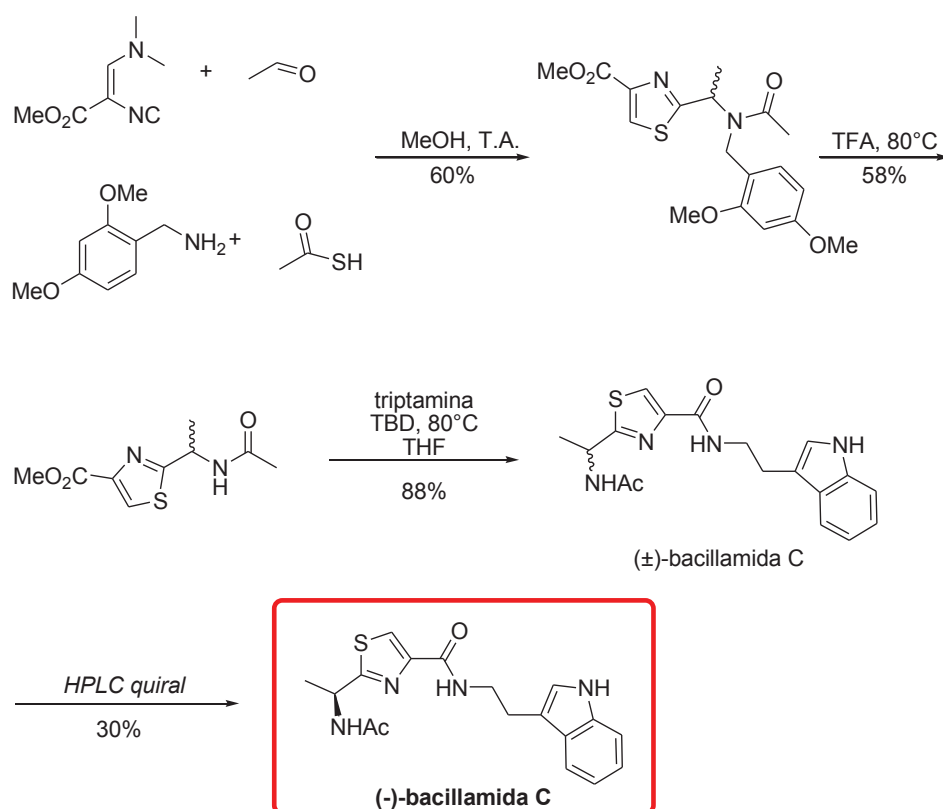


<sup>42</sup> Li, D., Yang, H. S., Cui, Q., Mao, S. J., Xu, X. H., *Chinese Chemical Letters*, 2009, 20, 1195–1197



La segunda síntesis para la (-)-bacillamida C también fue reportada en 2009 por Wei Wang *et al.*<sup>43</sup>, con 30% de rendimiento en tres pasos de reacción. En esta síntesis plantearon preparar el anillo tiazol racémico por una reacción multicomponente de Ugi. Por lo que obtienen una mezcla racémica de la bacillamida C, separando el enantiómero (-) por HPLC quiral. (Esquema 3.2)

**Esquema 3.2.** Síntesis de Wei Wang *et al.* de bacillamida C.



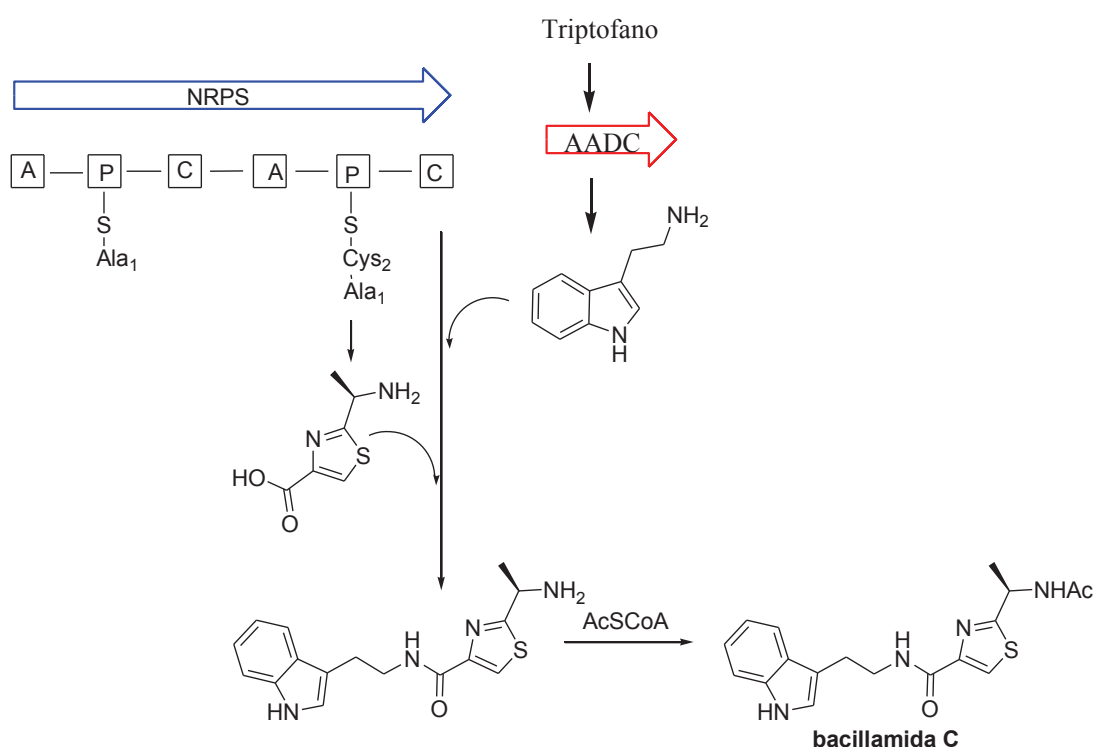
En 2013 Yuwen *et al.*<sup>44</sup> estudió la posible biosíntesis para la bacillamida C por el *Bacillus atrophaeus* C89 y el rol que cumple la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) en su producción. Donde plantean que los aminoácidos alanina, cisteína y triptofano son los precursores de la bacillamida C. La formación del enlace peptídico y posterior heterociclación para formar el anillo tiazol se da a partir de cisteína y alanina en el grupo de genes de péptido sintetisas no ribosómicas (NRPS). El anillo tiazol es

<sup>43</sup> Wang, W., Joyner, S., Khoury, K. A. S., Dömling A., *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 529–532.

<sup>44</sup> Yuwen, L., Zhang, F., Chen, Q., Lin, S., Zhao, Y., Li, Z., *Sci. Rep.*, **2013**, 3, 1753.

probable que se combine por amidación con la triptamina que proviene de la descarboxilación del triptofano por parte de la AADC. Sin embargo no queda claro si la descarboxilación se da antes o después de la amidación. Por último para obtener la bacillamida C, el compuesto obtenido se acetila por la acetil coenzima A (AcSCoA). Esquema 3.3

**Esquema 3.3.** Biosíntesis planteada por Yuwen *et al.* para la bacillamida C



A: Dominio de adenilación, P: Dominio transportador peptídico, C: Dominio de condensación

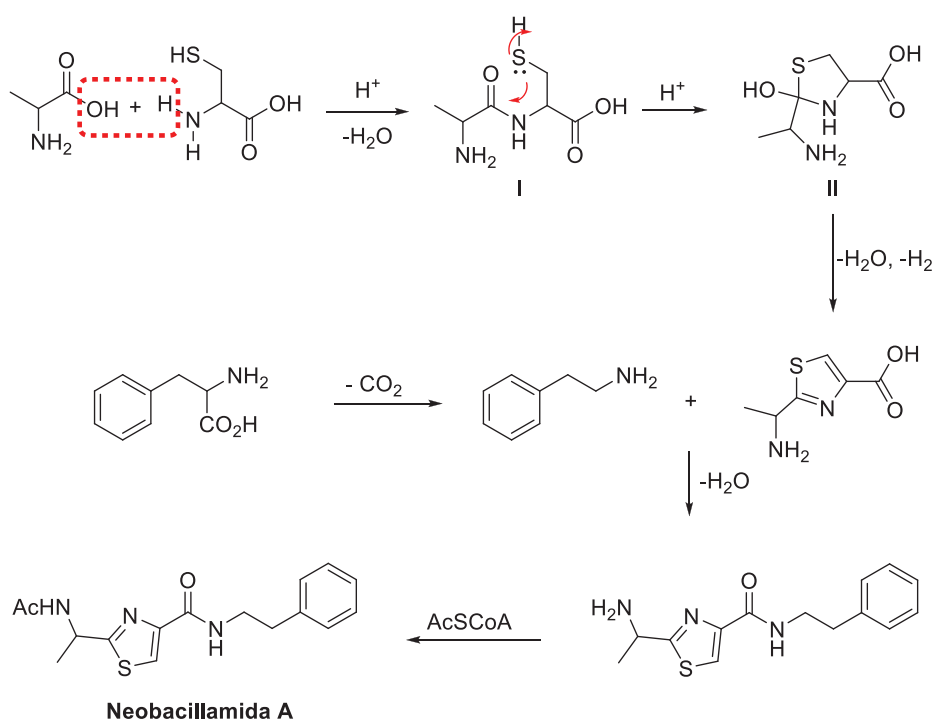
AADC: Enzima aminoácido descarboxilasa, NRPS: enzimas péptido sintetisas no ribosómicas

### 3.1.2 Síntesis de Neobacillamida A

La neobacillamida A fue aislada por Yu L.L. *et al.* de la bacteria de origen marino *Bacillus atrophaeus* asociada a la esponja *Dysidea avara* del sur de China<sup>13</sup>. Su configuración absoluta fue propuesta en forma tentativa como (*R*) por comparación de la actividad óptica medida  $[\alpha]^{24}_D = -16.0$  ( $c=0.10$ , MeOH) con la actividad óptica reportada para la bacillamida C  $[\alpha]^{24}_D = -15.2$  ( $c=0.10$ , MeOH). En el mismo trabajo se plantea una posible biosíntesis de la neobacillamida. Esta puede derivar de tres aminoácidos como lo son la

alanina, cisteína y fenilalanina y se daría en tres pasos (Esquema 3.4). En el primer paso se da la condensación de la alanina con cisteína y por la vía de dos intermediarios I y II se formaría el anillo tiazol. El segundo paso incluye la descarboxilación de la fenilalanina para obtener 2-feniletilamina, y la formación del enlace amida entre esta última y el anillo tiazol. El último paso es la N-acetilación del grupo amino libre por la acetil coenzima A. Para la neobacillamida A no hay síntesis reportada hasta el momento.

**Esquema 3.4.** Biosíntesis propuesta por Yu *et al.* para la neobacillamida A.

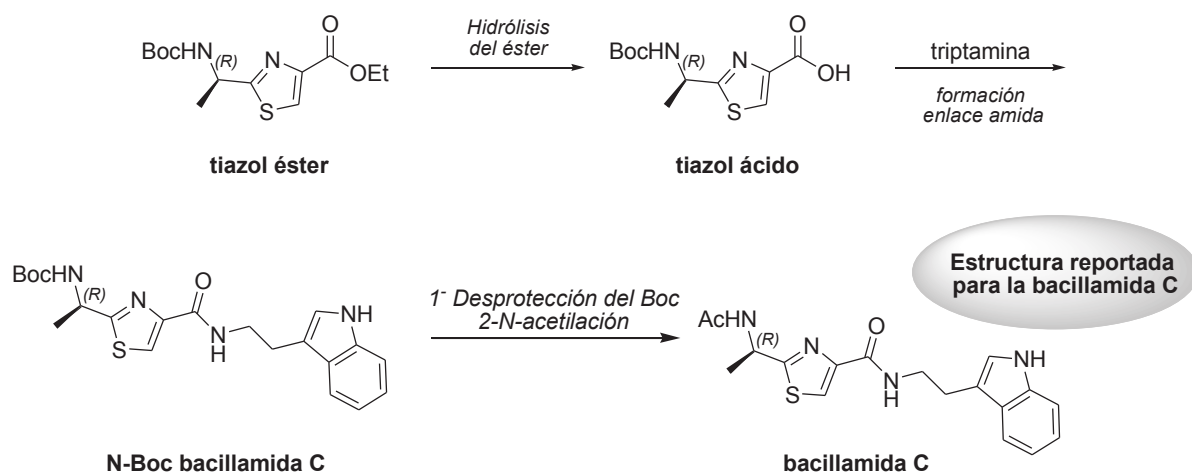


## 3.2. Resultados y discusión

### 3.2.1 Síntesis de la Bacillamida C

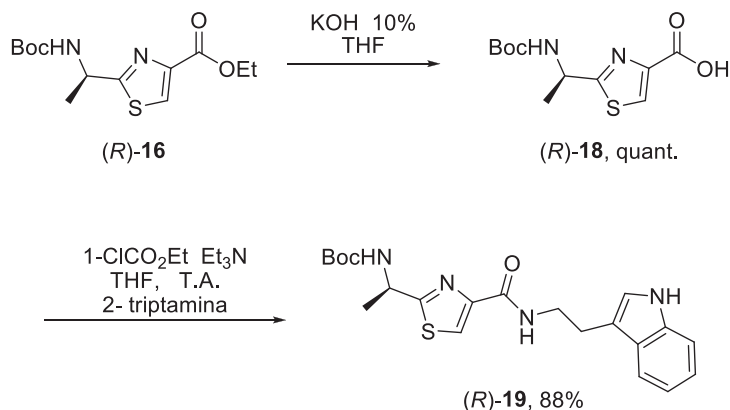
Se plantea preparar la bacillamida C en cuatro pasos a partir del bloque tiazol **16** preparado en el capítulo 2. Como la configuración propuesta para el producto natural es *R*, se parte del tiazol (*R*)-**16** obtenido de la D-alanina. (Esquema 3.5)

**Esquema 3.5** Ruta sintética propuesta para obtención de (*R*)-bacillamida C



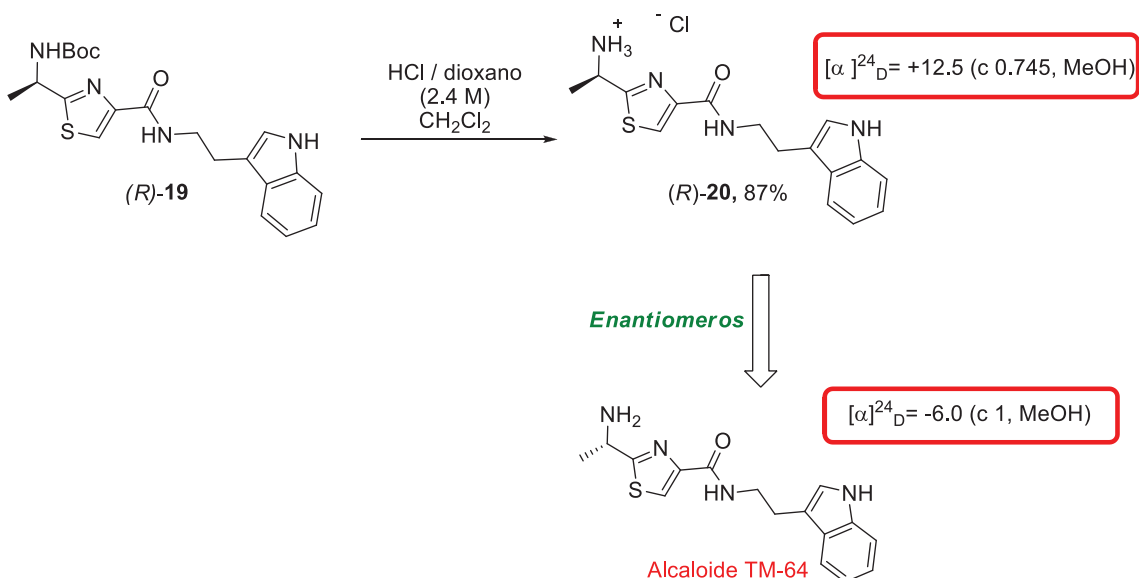
Como primer paso se hidrolizó el éster del tiazol (*R*)-**16** en forma cuantitativa. La hidrólisis se hizo en medio básico usando KOH al 10% a temperatura ambiente, para obtener el tiazol (*R*)-**18**, el cuál tiene el ácido carboxílico disponible para el acople con triptamina y dar el compuesto (*R*)-**19**. Para este acoplamiento se usó como agente acoplante cloroformiato de etilo, con Et<sub>3</sub>N como base y THF seco como solvente. Esta reacción se dio con un 88% de rendimiento. (Esquema 3.6)

### Esquema 3.6 Hidrólisis del éster y acoplamiento del tiazol con triptamina



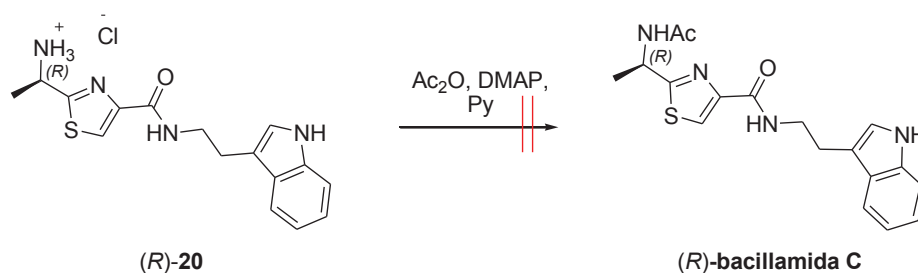
Se eliminó el grupo Boc del compuesto (R)-19 con HCl (2.4 M) en dioxano, obteniéndose el análogo desacetilado de la bacillamida C (R)-20 con un rendimiento del 87% (Esquema 3.7). Este análogo desacetilado resulta ser el enantiómero R del alcaloide TM-64. Se le midió la actividad óptica al compuesto (R)-20 siendo  $[\alpha]^{24}_D = +12.5$  (c 0.745, MeOH), resultando como se esperaba opuesta a la reportada para el alcaloide TM-64  $[\alpha]^{24}_D = -6.0$  (c 1, MeOH) y al cuál se le asigna una configuración absoluta S.

### Esquema 3.7 Preparación del análogo N-desacetilado de (R)-bacillamida C.



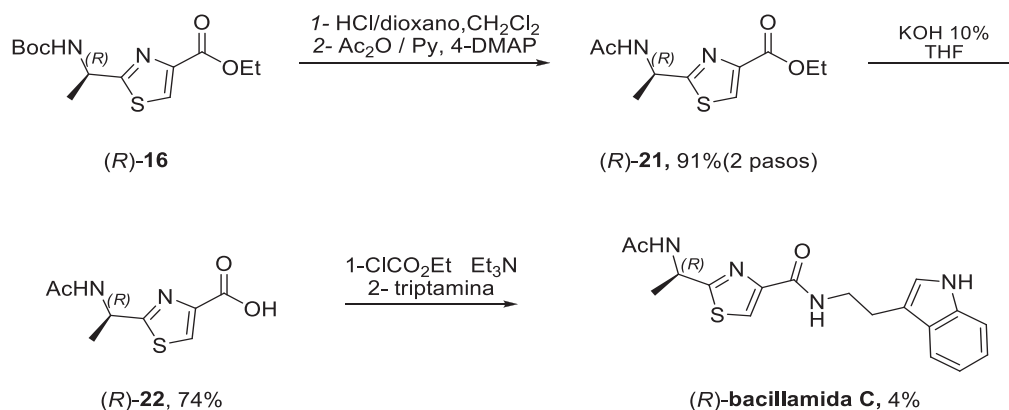
La N-acetilación del compuesto (*R*)-**20** se intentó con Ac<sub>2</sub>O y piridina (Esquema 3.8) a temperatura ambiente. En estas condiciones el avance de reacción fue muy lento y luego de 36 horas, por TLC se observó dos manchas superpuestas casi en el origen de la siembra, pudiendo ser una de estas nuestro producto. El crudo de esta reacción se purificó por cromatografía en columna en fase reversa, donde se logró separar ambas manchas y se les realizó H-RMN para identificarlos. Ninguno de los dos productos obtenidos resultó ser la bacillamida C, por lo que fue necesario plantear una nueva estrategia para su obtención.

**Esquema 3.8** N-Acetilación para la obtención de (*R*)-bacillamida C



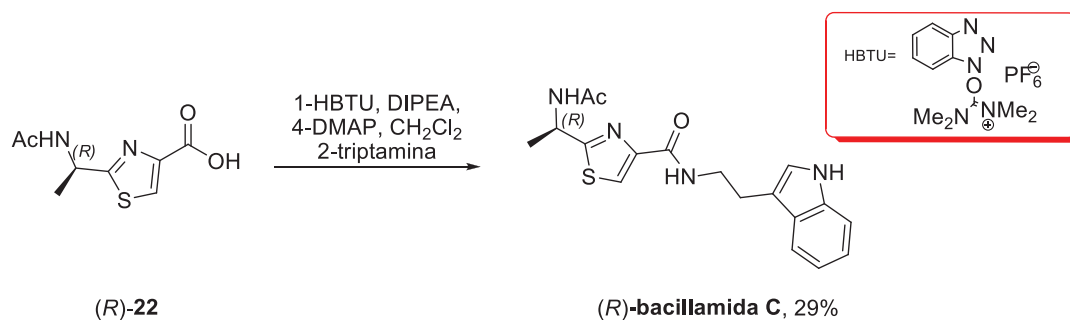
Como el problema para la obtención de la bacillamida C se dio en el paso de acetilación al compuesto (*R*)-**20**, se planteó acetilar primero el tiazol y luego realizar el acoplamiento de éste con la triptamina. Por lo que la nueva ruta planteada se muestra en el Esquema 3.9.

**Esquema 3.9** Nueva ruta para la preparación de (*R*)-bacillamida C



El tiazol N-acetilado (*R*)-**21** se obtuvo con un 91% en dos pasos, partiendo del tiazol (*R*)-**16**. La N-acetilación se realizó con Ac<sub>2</sub>O y piridina a temperatura ambiente previa eliminación del grupo protector Boc con HCl (2.4 M) en dioxano. La hidrólisis del éster del tiazol (*R*)-**21** con KOH al 10% en THF, dio lugar al tiazol (*R*)-**22** con un 74% de rendimiento, el cual ahora tiene disponible el grupo ácido carboxílico para su acoplamiento con triptamina. El acoplamiento para formar el enlace amida se realizó con cloroformiato de etilo y trietilamina, obteniéndose el producto esperado solo con un 4% de rendimiento. Además del producto esperado se obtuvo un producto secundario que no se pudo identificar, pero que por RMN se observa que contiene el fragmento triptamina. Esta podría ser la causa del bajo rendimiento de este acople usando el tiazol N-Ac (4%) con respecto al acople de la triptamina con el tiazol N-Boc (88%). Por esta razón se buscó otra alternativa para mejorar el rendimiento en la formación del enlace amida y se decidió utilizar el agente acoplante HBTU en medio básico tal como se muestra en el Esquema 3.10.

### Esquema 3.10 Acoplamiento tiazol-triptamina con HBTU

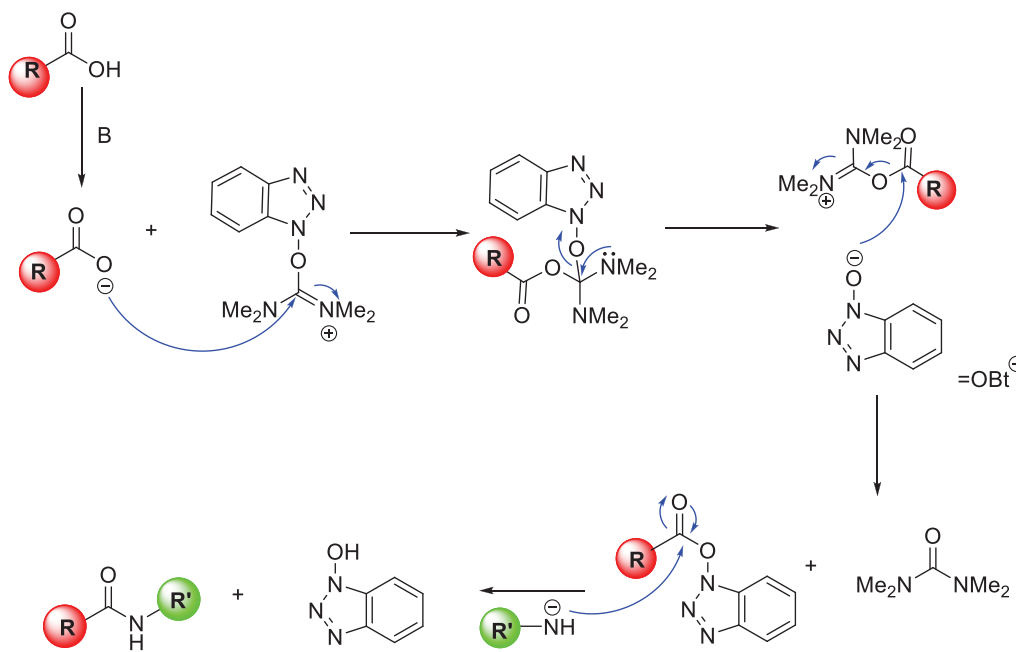


El mecanismo general involucrado en la formación del enlace amida con HBTU<sup>45</sup> en medio básico se muestra en el Esquema 3.11. El ácido carboxílico se desprotona por acción de la base y el anión carboxilato resultante ataca al carbono deficiente en electrones del HBTU. Se da la eliminación del anión OBT<sup>-</sup>, el cuál vuelve a reaccionar con el derivado

<sup>45</sup> Montalbetti, C. A. G. N., Falque, V., *Tetrahedron*, 2005, 61, 10827–10852

activado del ácido carboxílico para formar un éster OBt, el cuál es atacado por la amina para formar la amida correspondiente y HOBt.

**Esquema 3.11** Mecanismo para la formación del enlace amida con HBTU



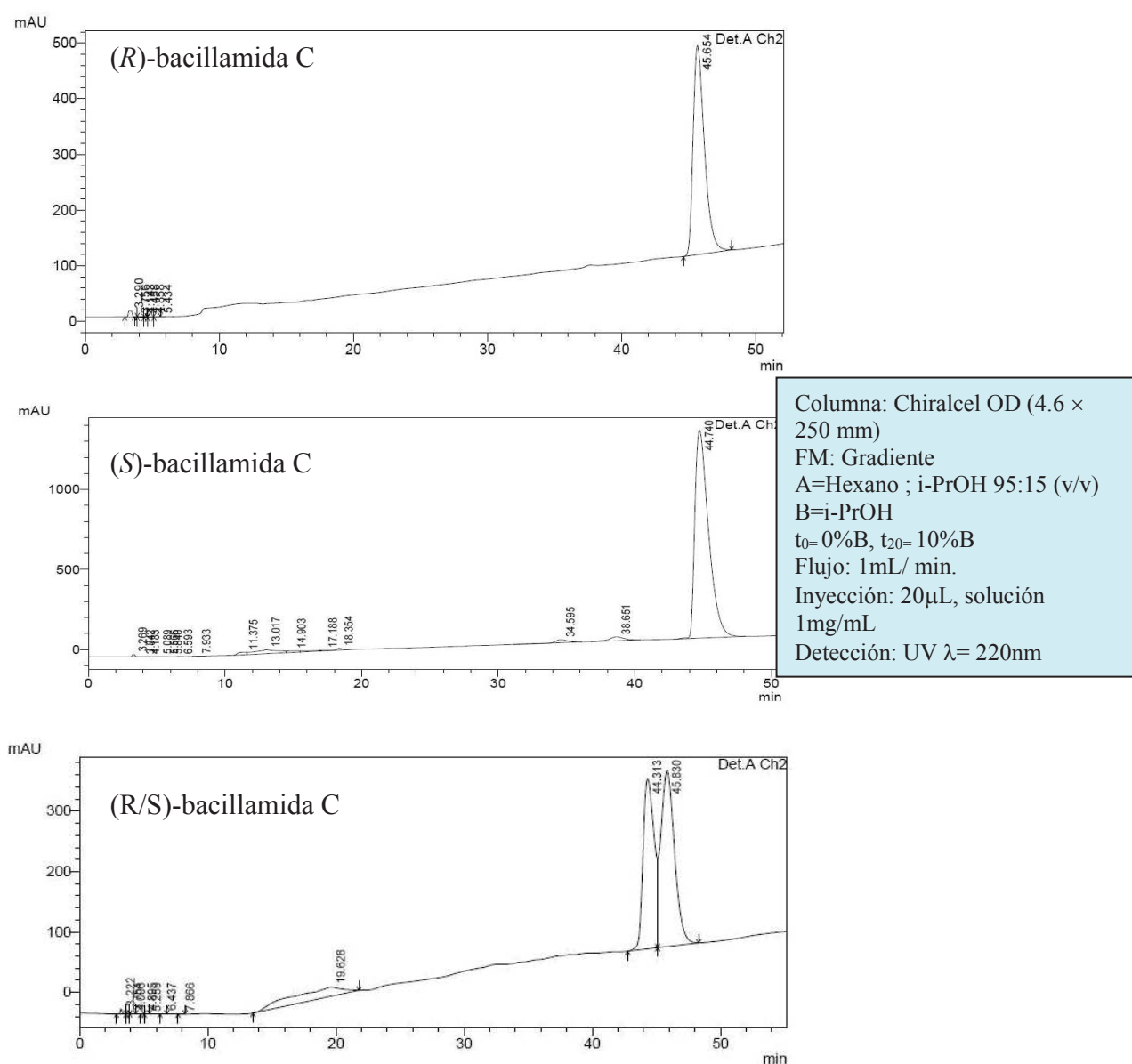
De esta manera se aumentó el rendimiento del paso de acoplamiento de 4% a 29%. La (*R*)-bacillamida C se obtuvo entonces con un rendimiento global de 13%. La caracterización del producto se realizó por espectroscopía de RMN usando experimentos mono y bidimensionales y por espectrometría de masa, confirmando que la estructura coincide con la estructura reportada para el producto natural. También se le midió la actividad óptica, dando como resultado un  $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = +23.11$  (*c* 4.71, MeOH). Esta actividad óptica resultó ser de signo opuesto a la actividad óptica reportada para el producto natural que es  $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -15.2$  (*c* 0.082, MeOH).

Se preparó el enantiómero (*S*)-bacillamida C a partir del tiazol (*S*)-22. El acoplamiento con la triptamina usando HBTU se dio con un 68 % de rendimiento y un rendimiento global de 45%. Al producto obtenido se le midió la actividad óptica siendo  $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -23.65$  (*c* 4.98, MeOH), coincidiendo con la reportada para el producto natural.



Las bacillamidas obtenidas y una mezcla de ambas (50:50) fueron analizadas por HPLC quiral en las condiciones que se muestran en la Figura 3.2. Donde se puede observar que ambos productos fueron obtenidos con una pureza enantiomérica del 100%.

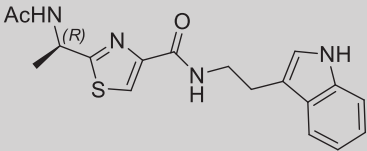
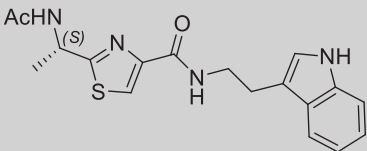
**Figura 3.2**



Por lo tanto con los resultados obtenidos (Tabla 3.1) para las actividades ópticas de los dos enantiómeros de la bacillamida C, se puede concluir que la configuración absoluta del producto natural reportada como (*R*) por Socha y

colaboradores<sup>11</sup> no es la correcta. Por lo que se revisó la configuración absoluta del producto natural de (*R*) a (*S*), lo que dio lugar a una publicación en *Tetrahedron: Asymmetry*<sup>46</sup>.

**Tabla 3.1** Comparación de Actividades ópticas de Bacillamida C natural y sintética

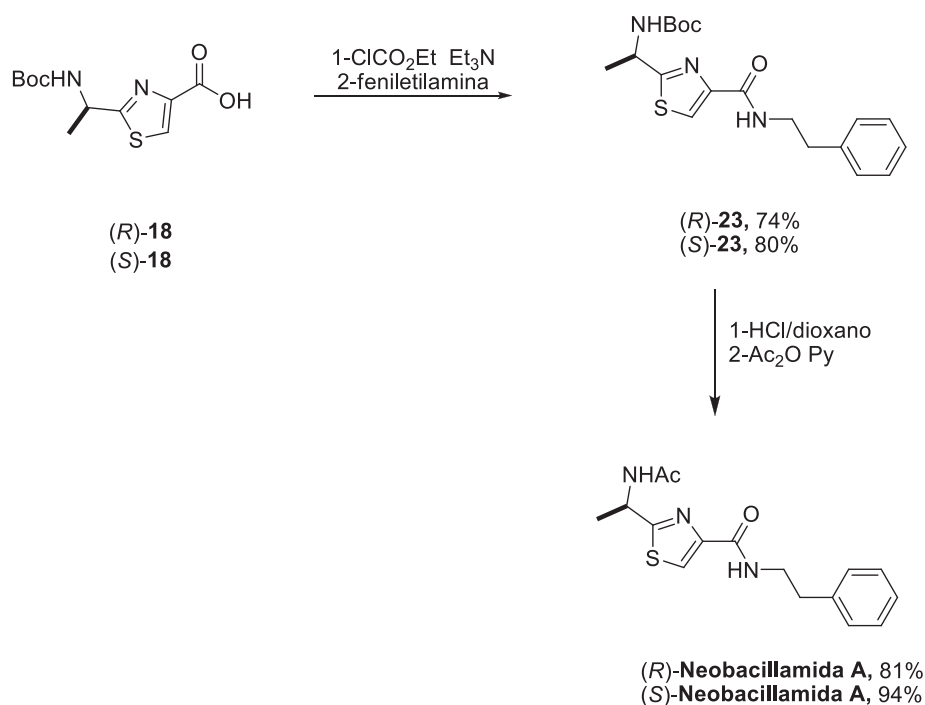
Bacillamida C (21)	Actividad óptica $[\alpha]_D^{24}$	Estructura reportada para la bacillamida C
( <i>R</i> )-21 producto natural	-15.2 ( <i>c</i> 0.082, MeOH).	
( <i>R</i> )-21 sintetizada	+23.11 ( <i>c</i> 4.71, MeOH)	<b>Estructura revisada para la bacillamida C</b>
( <i>S</i> )-21 sintetizada	-23.65 ( <i>c</i> 4.98, MeOH)	

### 3.2.2 Síntesis de la neobacillamida A

La preparación de la (*R*) y la (*S*)- neobacillamida A, se realizó usando la primer metodología que se planteó para preparar la bacillamidas C. Se partió del tiazol N-Boc **18**, con la configuración (*R*) y (*S*) correspondiente, y se acopló con 2-feniletilamina en lugar de triptamina, por el método de anhídrido mixto con cloroformiato de etilo. En un segundo paso a las N-Boc neobacillamidas **23** obtenidas se les desprotegió el grupo amino eliminando el Boc y se N-acetilaron en las condiciones ya mencionadas anteriormente. Ambos enantiómeros se obtuvieron con muy buenos rendimientos (60% y 75% respectivamente a partir del tiazol **18**) Esquema 3.12. En este caso no surgieron problemas con la N-acetilación como en el caso de la bacillamida.

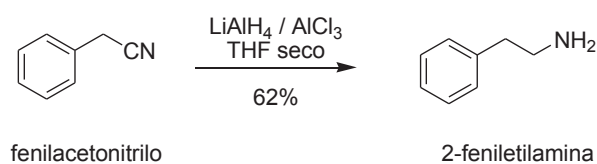
<sup>46</sup> Martínez, V., Davyt, D.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, 24, 1572–1575

### Esquema 3.12 Preparación de neobacillamida A



La 2-feniletilamina se obtuvo a partir del reactivo comercial fenilacetnitrilo, mediante reducción del nitrilo con LiAlH<sub>4</sub> y AlCl<sub>3</sub> en THF seco con un 62% de rendimiento. (Esquema 3.13)

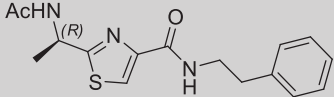
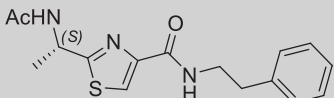
### Esquema 3.13 Preparación de 2-feniletilamina



Ambos enantiómeros fueron caracterizados por RMN, MS e IR coincidiendo con la estructura reportada para el producto natural. Las actividades ópticas medidas resultaron  $[\alpha]^{24}_D = +22.53$  (*c* 7.25, MeOH) para el enantiómero (*R*) y  $[\alpha]^{24}_D = -24.11$  (*c* 7.37, MeOH) para el enantiómero (*S*), coincidiendo esta última con la reportada  $[\alpha]^{24}_D = -16.0$  (*c* 0.10, MeOH). De

esta manera al igual que para la bacillamida C, también se revisó la configuración absoluta de la neobacillamida A de (*R*) a (*S*) (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2** Comparación de Actividades ópticas de Neobacillamida A natural y sintética

Neobacillamida A	Actividad óptica $[\alpha]_D^{24}$	<p data-bbox="1150 600 1410 645"><b>Estructura reportada para la neobacillamida A</b></p>  <p data-bbox="1158 853 1418 898"><b>Estructura revisada para la neobacillamida A</b></p> 
(R)-Neobacillamida A producto natural	-16.0 ( <i>c</i> 0.10, MeOH)	
(R)-Neobacillamida A sintetizada	+22.53 ( <i>c</i> 7.25, MeOH)	
(S)-Neobacillamida A sintetizada	-24.11 ( <i>c</i> 7.37, MeOH)	

*Parte experimental*

**Capítulo 3**



### 3.3 Parte experimental

#### 3.3.1 Procedimientos sintéticos

- *Procedimiento para la hidrólisis del éster*

El tiazol éster (0.35 mmoles), se disuelve en THF (2 ml), se agrega KOH 10% (2 ml) y se agita a temperatura ambiente por una hora. El THF se concentra a vacío, se agrega H<sub>2</sub>O (5 ml), se lleva el pH a 1-2 con HCl 6M y se extrae con AcOEt (3x15 ml). Se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida para obtener el tiazol ácido.

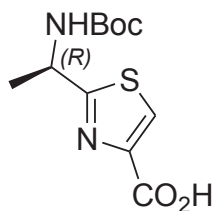
- *Procedimiento para la desprotección del Boc*

Bajo corriente de N<sub>2</sub> se disuelve el compuesto protegido N-Boc (0.32 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5ml). En baño de hielo se agrega una solución de HCl en dioxano 2.4 mmol/ml (3.95ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente toda la noche. El solvente se elimina a presión reducida, obteniéndose el clorhidrato de la amina correspondiente.

- *Procedimiento para la N-acetilación.*

Bajo corriente de N<sub>2</sub> se disuelve la amina (1.12 mmoles) en piridina seca (2ml). En baño de hielo se agrega el anhídrido acético (11.23 mmoles, 1.06 ml) y se agita a temperatura ambiente por 24 horas. Se agrega hielo y se agita por 30 minutos. Se extrae con AcOEt (4x20ml), se lava con HCl 5%, se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida, obteniéndose el tiazol N-acetilado.

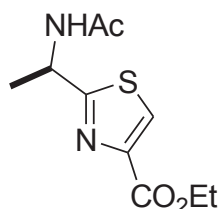
- *Preparación de (R) -2- (1- (terc-butoxicarbonilamino) etil) tiazol-4-carboxílico (R)-18*



Este compuesto se prepara a partir del tiazol (R)-16 utilizando el procedimiento de hidrólisis del éster y se obtiene como un aceite transparente.

**Rendimiento:** cuantitativo,  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.21 (s, 1H), 5.26 (br s, 1H), 5.12 (br s, 1H), 1.63 (d,  $J$  6.9 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H),  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 175.48, 163.99, 155.16, 146.45, 128.57, 80.62, 48.93, 28.42, 21.70.

- *Preparación de 2- (1-acetamidoetil) tiazol-4-carboxilato de etilo 21*



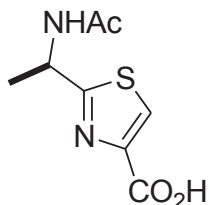
Este compuesto se prepara a partir del tiazol (R)-16 utilizando el procedimiento para eliminar el Boc, seguido del procedimiento para la N-acetilación. El producto se obtiene como un aceite de color marrón.

**(R)-21: Rendimiento:** 84% (2 pasos),  $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = +29.1$  ( $c$  0.47,  $\text{CHCl}_3$ ); **IR**  $n_{\text{max}}$  (NaCl) 3264 (br), 2985, 1720, 1655, 1373, 1219, 1022, 764  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.09 (s, 1H), 6.66 (m, 1H), 5.42 (p,  $J$  7.05 Hz, 1H), 4.41 (q,  $J$  7.11 Hz, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.63 (d,  $J$  6.93 Hz, 3H), 1.39 (t,  $J$  7.11 Hz, 3H),  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 172.67, 170.22, 161.13, 146.81, 127.37, 61.55, 47.20, 22.97, 21.72, 14.28.



(S)-**21**: **Rendimiento**: 91% (dos pasos),  $[\alpha]^{24D} = -50.5$  (*c* 0.45, CHCl<sub>3</sub>); los espectros de IR, <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN son idénticos a los obtenidos para (R)-**21**

- *Preparación de 2-(1-acetamidoetil) tiazol-4-carboxílico 22*



Este compuesto se prepara a partir del tiazol **21** usando el procedimiento de hidrólisis del ester. El producto se obtiene como un aceite color caramelo.

(R)-**22**: **Rendimiento**: 74%, <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, (acetona-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.30 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 5.32 (m, 1H), 1.98 (d, *J* 4.9 Hz, 3H), 1.59 (d, *J* 7.0 Hz, 3H); <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O) δ (ppm) 174.82, 169.19, 161.35, 146.99, 127.79, 46.98, 21.80, 19.85.

(S)-**22**: **Rendimiento**: 72%, los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN son idénticos a los obtenidos para (R)-**22**

- *Procedimientos para la formación del enlace amida en bacillamidas*

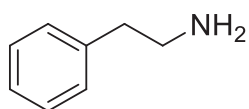
#### *Procedimiento 1*

Bajo atmosfera de N<sub>2</sub>, se disuelve el tiazol ácido (0.17 mmoles), THF seco (4 ml), se enfría la reacción a -5°C, se agrega la trietilamina (0.17 mmoles) y el cloroformiato de etilo (0.17 mmoles). Se agita la mezcla de reacción por una hora (hasta que por TLC no se observa más el reactivo, y se ve la formación del anhídrido mixto), se lleva a temperatura ambiente. Se agrega la triptamina o la 2-feniletilamina (0.20 mmoles) y se agita a 60°C por cuatro horas. La reacción se deja agitando a temperatura ambiente por 48 horas. Se agrega AcOEt (15 ml), se filtra el sólido (sal de TEA) y se lava con KHCO<sub>3</sub> 5% (15 ml), H<sub>2</sub>O (15 ml), HCl 5% (15 ml) y H<sub>2</sub>O (15 ml), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida. El producto se purifica según corresponda.

### Procedimiento 2

A una solución del tiazol ácido (0.38mmol) y triptamina o 2-feniletilamina según corresponda (0.45mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, se agrega el agente acoplante HBTU (0.45mmol), DIPEA (0.84mmol) y 4-DMAP (catalizador). La mezcla de reacción es llevada a temperatura ambiente y se agita por 6 horas. A la solución resultante se le agrega HCl 5% (10 ml) y se extrae con AcOEt (20mlx3). La fase orgánica se lava con una solución de NaHCO<sub>3</sub> y se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El solvente se elimina a presión reducida y el producto se purifica según corresponda.

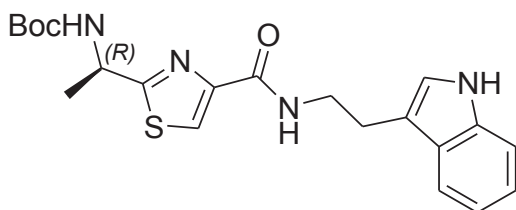
- *Preparación de 2-feniletilamina*



Bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se prepara una solución de AlH<sub>4</sub>Li (0.9ml, 3.20 mmoles) en THF seco (10 ml), la solución se lleva a 0°C, se agrega AlCl<sub>3</sub> (0.43g, 3.20 mmoles) y se agita por 5 minutos. Se agrega fenilacetnitrilo (0.25g, 2.18 mmoles) a la mezcla de reacción y se agita por 1 hora a 0°C y luego a temperatura ambiente por 12 horas. Se agrega H<sub>2</sub>O fría (0°C), y se agita por 20 minutos, se agrega H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M (20 ml) y se lleva a pH=11 con NaOH. Se filtra a vacío el coloide formado y el filtrado se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 20 ml), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el solvente se elimina a presión reducida. El producto se obtiene como un aceite de color amarillo.

**Rendimiento:** 62%.

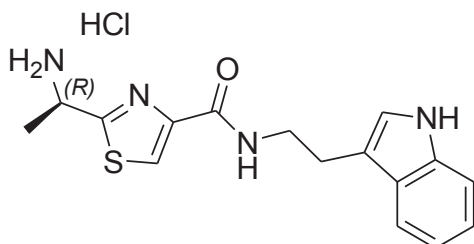
- *Preparación de (R)-etilcarbamato de terc-butilo 1-(4-(2-(1H-indol-3-il) etilcarbamoil) tiazol-2-il) (R)-19*



El compuesto se prepara a partir del tiazol (*R*)-**18** y triptamina usando el procedimiento 1 para la preparación del enlace amida. Se purifica por cromatografía en columna (FM: AcOEt: EP 80:20) y se obtiene el producto como un aceite color caramelo.

**Rendimiento:** 97%, <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.30 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.65 (d, *J* 8.0 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.38 (d, *J* 8.0 Hz, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.12 (td, *J* 11.4, 6.2, 2.7 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 5.03 (s, 1H), 3.76 (br s, 2H), 3.08 (t, *J* 6.9 Hz, 2H), 1.52 (d, *J* 6.9 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H); <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.89, 161.11, 154.92, 149.93, 136.53, 127.32, 122.92, 122.11, 119.53, 118.80, 112.93, 111.37, 80.55, 48.74, 39.83, 28.68, 25.62, 21.62.

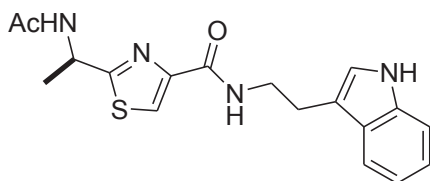
*Preparación de (R) -N- (2- (1H-indol-3-il) etil) -2- (1-aminoetil) tiazol-4-carboxamida clorhidrato (R)-20*



El compuesto se prepara a partir de (*R*)-**19** usando el procedimiento de desprotección del Boc y se obtiene el producto como un sólido amorfo de color blanco.

**Rendimiento:** 87%,  $[\alpha]^{20}_D = +12.5$  (c 0.745, MeOH), <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 8.28 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.59 (d, *J* 7.9 Hz, 1H), 7.33 (m, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.08 (m, 1H), 6.99 (td, *J* 7.9, 7.1, 1.0 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.72 (t, *J* 7.3 Hz, 2H), 3.08 (t, *J* 7.2 Hz, 2H), 1.73 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, MeOD) δ 168.57, 138.21, 128.75, 126.32, 123.49, 122.39, 119.63, 119.28, 112.98, 112.29, 79.48, 41.49, 26.36, 20.52, 20.09.

- Preparación de ***bacillamida C***

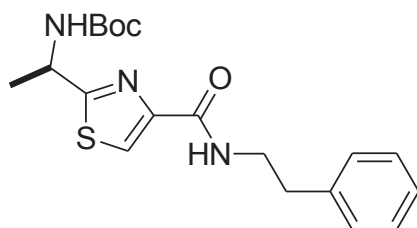


El compuesto se prepara usando el procedimiento **2** para la formación del enlace amida a partir del tiazol **22** y triptamina. El producto se purifica por columna (FM AcOEt:EP 70:30 + 5% MeOH) y se obtiene como un aceite de color marrón.

**(R)-bacillamida C: Rendimiento: 29%,  $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = +23.1$  (c 4.71, MeOH); IR**  $\nu_{\text{max}}$  (NaCl) 3283 (br), 2978, 1928, 1655, 1547, 1493, 1439, 1265, 1042, 741  $\text{cm}^{-1}$ ;  **$^1\text{H-RMN}$**  (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 10.83 (s, 1H), 8.71 (d, *J* 7.6 Hz, 1H), 8.40 (t, *J* 6.0 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.61 (d, *J* 7.9 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* 8.05 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* 2.3 Hz, 1H), 7.06 (m, 1H), 6.98 (m, 1H), 5.15 (p, *J* 7.1 Hz, 1H), 3.54 (dd, *J* 14.6, 6.6 Hz, 2H), 2.94 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.50 (d, *J* 7.0 Hz, 3H);  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (100 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 175.02, 169.04, 160.29, 149.68, 136.18, 127.15, 123.12, 122.50, 120.88, 118.32, 118.14, 111.65, 111.28, 46.66, 39.78, 25.23, 22.40, 20.38; **HRMS ESI:** MH<sup>+</sup>, encontrada 357.1387, calculada para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S 357.1385.

**(S)-bacillamida C: Rendimiento: 68%,  $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -23.6$  (c 4.99, MeOH);** los espectros de IR, HRMS ESI,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN son idénticos a los obtenidos para la **(R)-bacillamida C**.

- Preparación de **etilcarbamato de *tert*-butilo 1-(4-(fenetilcarbamoil) tiazol-2-il) 23**

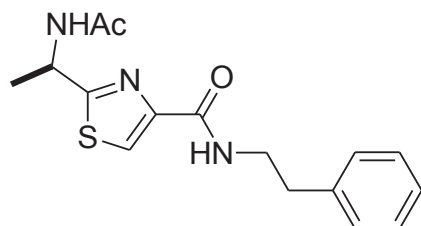


Se prepara usando el procedimiento **1** para la formación del enlace amida a partir del tiazol **18** y 2-feniletilamina, el producto se purifica por cromatografía en columna (FM AcOEt:EP 40:60) y se obtiene como un aceite de color marrón.

**(R)-23: Rendimiento:** 74%,  $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +16.5$  (*c* 0.665, MeOH),  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.02 (s, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.26 (m, 2H), 5.20 (br s, 1H), 5.06 (br s, 1H), 3.70 (dd, *J* 13.9; 6.7 Hz, 2H), 2.94 (t, *J* 7.2 Hz, 2H), 1.58 (d, *J* 6.9 Hz, 3H), 1.48 (s, 9H),  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 174.07, 161.02, 154.91, 149.87, 138.89, 128.85, 128.64, 126.54, 122.87, 80.36, 48.68, 40.62, 35.94, 28.34, 21.57.

**(S)-23: Rendimiento:** 80%,  $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -15.2$  (*c* 0.665, MeOH), los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN son idénticos a los obtenidos para la **(R)-23**.

- *Preparación de neobacillamida A*



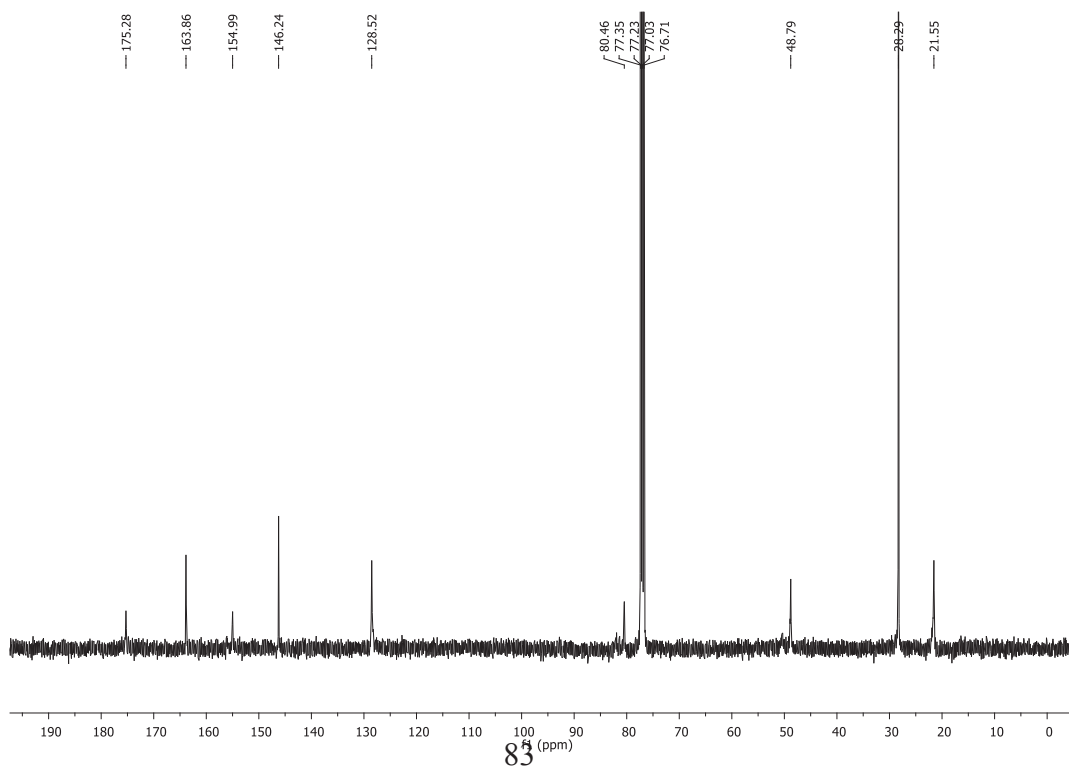
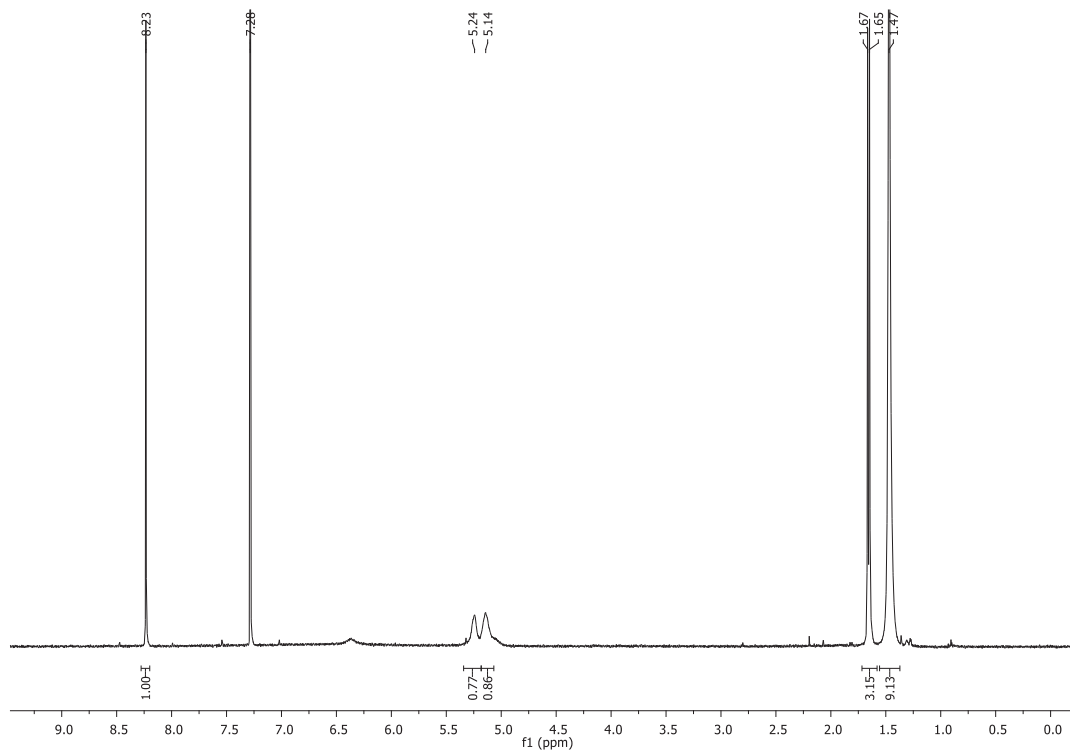
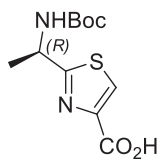
El compuesto se prepara a partir de Neobacillamida N-Boc **23**, usando el procedimiento de eliminación de Boc y luego el procedimiento de N-acetilación.

**(R)-Neobacillamida A: Rendimiento:** 81%,  $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = +22.5$  (*c* 7.25, MeOH); **IR**  $\nu_{\text{max}}$  (NaCl) 3267 (br), 2932, 2859, 1655, 1543, 1493, 1447, 1254, 1042, 748  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.02 (s, 1H), 7.34 (m, 3H), 7.26 (m, 3H), 6.12 (d, *J* 7.9 Hz, 1H), 5.36 (m, 1H), 3.70 (ddd, *J* 13.3, 7.1, 2.1 Hz, 2H), 2.93 (t, *J* 7.1 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.59 (d, *J* 6.9 Hz, 3H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 172.41, 169.46, 160.89, 149.66, 138.82, 128.83, 128.62, 126.54, 123.16, 47.02, 40.55, 35.84, 23.23, 21.38. **HRMS ESI:** MH $^+$ , calculada 316.1198 encontrada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  316.1122.

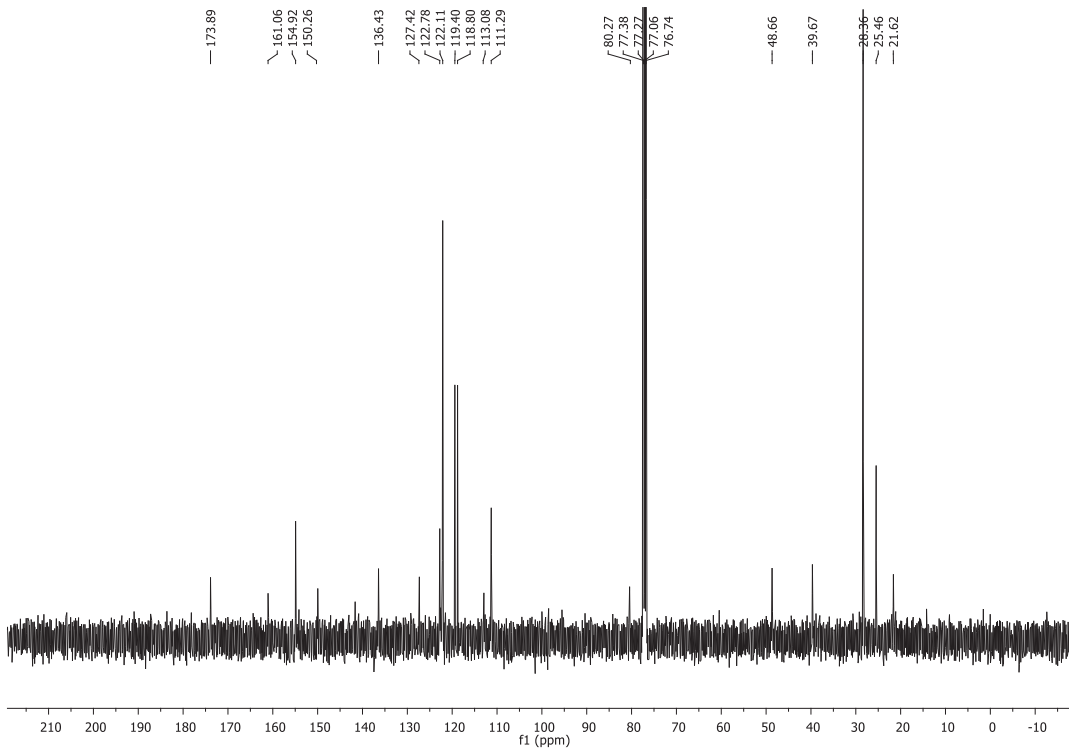
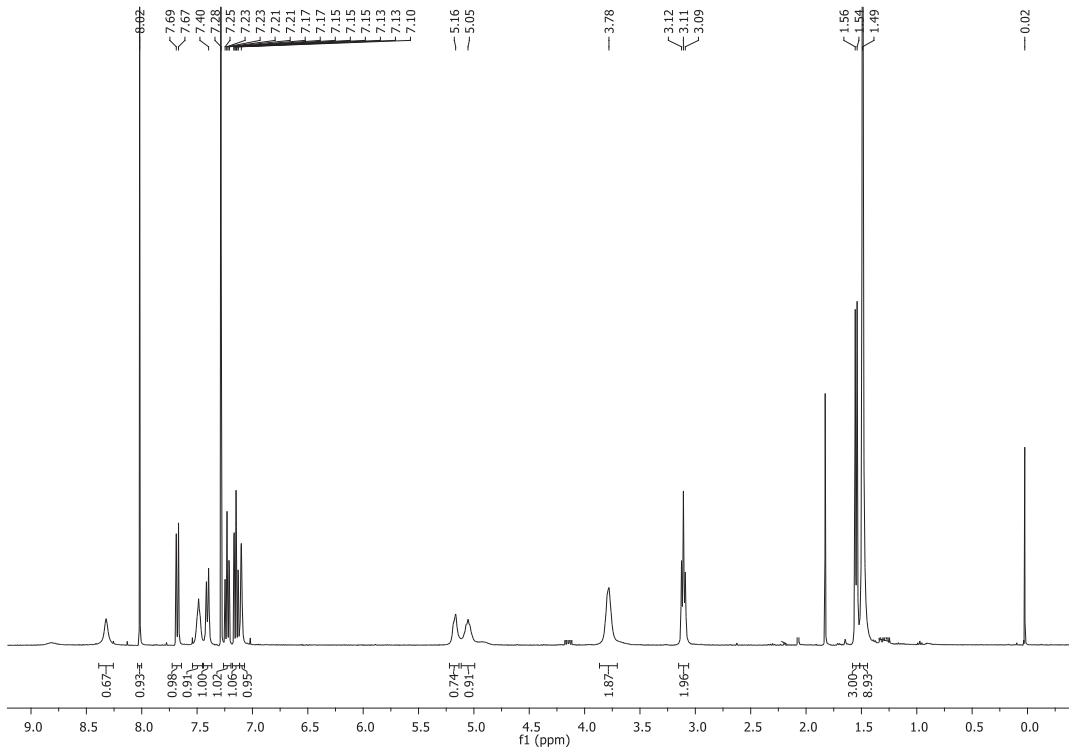
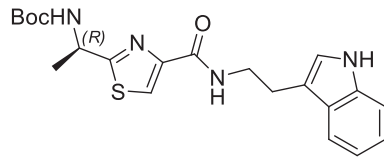
**(S)-neobacillamida A: Rendimiento:** 94%,  $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -24.1$  (c 7.37, MeOH). Los espectros de IR, HRMS ESI,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN son idénticos a los obtenidos para la (*R*)-neobacillamida A.

### 3.3.2 Espectroscopía de RMN

Compuesto 18

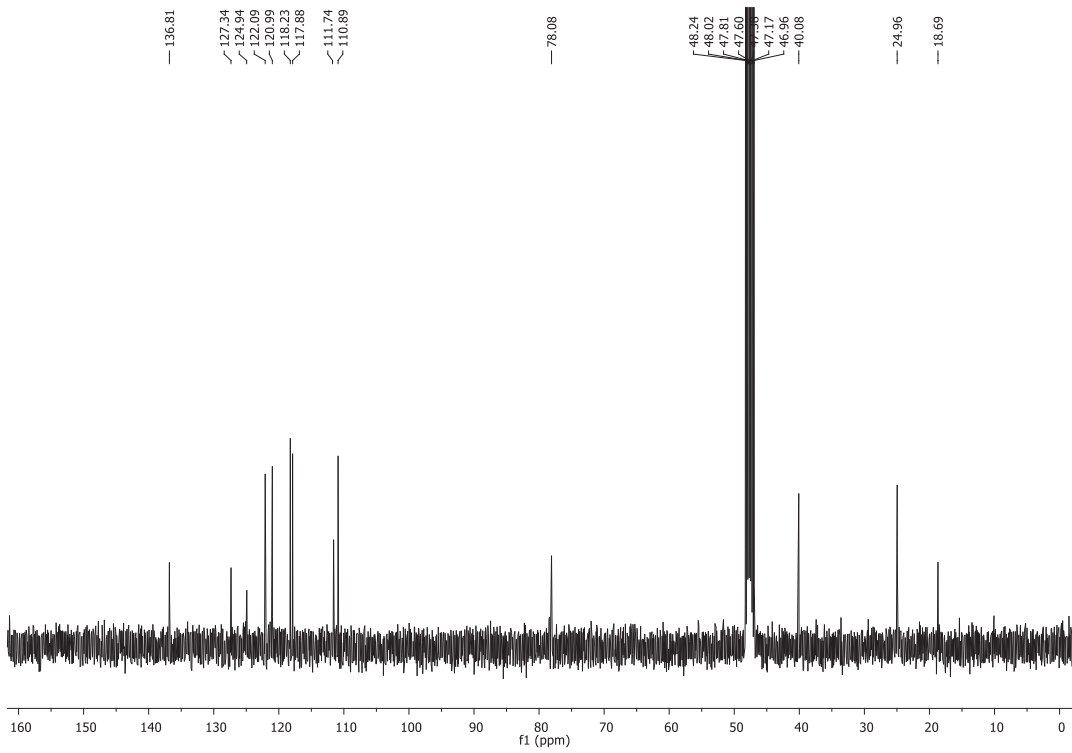
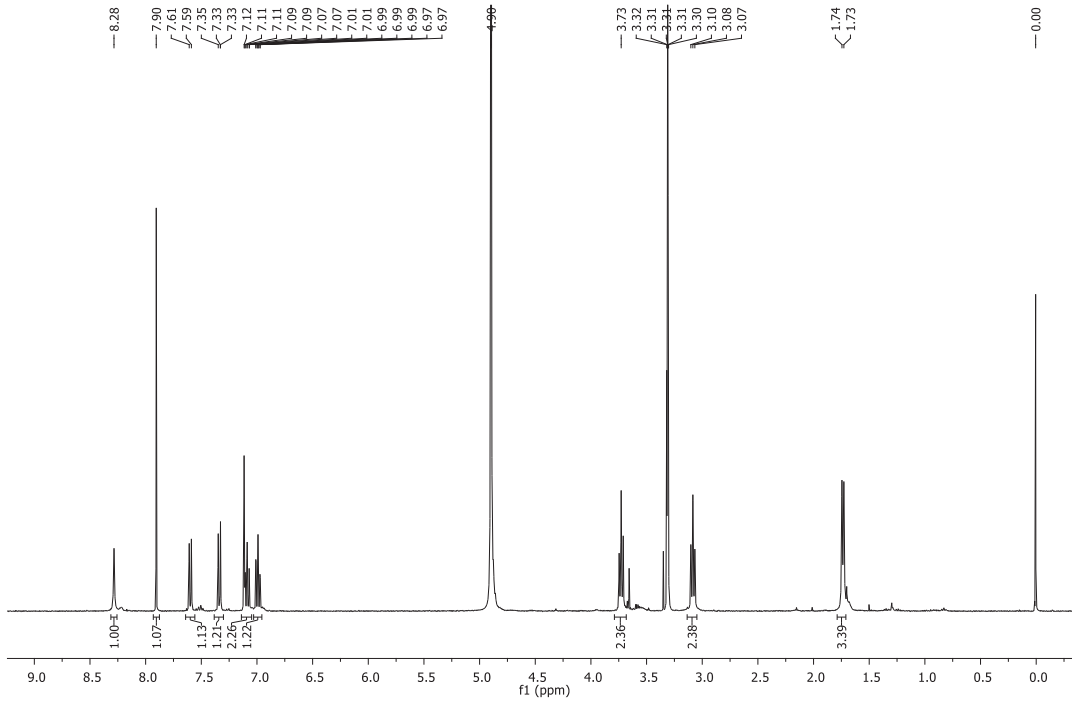
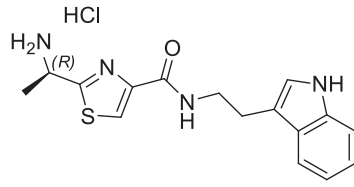


Compuesto 19

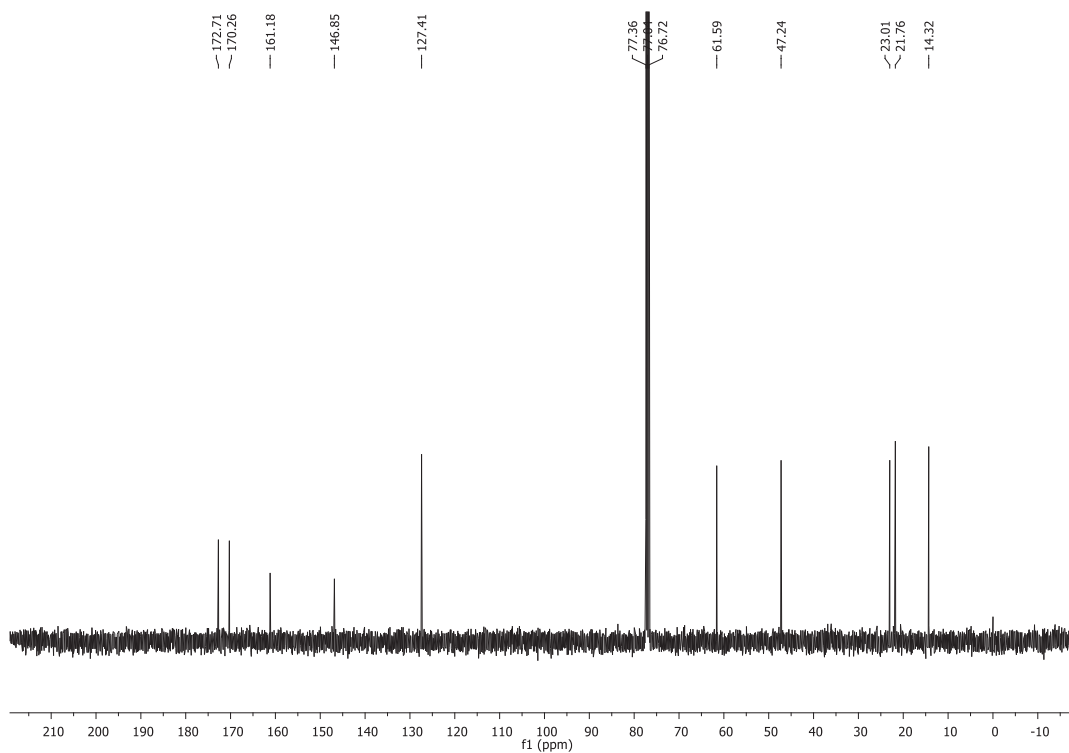
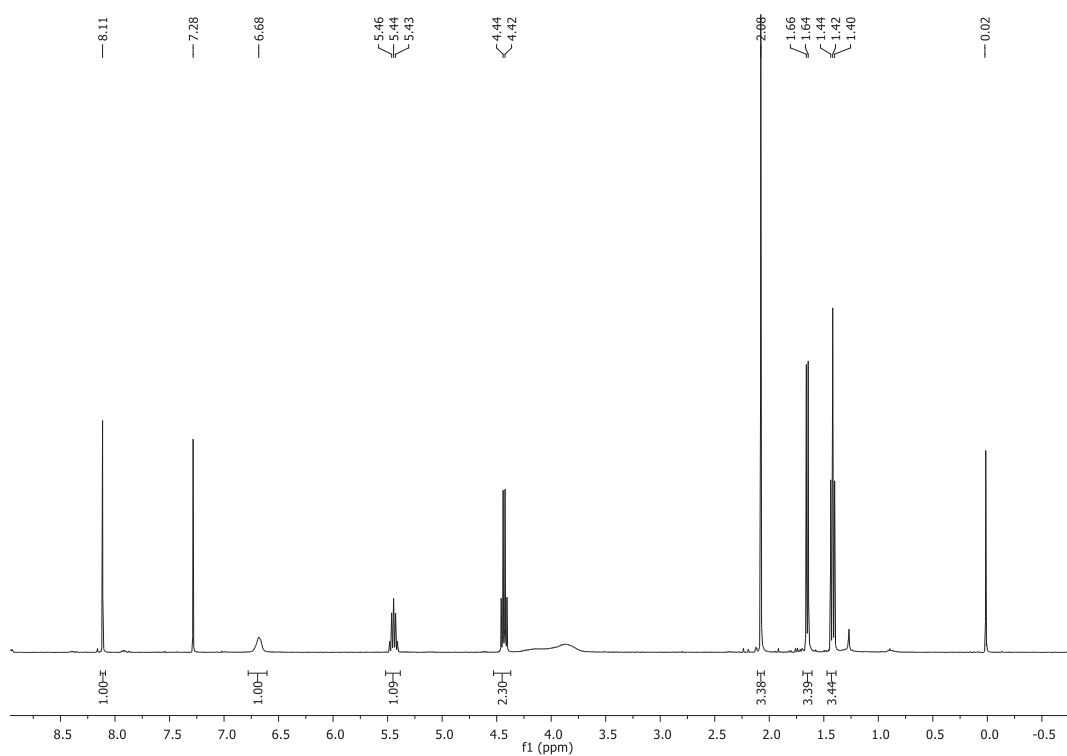
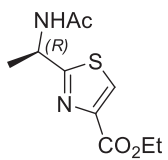




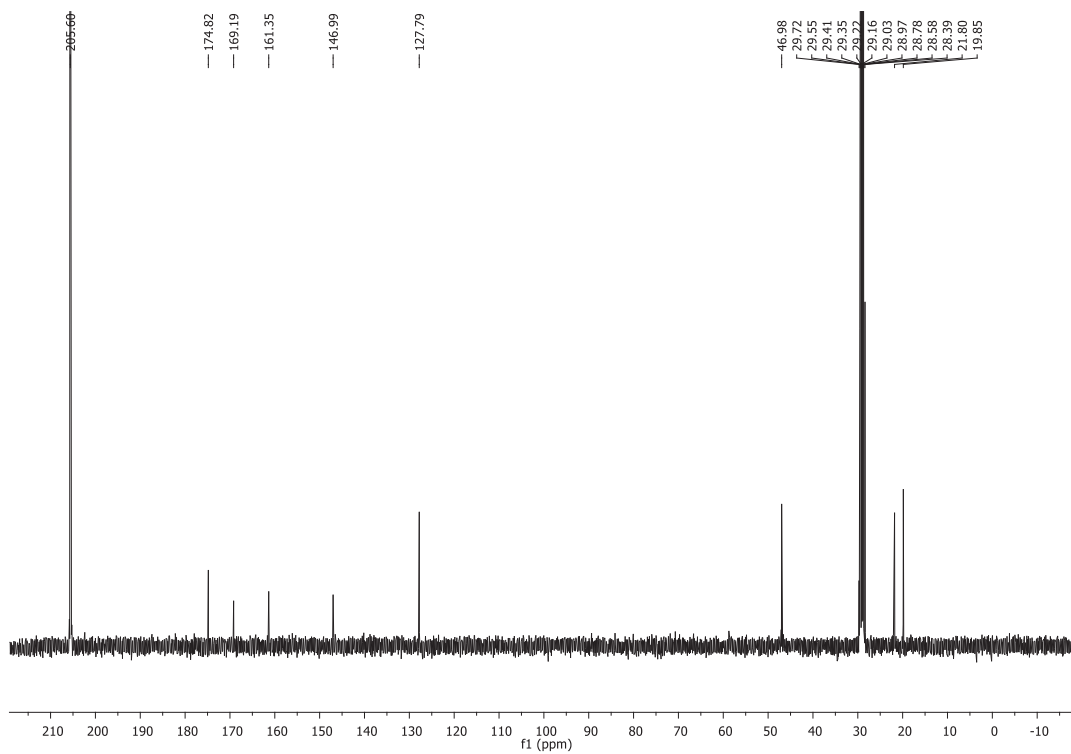
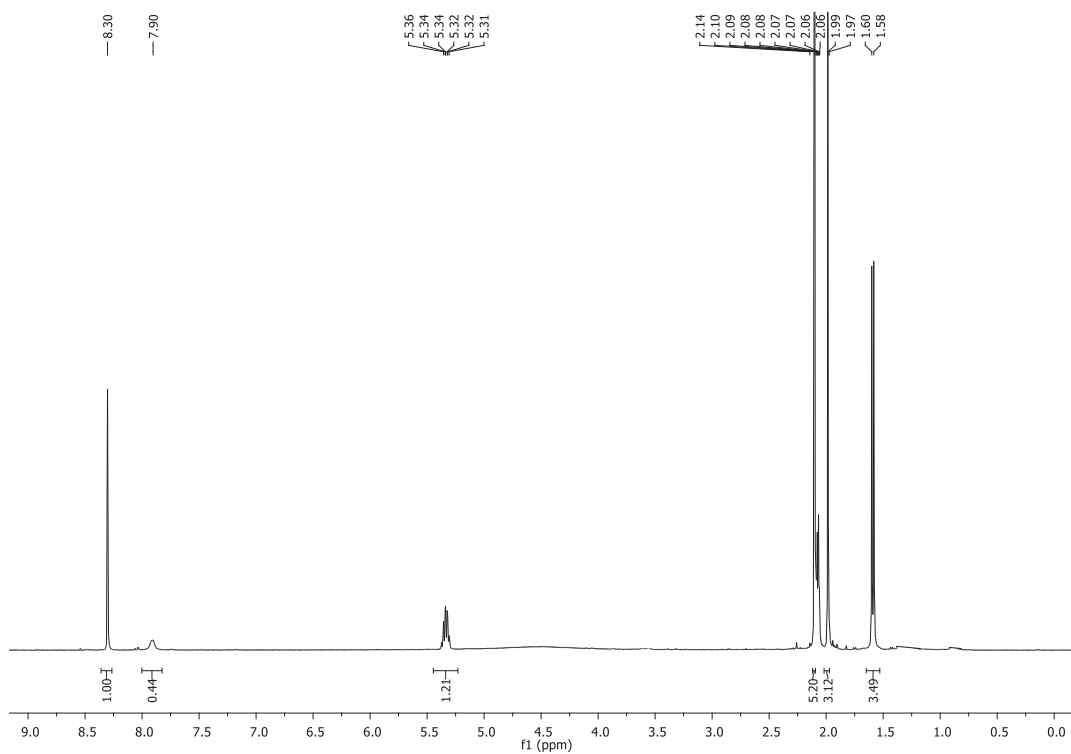
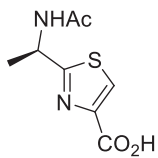
Compuesto 20



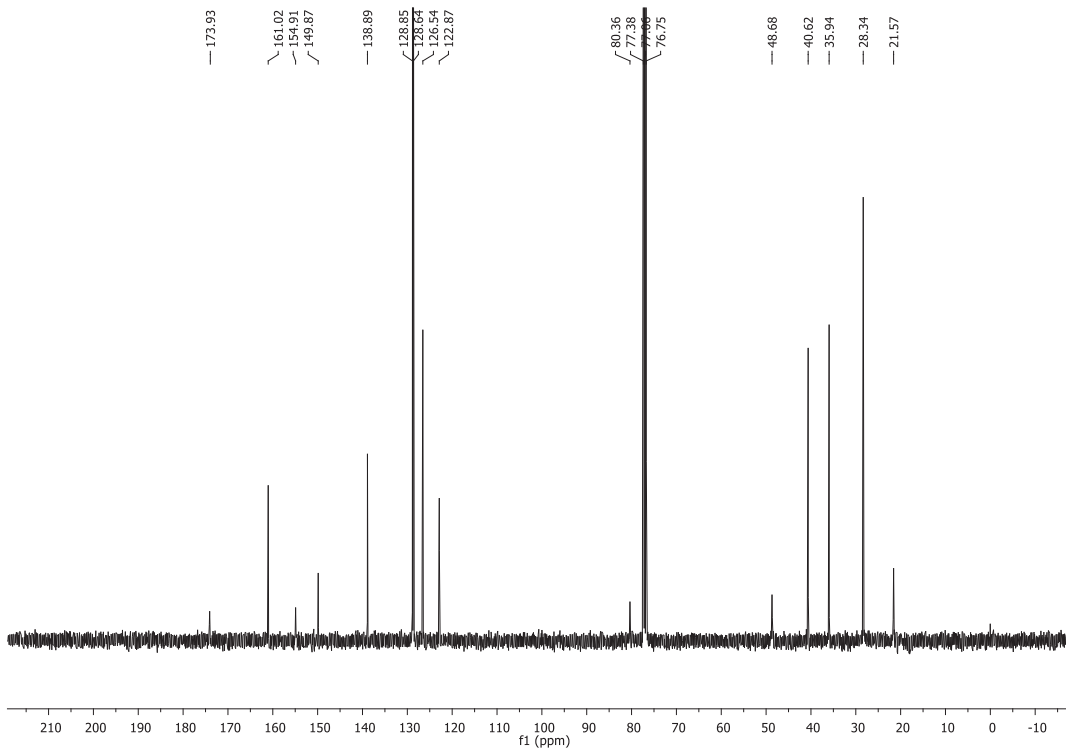
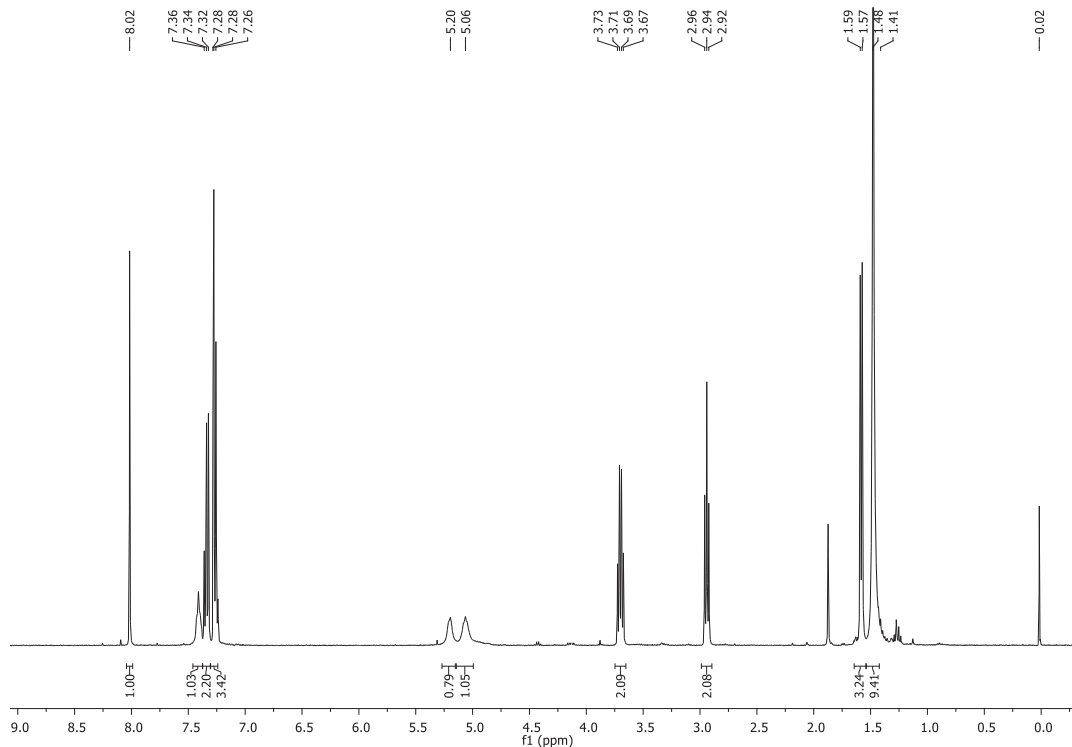
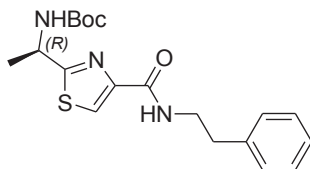
Compuesto 21



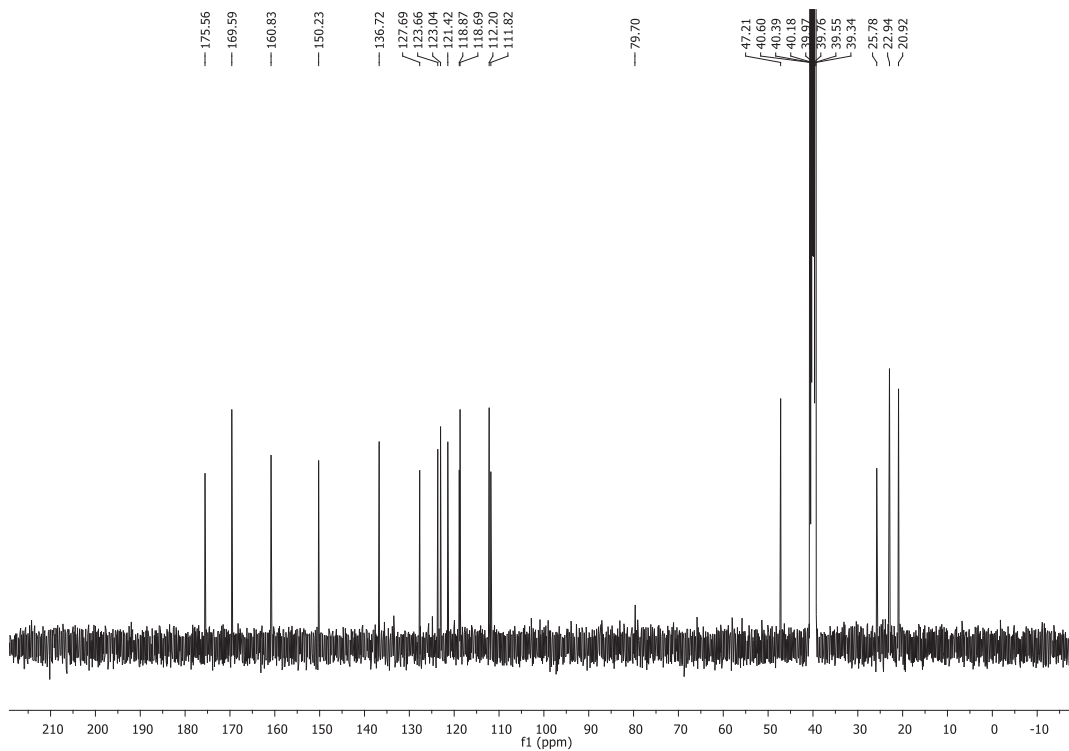
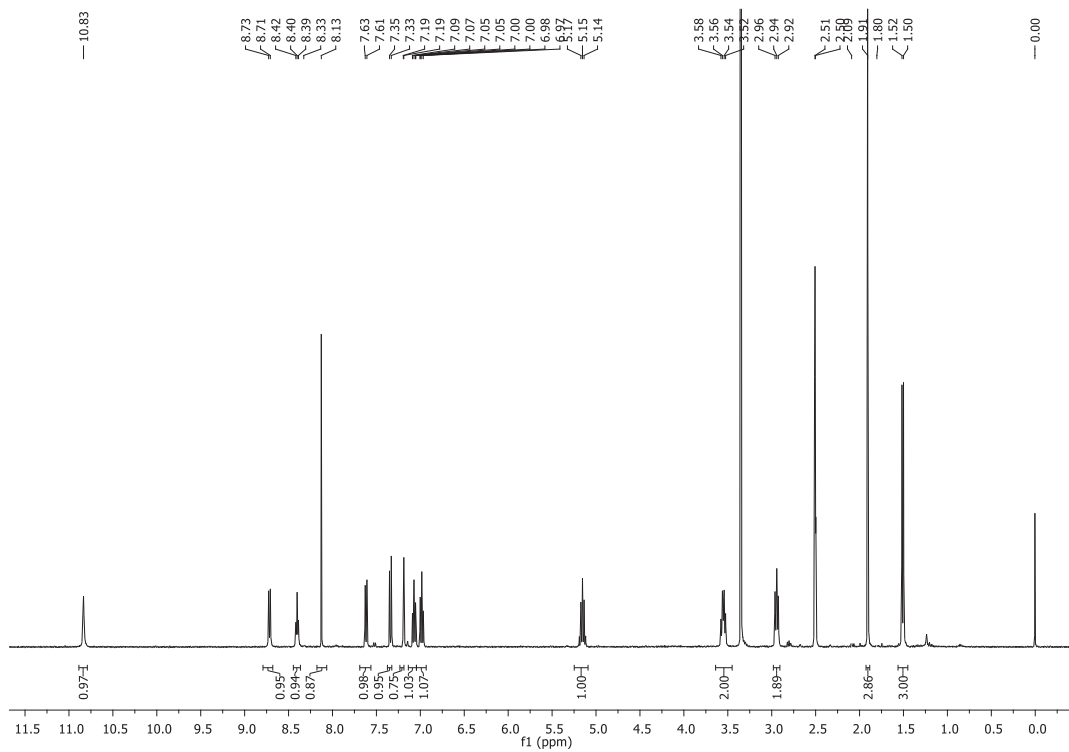
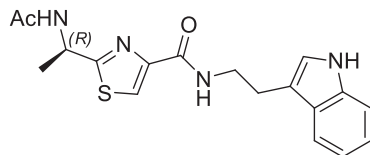
# Compuesto 22



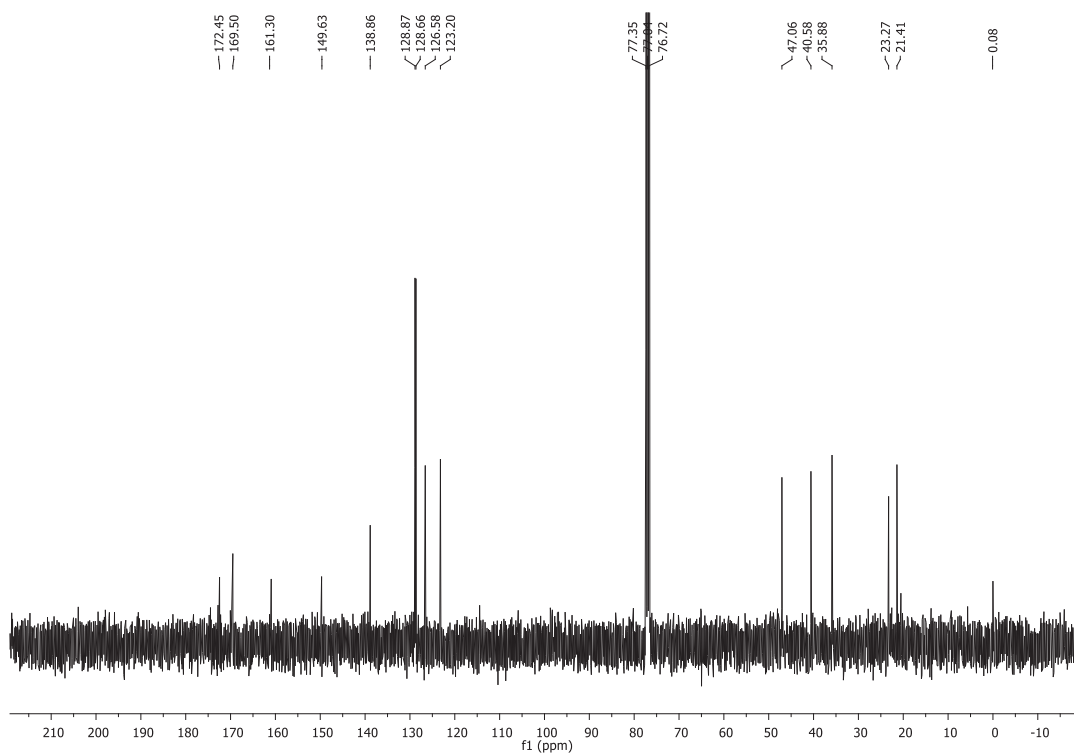
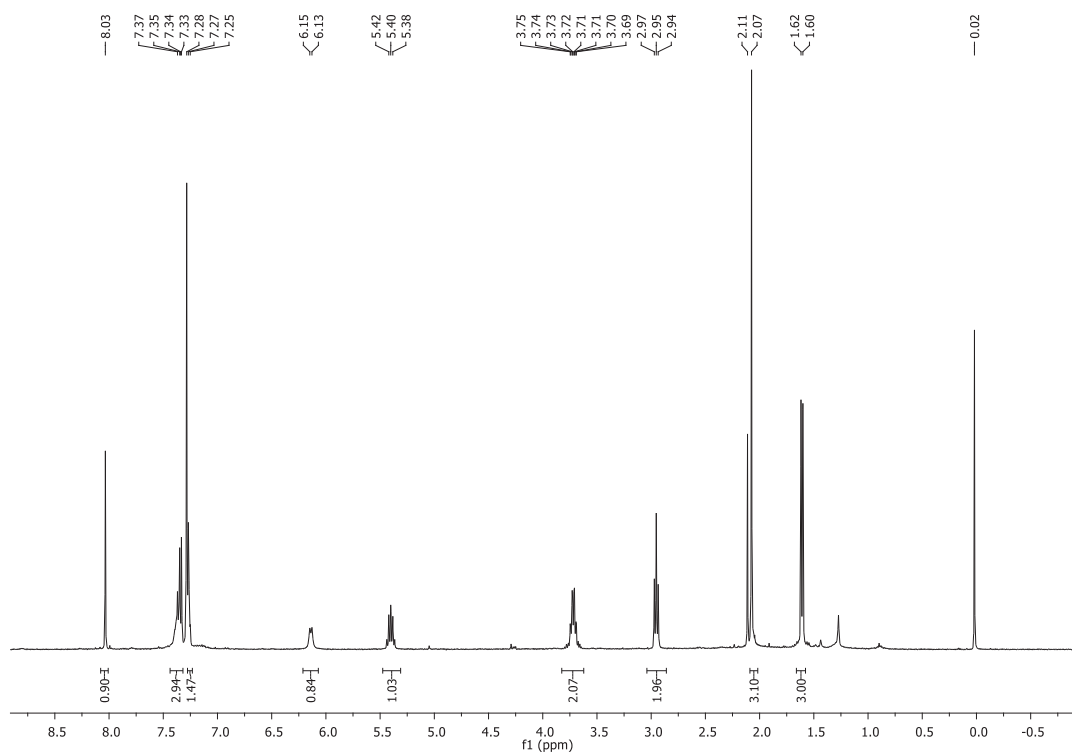
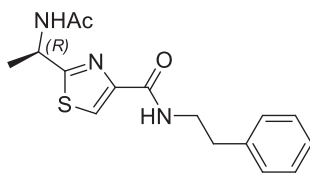
Compuesto 23



# Bacillamida C



# Neobacillamida A



**CAPÍTULO 4**  
**PREPARACIÓN DE ANÁLOGOS DE**  
**BACILLAMIDA C Y NEOBACILLAMIDA A CON EL**  
**ANILLO OXAZOL**





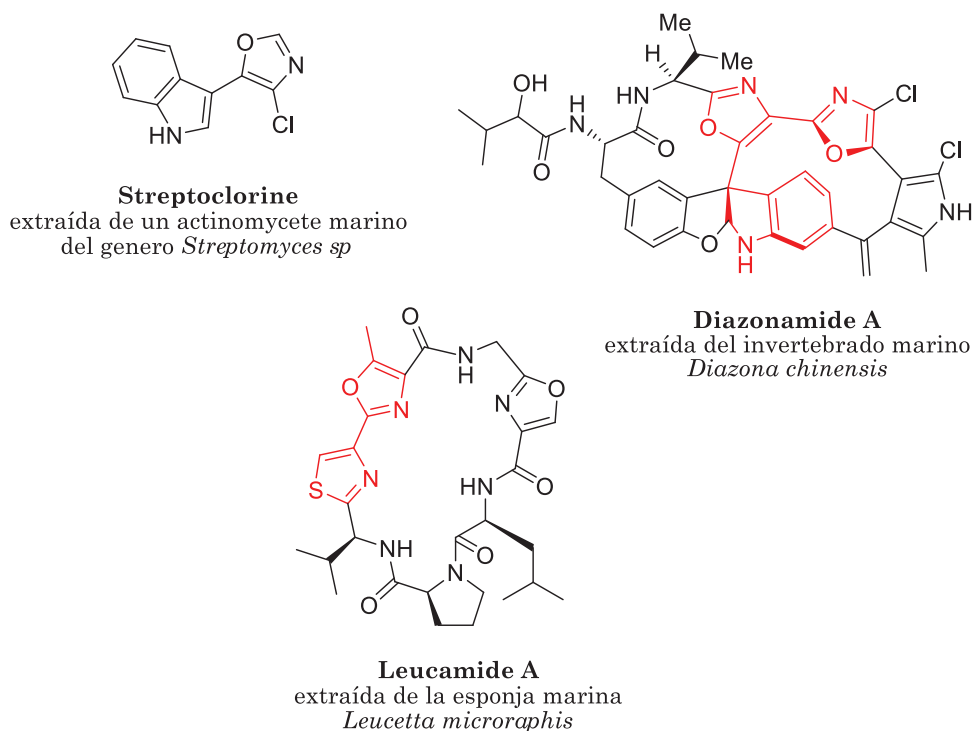
# Capítulo 4. Preparación de análogos de bacillamida C y neobacillamida A con el anillo oxazol

## 4.1 Antecedentes

En las últimas décadas han sido reportados varios productos naturales biológicamente activos, que contienen en su estructura los heterociclos tiazol, oxazol e indol.

Algunos compuestos que presentan actividad citotóxica ya han sido presentados en el capítulo 1, como es el caso de la *streptoclorina* con el motivo oxazol-indol y la *diazonamida A* con el motivo bisoxazol-indol, también está reportado el heptapéptido cíclico *leucamide A*<sup>47</sup>, que presenta el motivo 4,2-bis-heterociclo tiazol-oxazol (Figura4.1).

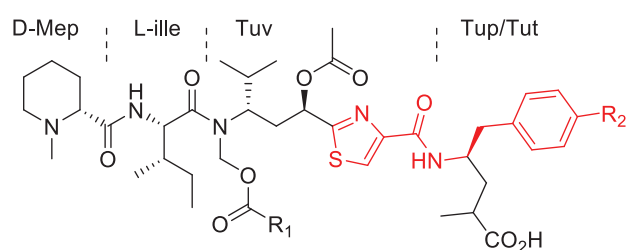
**Figura4.1** Productos naturales con actividad biológica



<sup>47</sup> Kehraus, S., König, G. M., Wright, A. D., *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4989-4992

Otro ejemplo interesante de mencionar es la familia de tetrapéptidos *Tubulysins* A-I, reportados por Sasse *et al.*<sup>48</sup> en el año 2000, y aislados de las micobacterias *Archangium gephyra* y *Angiococcus disciformis*. Estos presentan en su estructura el motivo tiazol-tubufenilalanina (Tz-Tup) similar al que presenta la neobacillamida A (Figura4.2). Los miembros de esta familia son potentes inhibidores de la polimerización de la tubulina, lo que provoca una rápida desintegración de los microtúbulos y división celular, induciendo de esta manera a la apoptosis de las células tumorales<sup>49</sup>.

**Figura4.2** Estructura de la familia Tubulysin



**Tubulysin family**

Tubulysin	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
A	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH
B	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH
C	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH
D	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
E	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H
F	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H
G	CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH
H	CH <sub>3</sub>	H
I	CH <sub>3</sub>	OH

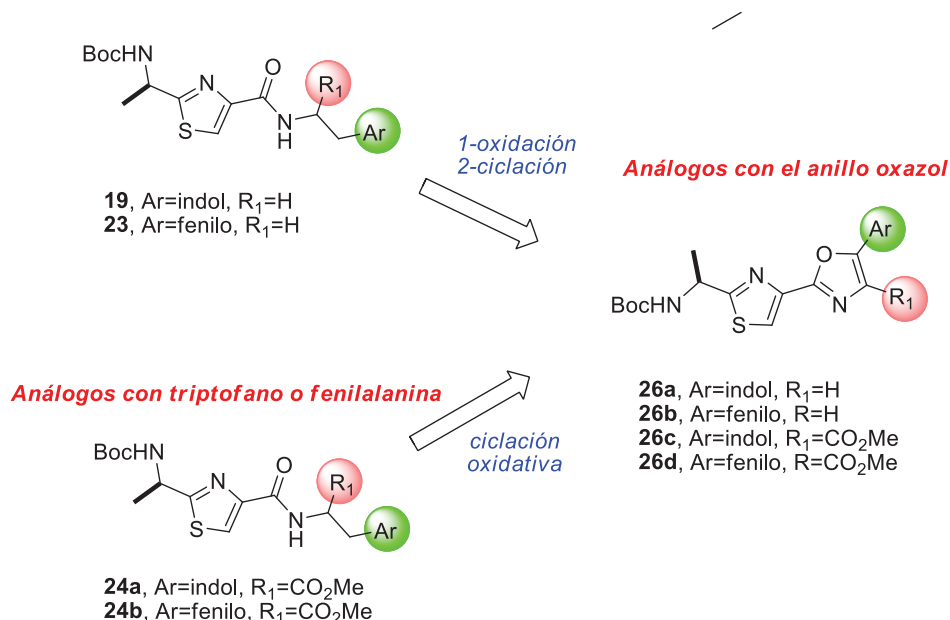
<sup>48</sup> Sasse, F., Steinmetz, H., Heil, J., Hofle, G., Reichenbach, H. *J. Antibiot.* **2000**, 53, 879-885

<sup>49</sup> Balasubramanian, R., Raghavan, B., Begaye, A., Sackett, D. L., Fecik, R. A., *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 238-240

## 4.2 Resultados y discusión

En la búsqueda de nuevos compuestos que puedan presentar actividad biológica en este trabajo se planteó preparar diferentes análogos de las bacillamidas incorporando el anillo oxazol entre los anillos Tiazol-indol o Tiazol-fenilo. También se planteó preparar análogos en donde se intercambia la triptamina por triptófano metil éster y la feniletilamina por fenilalanina metil éster. La estructura general de estos análogos así como la ruta sintética planteada para su obtención se muestran en el Esquema 4.1.

**Esquema 4.1.** Estructura general de los análogos de bacillamidas

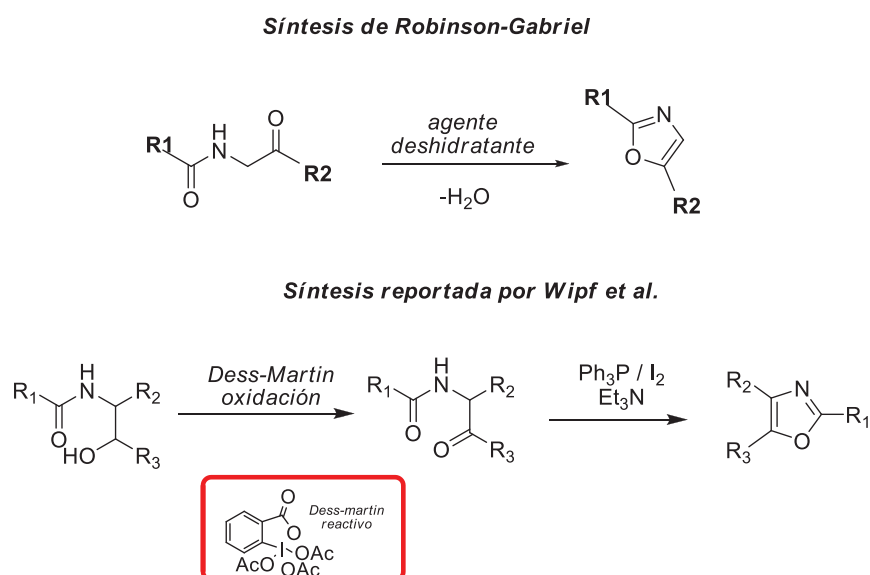


### 4.2.1. Preparación de análogos de bacillamidas con el anillo oxazol

Existen varios procedimientos reportados para la formación del anillo oxazol. Uno de los métodos clásicos para la síntesis de oxazoles es la síntesis de Robinson-Gabriel que involucra una ciclodeshidratación de  $\alpha$ -acilamino cetonas, ésteres, o amidas. Entre los agentes deshidratantes más usados se encuentran POCl<sub>3</sub>, SOCl<sub>2</sub>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, entre otros. Otra forma de preparar oxazoles eficientemente y con altos rendimientos a partir de  $\beta$ -

hidroxiamidas es reportada por Wipf *et al.*<sup>50</sup>, en donde la  $\beta$ -hidroxiamida es oxidada con el reactivo de Dess-Martin y luego la ciclodeshidratación se da con  $\text{Ph}_3\text{P}/\text{I}_2$  (Esquema 4.2)

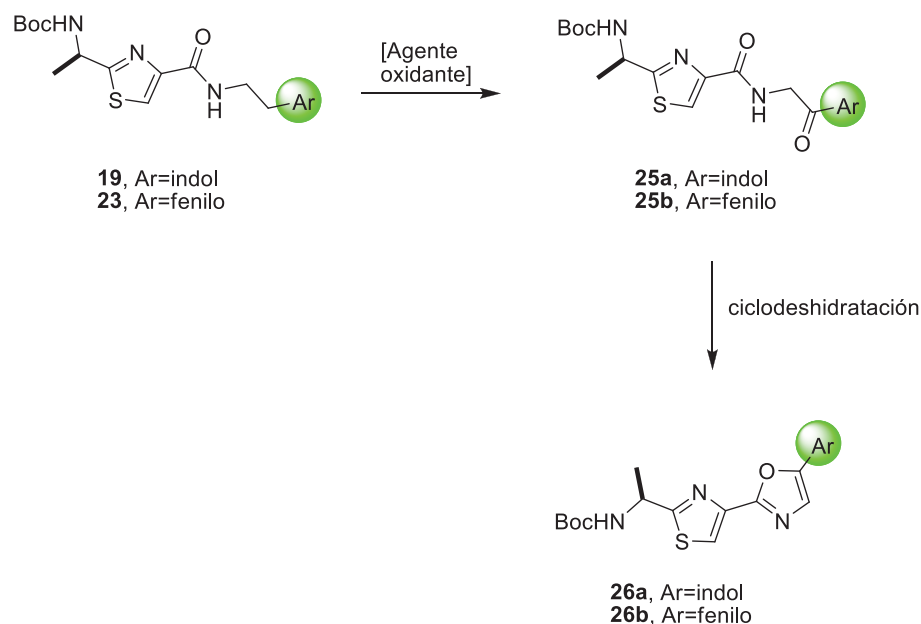
### Esquema 4.2. Síntesis de oxazoles



Teniendo en cuenta estos antecedentes, la estrategia que nos planteamos para obtener los análogos con el anillo oxazol, partiendo de los intermedios N-Boc de las bacillamidas obtenidas anteriormente, se muestra en el Esquema 4.3.

<sup>50</sup> Wipf, P., Miller, C. P., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 3604-3606

### Esquema 4.3 Preparación de los análogos de bacillamidas



En donde proponemos como primer paso la oxidación de las bacillamidas para obtener las  $\beta$ -cetoamidas correspondientes y como segundo paso la ciclodeshidratación de las mismas. En primer lugar intentamos obtener las  $\beta$ -cetoamidas por oxidación de los compuestos **19** y **23** respectivamente. Para ello se usó como agente oxidante DDQ en medio THF/H<sub>2</sub>O (9:1)<sup>51</sup>, obteniéndose el compuesto oxidado **25a** derivado de la bacillamida **19** con un 71% de rendimiento, sin embargo en las mismas condiciones no se logró obtener el compuesto oxidado **25b** derivado de la neobacillamida **23** recuperándose el material de partida. La oxidación del compuesto **23** se intentó con una mezcla MnO<sub>2</sub> activado/KMnO<sub>4</sub> (3:1) a temperatura ambiente<sup>52</sup>, en estas condiciones tampoco se obtuvo el producto deseado, recuperándose el material de partida. (Tabla 4.1)

<sup>51</sup> Cain, M., Mantei, R., Cook, J. M., *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 4933-4936.

<sup>52</sup> Shaabani, A., Mirzaei, P., Naderi, S., Lee, D. G., *Tetrahedron*, **2004**, 60, 11415-11420.

**Tabla 4.1.** Condiciones de oxidación

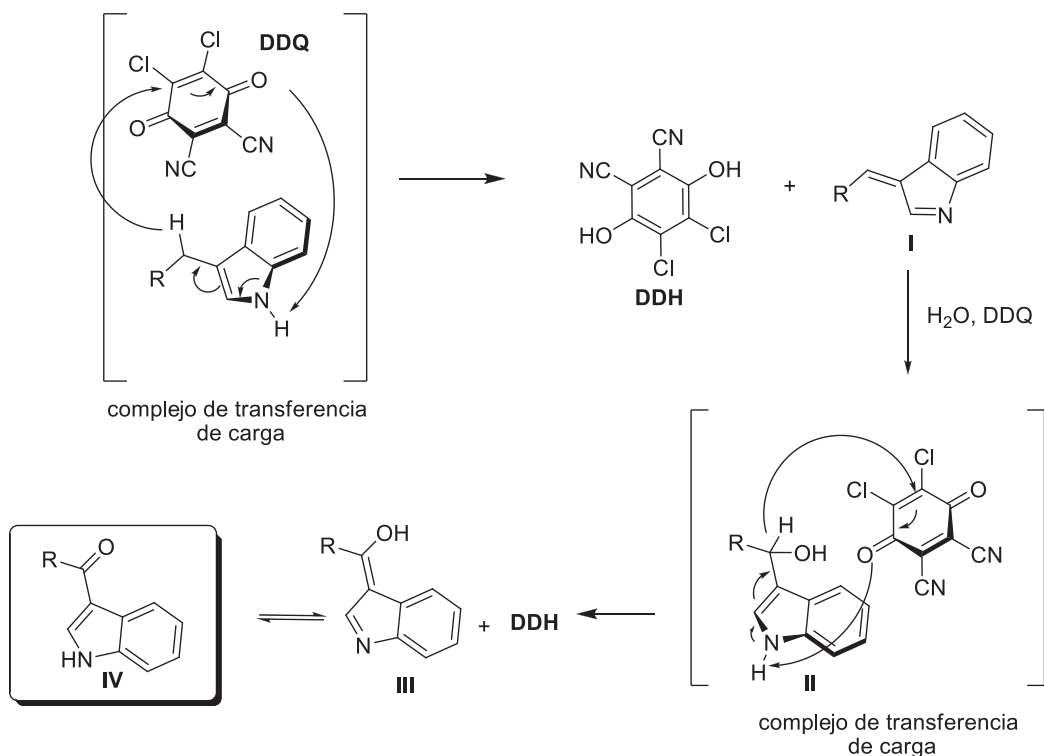
Compuesto de partida	Agente Oxidante	Condiciones	Acilaminocetona (%)
(S)-19	DDQ	THF/H <sub>2</sub> O	(S)-25a, 71%
(S)-23	DDQ	THF/H <sub>2</sub> O	se recupera material de partida
(S)-23	MnO <sub>2</sub> /KMnO <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , TA, 24 hrs	se recupera material de partida

En la oxidación con DDQ, el compuesto con el indol se oxida con un buen rendimiento y sin embargo no se logra oxidar el compuesto con el fenilo. Para explicar esto, vemos el mecanismo involucrado en dicha oxidación, como se detalla en el Esquema 4.4. En el mecanismo planteado por Oikawa *et al.*<sup>53</sup> se pueden diferenciar bien cuatro pasos. El primer paso es la formación de un complejo de transferencia de carga entre el anillo indol y el DDQ donde se transfiere un hidruro y un protón, para dar el intermedio deshidrogenado **I**, luego se da la adición de una molécula de agua por ataque nucleofílico para formar el compuesto **II**, y nuevamente se da la formación de un complejo de transferencia de carga entre **II** y el DDQ, para dar el compuesto deshidrogenado **III**, que por tautomerismo nos da el compuesto oxidado **IV**. Por lo tanto para formar el complejo de transferencia de carga se necesita un compuesto con un anillo aromático aceptor de electrones como el DDQ y un compuesto con un anillo dador de electrones. El anillo indol, es más rico en electrones que el fenilo, lo que explicaría la razón por la cuál no se da la oxidación cuando tenemos un fenilo. Esta oxidación se podría dar si tuviéramos un fenilo sustituido por un grupo dador de electrones en las posiciones orto o para.<sup>54</sup>

<sup>53</sup> Oikawa, Y., Yonemitsu, O., *J. Org. Chem.*, **1977**, 42 (7), 1213-1216.

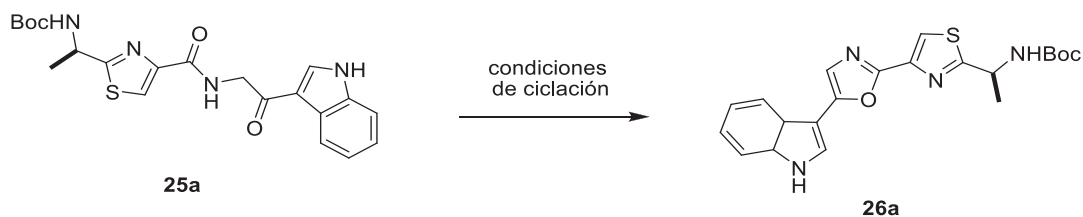
<sup>54</sup> Kalena, G. P., Jadhav, S. M., Banerji, A., *Molecules*, **2000**, 5, 240-244.

### Esquema 4.4. Mecanismo de oxidación con DDQ



Para la preparación del análogo **26a**, que contiene el anillo oxazol, se partió del compuesto oxidado **25a** y se ensayaron dos condiciones de ciclación, la reacción y las condiciones ensayadas se muestran en el Esquema 4.5.

### Esquema 4.5. Preparación del análogo con el anillo oxazol

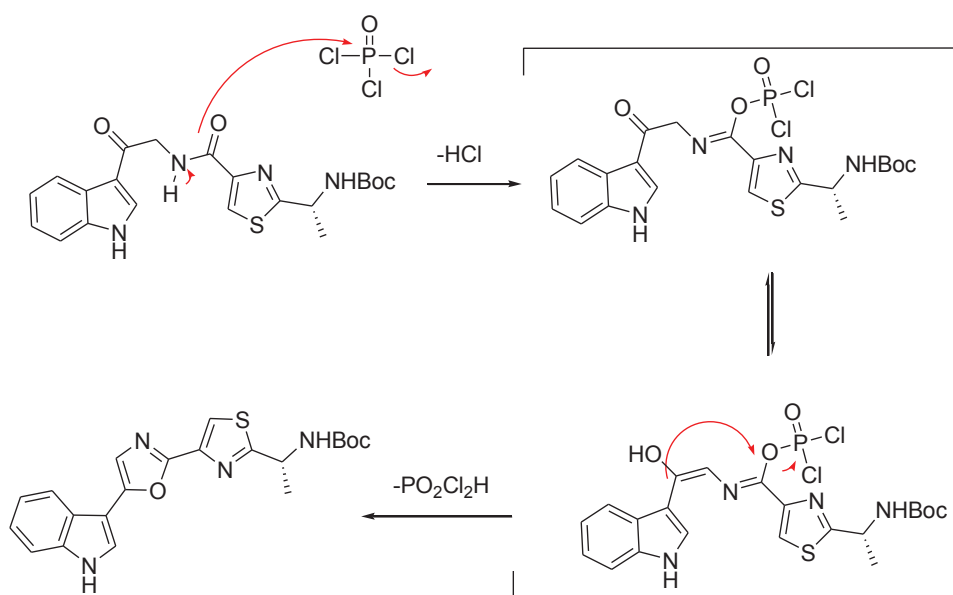


Entrada	Condiciones de ciclación	Producto
1	$\text{PPh}_3/\text{I}_2$ $\text{Et}_3\text{N}$ DCM	No se obtiene
2	$\text{POCl}_3/\text{Py}$	15%

Las primeras condiciones probadas para la ciclación fueron trifenilfosfina en presencia de yodo y a temperatura ambiente, no obteniéndose el producto

deseado, recuperándose solo una sal de trifenilfosfina, y un producto no identificado. Las segundas condiciones que se ensayaron fueron las de Robinson-Gabriel, usando como agente ciclodeshidratante  $\text{POCl}_3$  en piridina, obteniéndose el producto esperado **26a** aunque con un bajo rendimiento (15%). El mecanismo de Robinson-Gabriel planteado para la formación del anillo 1,3 oxazol por ciclodeshidratación con  $\text{POCl}_3$  se muestra en Esquema 4.6<sup>55</sup>.

**Esquema 4.6.** Mecanismo de Robinson-Gabriel



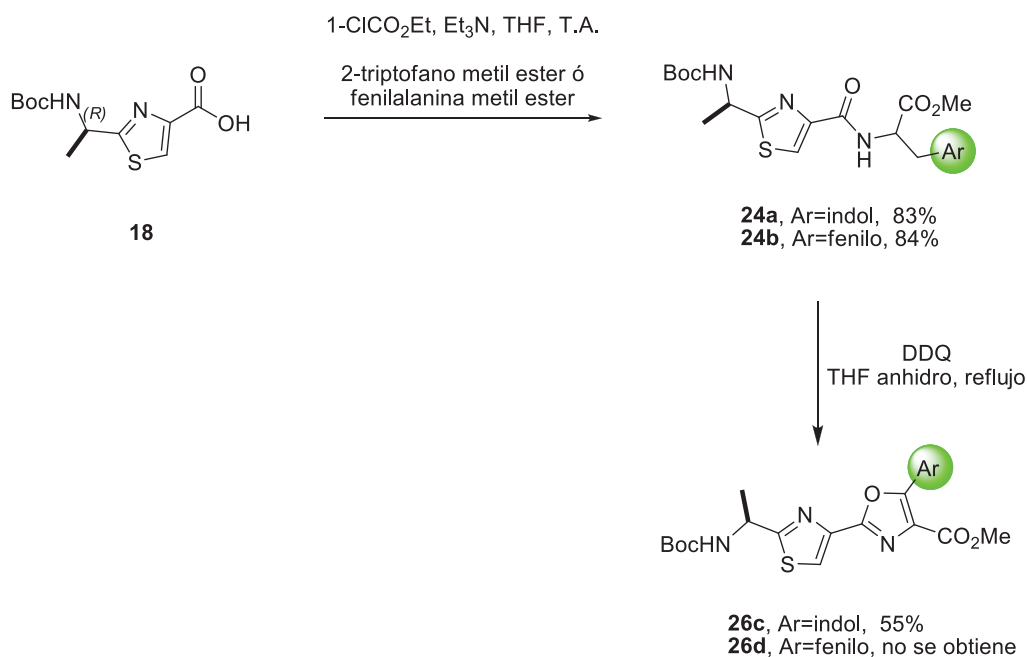
#### 4.2.2. Preparación de análogos de bacillamidas con triptófano y fenilalanina

Para este tipo de análogos de las bacillamidas se planteo primero intercambiar la triptamina por triptófano metil éster y la feniletilamina por fenilalanina metil ester y luego formar el anillo oxazol en un solo paso vía ciclación oxidativa con  $\text{DDQ}$ <sup>47</sup> como se muestra en el Esquema 4.7.

<sup>55</sup> Wasserman, H. H., Vinick, F. J., *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 2407–2408.



### Esquema 4.7 Preparación de análogos con triptófano y fenilalanina



El acople del triptófano o la fenilalanina con el bloque tiazol **18** se hizo usando las condiciones ya ensayadas con cloroformiato de etilo, obteniéndose ambos compuestos con un rendimiento mayor al 80%. Para la formación del anillo oxazol vía ciclación oxidativa, se usó DDQ en condiciones de reflujo y THF anhidro. En estas condiciones el compuesto **26c** derivado del compuesto con triptófano se obtuvo en un solo paso con un 55% de rendimiento. Sin embargo en las mismas condiciones el compuesto **26d** derivado del compuesto con fenilalanina no se logró obtener, recuperando el compuesto de partida.

En resumen se logró obtener dos análogos de la bacillamida C conteniendo el tricyclo tiazol-oxazol-indol y el análogo con triptófano. Para el caso de la Neobacillamida, se obtuvo el análogo con fenilalanina, pero no se pudieron obtener con éxito los análogos conteniendo el tricyclo tiazol-oxazol-fenilo. Se vio que el oxidante DDQ es selectivo para oxidar el carbono  $\alpha$  al indol y no funciona para oxidación bencílica en fenilos no sustituidos. La mezcla MnO<sub>2</sub>/KMnO<sub>4</sub> tampoco funcionó para este tipo de compuestos, por lo que se estudiarán otros agentes oxidantes.



*Parte experimental*

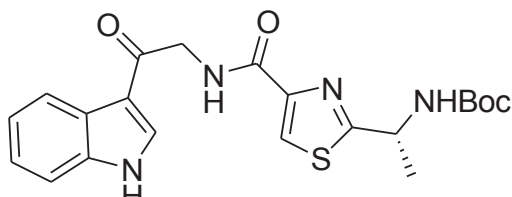
Capítulo 4



## 4.3 Parte experimental

### 4.3.1 Procedimientos sintéticos

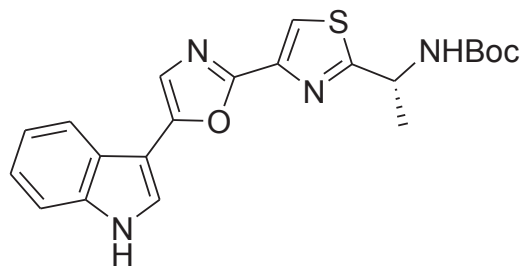
- Preparación (*S*)-*tert*-butil 1-(4-(2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoetilcarbamoil)thiazol-2-il)etilcarbamato (*S*)-**25a**



A una solución de DDQ (0.64 mmoles) en THF/H<sub>2</sub>O (9/1, 2 ml), se le agrega desde un ecualizador gota a gota una solución del compuesto (*S*)-**19** (0.29 mmoles) en THF/H<sub>2</sub>O (9/1, 3.5 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por 3 hrs. El solvente se elimina a presión reducida, al crudo obtenido se le agrega AcOEt (20 ml) y se lava con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (4x15ml) y luego con una solución saturada de NaCl (15 ml). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el solvente a presión reducida, obteniéndose el producto como un aceite color caramelo.

**Rendimiento:** 71%, **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.60 (br s, 1H), 8.36 (m, 2H), 8.04 (s, 1H), 7.97 (d, *J* 2.9Hz, 1H), 7.45 (m, 1H), 7.31 (m, 2H), 5.26 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 4.81 (m, 2H), 1.66 (d, *J* 6.9Hz, 3H), 1.51 (s, 9H), **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 188.93, 173.93, 161.26, 149.35, 136.37, 131.64, 125.33, 123.96, 122.99, 122.04, 115.29, 111.80, 80.15, 48.42, 46.13, 28.37, 21.58, **MS ID** 428,15 calculada para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S, observada 428.10 y M+1 429.10.

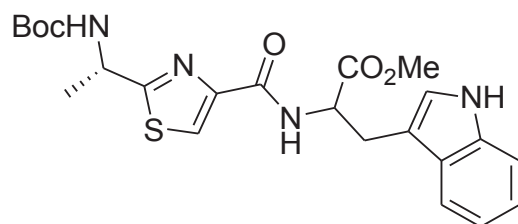
- Preparación de (*S*)-terc-butil 1-(4-(5-(1*H*-indol-3-il)oxazol-2-il)tiazol-2-il)etilcarbamato (*S*)-**26a**



Bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se disuelve el compuesto (*S*)-**25a** (0.1 mmol) en piridina seca (0.5 ml) y se agrega POCl<sub>3</sub> (0.1 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente por 3.5 horas y se le agrega AcOEt (10 ml) y NaHCO<sub>3</sub> solución saturada (20 ml) fría (0°C). Se extrae con AcOEt (3x15 ml) y se lava con H<sub>2</sub>O (20 ml) y con una solución saturada de NaCl (20 ml). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el solvente a presión reducida. El producto se purifica por sucesivos lavados con éter y se obtiene como un aceite color caramelo.

**Rendimiento:** 15%, <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 8.86 (s, 1H), 8.61 (t, *J* 6.9 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.89 (d, *J* 7.0 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.21 (m, 2H), 5.06 (m, 1H), 1.63 (d, *J* =7.0 Hz, 3H), 1.48 (s, 9H), <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, MeOD) δ (ppm) 149.15, 145.40, 142.70, 136.84, 126.88, 123.90, 123.18, 122.17, 120.20, 119.10, 118.75, 111.51, 109.43, 103.75, 98.50, 79.44, 27.31, 19.95.

- Preparación de metil 2-(2-((*S*)-1-(terc-butoxicarbonilamino)etil)tiazol-4-carboxamido)-3-(1*H*-indol-3-il)propanoato (*S*)-**24a**

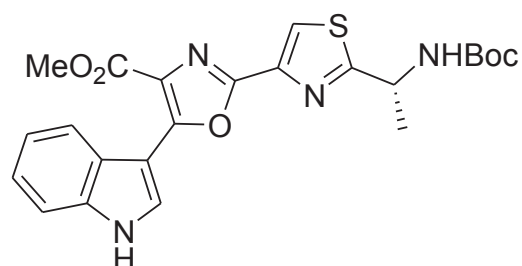


Bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, se disuelve el tiazol (*S*)-**18** (0.517 mmoles), en THF seco (4 ml), se enfría la reacción a -5°C y se agrega la trietilamina (1.25

mmoles) y el cloroformiato de etilo (0.63 mmoles). Se agita la reacción por una hora (hasta que por TLC no se observa más el reactivo, y se ve la formación del anhidrido mixto), se lleva la reacción a temperatura ambiente. Se agrega triptófano metil éster (0.68 mmoles) y la reacción se agita a 60°C por dos horas. La reacción se deja agitando a temperatura ambiente toda la noche. Se agrega AcOEt (15 ml), se filtra el sólido (sal de TEA) y se lava sucesivamente con KHCO<sub>3</sub> 5% (15 ml), H<sub>2</sub>O (15 ml), HCl 5% (15 ml) y H<sub>2</sub>O (15 ml), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el solvente a presión reducida. El producto se purifica por cromatografía en columna (FM AcOEt: EP 60:40) y se obtiene como un aceite color caramelo.

**Rendimiento:** 83%, **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.32 (br s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.81 (d, *J* 2.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* 7.8 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* 8.1 Hz, 1H), 7.17 (m, 2H), 7.08 (m, 2H), 5.11 (m, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.42 (m, 2H), 1.49 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), **<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 173.92, 172.24, 160.69, 154.95, 149.28, 136.19, 127.45, 123.47, 123.05, 122.19, 119.60, 118.68, 111.29, 109.87, 80.35, 52.78, 52.42, 48.57, 28.36, 27.86, 21.42. **HRMS ESI MH<sup>+</sup>**, calculada 472.1780 para C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S, observada 473.1838.

- *Preparación de 2-(2-((R)-1-(terc-butoxicarbonylamino)etil)tiazol-4-il)-5-(1H-indol-3-il)oxazol-4-carboxylato de metilo (S)-26c*

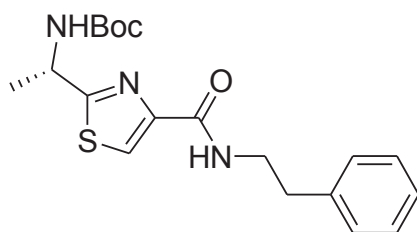


Bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se disuelve el DDQ (0.35 mmoles) en THF seco (2ml). Desde un ecualizador se le agrega gota a gota el compuesto (S)-**24a** (0.12 mmoles) en THF seco (4 ml). La mezcla de reacción se calienta a reflujo por 2.5 hrs. Luego se lleva a temperatura ambiente, y el solvente se elimina a presión reducida. El crudo obtenido se disuelve en 15 ml de AcOEt y se lava

sucesivamente con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5x10 ml), H<sub>2</sub>O (10 ml) y una solución saturada de NaCl (10 ml), luego se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el solvente a presión reducida. El producto se purifica por cromatografía en columna (FM AcOEt: EP 70:30) y se obtiene como un aceite color caramelo.

**TLC** (AcOEt: EP 70:30) R<sub>f</sub> = 0.45, **Rendimiento:** 55%, **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.91 (d, *J* 2.9 Hz, 1H), 8.84 (br s, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.33 (m, 2H), 5.38 (br s, 1H), 5.16 (m, 1H), 3.99 (s, 3H), 1.69 (d, *J* 6.9 Hz, 3H), 1.48 (s, 9H), **<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 176.63, 163.31, 154.58, 153.62, 142.88, 135.85, 130.00, 125.17, 124.18, 123.41, 121.85, 121.43, 119.95, 111.70, 104.16, 80.25, 52.07, 48.80, 28.37, 21.90. **HRMS ESI:** MH<sup>+</sup>, 468.1467 calculada para C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S, observada 468.1448.

- *Preparación de (S)-terc-butil 1-(4-(feniletilcarbamoil)thiazol-2-il)etilcarbamato (S)-23*



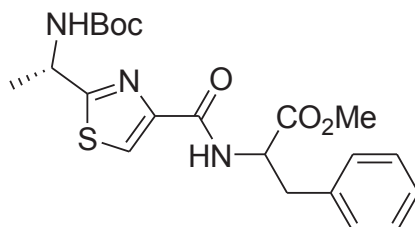
El compuesto se prepara a partir del tiazol (S)-18 y 2-feniletilamina, usando el procedimiento 1 para la formación del enlace amida. El producto se purifica por cromatografía en columna (FM: AcOEt:EP 40:60) y se obtiene como un aceite color caramelo.

**TLC** (AcOEt:EP 50:50) R<sub>f</sub>= 0.5, **Rendimiento:**68%, **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.01 (s, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.25 (m, 3H), 5.12 (br s, 1H), 5.05 (br s, 1H), 3.69 (dd, *J* 13.9, 6.7 Hz, 2H), 2.93 (t, *J* 7.2 Hz, 2H), 1.57 (d, *J* 6.8 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H). **<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ



174.03, 161.02, 149.88, 138.90, 128.94, 128.64, 126.58, 122.88, 80.57, 49.09, 40.62, 35.95, 28.34, 21.61.

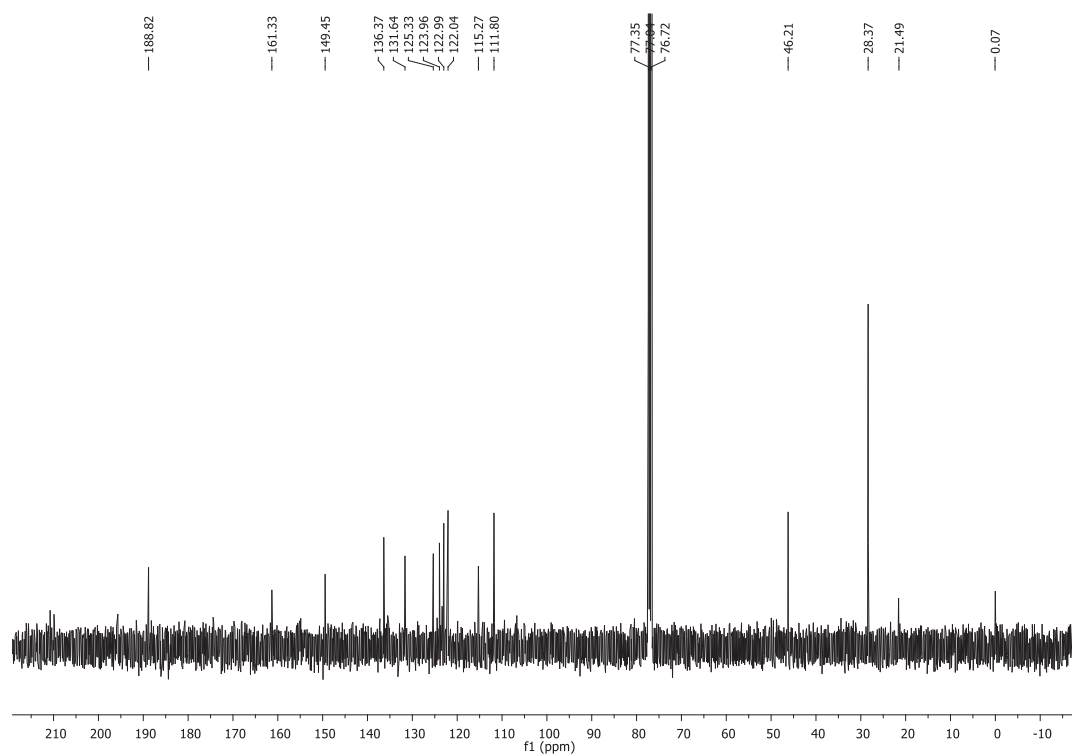
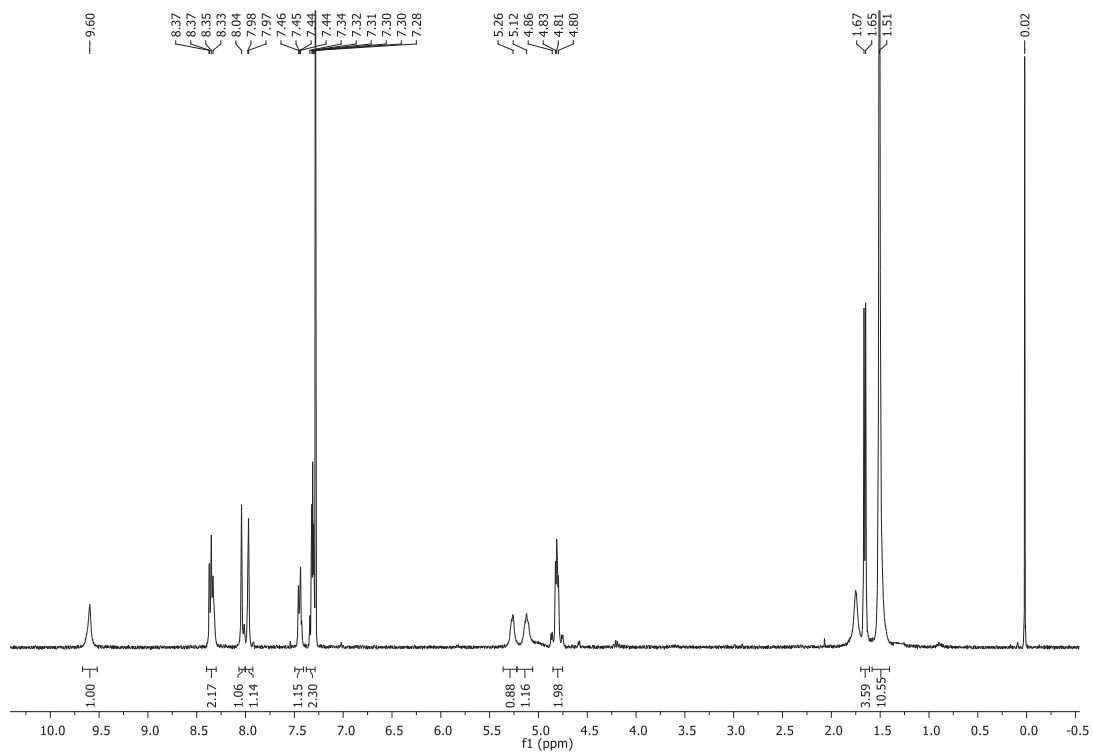
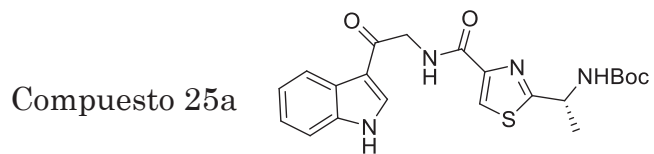
- *Preparación de metil 2-(2-((S)-1-(terc-butoxicarbonilamino)etil)thiazol-4-carboxamido)-3-fenilpropanoato (S)-24b*



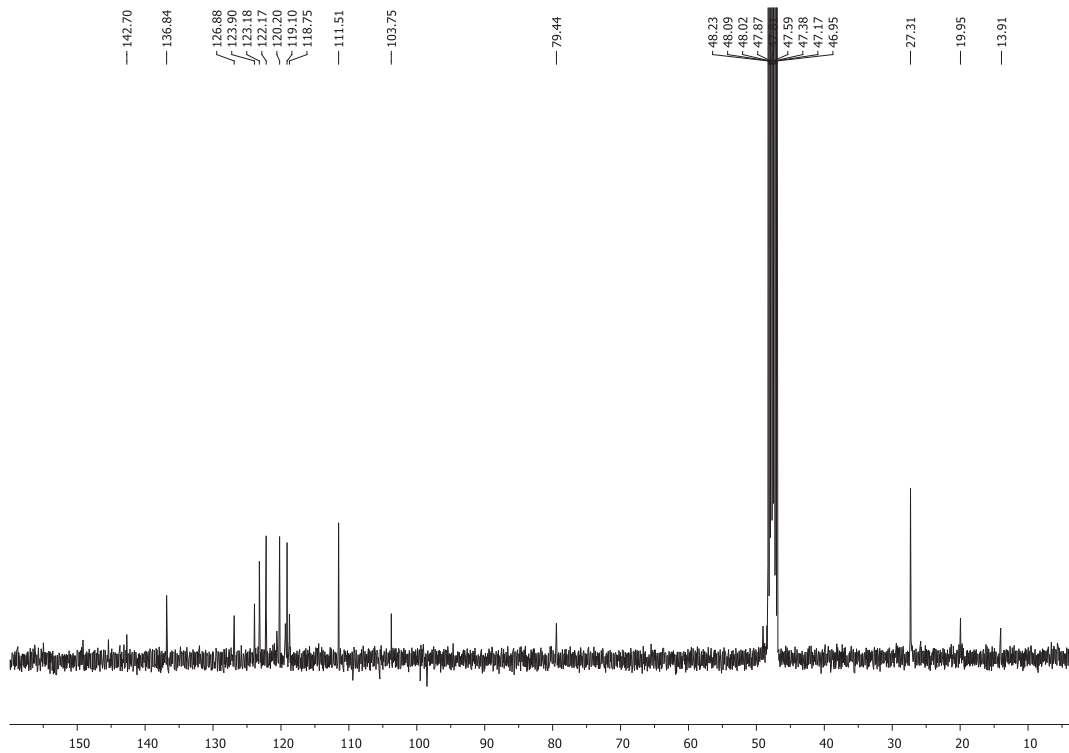
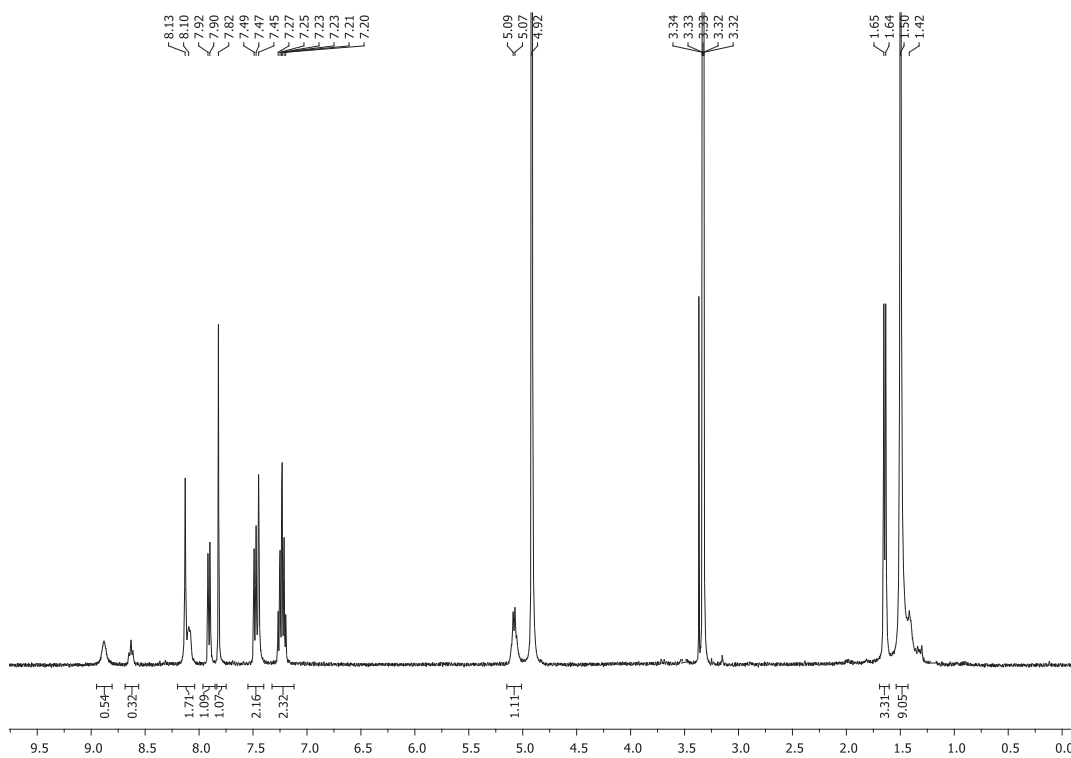
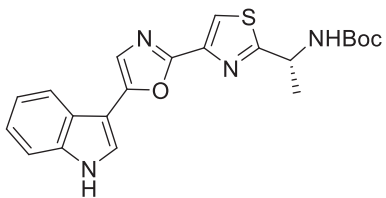
El compuesto se prepara a partir del tiazol (*S*)-**18** y fenilalanina metil éster usando el procedimiento 1 para la formación del enlace amida. El producto se purifica por cromatografía en columna (FM: AcOEt:EP 40:60) y se obtiene como un aceite color caramelo.

**Rendimiento:**84%, **<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.99 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.27 (m, 4H), 7.17 (m, 1H), 5.18 (br s, 1H), 5.03 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.22 (d, *J* 6.1Hz, 2H), 1.58 (d, *J* 6.9Hz,3H), 1.47 (s, 9H), **<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 171.91, 160.62, 155.02, 149.07, 135.88, 129.27, 128.63, 127.17, 77.39, 53.21, 52.36, 48.73, 38.14, 28.35, 21.27.

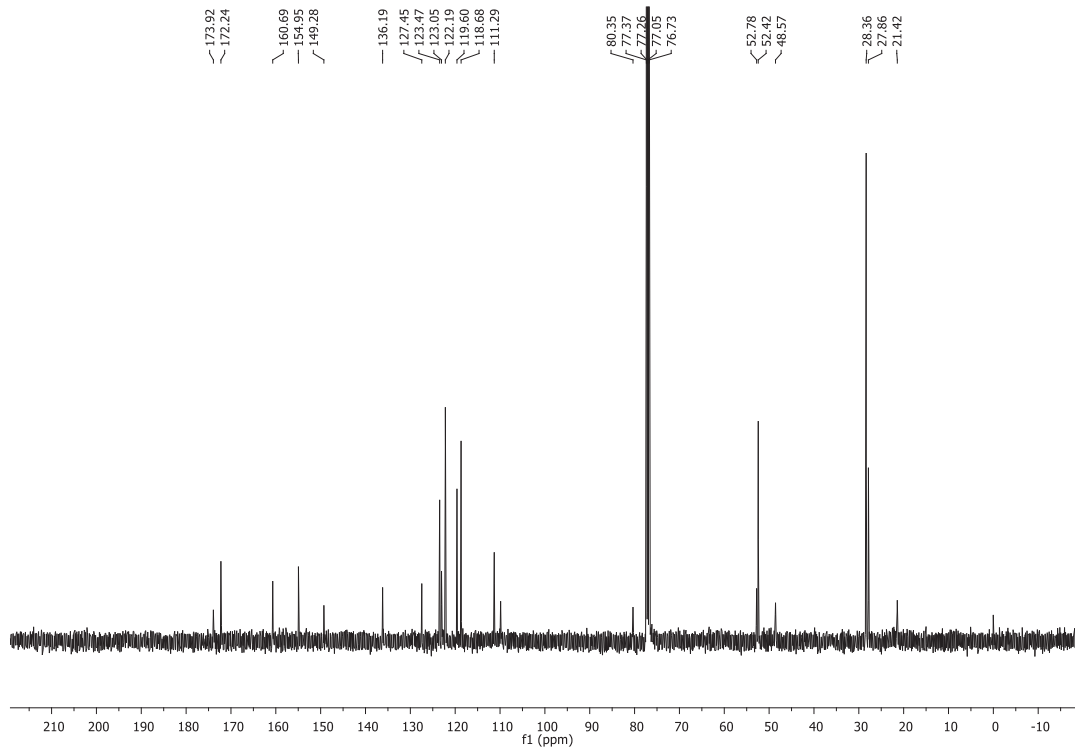
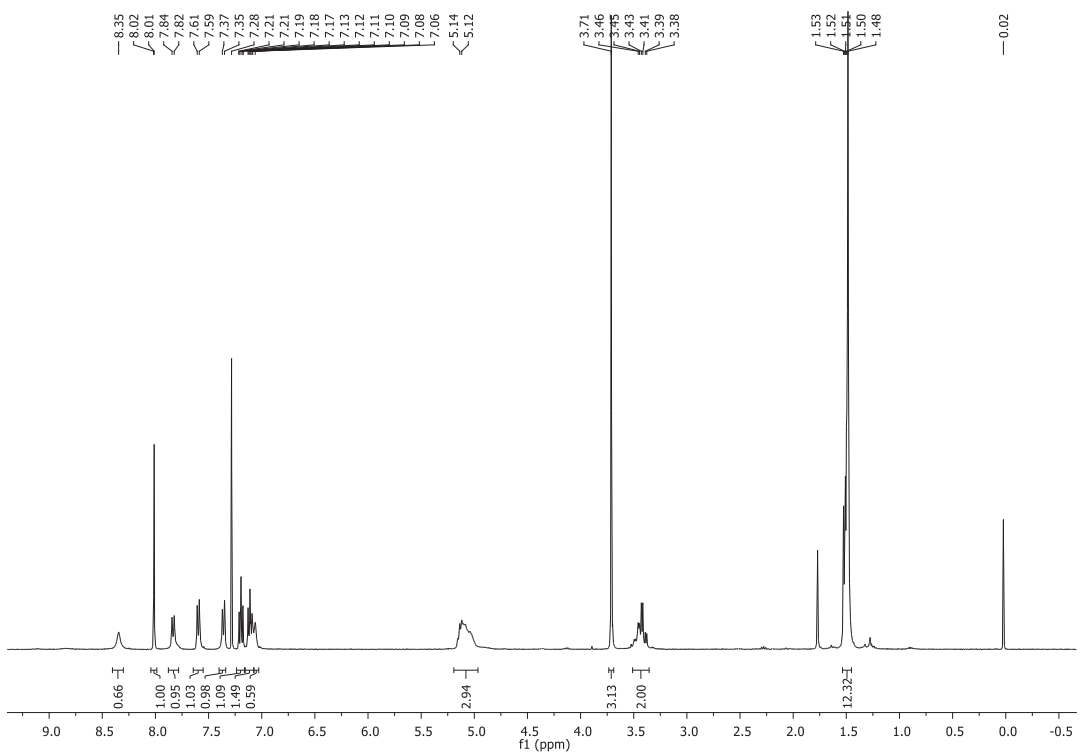
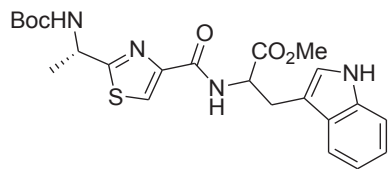
### 4.3.2 Espectroscopía de RMN



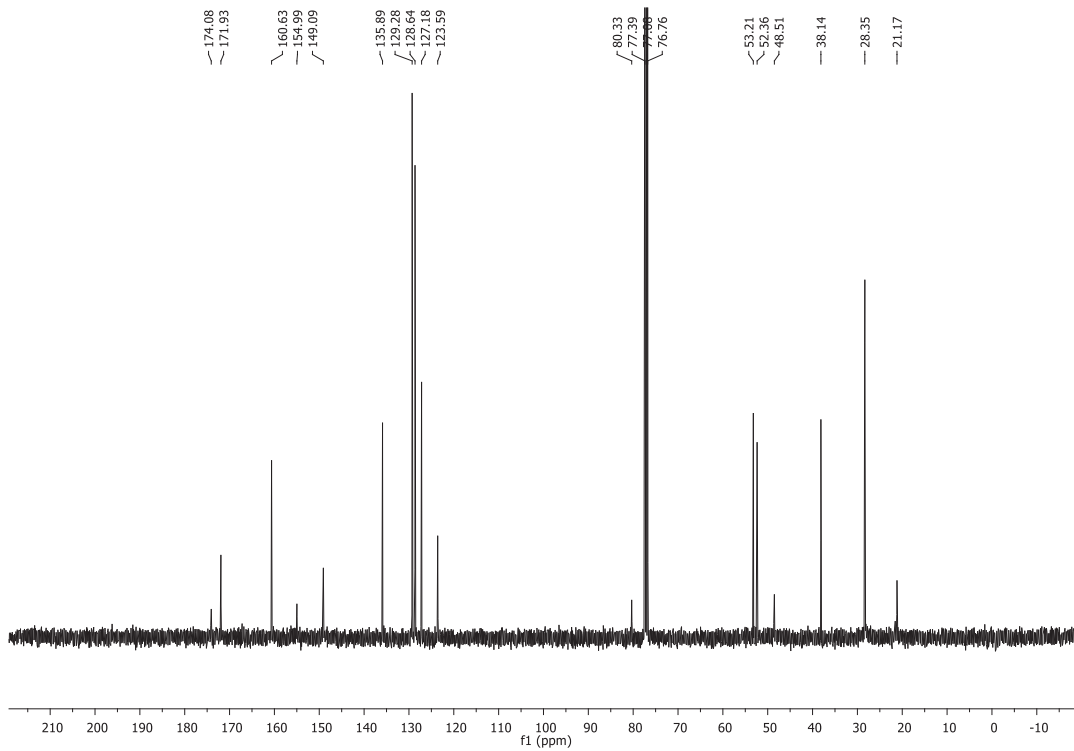
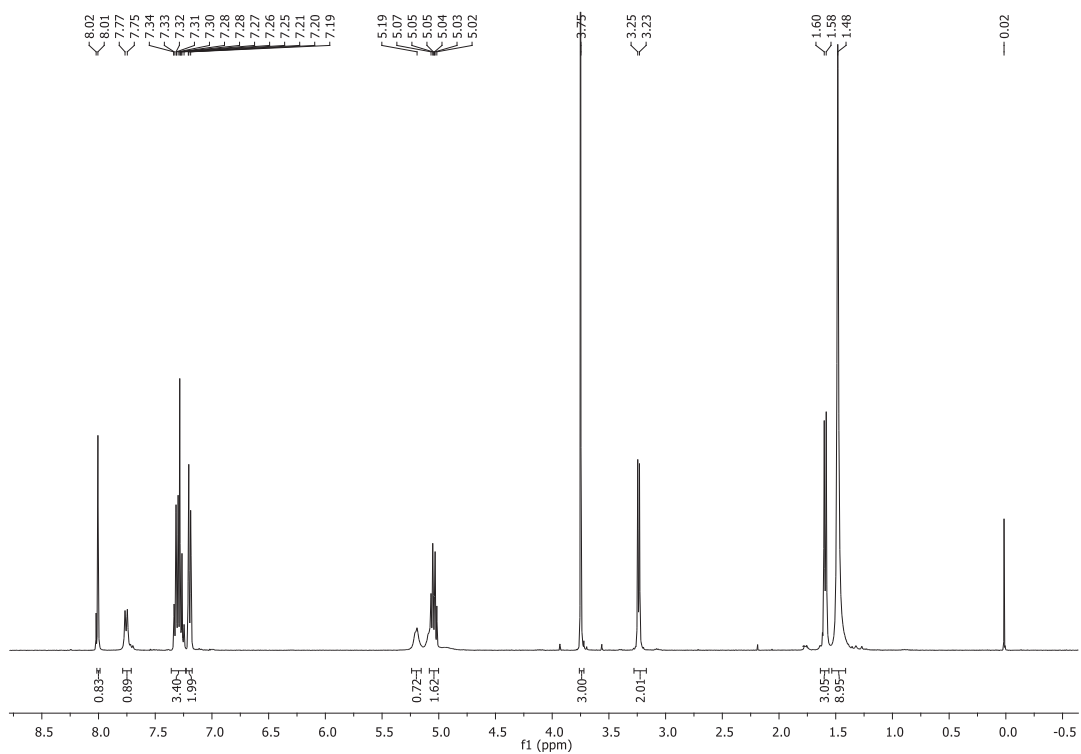
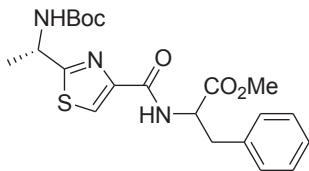
Compuesto 26a



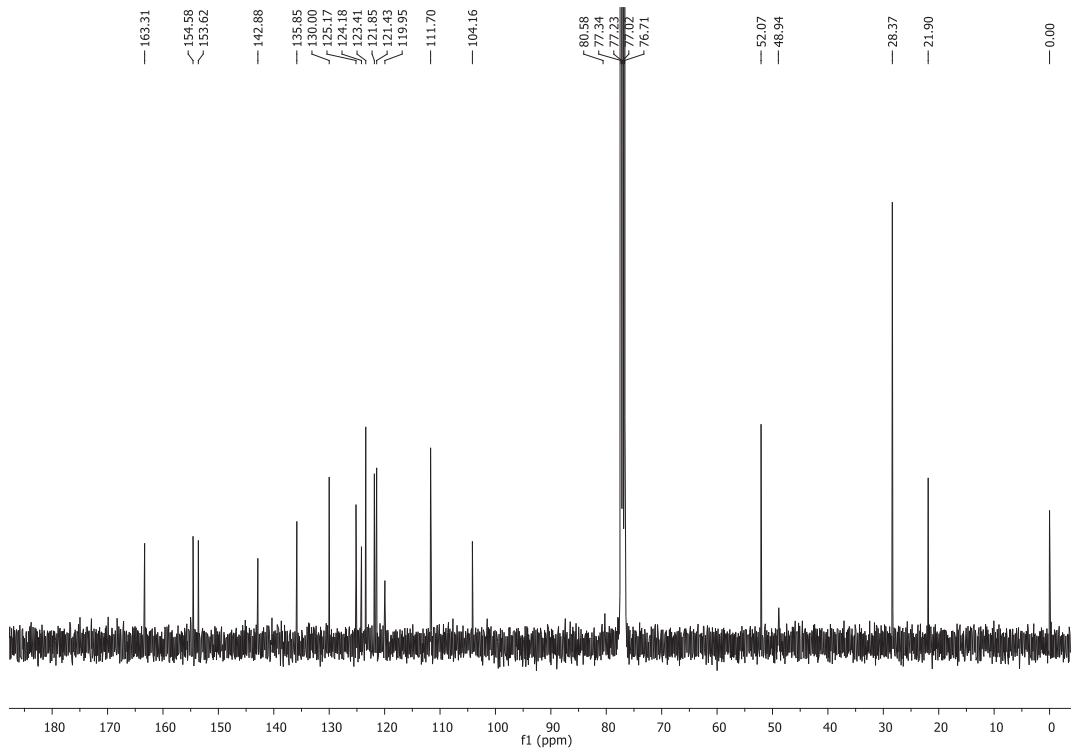
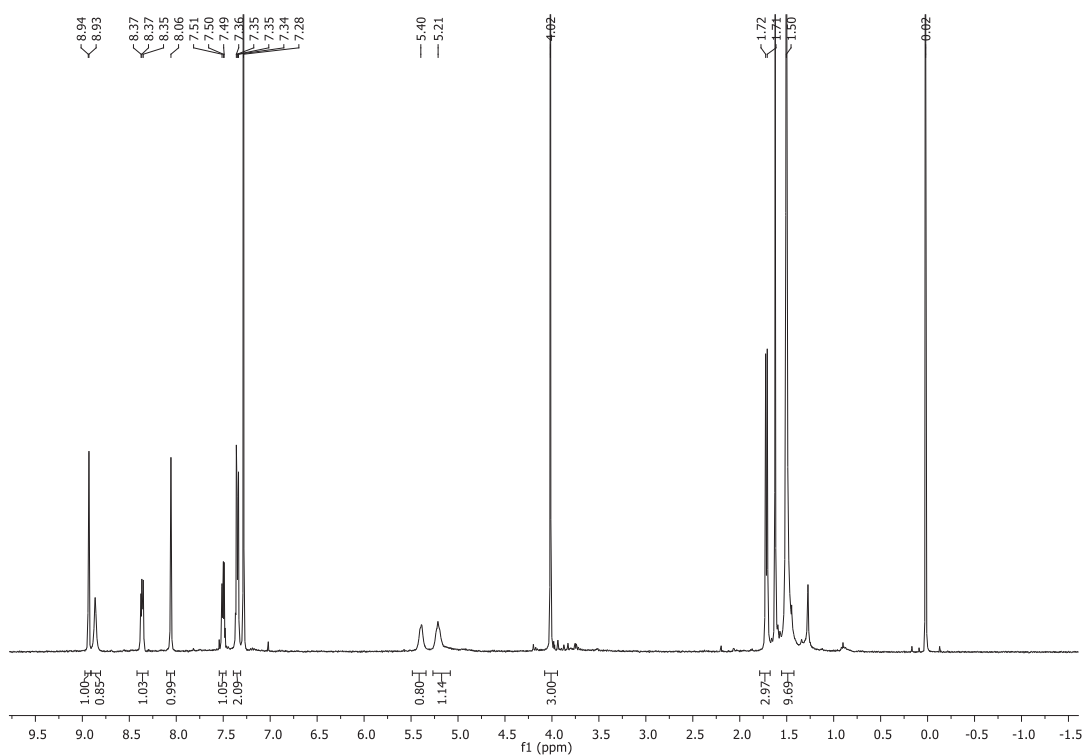
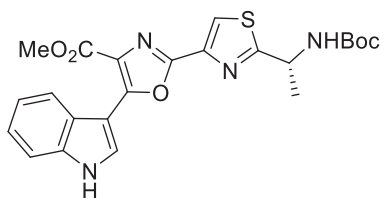
Compuesto 24a



Compuesto 24b



Compuesto 26c



**CAPÍTULO 5**  
**ACTIVIDAD BIOLÓGICA**





## Capítulo 5 Actividad Biológica

### 5.1 Antecedentes

Los compuestos obtenidos en este trabajo fueron sometidos a ensayos preliminares *in vitro* de actividad citotóxica frente a distintas líneas celulares de neoplasias humanas y a ensayos de actividad antihelmíntica frente al nematodo *Nippostrongylus brasiliensis*.

La evaluación de actividad citotóxica *in vitro* en células tumorales derivadas de neoplasias humanas, es una herramienta importante en los estudios de fase preclínica para la selección y desarrollo de nuevos fármacos antitumorales. En nuestro caso los productos se ensayaron sobre 6 líneas tumorales humanas: dos líneas de carcinoma de pulmón (**A549**, **SW1573**), dos líneas de cáncer epitelial de mama (**T-47D** , **HBL-100**), una línea de carcinoma de cuello de útero (**HeLa**), y una línea de carcinoma de colon (**WiDr**). Para evaluar la actividad citotóxica de los compuestos se empleó la metodología del Nacional Cáncer Institute (NCI)<sup>56</sup>, esta metodología determina la concentración que produce la inhibición del crecimiento celular al 50% (GI<sub>50</sub>).

El ensayo *in vitro* contra el nematodo *Nippostrongylus brasiliensis* es uno de los test más usados como screening primario para determinar la actividad antihelmíntica. Este ensayo se realiza usando *N-brasiliensis* en su estadio larvario L4, se calcula el porcentaje de muerte larval a determinada concentración del compuesto, tomando como droga patrón el albendazol el cual presenta un LC<sub>50</sub>= 3.4E-<sup>4</sup>mM

---

<sup>56</sup> Skehan, P., Storeng, P., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1990**, 82, 1107-1112.

Los estudios de actividad citotóxica fueron realizados por el Dr. José M. Padrón BioLab del Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio Gonzalez” (IUBO-AG).

Los ensayos de actividad antihelmíntica fueron realizados por la Dra. Jenny Saldaña en el laboratorio de experimentación animal, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.

## 5.2 Resultados y discusión

### 5.2.1 *Actividad citotóxica*

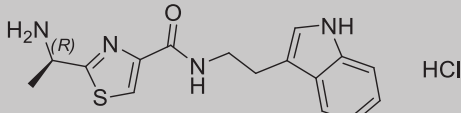
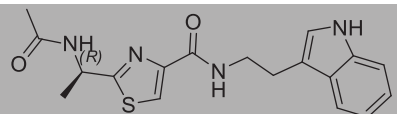
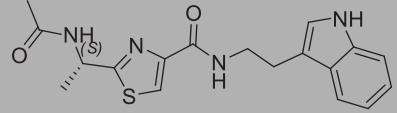
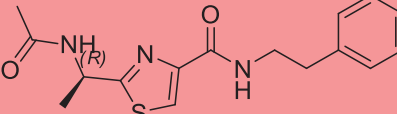
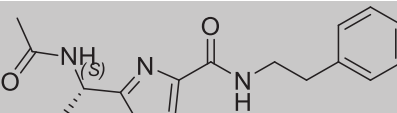
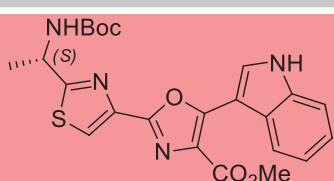
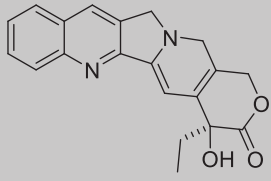
En estos ensayos se evaluaron 6 de los compuestos sintetizados, entre ellos los dos enantiómeros de los productos naturales bacillamida C y neobacillamida A.

Los resultados de la actividad citotóxica de los compuestos ensayados se muestran en la Tabla 5.1, acompañada de la Gráfica 5.1 usando como fármaco de referencia la camptotecina, un alcaloide quinolínico obtenido del árbol de origen chino *Camptotheca acuminata*, el cual presenta un uso clínico muy amplio en el carcinoma de mama, de pulmón y de colon<sup>57</sup>. Estos resultados muestran en las condiciones ensayadas, que solo dos de los productos evaluados presentan una actividad citotóxica promisoriosa.

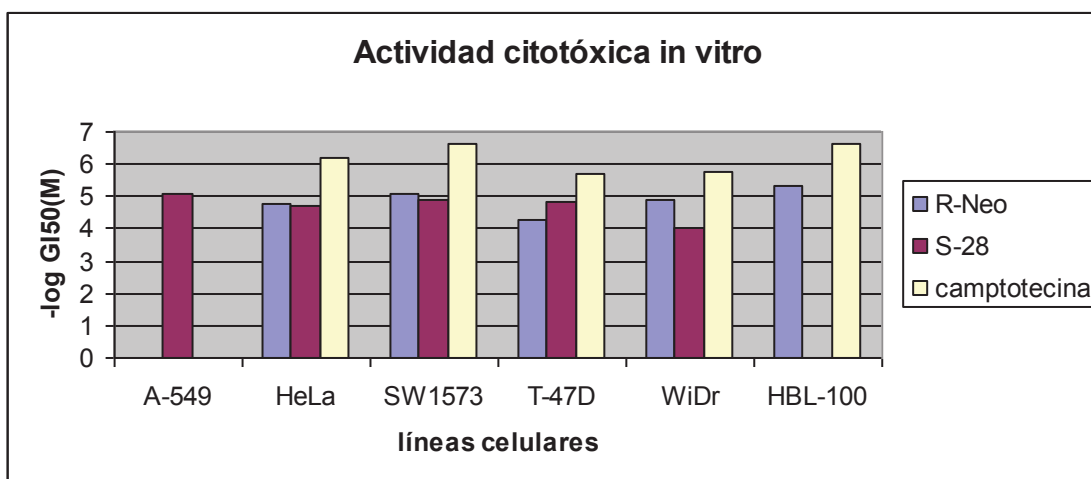
---

<sup>57</sup> Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.I., Sim G.A., *J. Am. Chem. Soc* **1966**, 88 (16): 3888–3890.

**Tabla 5.1** Ensayo de Actividad citotóxica

Compuesto	GI <sub>50</sub> (μM)					
	A549	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr	HBL-100
 <p><b>(R)-20</b> HCl</p>	> 100	> 100	>100	> 100	>100	---
 <p><b>(R)-bacillamida C</b></p>	> 100	> 100	>100	> 100	>100	---
 <p><b>(S)-bacillamida C</b></p>	> 100	> 100	>100	> 100	>100	---
 <p><b>(R)-neobacillamida A</b></p>	---	18	8.1	59	12	4.6
 <p><b>(S)-neobacillamida A</b></p>	> 100	> 100	>100	> 100	>100	---
 <p><b>(S)-26c</b></p>	8.1	19	13	14	8.8	---
 <p><b>Camptotecina</b></p>	---	0.5	0.25	2.0	1.8	0.23

Gráfica 5.1



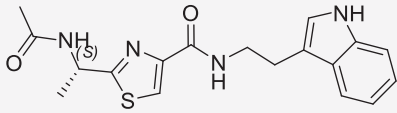
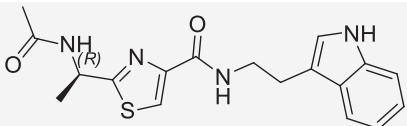
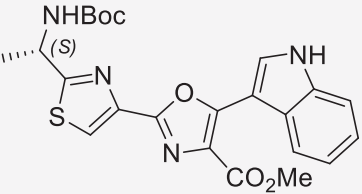
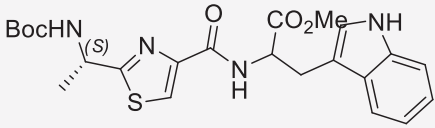
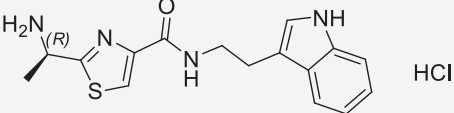
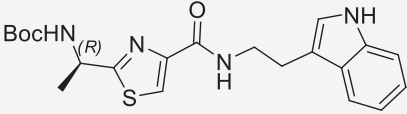
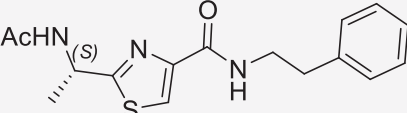
El enantiómero (*R*) de la Neobacillamida A, mostró actividad sobre las cinco células tumorales ensayadas, siendo más sensible la línea WiDr que resultó 7 veces menos potente que la camptotecina y la línea más resistente a este producto fue HeLa, lo que muestra una relativa selectividad de citotoxicidad en el panel de células evaluado. Tanto la (*S*)-Neobacilamida como los dos enantiómeros de la bacillamida C no mostraron actividad citotóxica sobre las células ensayadas en una concentración menor a  $100\mu M$ . Si comparamos la (*R*)-neobacillamida con su enantiómero (*S*) y con la (*R*)-bacillamida C, se puede decir que la presencia del grupo fenilo en combinación con la configuración (*R*) del tiazol son fundamentales para la actividad citotóxica. Estos resultados plantean interés por estudiar derivados de la (*R*)-neobacillamida con el fenilo sustituido, o análogos oxazólicos.

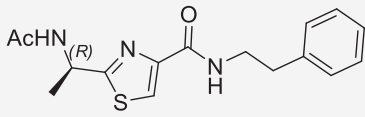
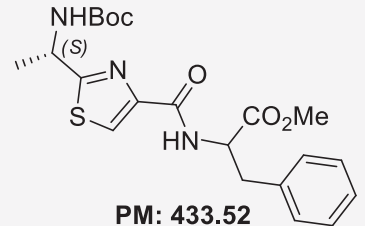
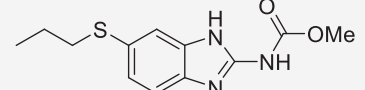
El análogo (*S*)-26c que contiene el anillo oxazol, fue el otro compuesto evaluado que también presentó una promisoriosa actividad citotóxica, mostrando una selectividad mayor para las líneas T-47D y WiDr, las cuales resultaron 7 y 5 veces menos potentes en comparación con la camptotecina.

### 5.2.2 Actividad Antihelmíntica

En la tabla 5.2 se muestran los resultados obtenidos para la actividad antihelmíntica de los 9 productos ensayados. La actividad antihelmíntica se expresó como porcentaje de muerte a la concentración medida.

**Tabla 5.2** Ensayo actividad antihelmíntica

Identificación muestra	Estructura	Concentración (mM)	Actividad (% muerte)
(S)-Bacillamida C	 <p>PM:356.13</p>	0,16	64
(R)-Bacillamida C	 <p>PM: 356.13</p>	0,15	61
(S)-26c	 <p>PM: 468.15</p>	0.14	71
(S)-24a	 <p>PM:472.18</p>	0.14	40
(R)-20	 <p>PM:350.87</p>	0.18	45
(R)-19	 <p>PM:414.52</p>	0.15	42
S-neo	 <p>PM: 317.40</p>	0.035	36

<i>R-neo</i>	 <p>PM: 317.40</p>	0.035	43
<i>S-24b</i>	 <p>PM: 433.52</p>	0.035	5
<i>Albendazol</i>		3.4E-4	50

El análisis comparativo de los resultados obtenidos para nuestros productos con relación al albendazol, reveló que ninguno de los compuestos ensayados presenta una actividad antihelmíntica interesante contra *N. brasiliensis*.

**CAPÍTULO 6**  
**CONCLUSIONES FINALES**  
**Y**  
**PERSPECTIVAS A FUTURO**





## Capítulo 6: Conclusiones finales y perspectivas a futuro

### 6.1 Conclusiones finales

En el trabajo de tesis se expusieron los resultados sintéticos obtenidos para la preparación del bloque tiazol, la síntesis de dos productos naturales de origen marino y sus análogos incorporando en su estructura el anillo oxazol, así como los ensayos biológicos realizados a los compuestos sintetizados.

Se destacan los resultados obtenidos para los objetivos específicos planteados:

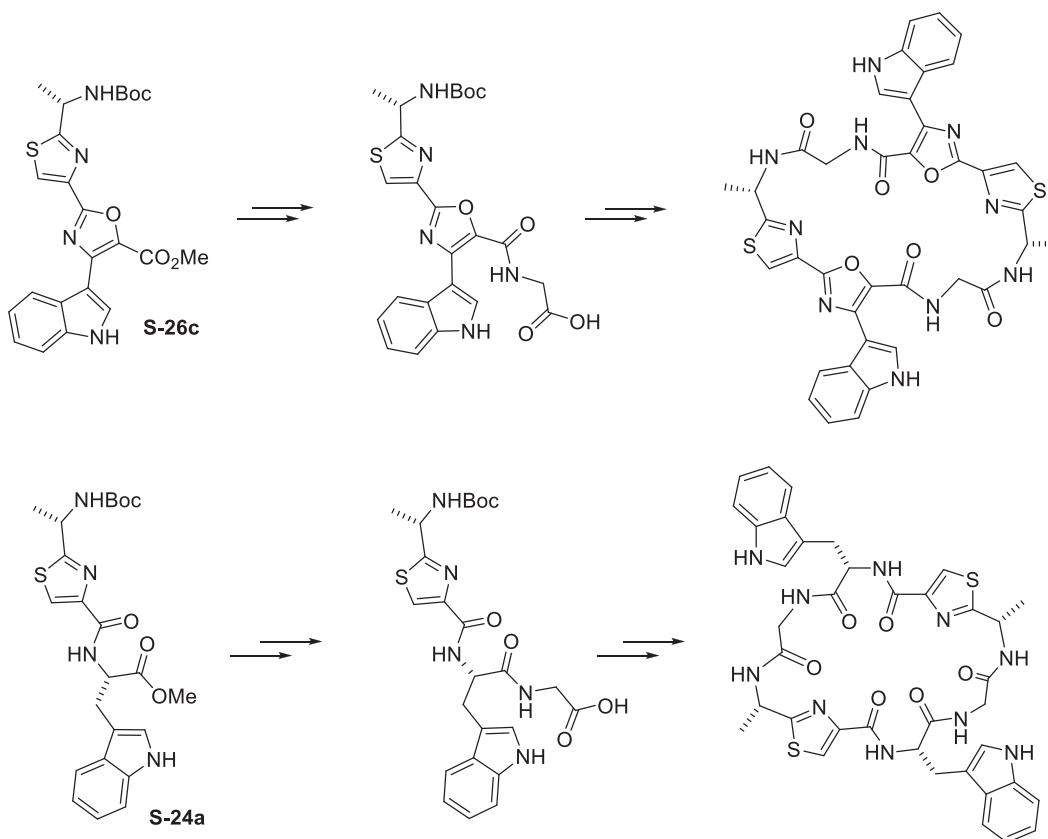
1. En cuanto a la síntesis del bloque tiazol, se probaron dos metodologías de síntesis. Los tiazoles se sintetizaron a partir de L y D-alanina y se estudió por HPLC quiral la pureza enantiomérica de estos.
2. Se logró sintetizar enantioméricamente puros y caracterizar los productos naturales de origen marino bacillamida C y neobacillamida A, y sus respectivos enantiómeros. En base a sus actividades ópticas, se revisó la configuración absoluta de ambos productos naturales de R a S. Estos resultados fueron publicados en *Tetrahedron Asymmetry*.
3. En cuanto a los derivados de la bacillamida C incluyendo en su estructura el anillo oxazol, estos se pudieron obtener por dos rutas: ciclación oxidativa con DDQ y síntesis de Robinson Gabriel. Los derivados de este tipo de la neobacillamida A no se lograron obtener mediante estas dos rutas, por lo que se estudiaran otras para la obtención de los mismos.
4. Se ensayo actividad citotóxica y antihelmíntica a los compuestos preparados. En cuanto a la actividad citotóxica se observó que el análogo de la bacillamida C conteniendo el biciclo tiazol-oxazol y la R-

neobacillamida demostraron tener actividad promisorio sobre las líneas tumorales ensayadas. En cuanto a la actividad antihelmíntica ninguno de los productos evaluados mostró actividad contra *N. brasiliensis*.

## 6.2 Perspectivas a futuro

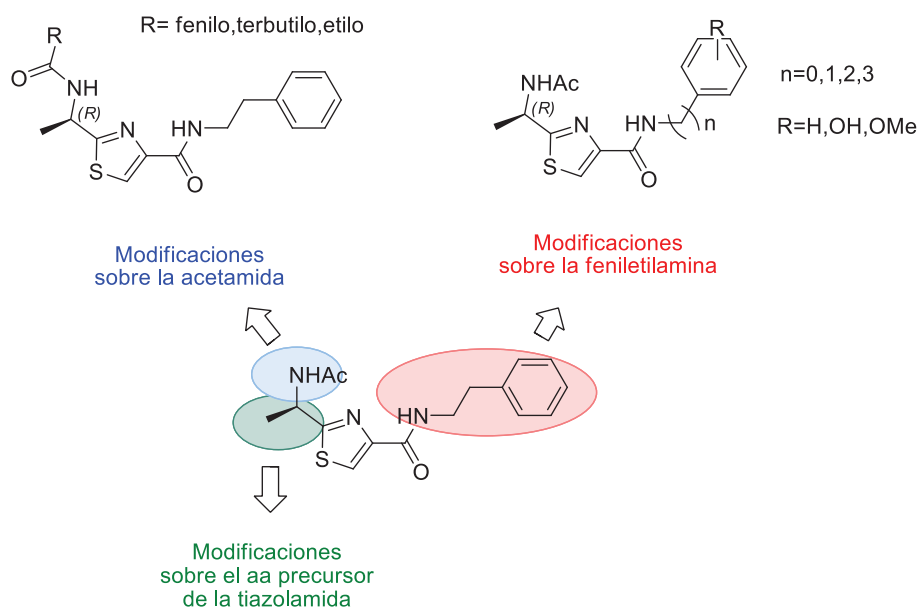
- Considerando que el compuesto (*S*)-**26c** mostró tener actividad citotóxica sobre algunas líneas tumorales, y que los anillos tiazoles y oxazoles cuando forman parte de péptidos cíclicos confieren a estos ciertas características, como rigidez estructural, restricción conformacional, estabilidad hidrolítica y proteolítica, que pueden ser útiles para la optimización estructural y funcional de futuros fármacos. Se plantea tomar este compuesto y el compuesto (*S*)-**24a** unidos a glicina como bloques de construcción y preparar péptidos cíclicos (dímeros) a partir de ellos como se muestra en el Esquema 6.1.

Esquema 6.1 Preparación de péptidos cíclicos



- Tomando en cuenta que la (*R*)-neobacillamida también presente actividad citotóxica promisoriosa frente a las líneas celulares ensayadas, sería interesante realizar modificaciones estructurales sobre ésta en busca de mejorar esa actividad. Las modificaciones que se plantea realizar se muestran en el esquema 6.2.

**Esquema 6.2.** Modificaciones planteadas sobre la (*R*)-neobacillamida





# ANEXO





# Total syntheses of bacillamide C and neobacillamide A; revision of their absolute configurations



Verónica Martínez, Danilo Davyt\*

Cátedra de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2124, Montevideo CP 11800, Uruguay

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 28 August 2013

Accepted 5 November 2013

## ABSTRACT

The enantiospecific syntheses of both enantiomers of bacillamide C and neobacillamide A are described, along with the measurement of their optical activities, leading to the revision of the proposed absolute configurations of these natural products.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Several natural products containing 2-(1-aminoethyl)thiazole-4-carboxylic acid **1** have been isolated from microorganisms that grow in marine and terrestrial biomass (Fig. 1). This scaffold has an asymmetric carbon atom on the  $\alpha$ -aminoethyl group that biosynthetically derives from alanine. The (*S*)-enantiomer of **1** is derived from L-(+)-alanine and the (*R*)-enantiomer from D-(−)-alanine. Despite the importance of the enantiomeric forms of bioactive natural products, there is widespread confusion in the literature on this aspect of some of the metabolites containing this moiety.

A tryptamine amide of **1**, the alkaloid **2** (Fig. 1), having local anesthetic action, was isolated from a thermophilic actinomycete from the soil *Thermoactinomyces* strain TM-64.<sup>1</sup> Its structure was determined on the basis of its chemical reactions and combined spectroscopy techniques (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, HRMS, IR). This metabolite showed  $[\alpha]_D^{20} = -6.0$  while the absolute configuration of the stereogenic center was tentatively determined as (*S*) by comparison of the circular dichroism (CD) of the *N*-salicylidene derivative with *N*-salicylidenes of (*S*)- $\alpha$ -aryl-alkylamines (having an aryl group instead of a thiazole). The total synthesis of **2** was performed from L-(+)-alanine and its configuration was confirmed as (*S*) although the product obtained showed extensive racemization.<sup>2</sup>

Bacillamide C was isolated from a culture of *Bacillus endophyticus* SP31 obtained on a bioassay-guided investigation from a hypersaline microbial mat. The bacillamide C showed  $[\alpha]_D^{24} = -15.2$  (c 0.082, MeOH).<sup>3</sup> The asymmetric carbon center of **3** was tentatively determined as (*R*) by comparison of its CD spectra with that reported for **2** (Fig. 1).

Microbiaeratin was isolated from a culture of *Microbispora aerata* IMBAS-11A obtained from penguin excrements collected at the Antarctic.<sup>4</sup> The planar structure of microbiaeratin was the

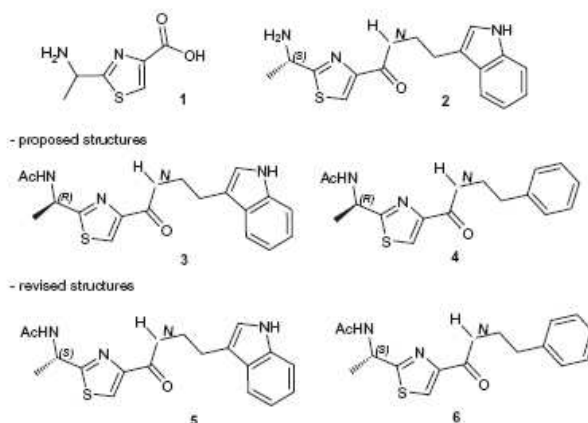


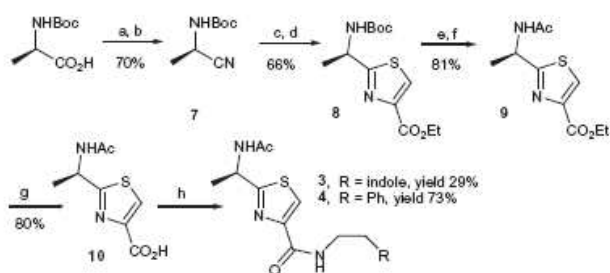
Figure 1. Metabolites containing 2-(1-aminoethyl)thiazole-4-carboxylic acid; proposed and revised structures for bacillamide C and neobacillamide A.

same as bacillamide C comparing their spectroscopic data with those reported. However, the optical activity of microbiaeratin was not reported. In a similar manner, another metabolite was isolated from a culture of *Thermoactinomyces* strain TA66-2 obtained from hot-spring water. This metabolite also has the planar structure of bacillamide C, but its specific rotation was not reported.<sup>5</sup>

Neobacillamide A, a phenethylamine amide analogue of bacillamide C, together with bacillamide C was isolated from a culture of *Bacillus atrophaeus* C89 obtained from the marine sponge *Dysidea avara*.<sup>6</sup> Neobacillamide A was characterized as the (*R*)-enantiomer by comparison of its specific rotation ( $[\alpha]_D^{24} = -16.0$ ) with the specific rotation of bacillamide C previously reported.<sup>3</sup> The proposed structure for neobacillamide was **4** (Fig. 1).

A total synthesis of (*R*)-bacillamide C from D-(−)-alanine was performed by Xu et al.,<sup>7</sup> and a convergent synthesis of bacillamide

\* Corresponding author. Tel.: +598 29290290.  
E-mail address: ddavyt@fq.edu.uy (D. Davyt).



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a)  $\text{NH}_3$  (g),  $\text{ClCO}_2\text{Et}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF,  $-10^\circ\text{C}$ ; (b) TFAA, Py, THF, rt; (c) cysteine ethylester hydrochloride, phosphate buffer pH 7, MeOH,  $60^\circ\text{C}$ ; (d) DBU,  $\text{BrCCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-10^\circ\text{C}$ ; (e) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt; (f)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Py, rt; (g) 10% aqueous KOH, THF, rt; (h) tryptamine, HBTU, DIPEA,  $0^\circ\text{C}$  to rt or 2-phenethylamine,  $\text{ClCO}_2\text{Et}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF,  $-5^\circ\text{C}$  to rt.

C and analogues using a chiral auxiliary was performed by Dömling et al.<sup>8</sup> However in both studies, the specific rotation was not compared to the natural product nor was it reported.

In our studies on the synthesis of marine products and their analogues our aim was to obtain (*R*)-bacillamide C and (*R*)-neobacillamide A by a stereospecific route from *D*-(-)-alanine. The total syntheses of both via a common key intermediate **10** are described here in (Scheme 1). The signs of the specific rotation of the synthesized compounds did not match with those reported. Both (*S*)-enantiomers were also synthesized to confirm these results.

## 2. Results and discussion

The synthesis of the common key intermediate **10** was performed by the stereospecific sequence of reactions as shown in Scheme 1. We began this synthesis with Boc-*D*-(+)-alanine having the (*R*)-configuration. The Boc-*D*-(+)-alanine led to the amide using ethylchloroformate and ammonia at  $-10^\circ\text{C}$ , which was then converted into nitrile **7** by dehydration with trifluoroacetic anhydride and triethylamine. The condensation of **7** with cysteine ethylester hydrochloride under buffered conditions in an aqueous methanol medium gave the thiazoline, which then was oxidized to thiazole **8** by bromotrichloromethane and DBU.

The Boc group of **8** was hydrolyzed with trifluoroacetic acid after which the amine was acetylated by acetic anhydride in pyridine. Intermediate **10** was then obtained by alkaline hydrolysis of ethyl ester. The (*R*)-bacillamide **3** was obtained by coupling **10** with tryptamine with an HBTU reagent. The methodology to prepare the thiazoline ring using a nitrile and cysteine is not a common method for thiazoline with an  $\alpha$  stereogenic carbon.<sup>9</sup> The enantiopurity of intermediates **8** and **3** were confirmed by chiral HPLC. The  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, and HRMS data of **3** were in agreement with previously reported data, however the specific rotation of this product was  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +23.1$  (c 4.71, MeOH), which is the opposite sign of the natural product.<sup>3</sup> Similarly (*R*)-neobacillamide **4** was prepared from intermediate **10** and 2-phenethylamine using ethyl chloroformate as an activating agent. The spectroscopic data of **4** were in agreement with the reported data but the specific rotation  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +22.5$  (c 7.25, MeOH) was contrary to the natural product; lit.<sup>4</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -16.0$  (c 0.10, MeOH).

The reaction sequences were performed again, but this time starting from Boc-*L*-(-)-alanine to obtain the (*S*)-enantiomers. The specific rotation of (*S*)-bacillamide **5** was  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -23.7$  (c 4.99, MeOH) while that of (*S*)-neobacillamide **6** was  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -24.1$  (c 7.37, MeOH); these were in agreement with the specific rotations of the corresponding natural products.

This result is especially important when producing bacillamide C from cultures of *Bacillus atrophaeus* strain C89 to serve as a

building block in potentially bioactive cyclic peptides.<sup>10</sup> Also the revised absolute configuration of bacillamide C and neobacillamide A shows they are derived of *L*-(+)-alanine; and this is important for genomic studies of their biosynthesis.<sup>11</sup> Bacillamides-type metabolites containing the scaffold **1** derived from *D*-(-)-alanine have not been confirmed in the literature, however, other metabolites from microorganisms containing it, such as the argyrins, have been reported.<sup>12</sup>

## 3. Conclusion

In conclusion, our stereospecific syntheses of **5** and **6** from *L*-(+)-alanine via the common key intermediate **10**, showed that their spectroscopic data and optical activities were consistent with those reported for bacillamide C and neobacillamide A, respectively. These results allowed us to conclude that the absolute configuration of the natural products bacillamide C and neobacillamide A should be revised to (*S*).

## 4. Experimental section

### 4.1. General procedures

All reagents were of reagent grade and used without further purification unless specified otherwise. Solvents for the reactions were distilled prior to use: THF was distilled from Na and benzophenone, and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  from  $\text{CaH}_2$ . All air- or moisture-sensitive reactions were conducted under a nitrogen atmosphere in flame-dried or oven-dried glassware with magnetic stirring. The  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer operating at 400 MHz and 100 MHz, respectively. Spectra were recorded at  $25^\circ\text{C}$  in  $\text{CDCl}_3$  or  $\text{DMSO}-d_6$ .  $^1\text{H}$  spectra were referenced internally to the solvent signal ( $\text{CHCl}_3$ , 7.26 ppm;  $\text{DMSO}$ , 2.50 ppm) and  $^{13}\text{C}$  spectra to the solvent signal ( $\text{CDCl}_3$ , 77.00 ppm;  $\text{DMSO}-d_6$ , 39.52 ppm). The coupling constants  $J$  are given in Hz. The signal patterns are indicated as follows: s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublet, t = triplet, td = triplet of doublet, q = quartet, m = multiplet, and br = broad. Optical rotations were measured on a digital polarimeter using a 0.7 mL cell with a 0.5 dm path length. Low resolution direct inlet electron impact mass spectra (EI-MS) were taken on a Shimadzu QP 2010 plus mass spectrometer, operating at 70 eV, and  $m/z$  ratios are reported as values in atomic mass units. High resolution mass analyses (HR-MS) were performed in ESI mode taken on a Bruker micrOTOF-Q. HPLC analyses were conducted with a Shimadzu instrument using a Chiralcel OD column ( $4.6 \times 250$  mm). Mobile phase for isocratic mode was a mixture of *n*-hexane and 2-propanol 90:10 (v/v) for the enantiomeric analysis of **8**. The enantiomeric analyses of the bacillamides were performed using gradient elution of *n*-hexane and 2-propanol, beginning with a mixture of 90:10 (v/v) to 40:60 (v/v). Column chromatography was carried out using silica gel (60–120 mesh or 100–200 mesh) packed in glass columns. Technical grade ethyl acetate and petroleum ether were used for column chromatography and were distilled prior to use.

### 4.2. Synthesis of *N*-Boc-(*R*)-alanine amide

To a stirred solution of *N*-Boc-(*R*)-alanine (5.0 g, 26.4 mmol) in dry THF at  $-10^\circ\text{C}$ , were added triethylamine (3 mL, 21.12 mmol) and ethyl chloroformate (2.5 mL, 26.4 mmol). The reaction mixture was stirred for 1 h and then  $\text{NH}_3$  (g) was bubbled for 1.5 h. The mixture was then stirred at room temperature overnight. Next, THF was removed under reduced pressure, after which NaCl sat. sol. (40 mL) was added and extracted with EtOAc ( $5 \times 40$  mL).



The organic layer was washed with HCl 0.5 M (2 × 30 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under vacuum, to give the amide (82% yield) as a white solid;  $[\alpha]_D^{24} = +36.6$  (c 0.74, CHCl<sub>3</sub>);  $\delta_H$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 6.52 (br s, 1H), 6.10 (br s, 1H), 5.30 (br s, 1H), 4.21 (br s, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.35 (d, J 7.07 Hz, 3H);  $\delta_C$  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 175.32, 155.54, 80.18, 59.45, 28.28, 18.25.

#### 4.3. Synthesis of *N*-Boc-(*S*)-alanine amide

The procedure 4.2 was performed using *N*-Boc-(*S*)-alanine to give the amide (89% yield);  $[\alpha]_D^{24} = -37.5$  (c 0.77, CHCl<sub>3</sub>). The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were identical with those of *N*-Boc-(*R*)-alanine amide.

#### 4.4. Synthesis of *N*-Boc-(*R*)-alanine nitrile 7

To a stirred solution of *N*-Boc-(*R*)-alanine amide (3.0 g, 15.94 mmol) in dry THF was added dry pyridine (5.15 mL, 63.76 mmol). The trifluoroacetic anhydride (4.4 mL, 31.76 mmol) was then added at 0 °C. The reaction mixture was then stirred for 2 h. Next, THF was removed under reduced pressure. The concentrate was dissolved in EtOAc (40 mL), washed with HCl 0.5 M (5 × 20 mL), half-satd aq NaHCO<sub>3</sub> solution (20 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated under vacuum, to give 7 (85% yield) as a yellow solid;  $\delta_H$  (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 4.81 (br s, 1H), 4.61 (br s, 1H), 1.54 (d, J 7.2 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H);  $\delta_C$  (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) 154.04, 119.49, 81.27, 37.58, 28.20, 19.59.

#### 4.5. Synthesis of *N*-Boc-(*S*)-alanine nitrile

The procedure in Section 4.4 was performed using *N*-Boc-(*S*)-alanine amide to give the corresponding nitrile (87% yield). The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were identical with those of *N*-Boc-(*R*)-alanine nitrile.

#### 4.6. Synthesis of (*R*)-ethyl 2-(1-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)thiazole-4-carboxylate 8

Cysteine ethyl ester (1.60 g, 8.68 mmol) and 7 (1.13 g, 6.63 mmol) were dissolved in a 1 M sodium phosphate buffer pH 7 (5 mL) and degassed by bubbling nitrogen for 10 min. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated in vacuo, to give a crude product. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/PE; 40:60) to give the thiazoline. To a solution of the thiazoline (1.35 g, 4.46 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL), at -20 °C was added BrCCl<sub>3</sub> (1.7 mL, 16.96 mmol) and the reaction mixture was stirred for 15 min. The DBU (2.5 mL, 19.96 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred for an additional 2 h. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was evaporated under vacuum, to give a crude product, which was purified by flash chromatography (EtOAc/PE; 40:60) to give 8 (79% yield), as a brown oil;  $[\alpha]_D^{24} = +11.3$  (c 0.65, CHCl<sub>3</sub>);  $\delta_H$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.06 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.39 (q, J = 7.12 Hz, 2H), 1.60 (d, J = 6.91 Hz, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.37 (t, J = 7.13 Hz, 3H);  $\delta_C$  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 174.93, 161.35, 154.88, 147.17, 127.16, 80.24, 61.43, 48.92, 28.30, 21.75, 14.36; MS ID 300.10, found 300.11

#### 4.7. Synthesis of (*S*)-ethyl 2-(1-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)thiazole-4-carboxylate

The procedure in Section 4.6 was performed using *N*-Boc-(*S*)-alanine nitrile to give the corresponding thiazole (95% yield) as a brown oil;  $[\alpha]_D^{24} = -11.7$  (c 1.05, MeOH). The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were identical with those of 8.

#### 4.8. Synthesis of (*R*)-ethyl 2-(1-(acetamidoethyl)thiazole-4-carboxylate 9

The *N*-Boc deprotection of 8 was performed using TFA according to the established literature method and the crude product was acetylated with acetic anhydride and pyridine to give product 9 (84% yield last 2 steps) as a brown oil;  $[\alpha]_D^{24} = +29.1$  (c 0.47, CHCl<sub>3</sub>);  $\nu_{\max}$  (NaCl) 3264 (br), 2985, 1720, 1655, 1373, 1219, 1022, 764 cm<sup>-1</sup>;  $\delta_H$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.09 (s, 1H), 6.66 (m, 1H), 5.42 (p, J 7.05 Hz, 1H), 4.41 (q, J 7.11 Hz, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.63 (d, J 6.93 Hz, 3H), 1.39 (t, J 7.11 Hz, 3H);  $\delta_C$  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 172.67, 170.22, 161.13, 146.81, 127.37, 61.55, 47.20, 22.97, 21.72, 14.28.

#### 4.9. Synthesis of (*S*)-ethyl 2-(1-(acetamidoethyl)thiazole-4-carboxylate

The procedure in Section 4.8 was performed using (*S*)-8 to give the corresponding acetamide (91% yield last 2 steps) as a brown oil;  $[\alpha]_D^{24} = -50.5$  (c 0.45, CHCl<sub>3</sub>). The IR spectra, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were identical to those of 9.

#### 4.10. Synthesis of (*R*)-2-(1-(acetamidoethyl)thiazole-4-carboxylic acid 10

To a solution of thiazole 9 (0.085 g, 0.35 mmol) in THF (2 mL), was added KOH 10% (2 mL), and the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvent was evaporated in vacuo. To the resulting solution was added H<sub>2</sub>O (5 mL), after which it was acidified to pH 1–2 with HCl (6 M) and extracted with EtOAc (15 mL × 3), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated under vacuum, to give 10 (74% yield) as a yellow oil;  $\delta_H$  (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) 8.29 (s, 1H); 7.90 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.57 (d, J = 7.04 Hz, 3H);  $\delta_C$  (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) 176.68, 171.04, 163.21, 148.85, 129.65, 48.84, 23.66, 21.71.

#### 4.11. Synthesis of (*S*)-2-(1-(acetamidoethyl)thiazole-4-carboxylic acid

The procedure in Section 4.10 was performed using (*S*)-thiazole 9 to give the corresponding acid (*S*)-10 (72% yield) as a yellow oil. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were identical with those of (*R*)-10.

#### 4.12. Synthesis of (*R*)-(N-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-2-(1-(acetamidoethyl)thiazole-4-carboxamide 3

To a solution of 10 (0.081 g, 0.38 mmol) and tryptamine (0.073 g, 0.45 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, at 0 °C were added HBTU (0.171 g, 0.45 mmol), DIPEA (0.15 mL, 0.84 mmol), and 4-DMAP (cat.). The reaction mixture was then warmed up to room temperature, and stirred for 6 h. To the resulting solution was added HCl 5% (10 mL) and it was extracted with EtOAc (20 mL × 3). The organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> solution, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under vacuum to give the crude product, which was purified by flash chromatography (EtOAc/PE/MeOH; 30:70:5) to give 3 (29%) as a light brown oil;  $[\alpha]_D^{24} = +23.1$  (c 4.71, MeOH);  $\nu_{\max}$  (NaCl) 3283 (br), 2978, 1928, 1655, 1547, 1493, 1439, 1265, 1042, 741 cm<sup>-1</sup>;  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 10.83 (s, 1H), 8.71 (d, J 7.6 Hz, 1H), 8.40 (t, J 6.0 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.61 (d, J 7.9 Hz, 1H), 7.33 (d, J 8.05 Hz, 1H), 7.18 (d, J 2.3 Hz, 1H), 7.06 (m, 1H), 6.98 (m, 1H), 5.15 (p, J 7.1 Hz, 1H), 3.54 (dd, J 14.6, 6.6 Hz, 2H), 2.94 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.50 (d, J 7.0 Hz, 3H);  $\delta_C$  (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 175.02, 169.04, 160.29, 149.68, 136.18, 127.15, 123.12, 122.50, 120.88, 118.32, 118.14, 111.65, 111.28, 46.66, 39.78, 25.23, 22.40, 20.38; HRMS ESI: MH<sup>+</sup>, found 357.1387. C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S requires 357.1385.

#### 4.13. Synthesis of bacillamide C, (S)-(N-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-2-(1-acetamidoethyl)thiazole-4-carboxamide 5

The procedure in Section 4.12 was performed using acid (S)-**10** to give **5** (68%) as light brown oil;  $[\alpha]_D^{24} = -23.6$  (c 4.99, MeOH). The IR, HRMS ESI,  $^1\text{H}$ , and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were identical with those of **3** and with those reported for bacillamide C.

#### 4.14. Synthesis of (R)-(N-(2-phenethyl)-2-(1-acetamidoethyl)thiazole-4-carboxamide 4

To a solution of **10** (0.15 g, 0.55 mmol) in dry THF at  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ , were added  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.08 mL, 0.55 mmol) and ethyl chloroformate (0.05 mL, 0.55 mmol). The reaction mixture was then stirred for 1 h, and warmed to room temperature. The 2-phenylethanamine (0.08 g, 0.66 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The EtOAc (15 mL) was added, and washed with  $\text{KHCO}_3$  5% (15 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL), HCl 5% (15 mL), and  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was evaporated under vacuum to give the crude product, which was purified by flash chromatography (EtOAc/PE; 30:70), to give **4** (73%) as a light brown oil;  $[\alpha]_D^{24} = +22.5$  (c 7.25, MeOH);  $\nu_{\text{max}}$  (NaCl) 3267 (br), 2932, 2859, 1655, 1543, 1493, 1447, 1254, 1042, 748  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 8.02 (s, 1H), 7.34 (m, 3H), 7.26 (m, 3H), 6.12 (d,  $J$  7.9 Hz, 1H), 5.36 (m, 1H), 3.70 (ddd,  $J$  13.3, 7.1, 2.1 Hz, 2H), 2.93 (t,  $J$  7.1 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.59 (d,  $J$  6.9 Hz, 3H);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 172.41, 169.46, 160.89, 149.66, 138.82, 128.83, 128.62, 126.54, 123.16, 47.02, 40.55, 35.84, 23.23, 21.38. HRMS ESI:  $\text{MH}^+$ , found 316.11224.  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  requires 316.11197.

#### 4.15. Synthesis of neobacillamide A, (S)-(N-(2-phenethyl)-2-(1-acetamidoethyl)thiazole-4-carboxamide 6

The procedure 4.14 was performed using the acid (S)-**10** to give **6** (94%) as a light brown oil;  $[\alpha]_D^{24} = -24.1$  (c 7.37, MeOH). The IR, HRMS ESI,  $^1\text{H}$ , and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were identical with those of **4** and with those reported for neobacillamide A.

#### Acknowledgments

The authors thank CSIC—Udelar (Csic grupos N° 654) for funding and Alejandra Rodríguez, Polo Tecnológico de Pando for HRMS.

#### References

- Konda, Y.; Suzuki, Y.; Omura, S.; Onda, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24*, 92–96.
- Onda, M.; Konda, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26*, 2167–2169.
- Socha, A. M.; Long, R. A.; Rowley, D. C. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1793–1795.
- Ivanova, V.; Kolarova, M.; Aleksieva, K.; Gräfe, U.; Dahse, H. M.; Laatsch, H. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *37*, 161–168.
- Korkmaz, C.A.; Hames-Kocabas, E.E.; Uzel, A.; Bedir, E. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 80–83.
- Yu, Lu-Lu; Li, Zhen-Yu; Peng, Chong-Sheng; Li, Zhi-Yong; Guo, Yue-Wei. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 607–612; Lu-Lu, Yu; Li, Zhen-Yu; Peng, Chong-Sheng; Li, Zhi-Yong; Guo, Yue-Wei. *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95*, 1048.
- Li, D.; Yang, H. S.; Cui, Q.; Mao, S. J.; Xu, X. H. *Chin. Chem. Lett.* **2009**, *20*, 1195–1197.
- Wang, W.; Joyner, S.; Sameer Khoury, K. A.; Dömling, A. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 529–532.
- Gaumont, A.; Gulea, M.; Levillain, J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1371–1401.
- Jin, L.; Ma, W.; Peng, C.; Yin, Y.; Xu, B.; Zhang, F.; Guo, Y.; Li, Z. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1153–1159.
- Yuwen, L.; Zhang, F.; Chen, Q.; Lin, S.; Zhao, Y.; Li, Z. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1753.
- Sasse, F.; Steinmetz, H.; Schupp, T.; Petersen, F.; Memmeret, K.; Hofmann, H.; Heusser, C.; Brinkmann, V.; Matt, P.; Höfle, G.; Reinchenbach, H. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 543–551.