

Informe Técnico de Avance

Síntesis estereoselectiva de nuevos compuestos tipo 2-oxazolina enantiopuros a partir de α -dibencilamino ésteres quirales

Línea de Investigación o de Trabajo: **Síntesis orgánica en fase sólida**

Clave del proyecto: **ITTIJ-PTC-001**

TIJ-MCQ-2009-09

Investigadores: *Adrián Ochoa Terán, Georgina E. Pina Luis, Raquel Muñoz Salazar, Jesús Estrada Manjarrez*,
Estudiantes: *Carmen Equihua Ruiz, Fernando Hernández Guevara, Jessica Lizeth Gómez López, Christian Xavier Urías Rodríguez*. ochoa@tectijuana.mx Instituto Tecnológico de Tijuana.

Introducción

Desde su primer descripción en el siglo XIX, los compuestos del tipo 2-oxazolina (UIQPA: 4,5-dihidrooxazoles) han jugado un papel muy importante en muchas áreas de la química.¹ Al igual que otros compuestos heterocíclicos, las 2-oxazolininas han generado un gran interés debido a la actividad biológica que presentan muchas moléculas que poseen esta estructura. Las 2-indoliloxazolininas (A-289099, **1**) son potentes inhibidores de la polimerización de la tubulina, por lo cual tienen una aplicación potencial como agentes anticancerígenos activos.² La D-Fluviabactina (**2**) es el enantiómero no natural de un agente quelante de hierro de origen bacteriano que se ha descrito como un potente eliminador de hierro y podría prescribirse en el tratamiento de talasemia crónica.³ El Deflazacor (**3**) es un derivado corticosteroide que ha sido distribuido comercialmente para el tratamiento de diversas condiciones inflamatorias.⁴ Por otra parte, se ha descrito al compuesto denominado L-161,240 (**4**) como un potente agente antibacteriano, que presenta una MIC (concentración mínima inhibitoria) en el mismo intervalo de otros antibióticos clínicamente importantes como lo son la ampicilina o la rifampicina, y con un mecanismo de acción basado en la inhibición de la biosíntesis de lípidos A, el principal constituyente de la membrana exterior de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*.⁵ También, se ha reportado en la literatura la actividad antimicrobiana significativa de la 2-oxazolina **5** contra diversas especies de bacterias Gram-positivas incluyendo algunas meticilino-resistentes (MRSA) como *Staphylococcus aureus* 70 y 92-1192.⁶ Finalmente, algunas 2-oxazolininas son conocidas como potentes pesticidas.⁷ Además, también han sido descritas como predrogas potenciales precursoras de ácidos carboxílicos.⁸

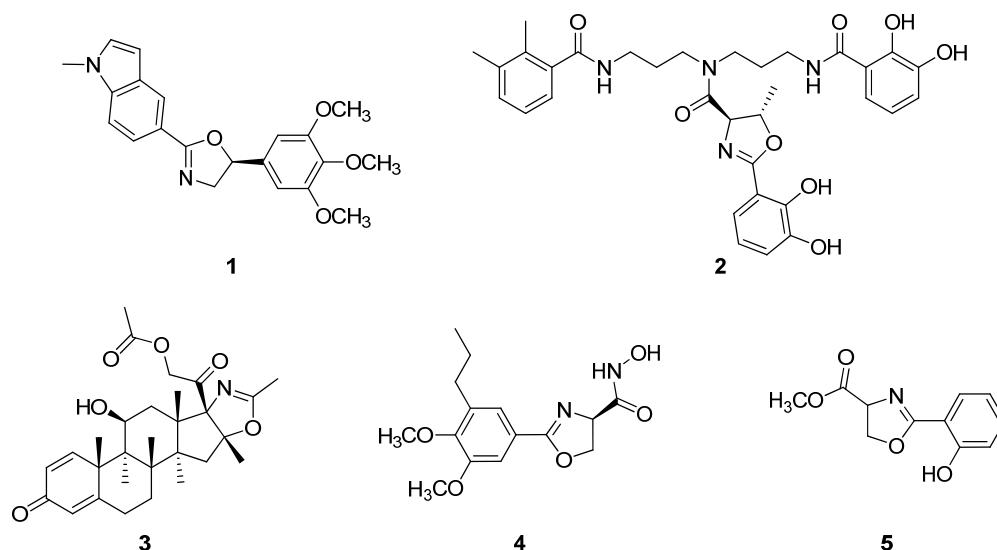
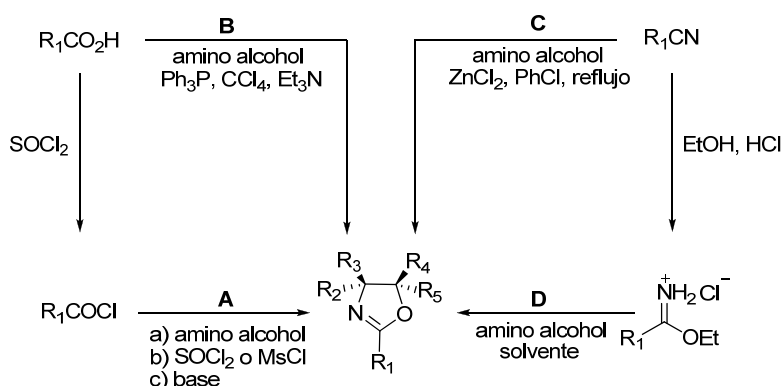


Figura 1. Moléculas biológicamente activas que poseen el anillo de 2-oxazolina.

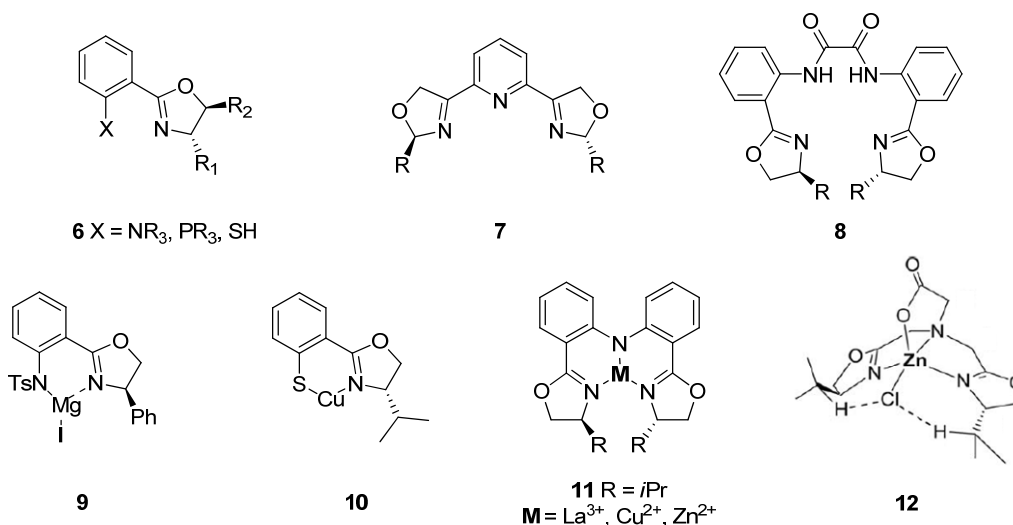
Informe Técnico de Avance

Desde el punto de vista sintético, las oxazolinas se emplean como grupos protectores de carboxilatos,⁹ como auxiliares en metalaciones *orto*-dirigidas¹⁰ o como monómeros en reacciones de polimerización.¹¹ Además las oxazolinas quirales son fragmentos importantes en compuestos biológicamente activos,¹² en auxiliares quirales¹³ o en numerosos ligandos para catálisis asimétrica como las bisoxazolinas o fosfinooxazolinas.¹⁴ Como resultado del interés por las oxazolinas, se han desarrollado métodos efectivos para su preparación.¹⁵ En particular la reacción de aminoalcoholes con cloruros de ácido (A), ácidos carboxílicos (B), nitrilos (C) e imidatos (D) son comúnmente utilizados (Esquema 1). El método A con tres etapas, generalmente resulta en buenos rendimientos; seguido de la formación del amido alcohol, el grupo hidroxilo se convierte en un buen grupo saliente y la molécula se cicla bajo condiciones básicas.¹⁵ Otro método de un solo paso que también utiliza ácidos carboxílicos en condiciones suaves es el de Appel (B), aunque tiene la desventaja de que requiere algunas veces de complicados procesos de separación para aislar los productos.¹⁶ Por su parte, la condensación de aminoalcoholes con nitrilos catalizada con ácidos de Lewis (C) a altas temperaturas es un método en un paso muy eficiente.¹⁷ Los imidatos y sus sales correspondientes, preparados mediante el tratamiento de amidas primarias con la sal de Meerwein o por la reacción de nitrilos con cloruro de hidrógeno gaseoso en etanol (D), reaccionan suavemente con aminoalcoholes para obtener las correspondientes oxazolinas.¹⁸

Esquema 1. Métodos frecuentes en la síntesis de 2-oxazolinas.



Por otra parte, el diseño y la síntesis de nuevos ligandos quirales y su aplicación en la catálisis asimétrica continúa siendo un tema de investigación importante en los laboratorios de investigación académicos e industriales. Los ligandos bidentados **6**,¹⁹ tridentados **7**^{15a,b} o tetradentados **8**²⁰ que contienen una o más unidades de oxazolina resultan ser muy eficientes en diversas transformaciones asimétricas debido a la capacidad que tienen para coordinarse con especies metálicas de distinta naturaleza (**9-12**).



Por lo tanto, en este proyecto se plantea la síntesis de nuevos compuestos de tipo 2-oxazolina derivados de α -dibencilamino ésteres quirales para ser evaluados como agentes antimicrobianos o antibióticos y en sus propiedades coordinantes como sensores para la detección y cuantificación de iones metálicos de interés clínico y ambiental.

Objetivos

Objetivo General

Sintetizar en forma estereoselectiva una serie de 2-oxazolinas enantiopuras con actividad biológica potencial a partir de α -dibencilamino ésteres quirales.

Objetivos particulares

1. Sintetizar una serie de cinco α -dibencilamino amino alcoholes a partir de α -amino ésteres naturales.
2. Preparar una biblioteca de 2-oxazolinas enantiopuras a partir de la reacción de α -dibencilamino amino alcoholes enantiopuros y nitrilos aromáticos.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de las 2-oxazolinas enantiopuras mediante bioensayos *in vitro* de pruebas de sensibilidad en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*.
4. Determinar el efecto de la estereoquímica de los compuestos sobre sus propiedades antimicrobianas.
5. Evaluar las propiedades de absorción (UV-vis) y fluorescentes de las 2-oxazolinas enantiopuras.
6. Evaluar la capacidad de coordinación de las 2-oxazolinas enantiopuras frente iones metálicos y especies moleculares a través del cambio en las propiedades de absorción y/o fluorescencia.
7. Determinar el efecto de la estereoquímica en la capacidad coordinante de los compuestos sintetizados.

Metas

1. Preparar una biblioteca de noventa compuestos tipo 2-oxazolina enantiopuros a partir de α -dibencilamino amino alcoholes y nitrilos aromáticos.
2. Probar la actividad antimicrobiana de estos compuestos frente a cepas de microorganismos de interés clínico y farmacológico como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Formación de un Doctor en Ciencias en Química.
4. Formación de un Licenciado en Ingeniería Bioquímica.
5. Integración de dos estudiantes de licenciatura a la investigación científica.
6. Publicación de dos artículos en revistas indexadas de alto impacto científico.
7. Presentación de dos ponencias en congresos nacionales especializados en el área.

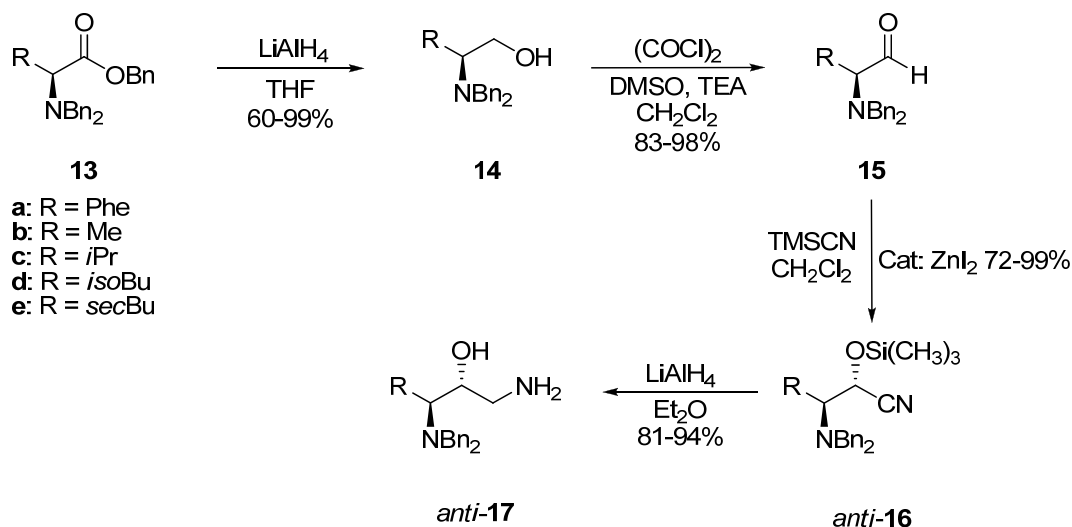
Desarrollo y resultados preliminares del proyecto

A) Síntesis estereoselectiva de 2-oxazolinas enantiopuras.

Los α -dibencilamino ésteres enantiopuros **13** derivados de L-fenilalanina (**a**), L-alanina (**b**), L-valina (**c**), L-leucina (**d**) y L-isoleucina (**e**) fueron preparados a partir de α -aminoácidos naturales mediante procedimientos estandarizados obteniéndose con rendimientos superiores al 95% en todos los casos. La reacción de estos compuestos con hidruro de litio y aluminio permitió la obtención de los correspondientes α -dibencilaminoalcoholes **14** con rendimientos del 60 al 99%. Estos alcoholes posteriormente se oxidaron a los correspondientes aldehídos **15** mediante las condiciones de oxidación de Swern obteniéndose estos productos con rendimientos del 83 al 98%.

En el proceso de adición del TMS-CN para obtener las trimetilsiloxicianhidrininas **16** en forma estereoselectiva se empleó la sal ZnI_2 como ácido de Lewis y se encontró una estereoselectividad hacia el diasteroisómero *anti* o (2*R*,3*S*) 99:1 con todos los sustratos y con rendimientos del 72 al 99%. Cuando se empleó como catalizador la sal de MgI_2 en la reacción de adición empleando el aldehído **15a** se observó una selectividad hacia el diasteroisómero *sin* o (2*S*,3*S*) 65:35 con un rendimiento del 95%. Por lo tanto, se procedió a trabajar el resto de la síntesis con los compuestos *anti*-**16** en forma independiente, estos se redujeron con hidruro de litio y aluminio para obtener los correspondientes dibencilamino amino alcoholes **17** necesarios para la síntesis de oxazolinas con rendimientos del 81 al 94% (Esquema 2). Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante las técnicas espectroscópicas de IR y RMN y por espectrometría de masas.

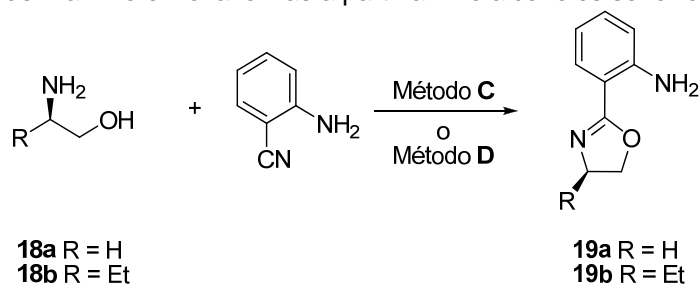
Esquema 2 Síntesis de dibencilamino aminoalcoholes enantiopuros.



Para llevar a cabo la síntesis de los compuestos tipo 2-oxazolina a partir de los aminoalcoholes sintetizados, primero se probaron los dos métodos C y D para la obtención de las 2-oxazolininas **19** empleando aminoalcoholes simples con 2-amino-benzonitrilo (Esquema 3). Primero, se llevó a cabo la reacción con 10 equivalentes de etanolamina (**18a**) empleando simultáneamente ambos métodos para poder hacer una comparación. Después de 24 horas se detuvieron las reacciones y se analizaron los productos encontrando que en la reacción con el método D se obtenía el producto con una conversión del 38%, este valor fue determinado en el espectro de RMN de hidrógeno en el producto crudo. Por su parte, con el método C se obtuvo el producto con rendimiento del 30% pero con la ventaja de que el compuesto se obtuvo puro; por lo que se optó por emplear solo el método C en la reacción del (*R*)-2-amino-1-butanol (**18b**) con el 2-aminobenzonitrilo obteniendo el producto deseado en un rendimiento del 68% después de una percolación en columna. Ambos compuestos fueron caracterizados por RMN de 1H y ^{13}C en donde se destaca una señal característica a 164 ppm correspondiente al carbono insaturado del anillo oxazolina.

Informe Técnico de Avance

Esquema 3 Preparación de 2-aminofeniloxazolininas a partir amino alcoholes sencillos.



Método C: ZnCl_2 , PhCl, reflujo

Método D: Etilenglicol/glicerol, 105°C

Debido a este análisis previo se decidió emplear el método C para la síntesis de 2-oxazolininas **20** haciendo reaccionar los aminoalcoholes enantiopuros derivado de fenilalanina con 2-aminobenzonitrilo (Esquema 4). Se realizaron ensayos para determinar las condiciones óptimas de reacción que permitieran obtener los productos deseados con el mayor rendimiento posible. Los espectros de RMN de ^{13}C de los productos crudos de la reacción mostraron evidencia de la formación del anillo de oxazolina al presentarse una señal a 165.4 ppm correspondiente al carbono insaturado de la oxazolina, sin embargo, los rendimientos son bajos y hasta este punto no ha sido posible optimizar las condiciones de reacción (Figura 2).

Esquema 4 Preparación de 2-aminofeniloxazolininas a partir de dibencilamino amino alcoholes.

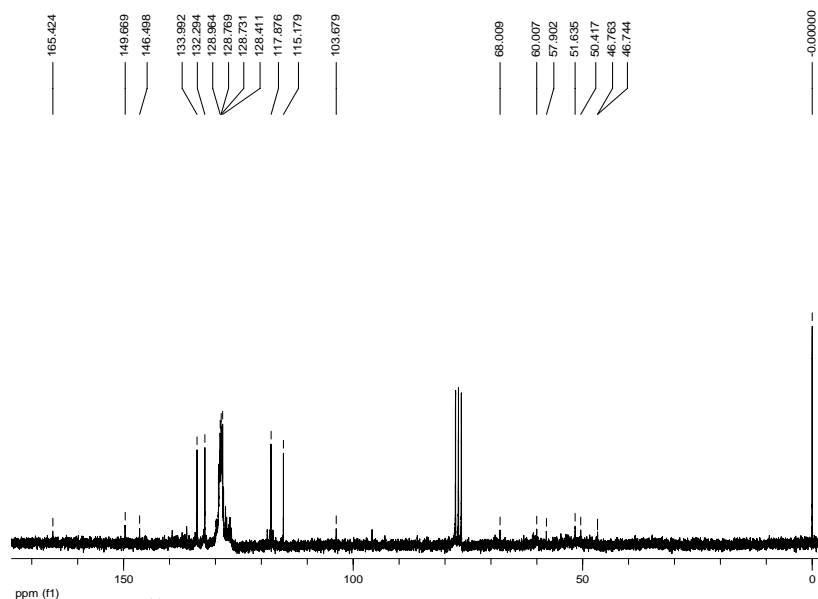
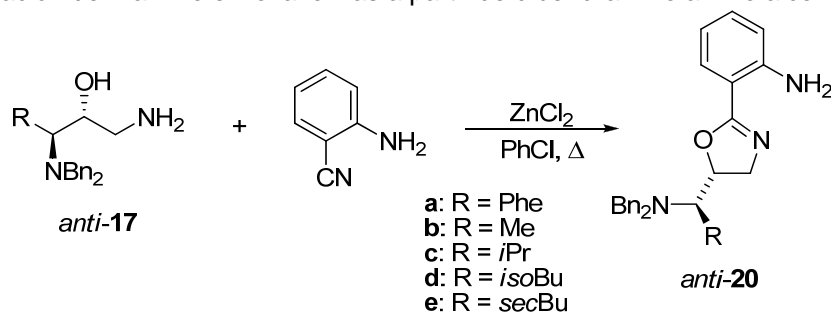
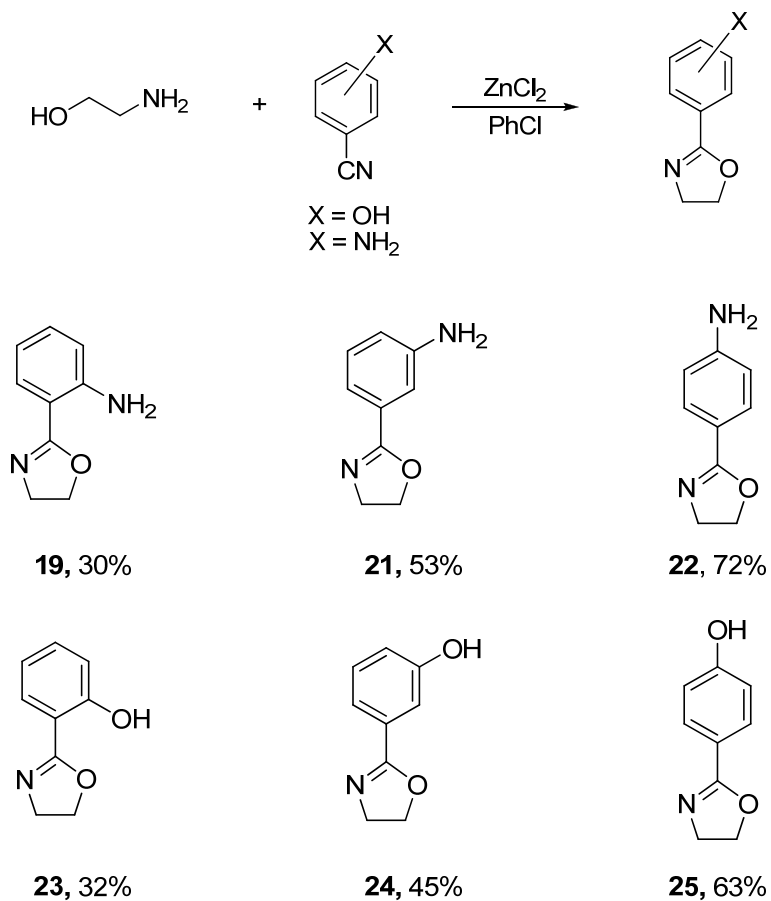


Figura 2. Espectro de RMN de ^{13}C del producto crudo **20a**.

Informe Técnico de Avance

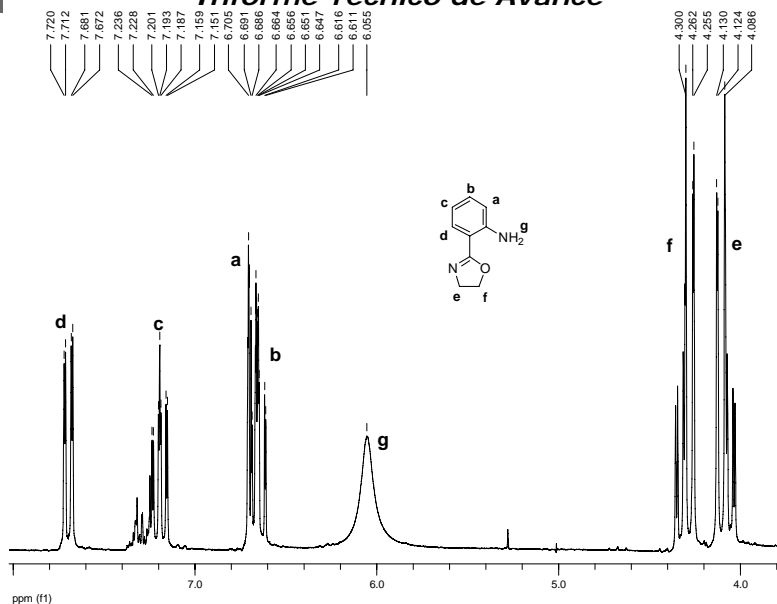
Ante la problemática experimental existente y con el objetivo de optimizar las condiciones de reacción en la formación de los productos propuestos, se decidió realizar la síntesis de 2-oxazolinas empleando como sustrato el 2-aminoetanol y la serie de benzonitrilos sustituidos con grupos amino e hidroxilo en posición *orto*, *meta* y *para* (Esquema 5). De tal forma que fue completada la serie de seis oxazolinas derivadas del 2-aminoetanol con grupos electrodonadores en el anillo aromático.

Esquema 5

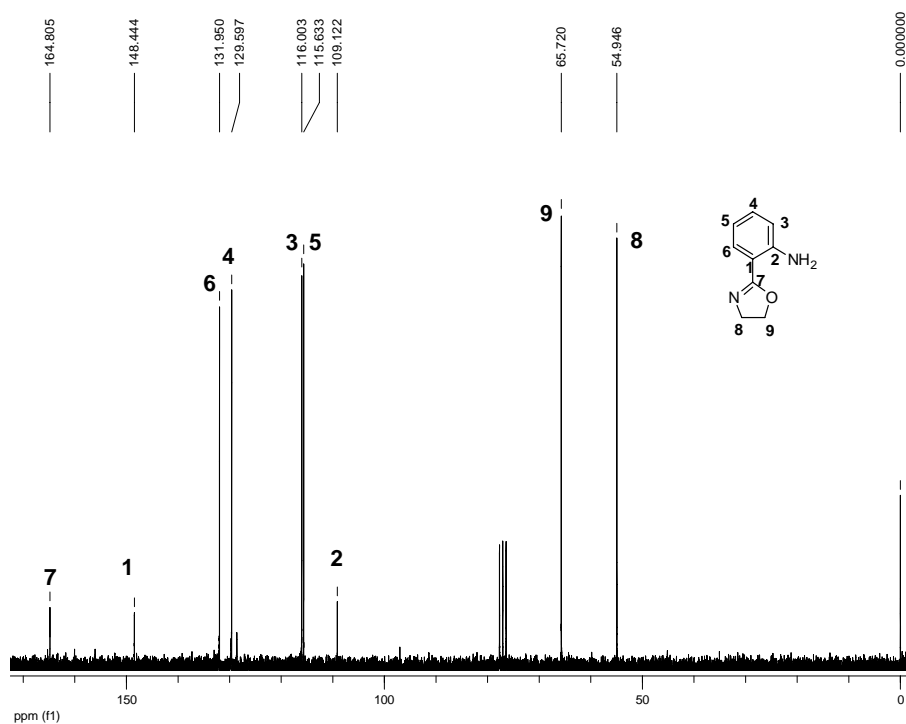


Toda la serie de compuestos fue caracterizada mediante RMN de ¹H y ¹³C, espectroscopia de infrarrojo y espectrometría de masas. En la figura 3 se muestran espectros de resonancia del compuesto **19** sustituido en *orto* con las asignaciones de las señales que corresponden a los hidrógenos y carbonos de la molécula.

Informe Técnico de Avance



(a)



(b)

Figura 3. Espectros de RMN de ^1H (a) y ^{13}C (b) del compuesto **19** obtenidos en CDCl_3 .

Con la síntesis de estos compuestos se determinó que el tiempo requerido para que se dé la conversión completa del benzonitrilo depende sustancialmente de la posición del grupo en el anillo aromático, siendo mayor con aquéllos sustratos donde la amina o el hidroxilo se encuentra en posición *orto* y menor con aquéllos que lo tienen en posición *para*. Los rendimientos obtenidos son mayores con los sustratos sustituidos en *para* y menores cuando el sustituyente se encuentra en *orto*. También, comparando entre los sustratos con amina e hidroxilo, los primeros presentaron menor tiempo de reacción y mayores rendimientos que los segundos. Con estos resultados se ha concluido que resulta conveniente optimizar las condiciones para la síntesis de las oxazolinas con los aminoalcoholes dibencilados empleando benzonitrilos sustituidos en posición *para*.

Informe Técnico de Avance

B) Estudio de las propiedades fluorescentes de los compuestos 2-oxazolina.

Para estudiar las propiedades fluorescentes de los sistemas moleculares sintetizados se procedió a medir la fluorescencia de los compuestos **19** al **24** a distintas concentraciones. En la figura 4a se muestran los espectros de emisión del compuesto **19** medidos a concentraciones entre 1×10^{-6} a 5×10^{-4} M en metanol. La longitud de onda de máxima emisión se encontró a 400 nm. Como se puede observar, este compuesto presenta una fluorescencia considerable; en el perfil de respuesta (figura 4b) se observa que la fluorescencia depende de la concentración y ésta aumenta en forma lineal en el intervalo de concentración de 1×10^{-6} M a 1×10^{-4} M. Más allá de este valor se observa el amortiguamiento de la fluorescencia por efecto de la concentración.

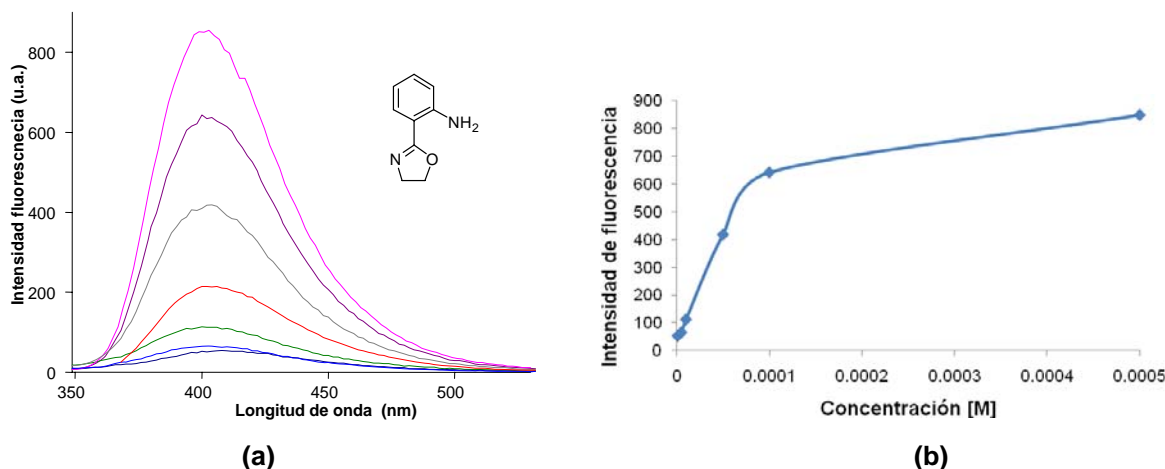


Figura 4. Espectros de emisión de fluorescencia (a) y perfil de fluorescencia del compuesto **19** en función de la concentración obtenidos en metanol. Slit 5-5.

También se efectuó la medición de fluorescencia en otros solventes polares como acetato de etilo (AcOEt), tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO), agua (H_2O), diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF) y acetonitrilo (ACN) para determinar si el solvente afectaba la fluorescencia de este compuesto. En la figura 5 se comparan los perfiles de intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración medidos con ranuras (slits de excitación y emisión) 5:5.

En los solventes polares apróticos como DMF, ACN, DCM y THF la intensidad de fluorescencia fue baja con amortiguamiento a partir de una concentración 1×10^{-4} M. En DMSO la intensidad de fluorescencia se mantuvo constante independientemente de la concentración. Sin embargo, con solventes polares próticos como MeOH y H_2O la intensidad de fluorescencia es mucho mayor y el amortiguamiento por efecto de la concentración es menos favorecido. Incluso la fluorescencia es mayor en H_2O que en MeOH, siendo el primero más polar que el segundo.

Estos resultados demuestran que la fluorescencia de este compuesto si se ve afectada por la naturaleza del solvente y la polaridad.

Informe Técnico de Avance

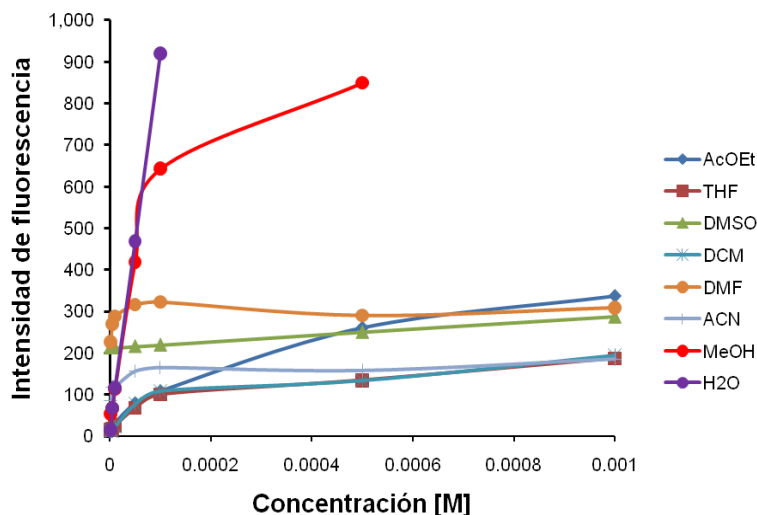


Figura 5. Perfiles de fluorescencia del compuesto **19** medido en distintos solventes. Slit 5:5.

El compuesto **21** presenta una longitud de onda de máxima emisión a 415 nm (figura 6a) en metanol. Como se puede observar, este compuesto también presenta una fluorescencia considerable aunque es de menor intensidad que la del análogo **19** en el mismo solvente; en el perfil de respuesta (figura 6b) se observa que la fluorescencia depende de la concentración y ésta aumenta en forma lineal en el intervalo de concentración de 1×10^{-6} M a 1×10^{-4} M. Más allá de este valor se observa el amortiguamiento de la fluorescencia por efecto de la concentración.

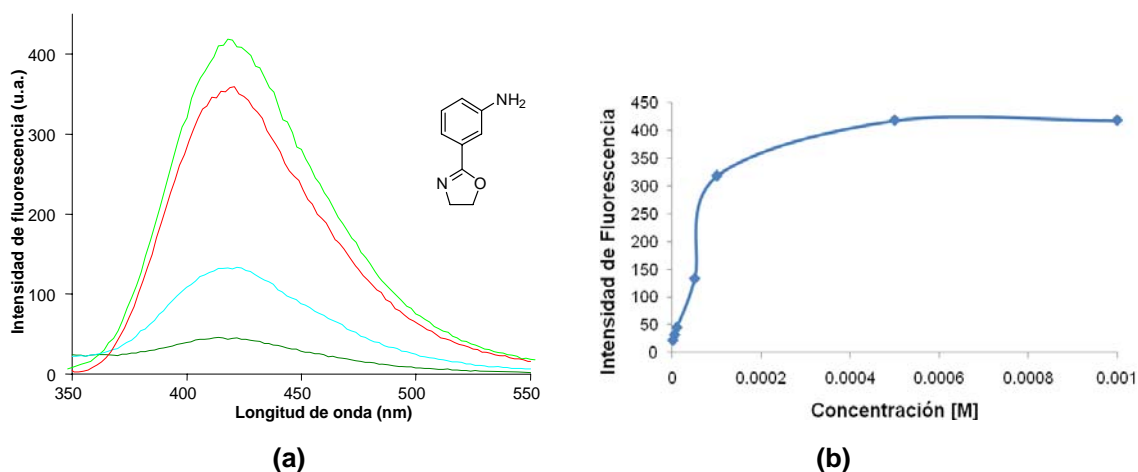


Figura 6. Espectros de emisión de fluorescencia (a) y perfil de fluorescencia del compuesto **20** en función de la concentración obtenidos en metanol. Slit 5-5.

Por su parte, el compuesto **22** presenta una longitud de onda de máxima emisión a 356 nm (figura 7a) en metanol. La medición de la fluorescencia de este compuesto se realizó empleando ranuras (slits) de 2.5:2.5 ya que en la medición con ranuras mayores la lectura obtenida se salía de la escala, esto es debido a la intensidad de fluorescencia tan alta que presenta este compuesto en metanol. En el perfil de respuesta (figura 7b) se observa que la fluorescencia depende de la concentración y ésta aumenta en forma lineal en el intervalo de concentración de 1×10^{-6} M a 5×10^{-5} M. Más allá de este valor se observa el amortiguamiento de la fluorescencia por efecto de la concentración.

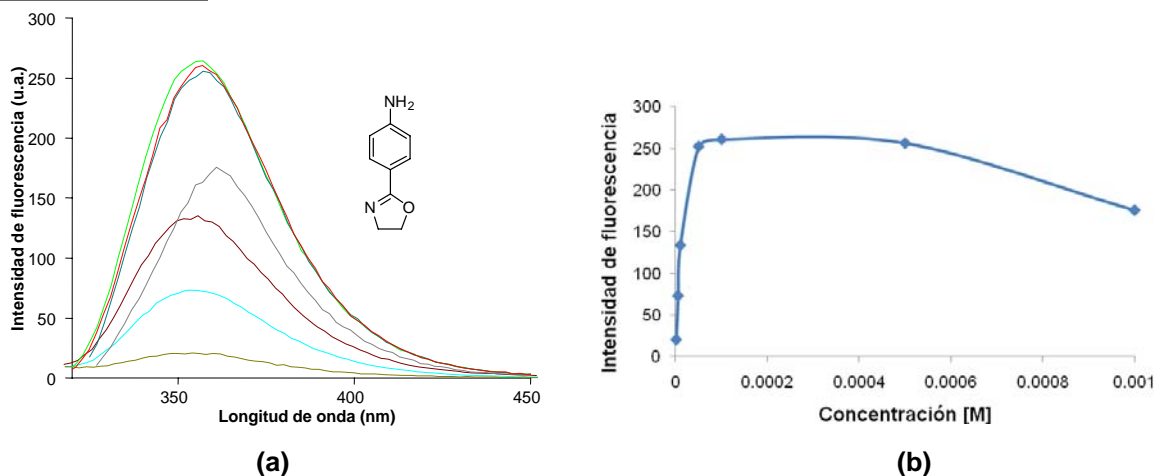


Figura 7. Espectros de emisión de fluorescencia (a) y perfil de fluorescencia del compuesto **21** en función de la concentración obtenidos en metanol. Slits 2.5:2.5.

Cuando se relacionan las propiedades fluorescentes de los compuestos **19**, **21** y **22** con su estructura es evidente que la posición del grupo amino en el anillo aromático es un factor que determina la naturaleza de la emisión y la intensidad de fluorescencia (Figura 8). Desde el punto de vista electrónico estas moléculas poseen un grupo donador y otro aceptor unidos a través de un sistema conjugado que favorece la transferencia de carga, es esta característica la que les confiere sus propiedades espectroscópicas. Sin embargo, la efectividad de esta transferencia electrónica a través de este sistema es que determina la intensidad de la fluorescencia.

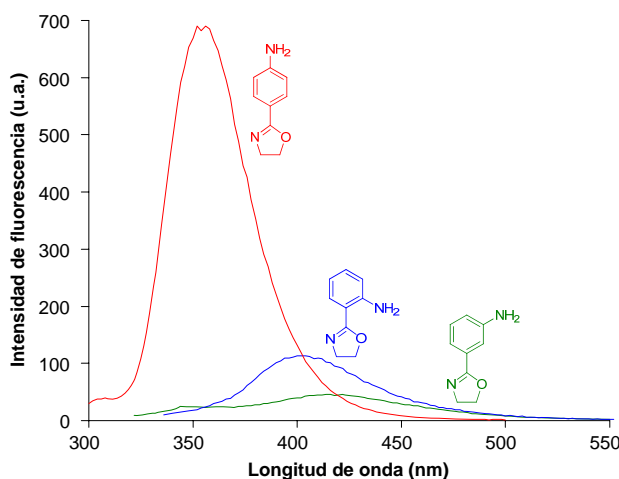
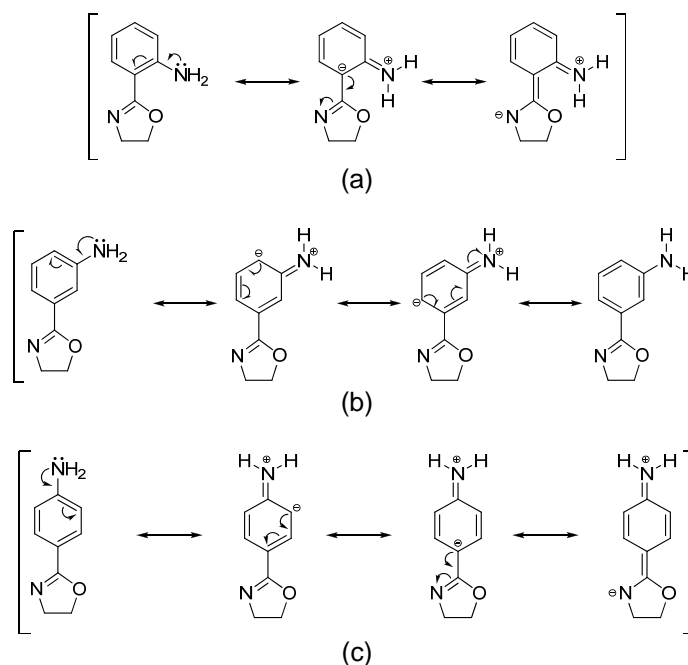


Figura 8. Espectros de emisión de fluorescencia de los compuestos **19** (slits 5:5), **21** (slits 5:5) y **22** (slits 5:2.5) obtenidos en metanol a 1×10^{-5} M.

La intensidad de fluorescencia de las aminofeniloxazolinas presenta el orden decreciente *para*>*orto*>*meta*, siendo el derivado *para* significativamente más fluorescente que los otros dos análogos. Si se analiza la deslocalización de carga que ocurre en cada una de las moléculas se observa que cuando el sustituyente amino se encuentra en posiciones *orto* y *para* (esquemas 6a y 6c) puede presentarse la transferencia de carga desde el nitrógeno de la amina hasta el nitrógeno de la oxazolina y además que el sistema conjugado es más extenso en el análogo con el sustituyente en *para* en comparación con el *orto*, lo cual explica por qué compuesto es más fluorescente. En el análogo *meta* (esquema 6b) puede presentarse deslocalización de los electrones del grupo amino hacia el anillo aromático pero estructuralmente no se favorece la transferencia de carga hacia el nitrógeno de oxazolina, lo que justifica que este compuesto sea el menos fluorescente de los tres.

Esquema 6.



Posteriormente, se realizaron estudios supramoleculares de tipo anfitrión-huésped con el compuesto **19** y diferentes cationes. En la figura 9 se presentan los perfiles de respuesta normalizados (I_f/I_o) obtenidos en la titulación con Cu^{2+} a distintas relaciones molares metal-ligando y en diferentes solventes polares. Aquí se observa que en general existe una disminución de la intensidad de fluorescencia al aumentar la relación de metal sobre el ligando. Con los solventes apróticos como DMSO, DMF y DCM se obtuvo un perfil de respuesta errático, quizás por efecto de polaridad y viscosidad altas que presentan estos solventes. Con los solventes AcOEt, ACN y THF, que son menos polares y menos viscosos, se observó una disminución gradual de la fluorescencia al aumentar la relación metal ligando, la cual resultó ser mayor en THF y ACN en comparación con AcOEt. Con solventes polares próticos como MeOH y H_2O se observó el mismo comportamiento, sin embargo, se presentó una respuesta con mayor sensibilidad con agua como solvente. En resumen la calidad de la respuesta en función del solvente tuvo el orden $\text{H}_2\text{O} \gg \text{ACN, THF} > \text{AcOEt, MeOH} \gg \gg \text{DMF, DMSO, DCM}$.

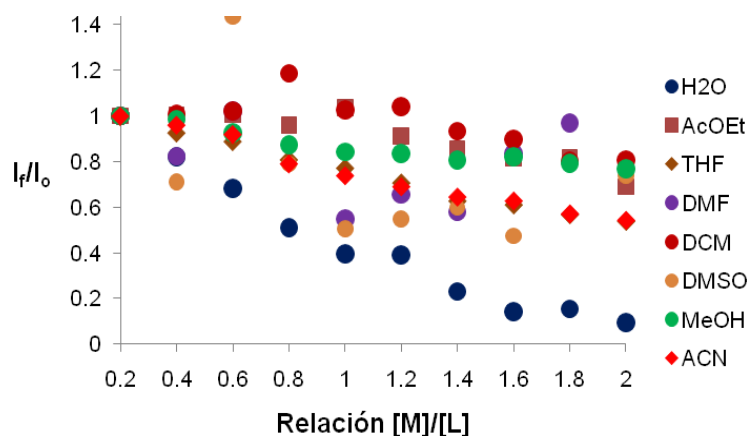


Figura 9. Perfiles de respuesta obtenidos por titulación del compuesto **19** con Cu^{2+} en distintos solventes.

Informe Técnico de Avance

En la figura 10 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos en la titulación de una solución acuosa del compuesto **19** a una concentración 1×10^{-5} M desde 0.2 hasta 2 equivalentes molares de Cu^{2+} . Esta gráfica muestra que el compuesto **19** además de presentar fluorescencia alta en agua, también presenta una respuesta de gran sensibilidad hacia los iones de Cu^{2+} .

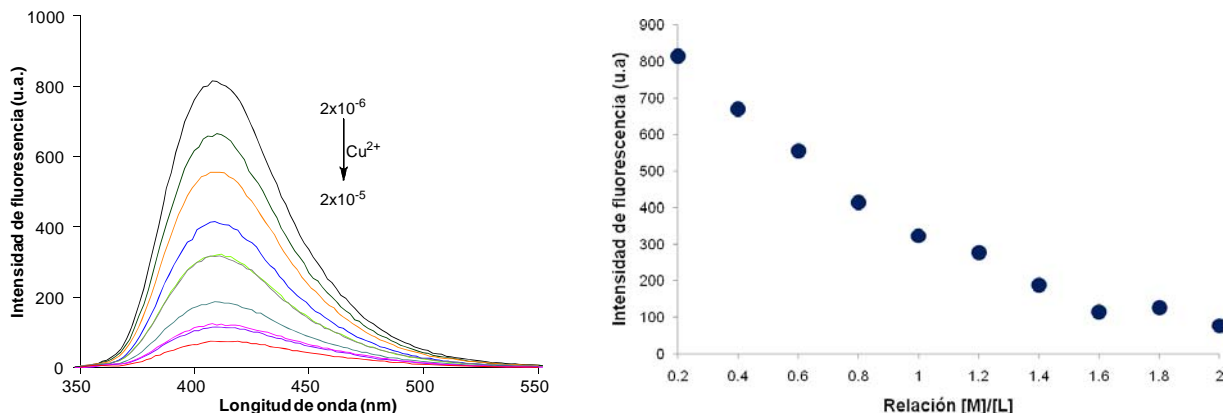
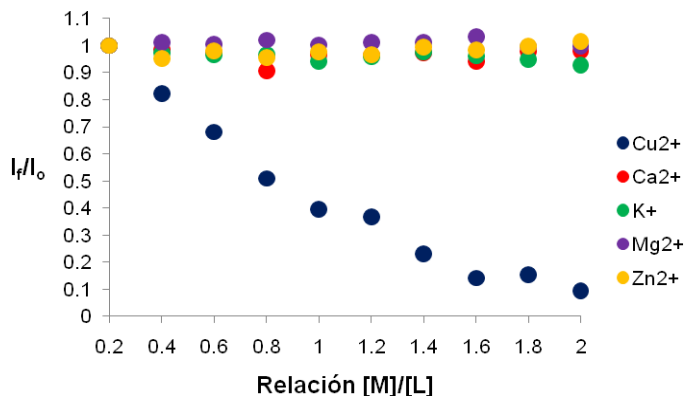
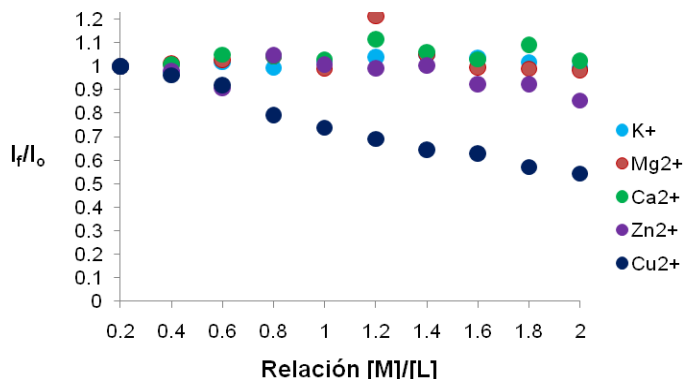


Figura 10. (a) Espectros de emisión de fluorescencia del compuesto **19** (1×10^{-5} M) titulado con Cu^{2+} en H_2O . (b) Perfil de respuesta de la titulación. Slits 2.5:5.

Cuando se efectuaron estudios supramoleculares con otros cationes como K^+ (catión alcalino), Mg^{2+} y Ca^{2+} (cationes alcalino-térreos) y Zn^{2+} (catión de transición) en agua y acetonitrilo no se presentó cambio en la fluorescencia a ninguna relación metal-ligando (Figura 11). Estos resultados mostraron que el reconocimiento con iones Cu^{2+} además de ser de alta sensibilidad es de gran especificidad o selectividad.



(a)



(b)

Figura 11. Perfiles de respuesta del compuesto **19** (1×10^{-5} M) en (a) agua y (b) acetonitrilo obtenidos por titulación con distintos cationes metálicos.

Informe Técnico de Avance

Además en la comparación de los perfiles de respuesta obtenidos en agua y acetonitrilo muestran que el solvente afecta la sensibilidad de la respuesta frente al catión pero no la selectividad, lo cual es muy importante desde el punto de vista analítico.

Mediante el método de las proporciones constantes o método de Job fue determinada la relación metal-ligando en la que se forma el complejo del ligando **19** y el catión de Cu^{2+} . En la figura 12a y 12c se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos a distintas proporciones de metal-ligando medidos en agua y acetonitrilo y mediante los perfiles de respuesta (figura 12b y 12d) se determinó que la relación metal:ligando para este complejo es de 1:1.

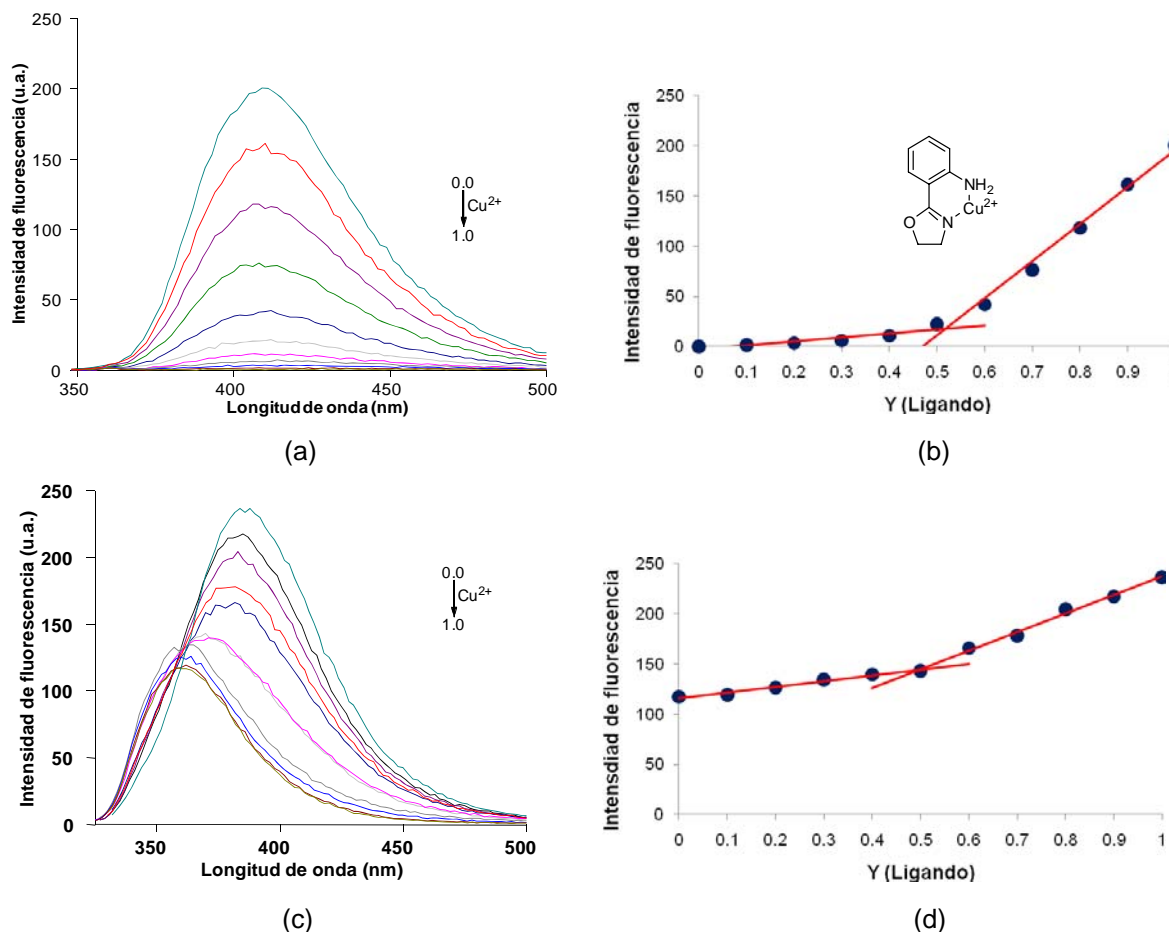


Figura 12. Método de Job: espectros de emisión del ligando **19** y Cu^{2+} $[\text{L} + \text{Cu}^{2+}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ en agua (a) y acetonitrilo (c) con sus respectivos perfiles de respuesta (b y d) . Slits 2.5:5.

De nuevo, la comparación de los espectros de emisión obtenidos en agua y acetonitrilo muestra una respuesta con mayor sensibilidad en agua, sin embargo, en acetonitrilo se observa el desplazamiento de la banda de emisión a menor número de onda lo demuestra la formación de otra especie, que en este caso es el complejo con el metal. También se observa que el punto isobéptico se encuentra a 360 nm, esta es la longitud de onda a la cual las dos especies químicas tienen la misma absorptividad molar.

C) Aislamiento de microorganismos y pruebas antimicrobianas.

Un objetivo importante en el desarrollo de este proyecto es probar la actividad antimicrobiana de los compuestos químicos sintetizados frente a bacterias *Gram* negativas. Por lo tanto, para el aislamiento de bacterias entéricas como lo es la *Escherichia coli* fue necesario tomar una muestra de heces fecales y aislar el microorganismo mediante cultivo en placas de agar EMB estéril por el método de estria cruzada. Las

Informe Técnico de Avance

colonias sospechosas de ser *Escherichia coli* se reaislaron por el método de estría cruzada, en placas de agar EMB estéril cultivándolas a 35°C por 24 h.

Una vez aislado el microorganismo, se le realizaron pruebas morfológicas y bioquímicas para verificar que se trataba de *E. coli*, esta serie de pruebas consistieron en una tinción tipo *Gram*, tomando un poco de muestra del cultivo puro, se diluyó con un poco de agua destilada y se fijó a un portaobjetos, posteriormente se realizó una tinción siguiendo la metodología *Gram*, los resultados de ésta fueron la visualización de bacilos cortos de coloración rojiza a fucsia.

Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas y enzimáticas a este cultivo, utilizando el “kit BBL-cristal”, de acuerdo a las instrucciones del mismo se tomó un poco del cultivo y se diluyó de acuerdo a las instrucciones del kit. Esta dilución se vertió en el panel de control del mismo kit, y se incubó el panel a 35°C por 24 h. Se leyeron los resultados del panel de acuerdo a la base de datos del kit, el resultado de esta prueba fue una identificación positiva de *Escherichia coli* con una probabilidad del 99.8%.

Parte Experimental

Procedimiento general para la síntesis de α -N,N-dibencilamino alcoholes 14. Se agregó LiAlH₄ (2 equivalentes) a una solución del α -dibencilamino ester **13** en éter etílico seco bajo atmósfera de argón a 0°C. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación constante durante 8 horas y posteriormente se agregó gota a gota una solución acuosa de hidróxido de potasio al 5% hasta lograr un sólido blanco. La mezcla de reacción se filtró por gravedad para separar el sólido y se eliminó el solvente de la fase orgánica para obtener el producto puro.

(S)-2-(N,N-dibencilamino)-3-fenilpropanol (14a). Sólido blanco. 99% de rendimiento. FTIR (KBr): 3426, 3026, 2958, 1601, 1029 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.28 (m, 15H), 4.64 (s, 1H), 3.91 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.47 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.32 (dd, $J=10.6$, 4.5 Hz, 1H), 3.10 (m, 2H), 2.42 (dd, $J=14.0$, 10.6 Hz, 1H). RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ 138.8 (C), 138.7 (2 x C), 128.7 (6 x CH), 128.2 (6 x CH), 127.0 (2 x CH), 125.9 (CH), 60.7 (CH), 60.1 (CH₂), 53.2 (2 x CH₂), 31.7 (CH₂). EM-IES m/z : 332 [M+H]⁺; EM/EM m/z (int. rel.): 240(75), 224(96), 181(100), 117(30). EM-IES m/z : 354 [M+Na]⁺.

(S)-2-(N,N-dibencilamino)propanol (14b). Aceite transparente. 94% de rendimiento. FTIR (película): 3421, 3060, 2929, 1601, 1365, 1035 cm⁻¹. NMR-¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.30 (m, 10H), 3.81 (d, $J=13.4$ Hz, 2H), 3.45 (t, $J=10.6$ Hz, 1H), 3.44 (m, 2H), 3.35 (d, $J=13.4$ Hz, 2H), 3.34 (dt, $J=10.6$, 5.6 Hz, 1H), 2.98 (m, 1H), 0.97 (d, $J=6.6$ Hz, 3H). RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ 138.8 (2 x C), 128.7 (4 x CH), 128.2 (4 x CH), 126.9 (2 x CH), 62.5 (CH), 56.0 (CH₂), 52.7 (2 x CH₂), 8.6 (CH₃). EM-IES m/z : 256 [M+H]⁺; EM/EM m/z (int. rel.): 181(96), 164(35), 148(60), 91(100). EM-IES m/z : 278 [M+Na]⁺.

(S)-2-(N,N-dibencilamino)-4-metilpentanol (14c). Aceite transparente. 78% de rendimiento. FTIR (película): 3430, 3027, 2955, 1601, 1364 1068 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.27 (m, 10H), 3.80 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.44 (m, 2H), 3.36 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 2.84 (m, 1H), 1.51 (m, 2H), 1.15 (m, 1H), 0.91 (d, $J=6.2$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J=6.4$ Hz, 3H). RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ 139.0 (2 x C), 128.7 (4 x CH), 128.1 (4 x CH), 126.9 (2 x CH), 67.7 (CH), 56.7 (CH₂), 52.9 (2 x CH₂), 33.9 (CH₂), 25.4 (CH), 23.9 (CH₃), 22.0 (CH₃). EM-IES m/z : 284 [M+H]⁺; EM/EM m/z (int. rel.): 192(35), 181(90), 120(90), 91(100). EM-IES m/z : 306 [M+Na]⁺.

(S)-2-(N,N-dibencilamino)-3-metilbutanol (14d). Aceite transparente. 60% de rendimiento. FTIR (película): 3440, 3060, 2952, 1600, 1151, 1030 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.27 (m, 10H), 3.80 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.44 (m, 2H), 3.36 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 2.84 (m, 1H), 1.51 (m, 2H), 1.15 (m, 1H), 0.91 (d, $J=6.2$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J=6.4$ Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 139.0 (2 x C), 128.7 (4 x CH), 128.1 (4 x CH), 126.9 (2 x CH), 67.7 (CH), 56.7 (CH₂), 52.9 (2 x CH₂), 33.9 (CH₂), 25.4 (CH), 23.9 (CH₃), 22.0 (CH₃). EM-IES m/z : 298 [M+H]⁺; EM/EM m/z (int. rel.): 206(50), 190(96), 181(90), 91(100). EM-IES m/z : 320 [M+Na]⁺.

(2S,3S)-2-(N,N-dibencilamino)-3-metilpentanol (14e). Aceite transparente. 87% de rendimiento. FTIR (película): 3376, 3060, 2962, 1601, 1377, 1070, 1027 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.26 (m, 10H), 3.88 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.59 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.53 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.64 (c, $J=7.0$ Hz, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.25 (m, 1H), 0.90 (d, $J=4.4$ Hz, 3H), 0.87 (t, $J=6.6$ Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 139.4 (2 x C), 128.8 (4 x CH), 128.1 (4 x CH), 126.8 (2 x CH), 62.7 (CH), 58.6 (CH₂), 53.9 (2 x CH₂), 32.7 (CH), 28.3 (CH₂), 15.9 (CH₃), 11.5 (CH₃). EM-IES m/z : 298 [M+H]⁺; EM/EM m/z (int. rel.): 206(35), 181(95), 120(85), 91(100). EM-IES m/z : 320 [M+Na]⁺.

Informe Técnico de Avance

Procedimiento general para la síntesis de α -*N,N*-dibencilamino aldehídos 15. Se preparó una solución de cloruro de oxalilo (1.1 equivalentes) en CH_2Cl_2 seco y se bajó la temperatura a -78°C manteniendo agitación constante bajo atmósfera de argón. Posteriormente se añadió gota a gota una solución de DMSO (2.2 equivalentes) en CH_2Cl_2 y se mantuvo en agitación durante 10 minutos. Posteriormente se agregó gota a gota una solución del *N,N*-dibencilamino alcohol **14** (1.0 equivalente) y se agitó durante 30 minutos manteniendo la misma temperatura. Luego se añadió lentamente una solución de trietilamina (5.0 equivalentes) en CH_2Cl_2 y la mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con solución salina y se secó con Na_2SO_4 , se filtró y el solvente fue evaporado a presión reducida obteniendo los productos crudos que se emplearon en la siguiente reacción sin purificación.

(S)-2-(*N,N*-dibencilamino)-3-fenilpropanal (15a). Aceite amarillo. 95% de rendimiento. FTIR (película): 3026, 2922, 2709, 1727, 1122 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 9.70 (s, 1H), 7.27 (m, 15H), 3.82 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.66 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.55 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.14 (dd, $J=13.6, 7.2$ Hz, 1H), 2.92 (dd, $J=13.6, 6.2$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 201.7 (CH), 138.8 (C), 138.5 (2 x C), 129.1 (2 x CH), 128.4 (4 x C), 128.1 (6 x CH), 127.0 (2 x CH), 125.9 (CH), 68.3 (CH), 54.7 (2 x CH_2), 30.0 (CH_2). EM-IES m/z : 362 [$\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}$] $^+$; EM/EM m/z (int. rel.): 344(100), 330(35).

(S)-2-(*N,N*-dibencilamino)propanal (15b). Aceite amarillo. 83% de rendimiento. FTIR (película): 3060, 2807, 2706, 1725, 1372, 1149, 1028 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 9.71 (s, 1H), 7.28 (m, 10H), 3.73 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.55 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 2.77 (q, $J=6.6$ Hz, 1H), 1.17 (d, $J=6.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 204.0 (CH), 138.7 (2 x C), 128.5 (4 x CH), 128.1 (4 x CH), 127.0 (2 x CH), 62.7 (CH), 54.8 (2 x CH_2), 6.7 (CH_3). EM-IES m/z : 254 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

(S)-2-(*N,N*-dibencilamino)-3-metilbutanal (15c). Aceite amarillo. 97% de rendimiento. FTIR (película): 3060, 2961, 2723, 1728, 1198 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 9.83 (d, $J=3.4$ Hz, 1H), 7.32 (m, 10H), 4.01 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.70 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 2.71 (dd, $J=10.0, 3.4$ Hz, 1H), 2.25 (m, 1H), 1.07 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J=6.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 204.6 (CH), 138.8 (2 x C), 128.4 (4 x CH), 128.0 (4 x CH), 126.8 (2 x CH), 71.3 (CH), 54.4 (2 x CH_2), 25.9 (CH), 20.1 (CH_3), 19.7 (CH_3). EM-IES m/z : 282 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 314 [$\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}$] $^+$.

(S)-2-(*N,N*-dibencilamino)-4-metilpentanal (15d). Aceite amarillo. 98% de rendimiento. FTIR (película): 3061, 2954, 2706, 1727, 1370, 1145 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 9.74 (s, 1H), 7.31 (m, 10H), 3.78 (d, $J=13.8$ Hz, 2H), 3.69 (d, $J=13.8$ Hz, 2H), 3.21 (t, $J=6.4$ Hz, 1H), 1.56 (m, 3H), 0.82 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 0.77 (d, $J=6.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 203.5 (CH), 138.9 (2 x C), 128.5 (4 x CH), 128.0 (4 x CH), 126.9 (2 x CH), 64.6 (CH), 54.6 (2 x CH_2), 32.9 (CH_2), 25.1 (CH), 22.6 (CH_3), 22.4 (CH_3). EM-IES m/z : 296 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; 328 [$\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}$] $^+$.

(2S,3S)-2-(*N,N*-dibencilamino)-3-metilpentanal (15e). Aceite amarillo. 96% de rendimiento. FTIR (película): 3030, 2964, 2730, 1723, 1207, 1028 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 9.84 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 7.31 (m, 10H), 4.00 (d, $J=13.7$ Hz, 2H), 3.68 (d, $J=13.7$ Hz, 2H), 2.81 (dd, $J=9.6, 4.0$ Hz, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.19 (m, 1H), 0.84 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 0.79 (t, $J=7.4$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 205.0 (CH), 138.8 (2 x C), 128.5 (4 x CH), 128.0 (4 x CH), 126.8 (2 x CH), 69.8 (CH), 58.6 (CH_2), 54.4 (2 x CH_2), 31.9 (CH), 25.4 (CH_2), 15.8 (CH_3), 10.4 (CH_3). EM-IES m/z : 296 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; EM/EM m/z (rel. int.): 206(35), 181(95), 120(85), 91(100). EM-IES m/z : 328 [$\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}$] $^+$.

Procedimiento general para la síntesis de *N,N*-dibencilamino trimetilsililoxicianhidridinas 16. A una solución de aldehído **15** (1.0 equivalente) en CH_2Cl_2 anhidro se le añadió el catalizador (1.0 equivalente, ZnI_2 o MgBr_2) a 0°C bajo atmósfera de argón y se mantuvo en agitación durante 10 minutos. Luego se añadió gota a gota cianuro de trimetilsilano (1.0 equivalente) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante dos horas a la misma temperatura. Después de este tiempo, se añadió agua y la mezcla se agitó durante cinco minutos permitiendo que alcanzara la temperatura ambiente. La fase orgánica fue separada y lavada con una solución salina, se secó con Na_2SO_4 , se filtró y el solvente fue eliminado a presión reducida para obtener un producto crudo que fue utilizado en la siguiente reacción sin purificación.

(2S,3S)-3-(*N,N*-dibencilamino)-4-fenil-2-(trimetilsililoxi)butanonitrilo (16a). Aceite transparente. 99% de rendimiento. FTIR (película): 3028, 2950, 2368, 1254, 1114, 850 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.22 (m, 15H), 4.46 (d, $J=6.2$ Hz, 1H), 3.72 (sa, 4H), 3.38 (dt, $J=8.0, 6.2$ Hz, 1H), 2.99 (m, 2H), 0.17 (s, 9H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 138.9 (C), 138.6 (2 x C), 129.1 (2 x CH), 128.5 (4 x CH), 128.0 (2 x CH), 127.9 (4 x CH), 126.8 (2 x CH), 126.0 (CH), 119.5 (C), 63.0 (CH), 62.7 (CH), 54.7 (2 x CH_2), 33.1 (CH_2), -0.4 (3 x CH_3). EM-IES m/z : 429 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; EM/EM m/z (int. rel.): 311(100), 210(20). EM-IES m/z : 451 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

Informe Técnico de Avance

(2S,3S)-3-(N,N-dibencilamino)-2-(trimetilsililoxi)butanonitrilo (16b). Aceite transparente. 97% de rendimiento. FTIR (película): 3061, 2959, 2212, 1253, 1092, 845 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.43 (m, 10H), 4.47 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 3.87 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.64 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.24 (m, 1H), 1.24 (d, $J=6.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 139.0 (2 x C), 128.8 (4 x CH), 128.4 (4 x CH), 127.2 (2 x CH), 120.0 (C), 65.2 (CH), 57.6 (CH), 55.1 (2 x CH_2), 9.5 (CH_3), 0.08 (3 x CH_3). EM-IES m/z : 353 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 375 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(2S,3S)-3-(N,N-dibencilamino)-4-metil-2-(trimetilsililoxi)pentanonitrilo (16c). Aceite transparente. 83% de rendimiento. FTIR (película): 3062, 2957, 2218, 1250, 1085, 840 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.32 (m, 10H), 4.77 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 4.19 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.73 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 2.66 (dd, $J=10.6$, 5.8 Hz, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.02 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J=6.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 138.9 (2 x C), 129.2 (4 x CH), 128.5 (4 x CH), 127.4 (2 x CH), 119.9 (C), 64.6 (CH), 59.3 (CH), 54.6 (2 x CH_2), 28.9 (CH), 22.4 (CH_3), 20.1 (CH_3), -0.2 (3 x CH_3). EM-IES m/z : 367 $[\text{M}-\text{Me}+2\text{H}]^+$; EM/EM m/z (int. rel.): 325(95), 275(100), 199(10).

(2S,3S)-3-(N,N-dibencilamino)-5-metil-2-(trimetilsililoxi)hexanonitrilo (16d). Aceite transparente. 94% de rendimiento. FTIR (película): 3061, 2955, 2228, 1255, 1106, 848 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.34 (m, 10H), 4.45 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 3.81 (d, $J=13.8$ Hz, 2H), 3.63 (d, $J=13.8$ Hz, 2H), 3.00 (m, 1H), 1.75 (m, 2H), 1.25 (m, 1H), 0.90 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 0.70 (d, $J=6.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 139.0 (2 x C), 128.6 (4 x CH), 128.0 (4 x CH), 126.8 (2 x CH), 119.8 (C), 63.2 (CH), 58.8 (CH), 54.6 (2 x CH_2), 36.4 (CH_2), 25.0 (CH), 23.3 (CH_3), 22.0 (CH_3), -0.4 (3 x CH_3). EM-IES m/z : 395 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 417 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 381 $[\text{M}-\text{Me}+2\text{H}]^+$; EM/EM m/z (int. rel.): 290(100), 248(10), 213(12), 157(10).

(2S,3S,4S)-3-(N,N-dibencilamino)-4-metil-2-(trimetilsililoxi)hexanonitrilo (16e). Aceite transparente. 72% de rendimiento. FTIR (película): 3060, 2958, 2232, 1245, 1102, 845 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.33 (m, 10H), 4.78 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.87 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.65 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 2.79 (dd, $J=7.8$, 4.8 Hz, 1H), 1.94 (m, 2H), 1.17 (m, 1H), 0.97 (d, $J=7.0$ Hz, 3H), 0.75 (t, $J=7.4$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 139.1 (2 x C), 129.0 (4 x CH), 128.2 (4 x CH), 126.9 (2 x CH), 120.3 (C), 64.0 (CH), 61.0 (CH), 54.9 (2 x CH_2), 33.0 (CH), 27.1 (CH_2), 16.0 (CH_3), 11.2 (CH_3), -0.2 (3 x CH_3). EM-IES m/z : 296 $[\text{M}+\text{H}]^+$; EM/EM m/z (int. rel.): 206(35), 181(95), 120(85), 91(100). EM-IES m/z : 395 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 417 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Procedimiento general para la síntesis de α -N,N-dibencilamino amino alcoholes 17. Se añadió LiAlH_4 (2.0 equivalentes) a una solución de una trimetilsililoxicianhidrina **16** en éter etílico anhidro bajo atmósfera de argón a 0°C y se mantuvo en agitación constante durante 5 horas a la misma temperatura. Luego, se añadió gota a gota una solución acuosa de KOH al 5% hasta la formación de un sólido blanco. La mezcla se filtró para separar el sólido y se evaporó el solvente de la fase orgánica para obtener el producto crudo que se empleó en la siguiente reacción sin purificación.

(2R,3S)-1-amino-3-(dibencilamino)-4-fenil-2-butanol (17a). Aceite transparente. 94% de rendimiento. FTIR (película): 3365, 3299, 2926, 1600, 1251, 1110 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.21 (m, 15H), 3.93 (dd, $J=13.4$, 9.4 Hz, 1H), 3.70 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.57 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.43 (dd, $J=15.0$, 13.4 Hz, 1H), 2.82 (m, 4H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 141.1 (C), 139.5 (2 x C), 129.1 (2 x CH), 128.5 (4 x CH), 128.2 (2 x CH), 127.9 (4 x CH), 126.6 (2 x CH), 125.5 (CH), 72.0 (CH), 61.4 (CH), 54.4 (2 x CH_2), 44.6 (CH_2), 32.5 (CH_2). EM-IES m/z : 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$; EM/EM m/z (int. rel.): 344(98), 300(20), 210 (100).

(2R,3S)-1-amino-3-(dibencilamino)-2-butanol (17b). Aceite transparente. 81% de rendimiento. FTIR (película): 3363, 3284, 3027, 2958, 1578, 1076 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.25 (m, 10H), 3.65 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 3.62 (dd, $J=11.0$, 5.8 Hz, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.31 (d, $J=13.6$ Hz, 2H), 2.76 (dd, $J=11.0$, 6.4 Hz, 1H), 2.55 (q, $J=6.6$ Hz, 1H), 1.10 (d, $J=6.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 140.3 (2 x C), 129.1 (4 x CH), 128.5 (4 x CH), 127.2 (2 x CH), 73.5 (CH), 65.6 (CH), 54.7 (2 x CH_2), 44.6 (CH_2), 12.1 (CH_3). EM-IES m/z : 286 $[\text{M}+\text{H}]^+$; EM/EM m/z (int. rel.): 268(100), 199(5), 91(10).

(2R,3S)-1-amino-3-(dibencilamino)-5-metil-2-hexanol (17c). Aceite transparente. 92% de rendimiento. FTIR (película): 3342, 3283, 3061, 2955, 1601, 1361, 1068 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.24 (m, 10H), 3.87 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.66 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.56 (dd, $J=10.6$, 4.8 Hz, 1H), 3.42 (t, $J=10.6$ Hz, 1H), 2.52 (m, 1H), 2.06 (m, 1H), 1.12 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J=7.0$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 139.5 (2 x C), 128.9 (4 x CH), 128.0 (4 x CH), 126.8 (2 x CH), 70.5 (CH), 64.0 (CH), 55.1 (2 x CH_2), 44.7 (CH_2), 26.3 (CH), 23.6 (CH_3), 20.1 (CH_3). EM-IES m/z : 313 $[\text{M}+\text{H}]^+$; EM/EM m/z (int. rel.): 296(100), 278(5), 199(10), 91(7).

(2R,3S)-1-amino-3-(dibencilamino)-5-metil-2-hexanol (17d). Aceite transparente. 89% de rendimiento. FTIR (película): 3300, 3061, 2952, 1601, 1366, 1072 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.30 (m, 10H), 3.76 (m, 1H), 3.62 (sa, 4H), 3.38 (dd, $J=13.2$, 11.8 Hz, 1H), 2.66 (m, 3H), 1.60 (m, 1H), 0.91 (d, $J=6.6$ Hz, 3H),

Informe Técnico de Avance

0.73 (d, $J=6.4$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 139.9 (2 x C), 128.7 (4 x CH), 127.9 (4 x CH), 126.6 (2 x CH), 71.4 (CH), 56.8 (CH), 54.6 (2 x CH_2), 44.9 (CH_2), 35.5 (CH_2), 25.2 (CH), 23.2 (CH_3), 22.7 (CH_3). EM-IES m/z : 327 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; EM/EM m/z (int. rel.): 310(100), 233(45), 198(30).

(2R,3S,4S)-1-amino-3-(dibencilamino)-4-metil-2-hexanol (17e). Aceite transparente. 87% de rendimiento. FTIR (película): 3345, 3289, 3060, 2955, 1601, 1376, 1061, 1027 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.24 (m, 10H), 3.75 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 3.73 (m 2H), 3.54 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 2.65 (dd, $J=13.6$, 7.0 Hz, 1H), 2.44 (dd, $J=7.6$, 4.6 Hz, 1H), 2.24 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.08 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 0.95 (t, $J=7.6$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 139.7 (2 x C), 128.8 (4 x CH), 128.0 (4 x CH), 126.8 (2 x CH), 70.1 (CH), 62.5 (CH), 54.8 (2 x CH_2), 44.6 (CH_2), 32.4 (CH), 29.8 (CH_2), 16.1 (CH_3), 12.2 (CH_3). EM-IES m/z : 327 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; EM/EM m/z (rel. int.): 309(100), 292(10), 198(35), 91(5).

Procedimiento general para la síntesis de oxazolinas 19 (Método C). Se añadió ZnCl_2 (1.2 equivalentes) y 2-aminobenzonitrilo (2 equivalentes) a una solución del aminoalcohol (10 equivalentes) en cloruro de benceno como solvente en una proporción de 8.14 mL de solvente/mmol de aminoalcohol. Se dejó reaccionar por un periodo de 24 h en un sistema de reflujo y agitación constantes. Una vez transcurridas las 24 h se evaporó el solvente a presión reducida y se hicieron lavados con soluciones acuosas de NH_4Cl y NaCl , la fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 . Se eliminó el exceso de agua en la fase orgánica con Na_2SO_4 , siendo posteriormente separado por filtración por gravedad y el solvente se eliminó por evaporación a presión reducida.

2-(4,5-dihidrooxazol-2-il)anilina (19a). Sólido blanco. 30% de rendimiento. FTIR (KBr): ν 3384, 3264, 3082, 1630, 1254 cm^{-1} . RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.70 (dd, $J=7.9$, 1.7 Hz, 1H), 7.18 (ddd, $J=8.3$, 7.1, 1.8 Hz, 1H), 6.68 (dd, $J=8.4$, 1.0 Hz, 1H), 6.60 (ddd, $J=7.9$, 7.1, 1.6 Hz, 1H), 6.05 (sa, 2H), 4.22 (dd, $J=8.4$, 2.2 Hz, 1H), 4.17 (dd, $J=8.0$, 1.6 Hz, 1H), 4.00 (dd, $J=8.0$, 1.6 Hz, 1H), 3.95 (dd, $J=8.4$, 2.2 Hz, 1H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 164.8, 148.5, 131.9, 129.6, 116.0, 115.6, 109.1, 65.7, 54.9. EM-IE m/z (int. rel.): 162 (100), 131 (36), 118 (33) uma.

2-(5-etil-4,5-dihidrooxazol-2-il)anilina (19b). Aceite transparente. 68% de rendimiento. RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.68 (dd, $J=8.0$, 1.4 Hz, 1H), 7.19 (ddd, $J=8.5$, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 6.68 (dd, $J=8.5$, 1.0 Hz, 1H), 6.64 (ddd, $J=8.0$, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 6.10 (sa, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.31 (dd, $J=12.0$, 6.0 Hz, 1H), 3.91 (t, $J=7.0$ Hz, 1H), 1.62 (m, 2H), 1.00 (dd, $J=7.4$, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ 163.5, 148.5, 131.9, 129.6, 116.0, 115.6, 109.2, 70.5, 68.2, 29.0, 10.2.

Procedimiento general para la síntesis de oxazolinas 19 (Método D) Se añadió 2-aminobenzonitrilo (1 equivalentes) y K_2CO_3 (0.1 equivalentes) a una solución del aminoalcohol en una mezcla etilenglicol:glicerol (9:5), en una relación de 3.3 mL de disolvente/mmol de aminoalcohol y se calentó a 150°C por un tiempo de 3 h. La reacción se llevó a cabo a 105°C en atmósfera de argón en un sistema de reflujo y agitación constantes por 24 h. Concluido este tiempo se añadió hielo molido formando una suspensión blanquecina a la cual se le hicieron extracciones con CH_2Cl_2 , se eliminó el exceso de agua con Na_2SO_4 , se filtró a gravedad y se evaporó el solvente a presión reducida.

Aislamiento y cultivo de una cepa de *Escherichia coli* para pruebas microbiológicas. Se prepararon 300 ml de medio EMB en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 500 mL, suspendiendo 10.8 g de EMB en 300 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer, agitando y llevando a calentamiento por 1 o 2 min., en agitación constante. Una vez homogenizado se le colocó un tapón de gasa y algodón, y sobre éste un tapón de papel estraza, esto con el fin de impedir el derramamiento del medio al esterilizarse, la esterilización se realizó en una autoclave automática por 15 minutos a 121°C . Una vez estéril se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45°C , se transfirió a cajas petri plásticas estériles y se dejó solidificar a temperatura ambiente, una vez el agar se puso sólido, se tomó un gramo de heces fecales y se diluyó en aproximadamente 1 mL de agua destilada, tomando una azada de la dilución anterior se sembró en una caja petri por el método de estría cruzada, en atmósfera estéril, este último paso se repitió en 2 placas más, las placas se dejaron incubar por un lapso de 24 h a una temperatura de 35°C . Una vez aisladas las colonias sospechosas de ser *E.coli*, se realsaron en placas de agar EMB estériles, con la misma técnica anteriormente descrita, esto con el fin de obtener un cultivo puro.

Identificación morfológica, bioquímica y enzimática de *Escherichia coli*. Transcurrido el tiempo de incubación, se verificó la morfología de la posible *E.coli*, a través de una tinción de Gram, realizando un frotis, colocando una gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos limpio y seco, se tomó un poco de cultivo y se diluyó en el agua destilada, extendiéndola sin tocar los extremos del portaobjetos. Se dejó

Informe Técnico de Avance

secar la muestra y se fijo, pasándola tres veces por el mechero rápidamente, posteriormente se colocó el frotis sobre un puente de tinción y se añadió cristal violeta como colorante primario, dejándolo actuar sobre la muestra por un minuto, posteriormente se enjuagó el portaobjetos con abundante agua, después se añadió lugol, expandiéndolo por todo el frotis, se dejó actuar por un minuto y posteriormente se enjuagó con agua, se adicionó alcohol-cetona para eliminar el exceso del colorante, una vez eliminado el colorante se enjuagó el frotis con agua, se le agregó safranina, como colorante contraste, dejándolo actuar por un minuto, transcurrido este tiempo se enjuagó el exceso de safranina con abundante agua, se dejó secar el frotis a temperatura ambiente y se observó con seco fuerte e inmersión, en base a la morfología observada y a la denominación dada de acuerdo a la tinción, el microorganismo observado fue un bacilo *Gram* negativo.

Tomando como referencia el resultado anterior y de acuerdo a las características de coloración de las colonias previamente aisladas, se determinó que el microorganismo que se aisló era *Escherichia coli*, sin embargo, para tener una mayor certeza se realizaron pruebas bioquímicas y enzimáticas a dicho microorganismo, estas pruebas fueron realizadas utilizando un kit de BBL-cristal.

Tomando un poco de cultivo, se suspendió en el tubo de inoculación incluido en el kit BBL cristal; todo el procedimiento se realizó en una zona estéril y se agitó por 15 segundos, posteriormente se vertió el contenido del tubo de inoculación al área objetivo de la base del panel de pruebas bioquímicas, hasta lograr por medio de movimientos ondulatorios que el líquido humectara todos los orificios de dicha base, se tapó dicho panel y se llevó a incubación por 24 h a 35-37°C, una vez transcurrido este tiempo se leyeron los factores enzimáticos y bioquímicos positivos en base a la coloración que presentaron, la cual fue comparada en la base de datos proveniente del kit BBL-cristal para *Gram* negativos. Los resultados se anotaron en una hoja tabulada de acuerdo al panel de control, al final se sumaron los resultados y en base a esta suma el cálculo arrojó el resultado obtenido de acuerdo a la prueba y el grado de certeza de que se trata del microorganismo dado. El resultado obtenido fue una identificación positiva para *Escherichia coli* con una certeza del 99.8%.

Para la prueba de indol y una solución de oxidasa incluidas en el kit, se colocó un poco de cultivo en 5 mL de agua destilada, posteriormente se suspendieron dos trozos pequeños de papel filtro, posteriormente se colocó una gota de la solución de indol y oxidasa en cada trozo, respectivamente, de acuerdo a lo anterior se anotaron los resultados obtenidos colorimétricamente.

Conclusiones y Observaciones

En el avance de este proyecto se han sintetizado y caracterizado por espectroscopia IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y espectrometría de masas los *N,N*-dibencilamino- α -aminoalcoholes enantiopuros derivados de α -dibencilamino ésteres precursores en la síntesis de las 2-oxazolininas enantiopuras y se han realizado estudios preliminares para la formación de estos productos empleando 2-aminobenzonitrilo como material de partida encontrándose evidencia de la formación del anillo de 2-oxazolinina a partir de estos sustratos, sin embargo, ha quedado pendiente la optimización de las condiciones de reacción.

Por su parte, se han estudiado las condiciones de reacción para la síntesis de una serie de oxazolininas empleando aminoalcoholes de menor complejidad estructural como etanolamina y se determinó que la catálisis con cloruro de zinc y clorobenceno como solvente es un método viable para la síntesis de estos productos. Se preparó una serie completa de oxazolininas a partir de etanolamina y benzonitrilos sustituidos con grupos electrodonadores (amino e hidroxilo) en posiciones *orto*, *meta* y *para*. De estos experimentos se determinó que la posición del grupo en el anillo aromático influye directamente en el tiempo requerido para que se efectúe la reacción y en los rendimientos obtenidos del producto. Esta experiencia contribuirá a la optimización de las condiciones de reacciones empleando los aminoalcoholes complejos.

Las mediciones de fluorescencia de las aminofeniloxazolininas han mostrado que estas moléculas tienen propiedades fluorescentes interesantes en función del solvente y la concentración. Además los estudios supramoleculares anfitrión-huésped realizados con la 2-(*O*-aminofenil)oxazolinina y cationes metálicos mostraron gran sensibilidad y selectividad en el reconocimiento de iones Cu²⁺, lo que convierte a esta molécula un excelente candidato para el diseño y desarrollo de un sensor para este catión basado en el uso

Informe Técnico de Avance

de esta molécula. Aún cuando es necesario seguir realizando estudios con el resto de la serie de estos compuestos, es evidente que se ha iniciado el desarrollo de una línea de investigación que promete dar resultados importantes y de gran impacto en el campo de la química supramolecular. Además, es un antecedente importante para los estudios que se pretenden realizar con las oxazolininas más complejas.

Con respecto a las pruebas de actividad biológica, hasta el momento se ha logrado el aislamiento de una cepa de *Escherichia coli* silvestre para realizar los estudios posteriores de actividad antimicrobiana, pero al no tener listos los compuestos de prueba esta parte se ha quedado pendiente.

Referencias.

1. a) Andreasch, R. *Monatsh. Chem.* **1884**, 5, 33.
2. Li, Q.; Woods, K. W.; Claiborne, A.; Gwaltney, S. L., II.; Barr, K. J.; Liu, G.; Gehrke, L.; Credo, R. B.; Hua Hui, Y.; Lee, J.; Warner, R. B.; Kovar, P.; Nukkala, M. A.; Zielinski, N. A.; Tahir, S. K.; Fitzgerald, M.; Kim, K. H.; Marsh, K.; Frost, D.; Ng, S.-C.; Rosenberg, S.; Sham, H. L. *Bioorg., Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 465-469.
3. Bergeron, R. J.; Xin, M. G.; Weimar, W. R.; Smith, R. E.; Wiegand, J. J. *Med. Chem.* **2001**, 44, 2469-2478.
4. Hahn, B. H.; Pletscher, L. S.; Muniain, M.; *J. Rheumatol.* **1981**, 8, 783-790.
5. Onishi, H. R.; Pelak, B. A.; Gerckens, L. S.; Silver, L. L.; Kahan, F. M.; Chen, M. H.; Patchett, A. A.; Galloway, S. M.; Hyland, S. A.; Anderson, M. S.; Raetz, C. R. H. *Science* **1996**, 274, 980-982.
6. Sasaki, T.; Otani, T.; Yoshida, K. I. Unemi, N. *J. Antibiot.* **1997**, 50, 881-883.
7. (a) Clark, D.; Travis, D. A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2857-2862. (b) Obata, T.; Fujii, K.; Shikita, S.; Goka, K. Eur. Pat. Appl. EP655444, 1995.
8. Bandgar, B. P.; Pandit, S. S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 2331-2333.
9. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; Wiley: New York, **1999**.
10. Snieckus, V. *Chem. Rev.* **1990**, 90, 879.
11. (a) Huang, H.; Hoogenboom, R.; Leenen, M. A. M.; Guillet, P.; Jonas, A. M.; Schubert, U. S.; Gohy, J.-F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3784. (b) Kobayashi, S.; Fujikawa, S.-i.; Ohmae, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14357.
12. (a) Nicolaou, K. C.; Livos, D. E.; Kim, D. W.; Schlawe, D.; de Noronha, R. G.; Longbottom, D. A.; Rodriguez, M.; Bucci, M.; Cirino, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4460. (b) Pirrung, M. C.; Tumej, L. N.; McClarren, A. L.; Raetz, C. R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1575. (c) Bode, H. B.; Irschik, H.; Wenzel, S. C.; Reichenbach, H.; Müller, R.; Höfle, G. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1203. (d) Kline, T.; Andersen, N. H.; Harwood, E. A.; Bowman, J.; Malanda, A.; Endsley, S.; Erwin, A. L.; Doyle, M.; Fong, S.; Harris, A. L.; Mendelsohn, B.; Mdluli, K.; Raetz, C. R. H.; Stover, C. K.; Witte, P. R.; Yabannavar, A.; Zhu, S. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3112. (e) Bergeron, R. J.; Xin, M. G.; Weimar, W. R.; Smith, R. E.; Wiegand, J. J. *Med. Chem.* **2001**, 44, 2469.
13. (a) Meyers, A. I.; Shipman, M. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 7098. (b) Gnas, Y.; Glorius, F. *Synthesis* **2006**, 1899.
14. (a) Ghosh, A. K.; Mathivanan, P.; Cappiello, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 1. (b) Pfaltz, A. *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 339. (c) Helmchen, G.; Pfaltz, A. *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 336.
15. a) Lu, S.-F.; Du, D.-M.; Zhang, S.-W., Xu, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 3433. b) McMannus, H. A.; Guiry, P. J. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 8566. c) Gant, T.; Meyers, A. I. *Tetrahedron* **1994**, 50, 2297. d) Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 835.
16. Vorbrüggen, H.; Krolkiewicz, K. *Tetrahedron* **1993**, 49, 9353. (b) Appel, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1975**, 14, 801.
17. a) Witte, H.; Seeliger, W. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 996. b) Kim, S.-G.; Seong, H. R.; Kim, J.; Ahn, K. H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 6835.
18. (a) Neilson, D. G. In *The Chemistry of Amidines and Imidates*; Patai, S., Ed.; Wiley: London, **1975**, 389. (b) Hoppe, D.; Schöllkopf, U. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1970**, 9, 300.
19. a) Fujisawa, T.; Ichianagi, T.; Shimizu, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5031. b) Zhou, Q.-L.; Pfaltz, A. *Tetrahedron* **1994**, 50, 4467.
20. a) Kang, Y. S.; Son, J.-H.; Hwang, I.-C.; Ahn, K. H. *Polyhedron* **2006**, 25, 3025. b) End, N.; Pfaltz, A. *Chem. Commun.* **1998**, 589.



Proyectos de Investigación y Desarrollo Tecnológico

Informe Técnico de Avance

