

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO.**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS.-**



Lugar de trabajo:  
Instituto de Química Rosario.  
**IQUIR-CONICET-UNR.**  
Rosario, Santa Fe.

Autor: Esteban Andrés Panozzo Zéneré.

Título: ***Biosíntesis y transporte de metabolitos nitrogenados como blanco de nuevos agentes antiparasitarios***

Director de Tesis: Dr. Guillermo Roberto Labadie.

2014

**Título de la tesis:**

***Biosíntesis y transporte de metabolitos nitrogenados como blanco de nuevos agentes antiparasitarios***

Esteban Andrés, Panozzo Zénere

Título de grado: Bioquímico.

Universidad que lo otorgó: Universidad Nacional de Rosario.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Química Rosario, en el Departamento de Química Orgánica, Laboratorio del Dr. Labadie, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01/02/2010 y el 23/10/2014, bajo la dirección del Dr. Guillermo, R. Labadie.

Jurado de Tesis:

Director: Dr. Guillermo, R. Labadie.

Dra. Carolina Carrillo

Dr. Teodoro, Kaufman

Dra. Maria Rosa Mazzieri

Defendida:

A Mayra  
A Leandro y Juan

Agradecimientos:

“Seamos realistas y hagamos lo imposible” E.Che.G

La importancia del desafío, radica en la relevancia del objetivo. Por lo que, el amor a la ciencia y a la enseñanza, como objetivos plantean una relevancia que desborda en sí misma. El desafío, es como cada persona vive aquello que siente. A Guillermo le agradezco, el haber tomado el desafío de construir y permitirnos, a nosotros sus aprendices, desarrollar nuestro amor a la ciencia y forjarnos con el ejemplo, el amor a la enseñanza. El pasar el bastón es siempre una tarea difícil y más aún cuando estas corriendo una carrera. Gracias, por tus sabias, palabras, por tu apoyo, por la comprensión de la vida y el concepto de la misma que inculcas, agradezco a quien corresponda y a vos en especial, el haber sido uno de tus aprendices de alquimista.

A mis hermanos Eugenia y Eduardo por estar, acompañar y sostener, a ellos por haberles debido en este tiempo, un hermano. A mis padres y en especial a mi madre que se le ocurrió dar a un chico de quinto grado un libro de química de cuarto año y así forjar un sueño.

A mis abuelas que estuvieron en mis comienzos y el apoyo inconmensurable de la humildad de mi Tati. A mi madrina, esa segunda madre que siempre estuvo presente.

A mis compañeros de ruta iniciales Colo, Maxi, Tano, Pucho, Peter, Martin; a Vir, Eda, Eli, Sabi, Clau, Celeste, Betina, Stella, Nadia. Por haberme prestado el tiempo y por haberme dejado compartir un poco de la vida juntos.

A mis compañeros de ruta en este camino, Exe, Sebas, Diego, Nico, Martin, Mariano, Walter, Pablo, Jhon y Rodo a las chicas Fer, Andrea, Lucia, Pamela, Luz, Agustina, Margarita, Maira, Bibi y Julia. Gracias por el tiempo, el desenfado y el cariño que demuestran por hacer las cosas, por los almuerzos y la compañía.

A Kela, por entender la génesis del bioquímico y su sabiduría, a Lili por su constancia y oído, gracias por los consejos de Juan, Silvina y Mirta y los aportes de M del Carmen.

A Manuel GS, al Dr. Ruveda, a Marita, por ser desde la humildad de las grandes mentes, unos maestros en muchas cosas que solo pueden palpase y no se miden con una regla, por los consejos, charlas y viajes.

A Pablo y Sergio, MGxRMNs ( Muchas Gracias x los RMN) por su calidez y el afecto a lo que hacen, a Guille y Gustavo por sus conocimientos y charlas.

A Juan, Patricia y Gut; a Gustavo, a Sigrid, a Ariel, a Marcelo y Diego, por el honor que ha sido trabajar con ellos y compartir parte de este viaje.

A todos los que trabajan en el lab del Roque Saenz Peña, a mis compañeras de Guardia, parte de esta tesis es de ellos también por soportar y acompañar en horas de trabajo.

A Zeta y Guillermo, simplemente Gracias.

Al resto de becarios, investigadores y Profesores del IQUIR, por haberme recibido y aportado conocimientos y tiempo, gracias.

A Teodoro y a Toni, por sus invaluable charlas, consejos y saberes volcados en mi cabeza, han logrado una mejor tesis y espero un mejor tesista.

Y finalmente a quienes están primero. A mis hijos, cuando lean este libraco que estará en la biblioteca, sabrán entender que mi mayor legado espero, sean uds, que así como esto es un esfuerzo de cinco años, uds serán una melodía que se escribirá cada día y espero que nos salga aún mejor día a día. Me hago eco de las palabras del Che : "Creczan como buenos revolucionarios. Estudien mucho para poder dominar la técnica que permite dominar la naturaleza. Acuérdense que la Revolución es lo importante y que cada uno de nosotros, solo, no vale nada. Sobre todo, sean siempre capaces de sentir en lo más hondo cualquier injusticia cometida contra cualquiera en cualquier parte del mundo. Es la cualidad más linda de un revolucionario."

Espero al menos poder darles lo necesario para poder ser buenas personas, eso ya los hará buenos revolucionaros de sus presentes.

Y finalmente a Mayra, gracias por el amor y por estar, por acompañar a pesar de no estar convencida, a seguir hasta donde pudiste y a ser parte de esta tesis y de esta porción de mi vida, nada seria sin ti y todo de algún modo, fue por ti. Perdón por todo y por tan poco y muchas gracias, por tanto.

Y volviendo al Che y a Labadie:

“Si no hay café para todos, no habrá para nadie”

En el transcurso de la presente Tesis se publicaron y presentaron los siguientes trabajos:

*N,N'-diamines derivatives with potent antikinoplastids activity.* Andrea P. Caminos, Esteban A. Panozzo-Zenere, Shane Wilkinson, Babu Tekwani, and Guillermo R. Labadie. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1712-1715 (2012) doi:10.1016/j.bmcl.2011.12.10.

**Substituted diamines with potent antiparasitic activity.** Guillermo Labadie, Andrea Caminos, Esteban Panozzo, and Babu Tekwani *Keystone Symposia: Drug Discovery for Protozoan Parasites (D2)*, Breckenbrigde, CO, USA Marzo 2009.

**Desarrollo de compuestos contra *S. aureus* mediante nuevas aproximaciones basadas en poliaminas.** Panozzo Zenere, Esteban; Avery, Mitchell A.; Labadie, Guillermo R.: XVII SINAQO, Mendoza. Noviembre 2011.

**Search of new chemotherapeutic agents against parasitic diseases.** Guillermo Labadie, Esteban Panozzo, Exequiel Porta, Shane Wilkinson and Babu Tekwani. *Keystone Symposia* 2010

**Síntesis eficiente de 1,2,3-triazolooxazinas y triazolooxazepinas con posible actividad biológica.** Andrea B. J. Bracca, Esteban A. Panozzo Zenere y Guillermo R. Labadie. 4° Workshop de Química Medicinal, XXVIII Congreso Argentino de Química. Lanús, 13-16/9/2010.

**Síntesis y Evaluación Inhibitoria sobre protozoos del orden Kinetoplastida , de compuestos N,N', disustituidos.** Panozzo Zénere, Esteban, Caminos Andrea, Labadie, Guillermo R. Reunión Sociedad Argentina de Parasitología, Ascochinga, Cordoba. 2010.

**Compuestos derivados de L-Prolina como nuevos agentes quimioterapéuticos contra leishmaniasis y tripanosomiasis.** Panozzo Zénere, Esteban; Barison, María Julia; Tekwani, Babu; Silber, Ariel; Labadie, Guillermo R. IX Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitaria. 10 al 12 de Noviembre de 2011- Mar del Plata –Buenos Aires – Argentina.

**Síntesis de análogos fluorescentes de diaminas N,N'-disustituidas con actividad antiparasitaria.** Esteban A. Panozzo Zenere y Guillermo R. Labadie. XVIII SINAQO, Villa Carlos Paz Noviembre 2011.

**Diamines, the minimalistic scaffold of antimalarial polyamines compounds.** Panozzo Zénere, Esteban; Tekwani, Babu; Labadie, Guillermo R. *Keystone Symposia*. New Mexico. NM. USA Enero 2012.

**Estudios comparativos del comportamiento de análogos de poliaminas en la familia Apicomplexa.** Panozzo Zenere, Esteban ;Arrizabalaga, Gustavo, Tekwani, Babu, Labadie Guillermo. Reunión Sociedad Argentina de Parasitología, Rosario 2013.

**Diferentes aproximaciones en la búsqueda del blanco molecular del metabolismo de las poliaminas en tripanosomátidos.** Panozzo Zenere, Esteban ;Benitez, Diego, Roberts, Sigrid, Comini, Marcelo, Babu Tekwani, Labadie Guillermo. Reunión Sociedad Argentina de Parasitología, Rosario 2013.

**Polyamine Pathway as a Potential Therapeutic Target against Leishmaniasis.** Fernando Estrada, Euna Kim, Tamara Olenyik, Estaban A. Panozzo-Zenere, Guillermo R. Labadie and Sigrid C. Roberts. Oregon Bio 2013. Annual Conference. Sept 2013.

## Abreviaturas

Absorbancia	abs
Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Ácido Ribonucleico	ARN
Ácido Ribonucleico mensajero	mARN
Adenosil Metionina	ADO
AdenosinDifosfato	ADP
AdenosinTrifosfato	ATP
Alanina	Ala
Arginina	Arg
Arginina deaminasa	ARGD
Arginina Descarboxilasa	ADC
Buffer Fosfato salino	PBS
Cisteina	Cys
Cloroformo deuterado	CDCl <sub>3</sub>
Constante de acoplamiento	<i>J</i>
Cromatografía en capa delgada	CCD
Desplazamiento químico	$\delta$
Diaminas N, N'di sustituidas	N,N'DS
Diamino Oxidasa	DAO
Diclorometano	DCM
Dimetilsulfoxido	DMSO
Espectro de Infrarrojo	IR
Espermedina	Spd
Espermidina sintasa	SpdSin
Espermidina/Espermina N <sup>1</sup> -acetiltransferasa	SSAT
Espermina	Spm
Espermina sintasa	SpmSin
Etanol	EtOH
Fenilalanina	Phe
Glóbulo Rojo (Eritrocito)	GR
Glutation	GSH
Grupos sulfhídricos	SH
Highthroughputscreening- Tamizaje en alta escala-	HTS
Intensidad	<i>i</i>
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Ld</i>
<i>Leishmania infantum</i>	<i>Li</i>
Litros	L
Metanol	MeOH
Metionina	Met
Microlitros	$\mu$ L
Micromolar	$\mu$ M
Multiplete	m
NanoMolar	nM

Organización Mundial de la Salud	OMS - WHO
Ornitina carbamoil transferasa	OCT
Ornitina Descarboxilasa	ODC
Partes por millón	ppm
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Pf</i>
Poliamino Oxidasa	PAO
Putrescina	Put
Resonancia Magnética Nuclear	RMN
Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C	<sup>13</sup> CRMN
Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H	<sup>1</sup> HRMN
S-Adenosil- Metionina	S-ADO
S-Adenosil- Metionina descarboxilasa	SAM-dc
S-Adenosil-Metionina sintetasa	SAMS
Singlete	<i>s</i>
Tetrahidrofurano	THF
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Tg</i>
Trietilamina	TEA
TrimetilOrtoformiato	TMOF
<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Tb</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Tc</i>
Tripanotion	Try
Tripanotion sintetasa	TryS
TripanotionReductasa	TryR
Triplete	<i>t</i>
Unidad de masa atómica	UMA
Ornitina	Orn
$\alpha$ -Difluorometilornitina	DFMO
4-Cloro-7-nitrobenzofurazan	NBD-Cl
7-nitrobenzofurazan	NBD

## INDICE

1	ACERCA DE LAS ENFERMEDADES DESATENDIDAS. ....	3
1.1	APICOMPLEJOS. ....	5
1.1.1	Malaria. ....	5
1.1.2	Toxoplasmosis. ....	8
1.2	TRIPANOSOMATIDOS. ....	11
1.2.1	La tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño). ....	11
1.2.2	Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) ....	13
1.2.2.1	Situación en Argentina ....	15
1.2.2.2	Formas de tratamiento ....	16
1.2.3	Leishmaniasis. ....	17
1.3	Poliaminas como estructura de importancia biológica. ....	21
1.3.1	Metabolismo de las poliaminas. ....	22
1.3.2	Transportadores de poliaminas. ....	30
2	OBJETIVOS. ....	33
2.1	Objetivos generales. ....	33
2.1.1	Objetivos Específicos ....	33
3	ESTRATEGIA GENERAL. ....	34
3.1	Definición. ....	34
4	DESARROLLO DE ETAPAS I A III. ....	39
4.1	Etapa I– Selección de estructura privilegiada. ....	39
4.2	Etapa II ....	43
4.2.1	Síntesis de bibliotecas de N, N´-diaminas disustituidas. ....	43
4.2.2	Síntesis de bibliotecas de diaminas N,N,N´,N´-tetrasustituidas. ....	49
4.3	Etapa III. ....	50
4.3.1	Caracterización de los productos preparados. ....	50
5	DESARROLLO DE ETAPAS IV A VI. ....	57
5.1	Breve reseña de aproximaciones al descubrimiento de drogas. ....	57
5.1.1	Definición de los descriptores fisicoquímicos utilizados. ....	60
5.2	Resultados generales de toxicidad. ....	64
5.3	Resultados generales de los cálculos fisicoquímicos realizados a la biblioteca. ....	65
6	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE ACTIVIDAD EN APICOMPLEJOS. ....	67
6.1	Introducción. ....	67
6.2	Poliaminas y su metabolismo en <i>Plasmodium falciparum</i> y <i>Toxoplasma gondii</i> . ....	67
6.3	Breve reseña sobre los ensayos biológicos realizados. ....	69
6.3.1	Determinación de la actividad en <i>Plasmodium falciparum</i> . ....	69

6.3.2	Determinación de la actividad en <i>Toxoplasma gondii</i> .....	70
6.4	Reseña de las vías metabólicas relacionadas con poliaminas presentes en <i>Plasmodium falciparum</i> . .....	70
6.5	Reseña de las vías metabólicas relacionadas con poliaminas presentes en <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	71
6.6	Análisis de los resultados actividad sobre en <i>Plasmodium falciparum</i> .....	72
6.6.1	Antecedentes.....	73
6.7	Análisis de estructura basados en la actividad sobre <i>Plasmodium falciparum</i> . .....	77
6.8	Análisis de los resultados actividad sobre <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	85
7	POLIAMINAS Y TRIPANOSOMATIDOS.....	93
7.1	Poliaminas y su metabolismo en tripanosomatidos. ....	93
7.2	Actividad de las colecciones sobre <i>T. brucei brucei</i> . .....	94
7.3	Actividades de las colecciones sobre <i>T. cruzi</i> y <i>L. donovani</i> . .....	100
7.3.1	Introducción.....	100
7.1	Resultados obtenidos del ensayo de HTS.....	102
7.2	Nuevos conceptos en probadas teorías. ....	117
7.3	Resultados y análisis del Ensayo de mínima concentración tripanocida (MTS).....	121
7.4	Evaluación de los resultados sobre la Tripanotion Sintetasa.....	124
7.5	Evaluación de los resultados de los ensayos de crecimiento en cultivos suplementados. ....	128
7.6	Síntesis y caracterización de derivados fluorescentes. Aplicación en estudios por microscopia de fluorescencia .....	132
8	CONCLUSIONES .....	138
9	PERSPECTIVAS Y ESTUDIOS FUTUROS.....	141
10	APÉNDICES.....	143
11	MATERIALES Y MÉTODOS .....	152
12	Espectros seleccionados. ....	235
13	Bibliografía.....	256

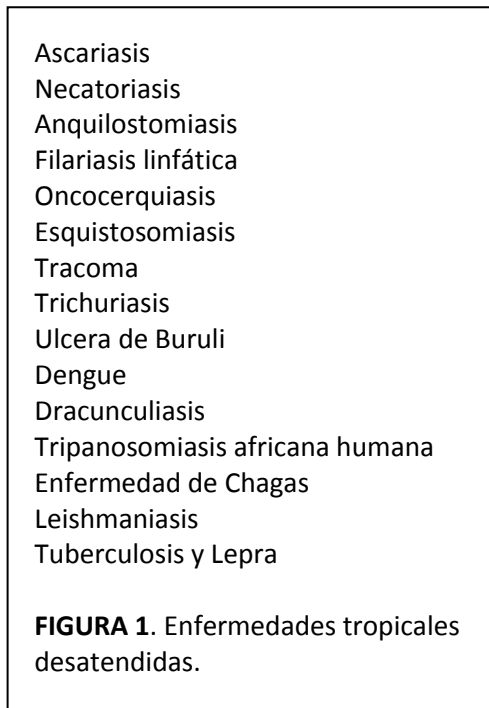


*“Dos caminos se bifurcaban en el bosque, yo tome el menos transitado y eso hizo la diferencia”.*

***1 .INTRODUCCIÓN.  
ACERCA DE LAS ENFERMEDADES  
DESATENDIDAS.***

## 1 ACERCA DE LAS ENFERMEDADES DESATENDIDAS.

Las enfermedades desatendidas comprenden un conjunto de dolencias que se encuentran conviviendo con el ser humano en distintas partes del globo, como parte de su entorno y perdurando a través del tiempo por diferentes razones. Según la Organización Mundial de la



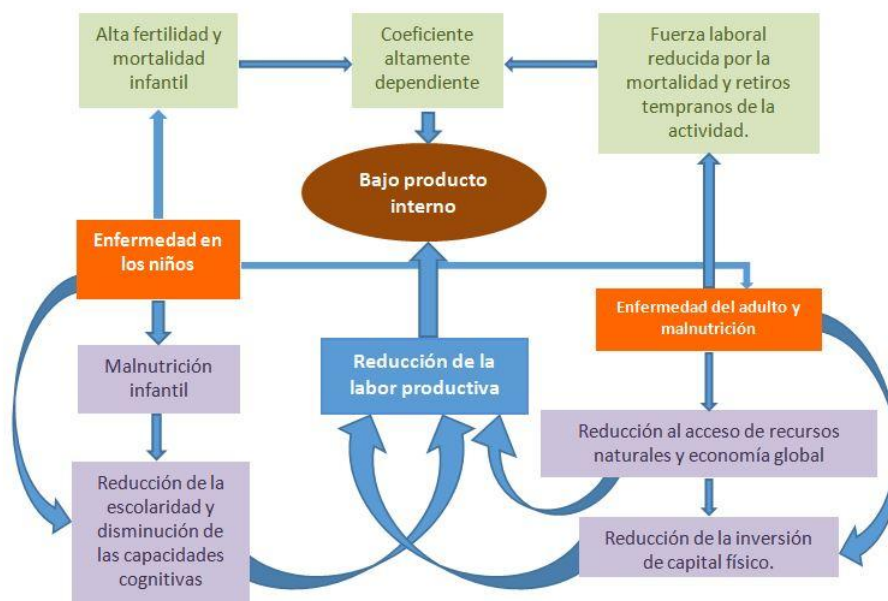
Salud el listado de enfermedades tropicales desatendidas (ver **FIGURA 1**) incluyen parasitosis de distintas familias y especies y para las cuales se han encontrado drogas que actúan en determinados estadios del ciclo de vida del parásito siendo sólo parcialmente eficientes. Por definición, las enfermedades tropicales son aquellas que ocurren únicamente, o principalmente, en los trópicos. En la práctica, esta expresión se aplica a las enfermedades infecciosas que predominan en climas cálidos y húmedos, incluyendo el paludismo, las leishmaniasis, la esquistosomiasis, la oncocercosis, la filariasis linfática, la enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis africana y el

dengue.<sup>2-5</sup>

Uno de los grandes problemas que poseen estas enfermedades son los lugares en el globo en donde son endémicas o epidémicas, debido a que la población afectada posee recursos limitados para acceder a tratamiento. En los últimos 20 años los países afectados han podido contar con recursos propios suficientes para comenzar programas tendientes a la erradicación de estas enfermedades, apoyados mediante infraestructura de investigación y desarrollo adecuada para tal fin. En este sentido, el aporte de la OMS y otros organismos no gubernamentales han permitido actuar principalmente evitando el desarrollo de los vectores y así combatir la transmisión. Por otro lado, actúan sobre la población evitando la transmisión vertical y tratando de cercar la enfermedad, mediante una acción rápida sobre la proliferación de las condiciones ambientales que permiten su rápida diseminación. Debido a la escasa o nula presencia de vacunas que permitan evitar el contagio, la posibilidad más adecuada en el momento de aparición de brotes se radica en una rápida intervención con antiparasitarios.<sup>2, 6</sup>

Uno de los aspectos que agravan el abordaje de la problemática para el tratamiento de estas

enfermedades es que los principales países afectados se encuentran en vías de desarrollo. Este hecho conlleva un problema económico de difícil solución en donde convergen la necesidad y la carencia de recursos. Para ilustrar esta problemática, en la **FIGURA 2** se muestra cómo afecta la malaria a la población, siendo no sólo un problema a nivel sanitario, sino también que repercute de manera directa en la economía. Debido a la presencia de estas enfermedades en estas regiones tiene existen desde los primeros asentamientos de poblaciones humanas, resulta necesario el apoyo de la comunidad internacional para que la ayuda permita alcanzar el objetivo básico de garantizar salud.<sup>7</sup>



**FIGURA 2.** Sobre la importancia del estado de salud de la población y su repercusión en la economía de un país o región.<sup>7</sup>

Las campañas de concientización y control de vectores han dado en el pasado, y continúan dando, resultados alentadores desacelerando la expansión de estas enfermedades. A su vez, si bien existen drogas para el tratamiento de estas patologías y se observa una disminución en el número de nuevos casos para alguna de ellas, la aparición de resistencias complican el tratamiento. La reaparición en lugares erradicados y la coexistencia dentro de un mismo nicho de enfermedades inmunodepresivas (SIDA), sumados a la ya preexistente desnutrición, generan una señal de alerta por posibles rebrotes de estas enfermedades que resultarían difíciles de controlar con los medios disponibles. Otro de los puntos es el corrimiento de las fronteras del vector y, por tanto, de la enfermedad.<sup>8,9,10,11,12</sup>

Afortunadamente esta tendencia se ha revertido en los últimos 10 ó 15 años, debido principalmente a la acción de organizaciones no gubernamentales y otros organismos internacionales que han apoyado distintos proyectos tendientes a encontrar soluciones para el

tratamiento de estas enfermedades que incluyen el desarrollo de drogas y planes de erradicación de vectores. La industria farmacéutica también ha registrado un cambio de actitud hacia esta problemática de salud, y ha iniciado proyectos conjuntos con organismos como el TDR o la OMS, asociándose también a universidades e institutos alrededor del mundo para aunar esfuerzos con el objetivo de desarrollar drogas o tratamientos que permitan combatir estas enfermedades. En la **FIGURA 3** se detallan algunas de las instituciones<sup>13</sup> donde distintos grupos de investigación que buscan desarrollar nuevas drogas para el tratamiento de estos padecimientos.

En el trabajo de tesis se buscará hacer aportes a la búsqueda de nuevas entidades químicas tendientes a desarrollar drogas contra distintas enfermedades desatendidas. Con este propósito se buscará optimizar una química robusta que permita obtener compuestos de manera que sean evaluados en sistemas biológicos, los parásitos Apicomplejos y Tripanosomátidos.

Estos parásitos presentan entre otras particularidades, un metabolismo de la vía de las poliaminas que resulta atractivo. Basándonos en las diferencias metabólicas entre los cinco parásitos a estudiar, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *T.cruzi*, *T.brucei* *bruceo* y *Leishmania donovani*, que presentan puntos en común dentro de éste metabolismo. El manejar distintos estadios nos asegura encontrar un buen candidato a droga.

Describiremos inicialmente la problemática actual de las enfermedades para comprender la importancia que tiene la búsqueda de nuevas drogas.

## 1.1 APICOMPLEJOS.

### 1.1.1 Malaria.

La malaria o paludismo es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium* siendo la primera en importancia entre las enfermedades debilitantes. Esta enfermedad se encuentra principalmente distribuida en las zonas tropicales del planeta. Se estima que entre 700.000 y 2,7 millones de personas mueren al año por causa de la misma, de los cuales más del 75 % son niños en zonas endémicas de África. El impacto de esta enfermedad en la población mundial se observa claramente en la **TABLA 1**, que muestra la relación entre muertes totales en el mundo y los decesos causados por malaria. Afortunadamente, estos números tuvieron una remarcable disminución, en el año 2012. Si bien esto es un dato alentador, el aumento en las especies circulantes con resistencia a los tratamientos disponibles y la mayor coexistencia con el VIH y la TB resultan en una mayor morbi-mortalidad de las personas que lo padecen.<sup>2, 3, 14</sup> La transmisión directa ocurre a través de la picadura de un

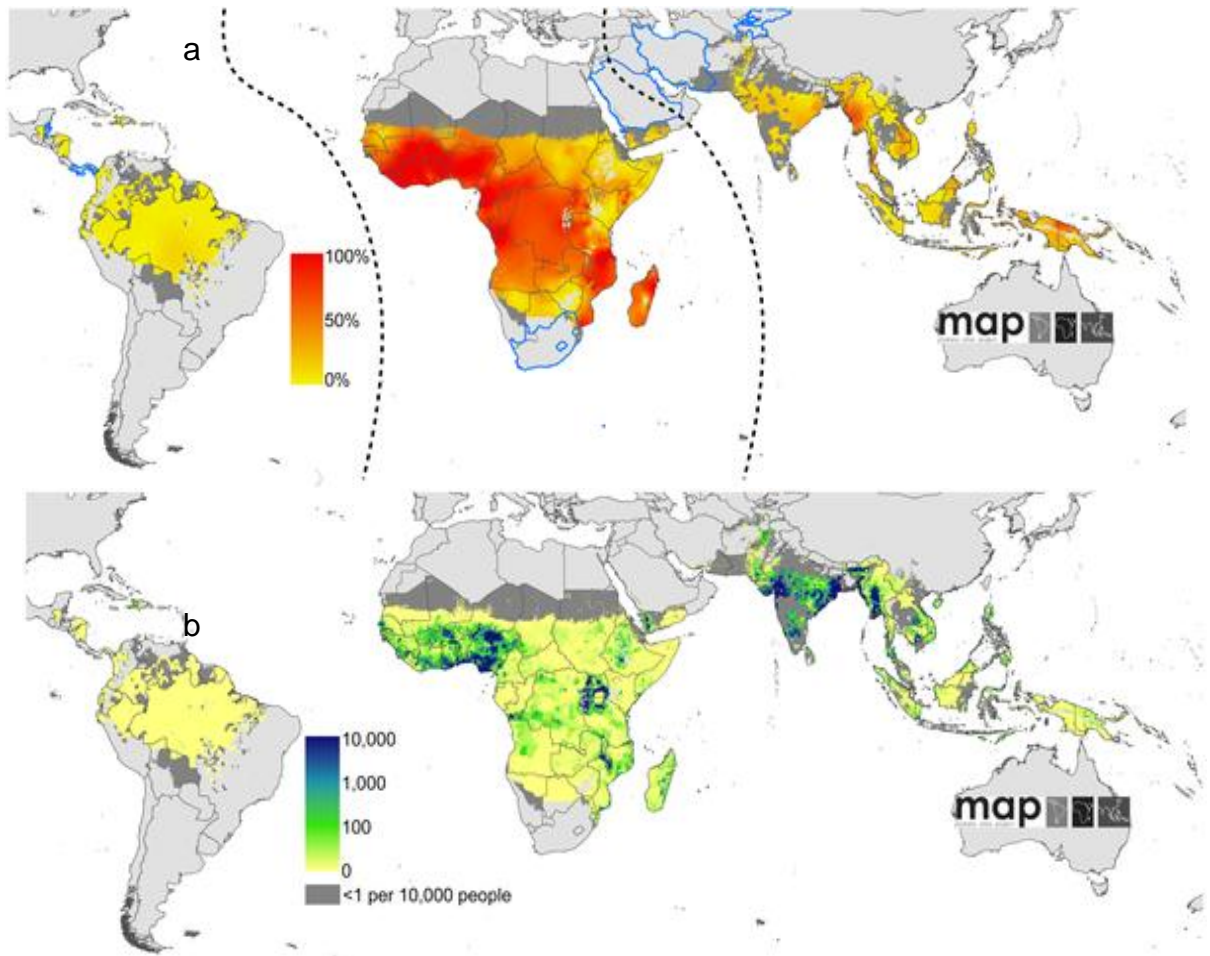
mosquito y la única forma posible de contagio directo entre humanos es que una persona embarazada lo transmita por vía placentaria al feto.. También es posible la transmisión por transfusiones sanguíneas de donantes que han padecido la enfermedad.<sup>15</sup> En lo que se refiere al vector (género *Anopheles*) se han abordado distintos enfoques entomológicos para su erradicación, desde campañas de pulverización con pesticidas a hongos que atacan determinados estadios de la vida del mosquito.

**Tabla 1.** Poblaciones relativas por región y fallecimientos expresados en millones.

	Pob (2002)	Pob (2010)	Fallecimientos (2000-2005)	Malaria (2002)	Fallecimientos (2012)	Malaria(2010)
Mundo	6122210	7114800	56554	1124 (2%)**	56554	219
África	655476	1031084	10681	963 (85%)*	10681	197 (90%)*
América Este	837967	942692	5911	1 (0,9%)*	5911	1,9 (0,9%)*
Mediterráneo	493091	ND	4156	55	4156	ND
Europa Sudeste	874178	740308	9703	0	9703	ND
asiático	1569810	1681407	14467	95	14467	ND
Pacífico Oeste	1401689	ND	11636	10	11636	ND

\*\*Porcentaje respecto a la población estimada. \*Porcentaje respecto a los fallecimientos reportados.(OMS)<sup>2, 3, 14, 16</sup>

En la **FIGURA 4** podemos observar la distribución de la malaria a nivel mundial. En estos últimos años los reportes de la OMS muestran una disminución en el número de afectados, sin embargo hay un aumento en la resistencia a drogas que se usan para combatir esta enfermedad. La aparición de cepas multirresistentes, incluso en zonas en donde no se han utilizado las drogas con anterioridad, representa un serio riesgo para la salud de la población. Otro de los factores que complican el tratamiento de la enfermedad es la existencia de distintas especies que presentan diferencias en sus metabolismos generando distintas respuestas a los agentes antimaláricos.<sup>17,8,10, 18</sup> Los mapas de distribución permiten deducir que por razones de resistencia se ha dejado de lado la Cloroquina como primera terapia, ya que presenta altos índices de resistencia. Esto ha llevado a usar terapias basadas en Artemisinina (**FIGURA 5**), o en combinación, quedando relegados los tratamientos con Cloroquina, o con sulfadoxina-pirimetamina e incluso quinina.

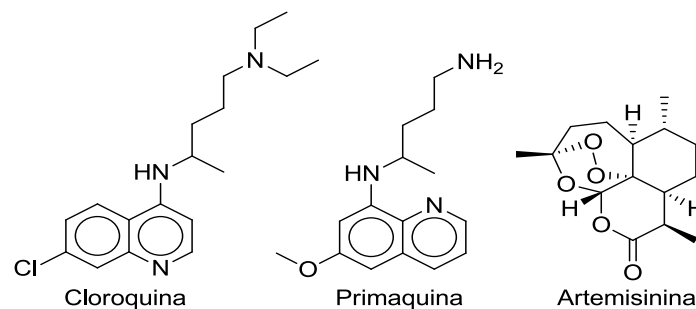


**Figura 4.**

a) Áreas de mayor índice de prevalencia de *Plasmodium falciparum* (2012).

b) Distribución de casos de malaria cada 10000 hab., causados por *P.falciparum* durante 2007<sup>1</sup>

Desafortunadamente, uno de los criterios mayormente seguidos para decidir el tipo de tratamiento quimioterapéutico es económico. Por ejemplo, en países africanos una misma droga antimalárica puede costar al consumidor desde US \$ 0,54 a US \$ 6, lo cual teniendo en cuenta los ingresos de los afectados, resulta muy elevado. Estos costos son a menudo transferidos a la Salud Pública, lo que ha movilizado ayuda internacional para contener el avance de la esta enfermedad.



**Figura 5.** Drogas disponibles para el tratamiento de la malaria.

Las drogas existentes no son efectivas en distintos lugares geográficos debido a la aparición

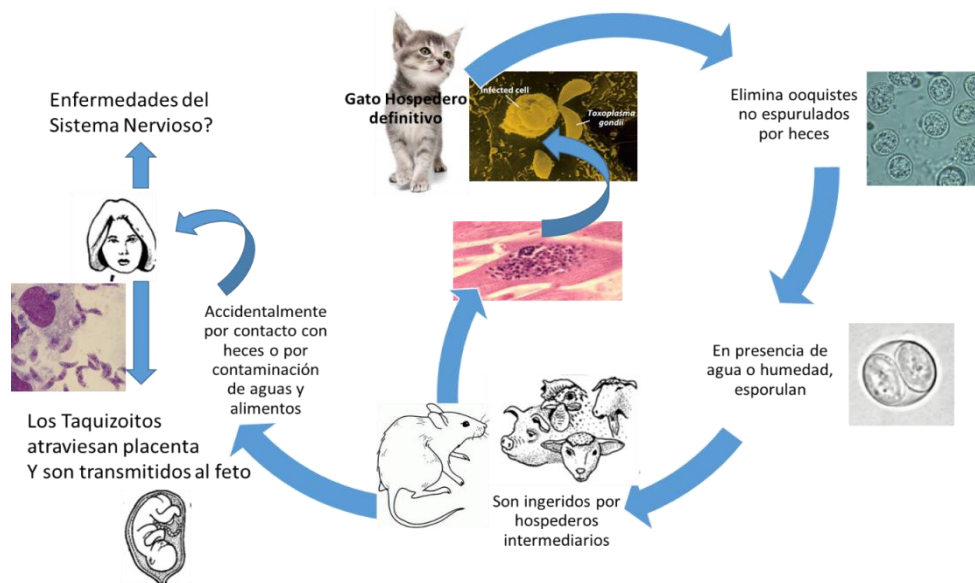
de resistencia por parte de los parásitos. El problema de la resistencia a las distintas drogas ha despertado alerta debido, en primer lugar a la falta de desarrollo nuevos agentes quimioterapéuticos que permitan combatir la enfermedad.

En la actualidad parte de los esfuerzos para el control de la malaria están enfocados en el control de los mosquitos transmisores para lograr una reducción en la cadena de contagios. Sin embargo, las chances de éxito de esta estrategia están supeditadas a la aplicación de las mismas dentro de áreas restringidas, sin incidencia en ambientes selváticos, que siguen siendo el principal reservorio de los vectores. Alternativamente, las vacunas siempre resultan una idea atractiva para obtener una respuesta desde el hospedero, pero los esfuerzos realizados han tenido escaso de éxito a lo largo de los años. En la actualidad distintos proyectos ha avanzado hasta fases clínicas teniendo resultados diversos. Uno de estos proyectos a dado lugar a la vacuna RTSS/AS01, que se encuentra en fase III, con buenos resultados y una aceptable tolerancia.<sup>19</sup>

Todos estos factores de endemidad, la aparición de múltiples resistencias, precios elevados de las terapias y avances inciertos en cuanto a las vacunas, hacen que la búsqueda de nuevas drogas resulte crucial y así lo consideran la OMS y otras organizaciones no gubernamentales que continúan apoyando la investigación en la búsqueda de las mismas.

### 1.1.2 Toxoplasmosis.

*Toxoplasma gondii* es un parásito protozoario de distribución mundial que se transmite al ser humano de distintas formas. Los gatos, que constituyen su reservorio principal, son los únicos animales que eliminan oocistos por las heces. Los oocistos permanecen viables en el suelo húmedo durante muchos meses e incluso pasan de una forma esporulada a una no esporulada. Una vez ingeridos, liberan formas invasivas que rápidamente se transforman en taquizoitos, los cuales experimentan una multiplicación asexual en los macrófagos tisulares. Los taquizoitos intracelulares se dispersan luego por la circulación sanguínea y linfática, alcanzando así el cerebro, el corazón y los pulmones. Cuando se establece la inmunidad, los taquizoitos constituyen agregados quísticos (bradizoitos), por lo general en el cerebro y el tejido muscular, que permanecen latentes durante toda la vida del hospedero pudiendo experimentar una reactivación (**FIGURA 6**)



**FIGURA 6.** Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Otros hospederos transitorios son los roedores, cerdos, ganado vacuno y ovejas, que pueden albergar quistes viables en los músculos y el cerebro, lo que permite tener una alta tasa de infección con distribución mundial, ya que para estos resultan relativamente inocuos.<sup>20</sup>

En muchas comunidades, la mayoría de la población ha sufrido la infección al comienzo de la edad adulta. En el caso de individuos inmunocompetentes, la enfermedad clínica no se presenta y la infección primaria sólo se manifiesta, cuando lo hace, por una hipertrofia leve y subaguda de los ganglios linfáticos sin mayores consecuencias.<sup>21,22</sup> En cambio, si el sistema inmunitario es deficiente, la infección tiene consecuencias graves:

- La infección primaria en personas inmunodeficientes puede dar lugar a encefalitis, miocarditis o neumonitis como consecuencia de la multiplicación incontrolada de taquizoitos.
- La perturbación subsiguiente de la inmunidad en un sujeto previamente infectado puede conducir a una encefalitis o meningoencefalitis si se reactivan los bradizoitos latentes. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ha originado un aumento pronunciado de los casos de encefalitis toxoplásmica, que a menudo se manifiestan en forma de lesiones intracerebrales expansivas.<sup>23</sup>
- La transmisión congénita es muy poco probable en los casos de infección previa de una madre sana inmunocompetente, pero la infección primaria que sobreviene al principio del embarazo deja en una situación muy vulnerable a la placenta y por ende, al embrión, hasta el momento en que los mecanismos inmunológicos de protección maternos pueden hacer frente a la enfermedad. Si la madre es inmunodeficiente, la infección latente previa puede ser causa de transmisión congénita. A consecuencia de la difusión del SIDA cabe prever numerosos

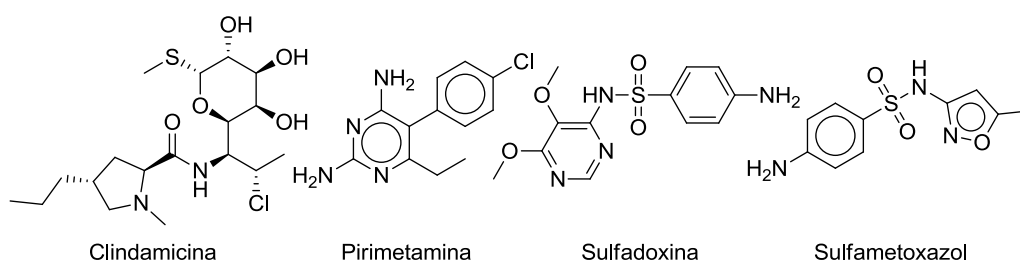
casos de este tipo, que se traducen por abortos espontáneos, muertes fetales o una enfermedad congénita grave. Cuando el recién nacido presenta signos evidentes de la enfermedad, las secuelas suelen ser graves y pueden comprender un síndrome potencialmente mortal en el que puede haber hidrocefalia, hepatoesplenomegalia con ictericia, retraso mental y coriorretinitis. La enfermedad congénita, que se manifiesta clínicamente más tarde, suele ser menos grave, pero a menudo produce trastornos oculares o neurológicos. En conjunto, la infección por toxoplasmas es la causa más común de coriorretinitis al principio de la vida adulta.<sup>20,24</sup>

Sólo en los Estados Unidos, ocurren aproximadamente unos 4000 casos por año de la enfermedad congénita, siendo el estimativo mundial de unos 200.000 casos.<sup>22, 25, 26</sup>

La toxoplasmosis congénita es un importante problema para la salud mundial, debiéndose incluir en actualizaciones futuras de la carga mundial de morbilidad, siendo necesario poseer datos que permitan racionalizar las intervenciones en materia de salud pública destinadas a disminuir este problema. Si bien el riesgo de transmisión puede reducirse considerablemente cambiando ciertos hábitos de alimentación e higiene, aún así se hace necesario tomar acciones directas en salud pública para poder prevenir complicaciones.<sup>26</sup>

En la actualidad los tratamientos contra la toxoplasmosis se realizan con pirimetamina y las sulfonamidas. Para el caso de la primera, su blanco de acción es la biosíntesis del ácido fólico y para la segunda es la biosíntesis del ácido *p*-aminobenzoico, por lo que su blanco biológico son los taquizoitos. Para el caso de la toxoplasmosis congénita es necesaria la detección rápida para evitar los riesgos teratogénicos de parte del parásito o por parte de los medicamentos utilizados.

Las sulfamidas más solubles parecen ser menos eficaces, pero se han revelado útiles para el tratamiento profiláctico de los sujetos inmunodeficientes. Las preparaciones comerciales de pirimetamina con sulfadoxina o sulfametoxazol no parecen satisfactorias debido principalmente a los efectos adversos. La clindamicina, que se concentra en coroides, resulta útil por vía intravenosa, para tratar la coriorretinitis y junto con la pirimetamina, para proteger a los enfermos inmunodeficientes que están sensibilizados a las sulfamidas (**FIGURA 7**).



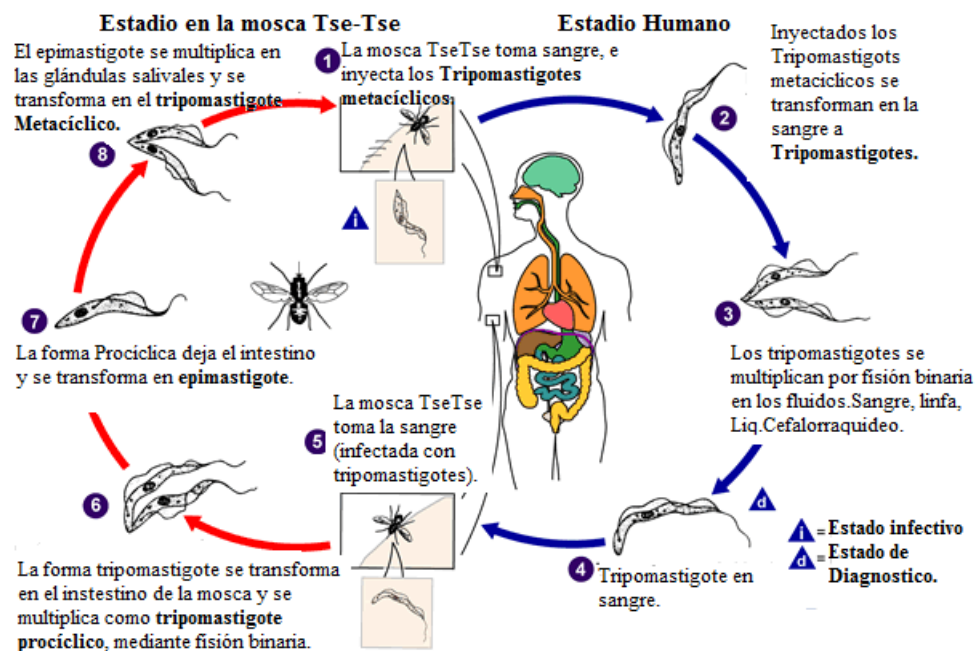
**FIGURA 7.** Drogas disponibles para el tratamiento de la toxoplasmosis.

En este contexto, la escasa cantidad de medicamentos disponibles en el mercado, la alta incidencia de eventos de intolerabilidad, la presencia de la enfermedad en personas de alto riesgo y en estado clínico comprometido, han convertido a esta enfermedad de distribución mundial en objetivos emergentes para la búsqueda de nuevas drogas que permitan mejorar su tratamiento.<sup>26</sup>

## 1.2 TRIPANOSOMATIDOS.

### 1.2.1 La tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño).

La enfermedad del sueño afecta a 36 países del África subsahariana, siendo el vector la mosca Tse tse (*Glossina spp*). En su mayoría los contagios ocurren en zonas rurales o selváticas, siendo causada por dos especies de, el *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, siendo la prevalencia del primero de un 95% de los casos.<sup>27</sup>



**FIGURA 8.** Ciclo de transmisión de *T.brucei* spp. y distribución actual en el continente africano. (Adaptado del CDC<sup>28</sup>)

La enfermedad posee dos etapas clínicas, aguda y crónica, que no tienen límites definidos y que dependen del estado inmunológico del paciente.

*T.brucei gambiense* puede generar una afección que puede ser aguda o crónica siendo esta última de especial cuidado ya que puede ser silente, y finalmente se manifieste a nivel del sistema nervioso central. En los últimos años, la cifra de enfermos ha ido en disminución lo que ha llevado a que en el año 2010 sólo se registren 7139 casos en toda África.<sup>29</sup>

*T.brucei rhodesiense*, mayormente afecta en el área de África oriental y del sur, y representa

menos del 5 % de los casos notificados. La enfermedad presenta síntomas a las pocas semanas o meses de la infección y evoluciona rápidamente afectando al sistema nervioso central. Las estadísticas de esta enfermedad están subestimadas debido a la densidad de personas que viven en las áreas afectadas y el bajo reporte de casos, sumado a la incidencia netamente rural de la misma. Teniendo en cuenta que los animales de granja sirven como hospederos, resulta un reservorio en constante contacto con el ser humano. A su vez, el ganado resulta también afectado y por lo tanto repercute a nivel económico en la región, siendo de este modo una enfermedad importancia tanto a nivel humano, como veterinario.<sup>30, 31</sup>

En cuanto al tratamiento, normalmente los antiparasitarios utilizados en la primera etapa tienen poca toxicidad y pueden ser administrados fácilmente, siendo el problema el diagnóstico temprano de la enfermedad. En cuanto al tratamiento en la etapa crónica, se requiere de drogas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.

En la actualidad se encuentran en uso cuatro drogas antiparasitarias:

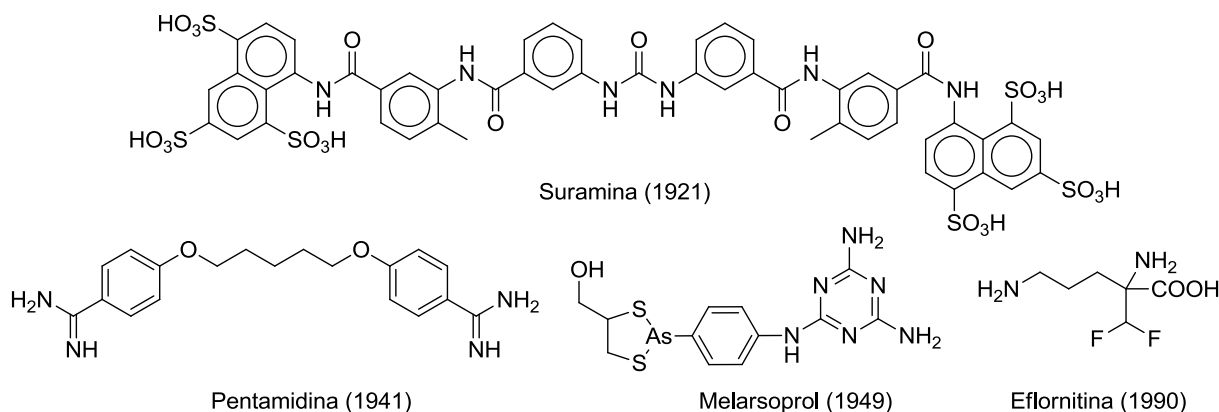
**Pentamidina:** se utiliza para la etapa aguda de la infección por *T.brucei. rhodesiense*. Esta droga en general presenta buena tolerancia.

**Suramina:** se administra de igual forma que la pentamidina, posee ciertos efectos secundarios en las vías urinarias, y produce reacciones alérgicas.

Para el tratamiento de la etapa crónica.

**Melarsoprol:** se usa contra las dos formas de la infección. Produce variados efectos secundarios; siendo el más severo la encefalopatía reactiva (síndrome encefalopático), que llega a ser mortal (entre 3 y 10%). Se ha observado un aumento de la resistencia a este medicamento en distintas regiones, particularmente en África central.

**Eflornitina:** Menos tóxica que el melarsoprol y más eficaz contra *T.brucei. gambiense*. Posee un régimen de tratamiento estricto y de difícil aplicación. El nifurtimox posee registro para el tratamiento de la tripanosomiasis americana, pero no para la tripanosomiasis africana humana. No obstante, una vez que los ensayos clínicos produjeron los datos de inocuidad y eficacia, su empleo en combinación con la eflornitina se ha aceptado e incluido en la lista de medicamentos esenciales de la OMS.<sup>32, 33,34</sup>



**FIGURA 9.** Drogas disponibles para el tratamiento de la toxoplasmosis.

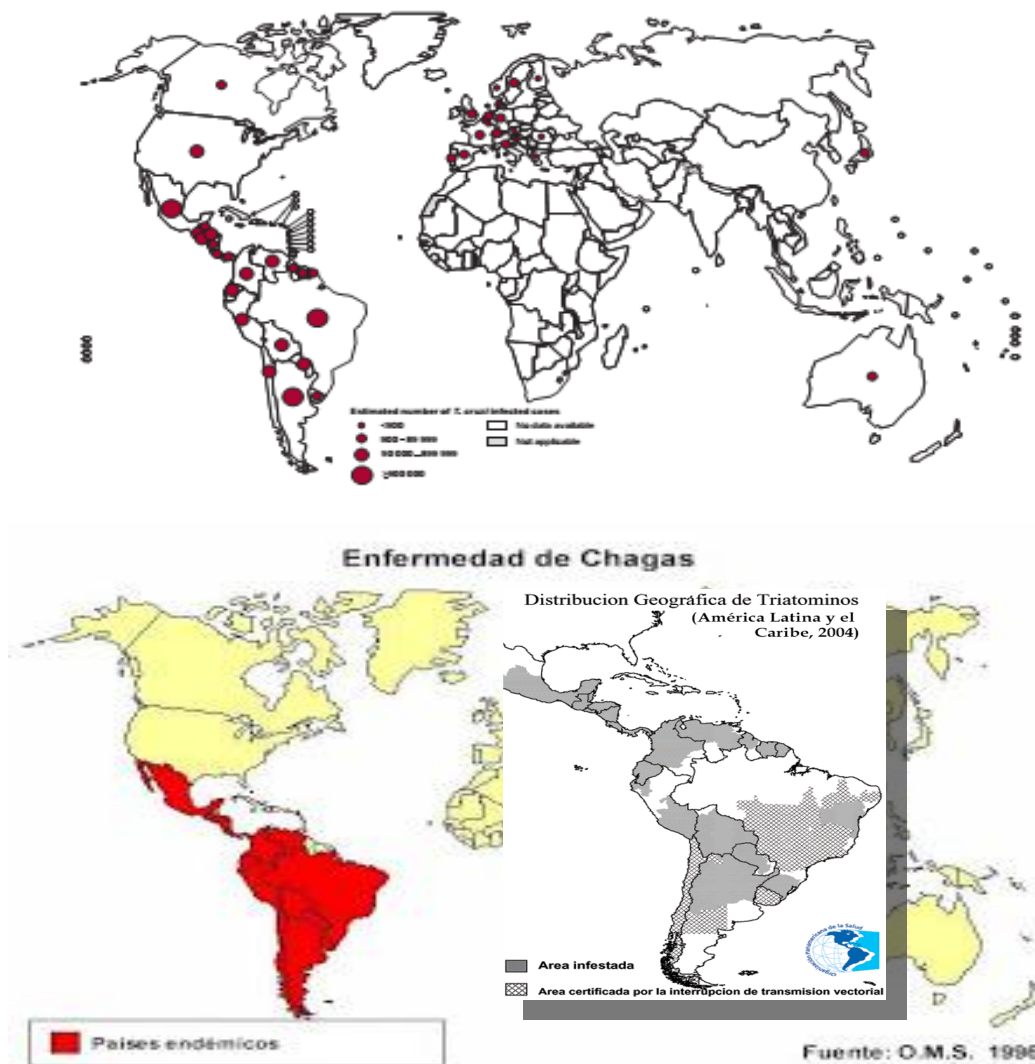
### 1.2.2 Enfermedad de Chagas (trpanosomiasis americana)

Esta antroponosis es causada por la infección de *Trypanosoma cruzi* y es endémica de América del Sur y Central. El resto de los continentes poseen casos reportados debido a las migraciones, dándose en escaso número y con una baja tasa de infección.<sup>35, 36</sup>

En la actualidad, la enfermedad representa unos diez millones de personas afectadas aproximadamente. El núcleo endémico es Brasil, centro y norte de Argentina, Paraguay, Bolivia, Perú, Colombia y Venezuela, y las Guayanas. Esta área representa una población en riesgo de trescientos millones, y una posible progresión estimada de unas veinticinco millones de personas infectadas (**FIGURA 10**). El número de fallecimientos reportadas a causa de complicaciones en la enfermedad es de unos 8000/por año, un número quizás alejado de la realidad debido a que muchos de los descensos por enfermedades cardiovasculares podrían provenir de enfermos de Chagas.<sup>37, 38, 39,11</sup>

La enfermedad es transmitida por el insecto hematófago *Triatoma infestans* (conocido comúnmente como vinchuca). Existen más de 130 especies de estos insectos que serían capaces de transmitir *T. cruzi* siendo *Triatoma*(*Triatoma infestans*), *Rhodnius* y *Panstrongylus* los géneros más importantes.<sup>40, 41</sup>

La transmisión ocurre cuando la zona contaminada por las heces del triatomino es rascada, introduciendo parte de las heces en la herida. Otras causas de infección incluyen las transfusiones de sangre, la ingesta de alimentos contaminados y de manera vertical madre-hijo.<sup>41</sup>



**FIGURA 10.** Distribución mundial de la enfermedad de Chagas (Arriba, según reporte de la OMS año 1996, abajo, misma fuente, año 2006-2010) y de sus vectores principales (en América Central y del Sur-recuadro en gris).

La enfermedad posee dos estadios clínicos marcados, una etapa aguda y una etapa crónica. Durante la etapa aguda, la parasitemia en sangre suele ser muy alta y aunque en la mayoría de los casos no se presentan síntomas, puede aparecer fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios y solo en un 50% de los casos hinchazón en el sitio de la lesión cutánea de entrada o una hinchazón en un párpado. Las muertes durante esta etapa son más probables que ocurran en niños pequeños y pacientes que están inmunodeprimidos que pueden desarrollar miocarditis aguda o meningoencefalitis. A este período le sigue un estadio silente, en donde, ya desarrollados los anticuerpos, el parásito invade distintos tipos de células. Quedando en forma amastigote durante un tiempo indeterminado que puede durar entre 5 y 40 años.<sup>42, 43</sup> Durante la etapa crónica se desarrolla la miocardiopatía chagásica, el megacolon y megaesófago. Hasta un 30 % de los enfermos crónicos presentan alteraciones cardíacas y un 10 % padecen las alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas. El tratamiento para

cada una de ellas es específico y es la causa de morbilidad de estos pacientes. Las cardiopatías son la forma crónica más frecuente, se pueden caracterizar por arritmias y anomalías en la conducción,

Para el caso de la transmisión durante el embarazo, el riesgo de contraer la enfermedad durante los primeros meses de gestación tiene una incidencia comprobada en el aumento de la probabilidad de aborto y cuando el contagio ocurre en etapas posteriores al tercer mes, los efectos de la enfermedad varían en los niños infectados. Los síntomas más frecuentes son nacimiento prematuro, hepatoesplenomegalia, meningoencefalitis, cambios en la retina y signos de miocarditis aguda o insuficiencia cardíaca.<sup>44,38, 45, 46</sup>

### 1.2.2.1 Situación en la Argentina.

Se estima que en nuestro país hay entre 1.500.000 y 2.000.000 de niños y adultos infectados. Las zonas endémicas son el NEA, NOA, Región centro y el sector comprendido por el sur de Buenos Aires, La Pampa y Mendoza, que debido a los cambios climáticos han permitido la adaptación de especies de insectos transmisores. Entre los años 2006 y 2010 la tasa de infestación de hogares ha disminuido notablemente, especialmente en sectores de bajos recursos, que son los de mayor incidencia, debido a la convivencia de animales reservorios, el vector y el humano. Según uno de los últimos informes nacionales, cinco provincias (Jujuy, Entre Ríos, La Pampa, Río Negro y Neuquén) han certificado la interrupción de la transmisión vectorial. Estos datos resultan de importancia ya que en función del número de nuevos casos reportados y el grado de implementación estrategias de tamizaje de la población de riesgo (en especial embarazadas), se desprende que las políticas aplicadas comienzan a mostrar tendencia a la disminución y esto llevaría a una mejoría de la condición de la enfermedad en la Argentina.<sup>47,35</sup>

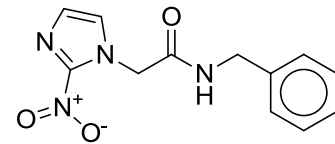
Si bien los indicadores resultan de importancia en la medida de observar los controles llevados para la erradicación de la enfermedad, no indican la morbi-mortalidad real del estado actual de las personas que poseen la enfermedad crónica. La disminución de madres infectadas, y la disminución de la seroprevalencia de los pacientes que concurren a donar sangre, nos permitirían decir que la situación de la enfermedad en el país comienza a ser controlada. A pesar de ello, una lectura adecuada nos permite observar que en las regiones de mayor impacto de la enfermedad, la situación merece una mayor atención.<sup>48, 39, 49</sup>

Uno de los puntos que no se tratan en informes de Brasil y Argentina es la tipificación de cepas. Esto en un comienzo resultaba de interés académico, sin embargo, debido a la

aparición de cepas resistentes a Benznidazol, e incluso a Nifurtimox, en estos momentos adquiere un carácter médico relevante.<sup>50</sup>

### 1.2.2.2 Formas de tratamiento.

La enfermedad de Chagas en la actualidad se trata con drogas como el Benznidazol, y el Nifurtimox, siendo el primero más efectivo durante la etapa aguda y en la etapa crónica. Estudios demuestran que ambos poseen una eficacia cercana al 100% en



Benznidazol

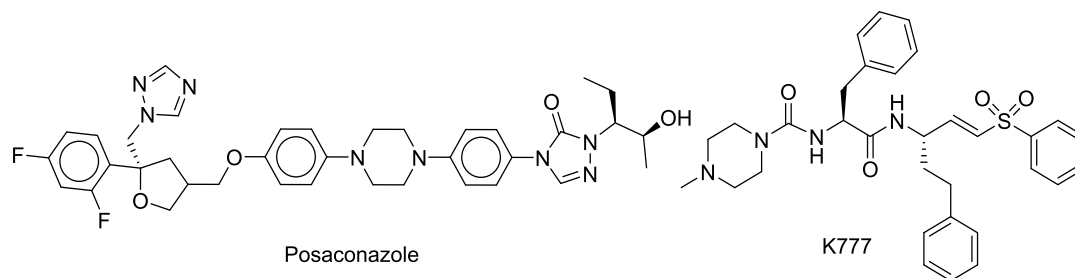
la remisión de la enfermedad en la etapa aguda. Pero su eficacia en la etapa crónica es discutible. Recientemente el estudio TRAENA, ha probado de manera consistente, que el uso del Benznidazol resulta efectivo para la remisión parasitaria y seroconversión a negativo de pacientes en etapa crónica sin aparición de síntomas. En esta etapa indeterminada de la enfermedad la parasitemia suele ser baja y los índices de anticuerpos resultan de vital importancia en el seguimiento de los pacientes.<sup>51,52</sup>

Estas dos drogas presentan un nivel de intolerancia alto (para TRAENA, en adultos sin síntomas el nivel alcanza un 75% de intolerancia con al menos un efecto adverso comprobado) lo cual abre un interrogante acerca del uso de estas drogas y la adherencia a los tratamientos por parte de los pacientes. Cabe destacar que no pueden ser administrados durante el embarazo y el grado de intolerancia aumenta cuando se trata de niños o de pacientes inmunodeprimidos.<sup>50</sup>

El Nifurtimox se encuentra contraindicado en personas con antecedentes de enfermedades del sistema nervioso neurológicas o trastornos psiquiátricos.<sup>53</sup>

Además, puede ser necesario administrar un tratamiento específico para las manifestaciones cardíacas o digestivas

Afortunadamente en tiempos recientes se ha avanzado en el desarrollo de K777 y pozaconazol, (**FIGURA 11**). habiendo logrado avanzar hasta las pruebas clínicas, encontrándose en Fase II y en Fase III respectivamente. Estas dos drogas apuntan al tratamiento de la forma crónica de la enfermedad, si bien son también efectivas en la forma aguda. Se ha demostrado que poseen una mejorada tolerancia y el estudio en modelos murinos revela una disminución en la reincidencia de la infección, comparado con el 40% de los casos de los individuos tratados con Benznidazol.<sup>49, 54, 55</sup>



**FIGURA 11.** Drogas en estudios clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

La OMS junto con los países afectados de zonas endémicas tiene en cuenta que a pesar de los logros alcanzados se debe seguir trabajando en las siguientes premisas:

- ✓ la propagación de la enfermedad, debido principalmente al aumento de la movilidad de la población dentro de América Latina y hacia el resto del mundo,
- ✓ el acceso al diagnóstico y al tratamiento por parte de millones de personas infectadas,
- ✓ el resurgimiento de la enfermedad en regiones donde se había avanzado en el control, como la región del Chaco de Argentina y Bolivia,
- ✓ el surgimiento de la enfermedad en territorios donde se consideraba que no existía, como la cuenca amazónica;
- ✓ la sostenibilidad, el mantenimiento y el afianzamiento de los adelantos en materia de control vectorial.

### 1.2.3 Leishmaniasis.

La leishmaniasis es un complejo de enfermedades producidas por el género *Leishmania* en seres humanos. Su vía de entrada resulta de la picadura de flebótomos infectados de los géneros *Phlebotomus*, *Psychodopygus* y *Lutzomyia*. Existen tres formas clínicas de la enfermedad: la visceral, cutánea y la muco-cutánea, siendo la primera la más importante en cuanto a morbi-mortalidad, seguida por la muco-cutánea y la cutánea. Se encuentra extendida en 98 países, ubicados en 3 territorios en los 5 continentes, con aproximadamente 1,3 millones de nuevos casos al año, siendo unos 300.000 debidos a leishmaniasis visceral. Los países más afectados son Bangladesh, Brasil, Etiopia, India, Nepal y Sudan. Existe un millón de personas afectadas por las formas cutánea y muco-cutánea, siendo esta última de gran impacto a nivel geográfico ya tiene una mayor área de influencia localizada en Brasil, Colombia, Perú, Bolivia, Paraguay y Norte de Argentina. Este complejo de enfermedades es uno de los más amplios y con mayor número de casos reportados, pero sólo 33, de los 98 los

países afectados, poseen reporte obligatorio de casos, por lo que se estima que existe un número aún mayor de casos. Otra particularidad es el hecho de que los vectores suelen estar dentro de los ecosistemas de manera natural y si bien hay una influencia del clima en el corrimiento de las fronteras entomológicas, el movimiento de la población genera la aparición de nuevos casos y focos.<sup>42, 56</sup> Los reservorios de las de los parásitos son diferentes según la región y la especie de *Leishmania*; en América el reservorio principal de la leishmaniasis visceral urbana es el perro doméstico infectado (tenga o no síntomas), y en el ciclo rural estarían involucrados también roedores y marsupiales (ver **FIGURA 12**).<sup>57</sup>

<b>VIEJO MUNDO</b>
Subgénero: <i>Leishmania</i> <i>L. aethiópica</i> (zoonótica), <i>L. donovani</i> (antroponótica), <i>L. infantum</i> (zoonótica), <i>L. mayor</i> (zoonótica), <i>L. trópica</i> (antroponótica).
<b>NUEVO MUNDO</b>
Subgénero: <i>Leishmania</i> <i>L. mexicana</i> , <i>L. amazeis</i> , <i>L. chagasi</i> (zoonóticas)
Subgénero: <i>Viannia</i> Complejo : <i>L. braziliensis</i> <i>L. braziliensis</i> , <i>L. peruviana</i> (zoonóticas)
Complejo: <i>L. guyanensis</i> <i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i> (zoonóticas)

**FIGURA 12.** Especies de *Leishmania spp.*<sup>58, 59</sup>

Para el caso de la leishmaniasis visceral, la coinfección con HIV ha aumentado la susceptibilidad de los pacientes y ha llevado tanto a un aumento de la mortalidad como al número de casos de leishmaniasis reportados, especialmente en países donde la terapia antirretroviral no se encuentra establecida correctamente o falta de adhesión al tratamiento.

Se estiman que entre 20.000 y 40.000 personas fallecieron durante el 2010 por causa de la leishmaniasis visceral en las zonas endémicas. Para el caso de la leishmaniasis cutánea, el número resulta indefinido ya que la incidencia en poblaciones rurales y remotas da como resultado un reporte de casos y un nivel de atención medica inadecuado. En cambio la forma muco-cutanea debido a que presenta sintomatología que requiere de atención médica, muestra mayor número de casos, teniendo mayor incidencia la acción terapéutica para su tratamiento. Todo este panorama se agrava con la aparición de cepas resistentes en todas las expresiones de esta enfermedad (**FIGURA 13**).<sup>60</sup>

El agente etiológico de la leishmaniasis visceral en América es *L.chaqasi*, sin embargo, la enfermedad es clínicamente similar a la causada por *L.infantum* o *L.donovani*. Los parásitos son indistinguibles por los métodos usuales de tipificación y la mayoría de los síntomas de la

enfermedad son similares a los presentados en pacientes de Europa y Asia. Son muy frecuentes además las infecciones asintomáticas y las formas subclínicas de la enfermedad. Pacientes considerados asintomáticos, pueden progresar hacia el clásico Kala-azar o resolverse sin tratamiento específico.



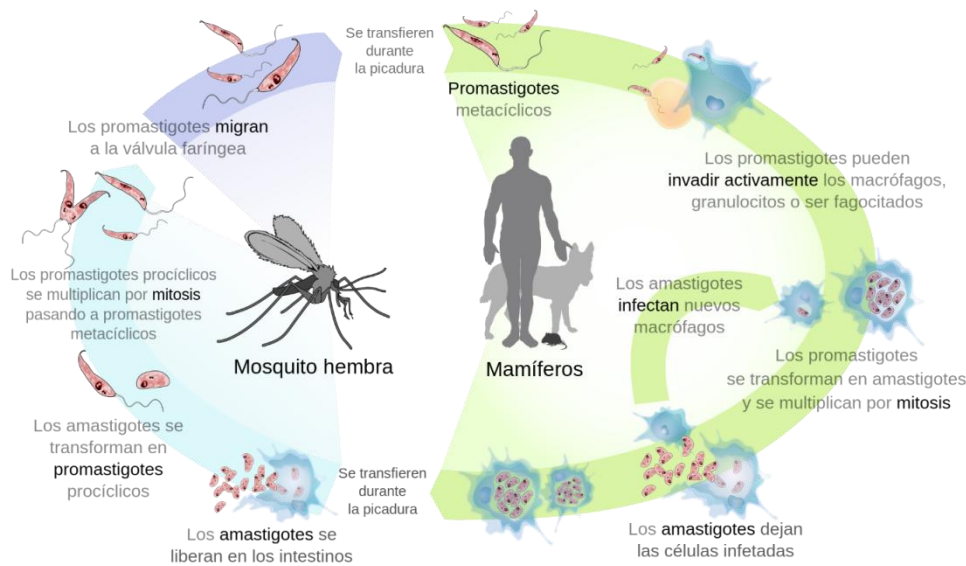
**FIGURA 13.** Distribución de la Leishmaniasis Visceral en 2010.

En Argentina, el área endémica de leishmaniasis cutánea corresponde a las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero, Chaco, Formosa, Misiones y Corrientes, encontrándose recientemente el vector sin enfermedad en Santa Fe y Entre Ríos. Por su parte, la leishmaniasis visceral se está dispersando a partir de focos de transmisión autóctona. La transmisión de leishmaniasis visceral humana y canina se ha registrado hasta el momento en Misiones y Corrientes, mientras que en Santiago del Estero hubo casos de leishmaniasis visceral humana. Sólo en la leishmaniasis visceral canina, el vector se encuentra en dispersión activa y actualmente la enfermedad se encuentra diseminada hasta el sur de la provincia de Corrientes.<sup>56,40</sup>

En Brasil, la leishmaniasis visceral canina, es un problema serio en cuanto a la prevalencia y el constante crecimiento de la población infectada, esto ha causado que perros en contacto con el vector por migraciones de los mismos, hayan traído la enfermedad en algunos sitios sin reportes previos en Argentina.<sup>56</sup>

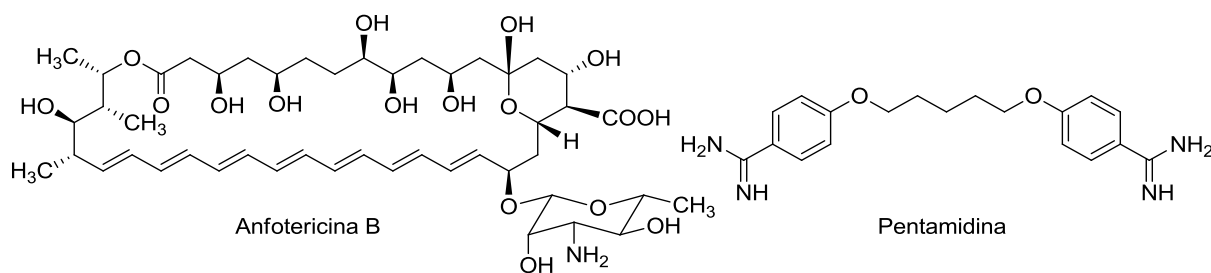
Desde el año de 1985 hubo un aumento en el informe de casos, especialmente en la zona de Salta-Jujuy, siendo en su mayoría correspondientes a las formas cutáneas y muco-cutáneas. En Argentina la leishmaniasis visceral comenzó a reportarse a partir del año 1917. En los últimos años han ocurrido brotes epidémicos de esta patología, en las regiones NEA e incluso se han trasladado hacia el centro del país. Si bien los casos deben ser reportados, es llamativo

que en las provincias con mayor incidencia debido al clima, el número de casos resulte aún muy bajo. Como se verá, la importancia del diagnóstico resulta de vital importancia en el momento de contener los brotes de esta enfermedad. El problema sanitario se vuelve más complejo, al observarse cepas que adquieren resistencia a los antiparasitarios utilizados, pero resulta incluso más preocupante la aparición de cepas multirresistentes, incluso sin presión de selección.<sup>56,41</sup>



**FIGURA 14.** Ciclo de vida de *Leishmania donovani*.

Su ciclo de vida de *Leishmania spp* resulta similar al hallado en los otros tripanosomátidos (**FIGURA 14**). Las drogas comúnmente usadas para el tratamiento de estas enfermedades varían de acuerdo al tipo de leishmaniasis, en general y debido a que una de las mayores poblaciones afectadas son los niños, resulta importante la elección adecuada del mismo. Teniendo en cuenta que existen los otros dos tipos de leishmaniasis, solo tomaremos en cuenta las drogas utilizadas contra leishmaniasis visceral. En la **FIGURA 15** se muestran las estructuras de la Pentamidina y la Anfotericina, siendo esta última, la droga de elección. Por otro lado, se encuentran el Antimoniato de Meglumina y el Estibogluconato de Sodio, que se utilizan como primera línea en algunos países, y están basados en antimoniatos pentavalentes. Lo importante a tener en cuenta es que estos son relativamente tóxicos. Las toxicidades en este tipo de enfermedades son importantes porque generan los abandonos de tratamiento, más allá de que se hayan encontrado resistencias a estos antiparasitarios<sup>4</sup>.

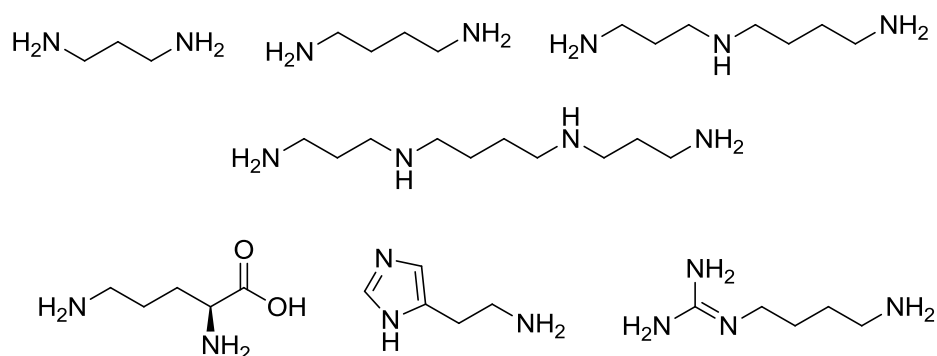


**FIGURA 15.** Drogas en uso para el tratamiento de la leishmaniasis.

### 1.3 Poliaminas como estructura de importancia biológica.

Las poliaminas son pequeñas moléculas orgánicas nitrogenadas, bases alifáticas, que se encuentran cargadas positivamente.

Las espermidina y espermina fueron descubiertas por Antoni van Leeuwenhoek en 1678, siendo Nicolas Vaeuquelin (1791) quien aísla los cristales de espermina y demuestra su relativa insolubilidad en agua y etanol. Posteriormente, A. Landenburg y J. Abel le dieron nombre de espermina, siendo finalmente Otto Rosenheim que logra elucidar la estructura química correcta en 1924 y sintetiza luego su fosfato, siendo esta última sal aislada de órganos animales, microorganismos y plantas. Otras poliaminas como putrescina, cadaverina, histamina, agmatina, se encuentran distribuidas en la naturaleza. Todas ellas se encuentran de forma libre, conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos, péptidos, etc. **(FIGURA 16).**<sup>61, 62</sup>



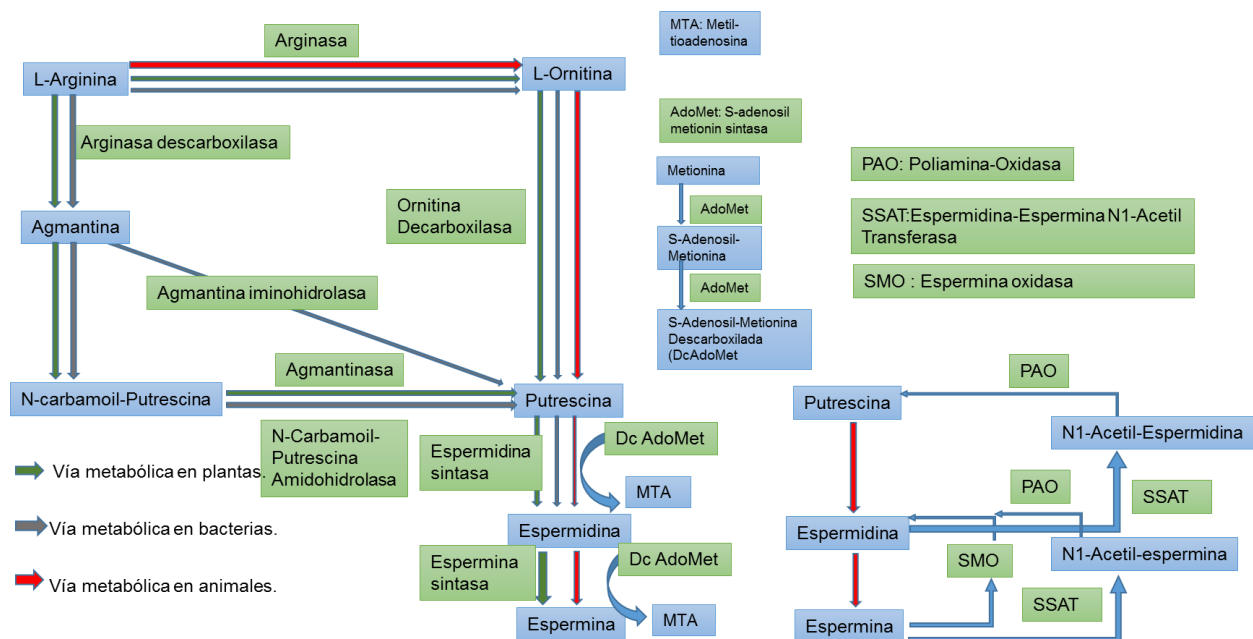
**FIGURA 16.** Poliaminas encontradas en la naturaleza.

El grado de hidrofilia de las poliaminas está determinado por la forma de la capa de agua que envuelve la estructura de la molécula y decrece en el orden Espermina > Espermidina > Putrescina. La flexibilidad y el grado de hidratación determinarán la habilidad de la poliamina a unirse a puntos rígidos y/o flexibles de las macromoléculas o estructuras celulares.

Las funciones de las poliaminas dependerían de su carga y de la energía de unión con otras moléculas aniónicas, siendo la espermina la más activa. Estos metabolitos están implicados en diversos procesos que incluyen la regulación de expresión génica, traducción, la proliferación celular, la modulación de la señalización celular y la estabilización de la membrana. Modulan también la actividad de ciertos canales iónicos que tienen importancia en la transmisión de señales neuronales. A causa de estas funciones, la homeostasis de poliaminas es crucial y está asegurada por la regulación de biosíntesis, catabolismo y el transporte.<sup>62</sup> Las poliaminas de forma directa o indirectamente regulan también el crecimiento, la muerte celular y la apoptosis.<sup>63</sup>

### 1.3.1 Metabolismo de las poliaminas.

En la **FIGURA 17** se presenta la ruta de biosíntesis *de novo* de poliaminas. Existen además rutas de interconversión en animales y levaduras y finalmente los diferentes mecanismos activos de transporte desde el exterior celular.

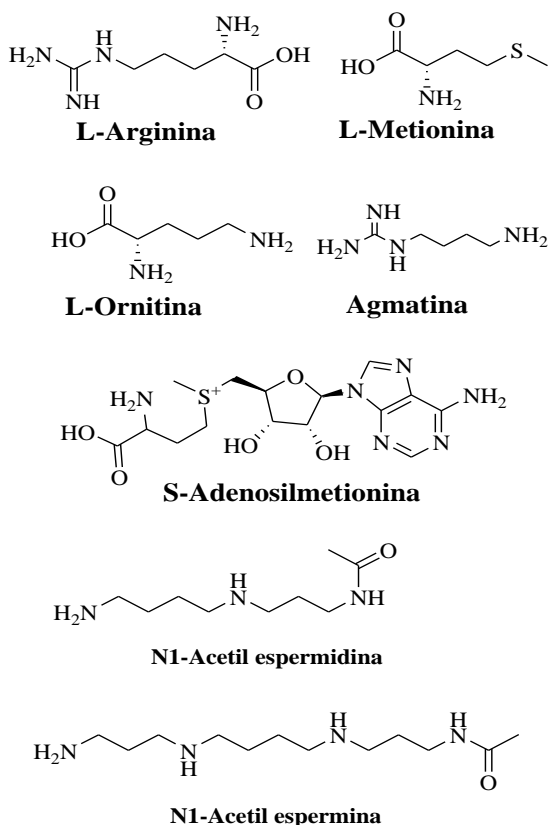


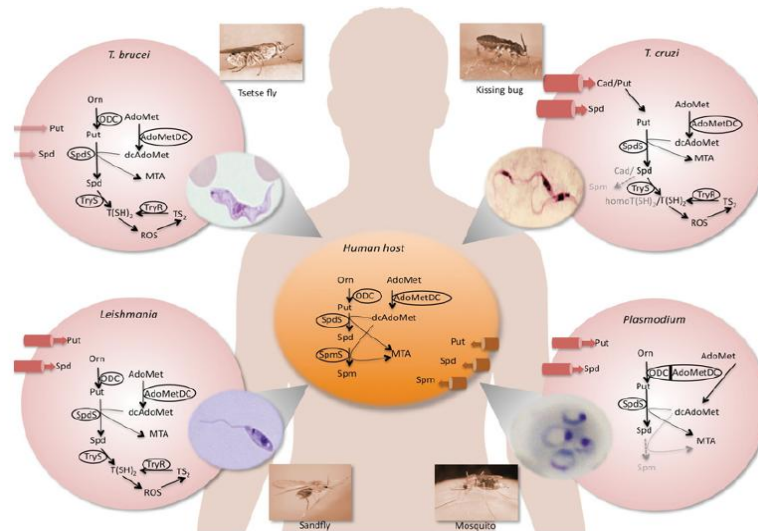
**FIGURA 17.** Biosíntesis y metabolismo de poliaminas en la naturaleza.<sup>62</sup>

Todo este flujo de metabolitos, no sólo se encuentra altamente regulado por enzimas, sino también a nivel transcripcional y translacional. La biosíntesis en animales comienza con L-Arg que es convertida mediante la arginasa (EC 3.5.3.1) y llevada a L-ornitina que subsecuentemente es descarboxilada a putrescina por la Ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17) que es usado, como precursor las enzimas espermidina sintasa (SPDS; EC 2.5.1.16) y la espermina sintasa (SPMS; EC 2.5.1.22) para producir espermidina y espermina. Estas dos

enzimas requieren de un donador de aminopropilo, que en general es la S-adenosilmetionina, la cual es sintetizada a partir de metionina y ATP por la S-Adenosilmetionina Sintetasa (AdoMetSyn; EC 2.5.1.6), que luego es activado por la AdoMetDecarboxilasa (AdoMetDC; EC 4.1.1.50). Entras las rutas de retroconversión, las enzimas espermina-espermidina N1-Acetil transferasa (SSAT; EC 2.3.1.57) en conjunto con la poliamina Oxidasa (PAO; EC 1.5.3.13) convierten espermina en espermidina y esta última en putrescina, pasando por sus N1-acetil derivados. A su vez, la espermina, puede ser retroconvertida a espermidina vía la espermina oxidasa (SMO; EC 1.5.3.16).

Inicialmente, debido al interés de este metabolismo como blanco de drogas anticancerígenas llevo a los grupos dedicados a la oncología estudiar las enzimas involucradas en su biosíntesis y al entendimiento de su regulación. Por otro lado, las pesquisas de este metabolismo en protozoarios permitió hallar puntos divergentes entre estos microorganismos y el ser humano. En efecto, algunas de las enzimas están ausentes en parásitos, lo que los convierte en auxótrofos y por tanto el nivel de estas poliaminas requiere de aporte externo, convirtiendo a este metabolismo en un blanco ideal para el desarrollo de nuevas drogas antiparasitarias.<sup>62</sup> Estas notables diferencias están presentes en *T. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp* y *Toxoplasma gondii* (**FIGURA 18**) lo que permitiría desarrollar drogas específicas para tratar las enfermedades que producen sin afectar al hospedero.



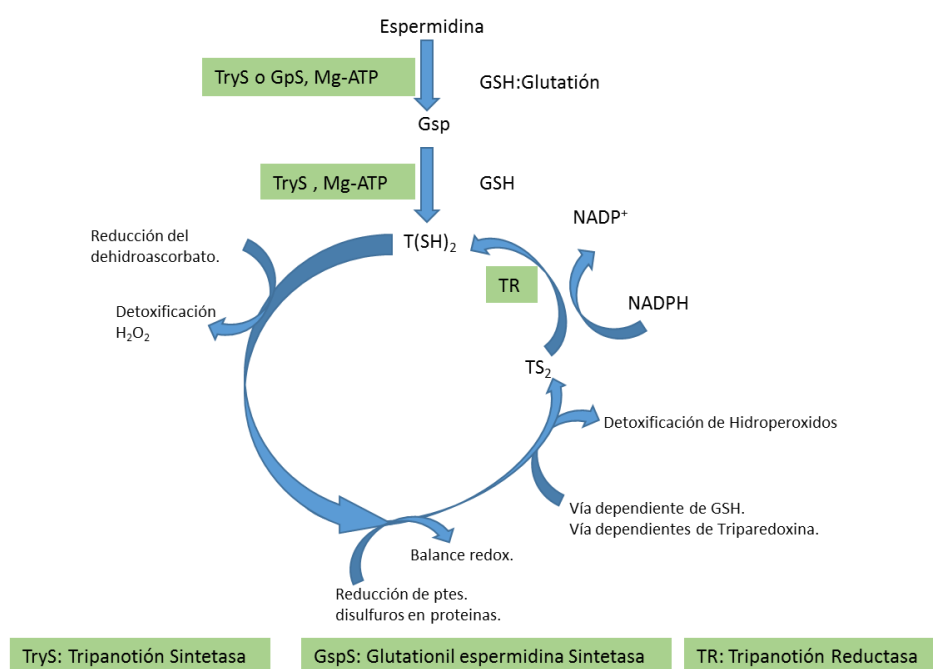


**FIGURA 18.**Metabolismo de las poliaminas (Extraído de referencia.)<sup>64</sup>

La interconexión entre el metabolismo de las poliaminas y el metabolismo redox, es uno de los puntos más estudiados en los protozoarios y en la biología en general. Son justamente las poliaminas las que de manera diferencial unen estos dos metabolismos en los protozoarios. Para el caso del ser humano, una de los actores fundamentales del metabolismo redox es el glutatión. En los parásitos, además de este último existe el tripanotión, que posee espermidina como puente entre dos moléculas de glutatión. Para los tripanosomatidos este metabolismo resulta crucial y las enzimas involucradas en su biosíntesis son atractivos blancos moleculares para el diseño de drogas como lo demuestra el amplio estudio que se han realizados en tripanotión sintetasa(TrpS) y tripanotión reductasa(TR).<sup>64</sup>

El metabolismo redox protege a las células del estrés oxidativo producido mayormente como producto de la cadena respiratoria y otros metabolismos que son productores de especies reactivas del oxígeno(ERO). La integridad del parásito depende de su habilidad para resistir el estrés oxidativo causado por las ERO ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $HO\cdot$ ), liberada tanto por el hospedador, como por su propio metabolismo. Por otra parte, los organismos eucariotas dependen de la eficacia de su maquinaria oxidativa para destruir a los parásitos invasores. Sin embargo, las mezclas de especies de oxígeno reactivas no son inofensivas para el hospedador y pueden causar daños letales si reaccionan de manera irreversible con DNA o lípidos de la membrana celular. Es por eso que estas especies deben ser eliminadas o neutralizadas por sistemas antioxidantes como el sistema del glutatión y enzimas relacionadas, superoxidos dismutasas (SOD) y catalasas. Una gran diferencia que se ve al comparar la bioquímica de mamíferos con las de los tripanosomatidos, es la defensa ante estas especies oxidantes.

En los mamíferos superiores el ambiente reductor es mantenido por la cupla glutatión-glutatión reductasa, en cambio en los protozoarios la cupla esta formada por (bis-glutatiónil)-espermidina (tripanotión) y la tripanotión reductasa. Este metabolismo está relacionado a una serie de reacciones y vías que son esenciales para los tripanosomatidos (**FIGURA 19**).

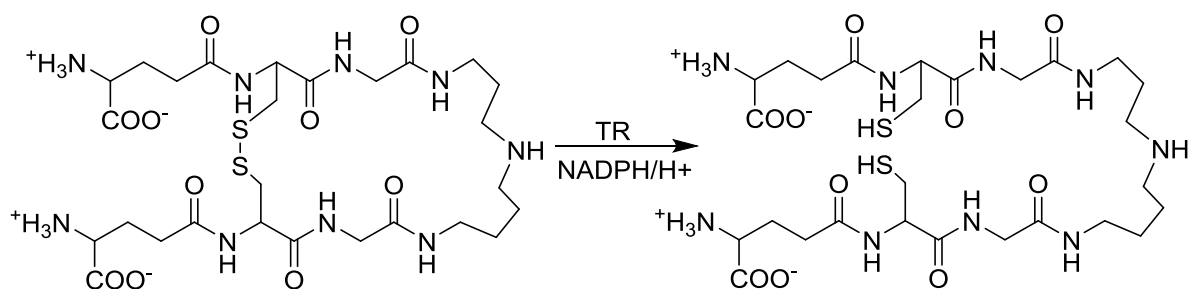


**FIGURA 19.** Síntesis y funciones del tripanotión (Adaptado de referencia).<sup>65</sup>

Para mantener el equilibrio oxidativo, el tripanotión se interconvierte entre su forma oxidada y su forma reducida a través de la ruptura y restauración de un puente disulfuro intramolecular. Los residuos de cisteína presentes en la porción de tripanotión están involucrados en esta interconversión (**ESQUEMA 1**).

Las enzimas más importantes relacionadas a este metabolismo son: la tripanotión sintetasa (TryS), la glutatión espermidina sintetasa (aunque la función en algunos parásitos, puede estar sustituida por la misma TryS), y la tripanotión reductasa (TR). Debido a sus virtudes como blanco molecular específico se han desarrollado numerosos inhibidores de la TR. Su abordaje ha incluido la optimización de métodos HTS, tamizajes virtuales y *docking*, como formas de filtrar las estructuras capaces de inhibir la enzima.<sup>66</sup> Si bien las reacciones y los mecanismos que catalizan la TR y la GR son similares, sus sitios activos son diferentes debido a que la TR posee aminoácidos específicos para unir los grupos amino del tripanotión. Para el caso de la GR, la región de unión a la Gly es hidrofílica, con presencia de residuos cargados positivamente para unir los carboxilatos, en cambio la TR tiene un sitio más amplio

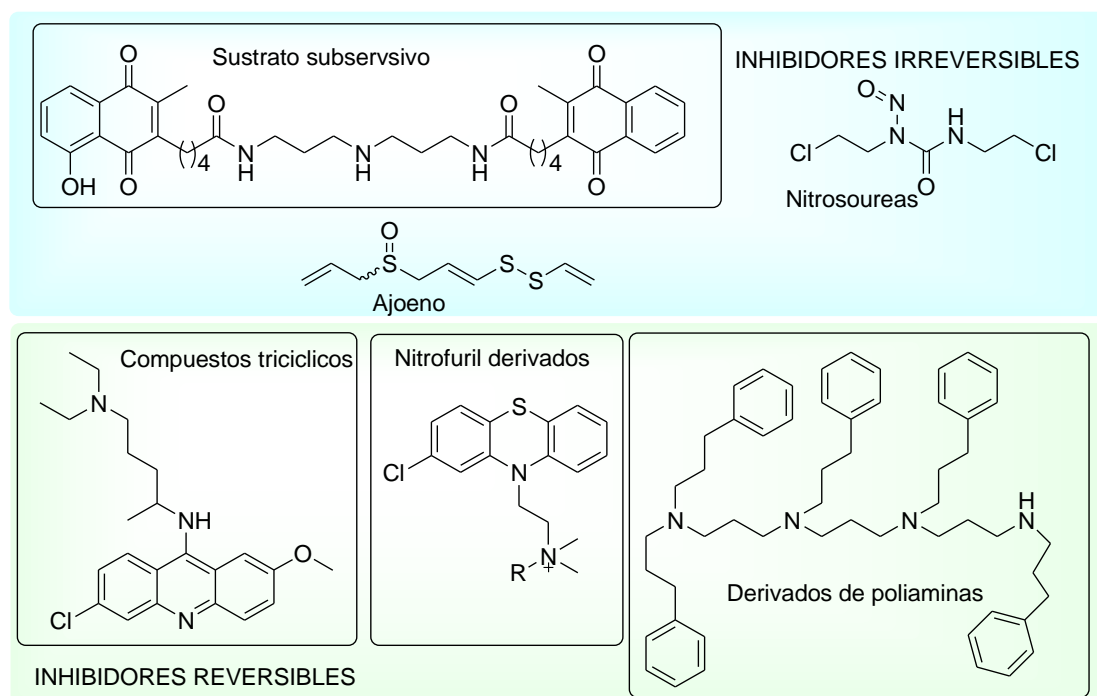
con una región hidrófoba y cargada negativamente, para unir la espermidina del tripanotión.



**ESQUEMA 1.** Modo de acción de la tripanotión reductasa.

Desde el año 1985, en donde fue caracterizada,<sup>67</sup> se han reportado un gran número de inhibidores de la TR. Los compuestos publicados se pueden clasificar en cinco grandes grupos: Inhibidores irreversibles, Sustratos subversivos, Análogos de sustratos, Compuestos tricíclicos, Derivados de poliaminas y peptidomiméticos.

A su vez se pueden dividir en inhibidores reversibles e irreversibles. En la **FIGURA 20** se muestran algunos ejemplos de estructuras de inhibidores de la TR.



**FIGURA 20.** Inhibidores reversibles e irreversibles de la TR.

Los sustratos subversivos, como los nitrofuranos y las naftoquinonas, son buenos inhibidores de TR. Sin embargo, su actividad en el ciclo redox no es selectiva. Las tendencias generales de inhibidores TR han revelado que los inhibidores más eficaces y selectivos son las aminas que contienen grupos hidrofóbicos. La TR cumple con tres requerimientos esenciales para el

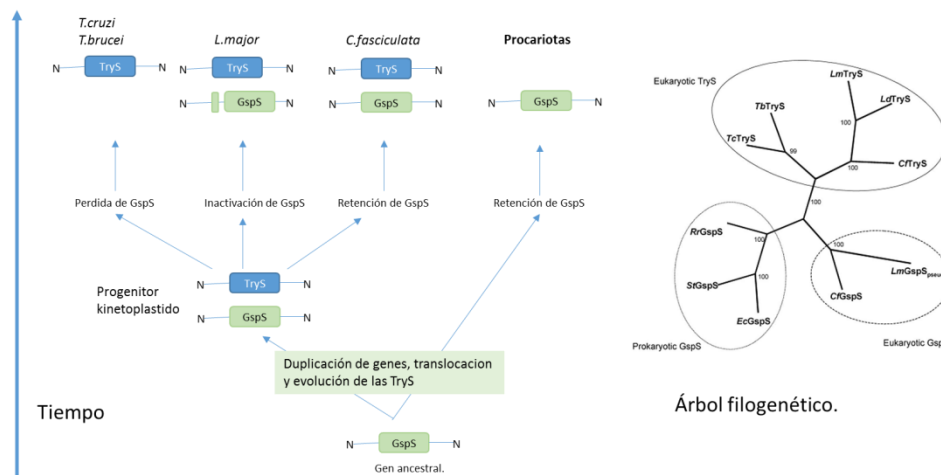
diseño de drogas basadas en HTS incorpora mediante distintas teorías de cálculos y modelado:

- Conocimiento de la estructura tridimensional y estructura del sitio activo,
- Esencialidad validada en los parásitos,
- Existencia de diferencias con su homólogo humano.

Sin embargo, la inspección del sitio activo en la estructura cristalográfica revela que la cavidad del sitio activo posee gran amplitud, hecho corroborado por las grandes diferencias topológicas observadas para los inhibidores encontrados.

La otra enzima de esta vía, la TryS, juega un rol central en la defensa contra el daño oxidativo. A su vez, interviene en el metabolismo de los ribonucleótidos y poliaminas y en la resistencia a drogas antimoniales en los tripanosomátidos. Si bien en *Crithidia fasciculata* la síntesis del tripanotión involucra dos enzimas, la glutationil-espermidina sintetasa (GspS, EC 6.3.1.8) en el primer paso y luego la TryS, se ha demostrado que en *T. cruzi* la síntesis es llevada a cabo solo por la TryS. En *T. brucei*, mediante experimentos con ARNi se demostró que el parásito se vuelve muy sensible al estrés oxidativo.<sup>65</sup> Es una enzima bifuncional que cataliza la formación del tripanotión a partir de glutatión y la espermidina, generando glutationil-espermidina y luego a tripanotión. También puede transformar la aminopropilcadaverina a glutationil-aminopropilcadaverina y homotripanotión. Posee a su vez una baja actividad amidasa que permite hidrolizar al tripanotión, dando como productos homotripanotión o la glutationilespermidina a glutatión y su correspondiente poliamina.

La TryS y el tripanotión solo han sido hallados en los tripanosomátidos, si bien en bacterias, como en *E. coli*, existe una GspS. Los estudios cinéticos han mostrado que la enzima asocia la función GspS y el segundo paso por parte de la TryS, tanto la TryS de *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi*, catalizan la síntesis desde GSH y espermidina. El análisis de las secuencias muestra una gran semejanza e identidad. Es así, que las enzimas *LmTryS* y *CfTryS* poseen una semejanza del 89 % e identidad del 77 %, seguido de ambas *TbTryS* y *TcTryS* (cada uno con semejanza de aproximadamente del 72 % e identidad del 57 %). El análisis de las secuencias por GlobPlot 2, que permite predecir fronteras de dominio dentro de una proteína, revela que el segmento interdominio amidasa y sintetasa para *LmTryS* y *CfTryS* sería de alrededor de 62 y 61 aminoácidos, respectivamente. Una región más corta de 42 aminoácidos enlazantes, fue predicha para *TbTryS* y *TcTryS*. Estas distancias están relacionadas con la función de estas enzimas pero también son un indicador de la evolución que va desde GspS hacia TryS<sup>68-70</sup>(FIGURA 21)

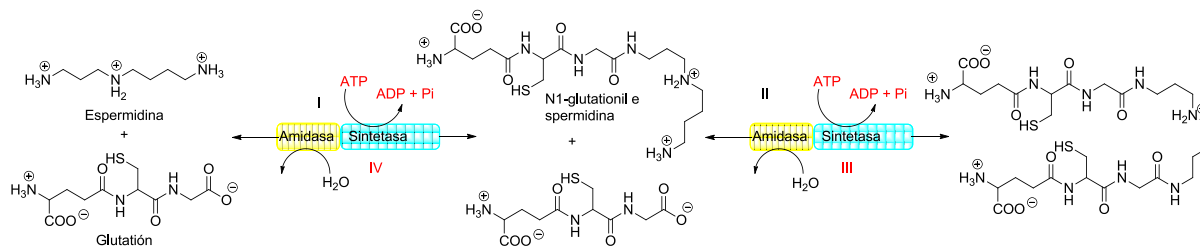


**FIGURA 21.** Izq. propuesta de evolución del gen de GspS hacia

TryS propuesto por Oza y col. A la derecha el árbol filogenético (tomado de Oza y col.<sup>71,71</sup>)

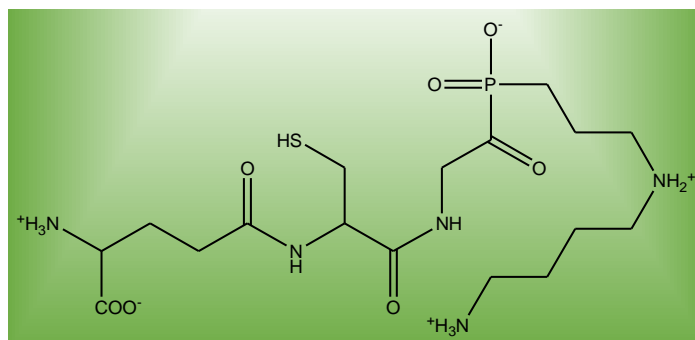
Basados en la comparación con las secuencias y funciones de la GspS de *E.coli*, se predicen dos dominios, uno en el extremo C-terminal, donde se lleva a cabo la síntesis del tripanotión con el concomitante gasto de ATP y otro, en el extremo N-Terminal, que posee la actividad amidasa. La estructura más estrechamente relacionada con la de GspS de *E.coli* es la de LmTryS y la comparación de los dominios sintasa tienen una alta homología. Por otro lado, la TryS posee una identidad de secuencia baja con la GspS (10%) pero una alta homología en el sitio activo.<sup>69</sup> Los estudios indican que tanto la GspS humana como la EcGSPS y la LmTrS son similares y que poseen los sitios de unión conservados para ATP y glutatión.<sup>65</sup>

Otro aspecto importante es la regulación de las actividades amidasa y la sintetasa, ya que su balance regula el proceso y las concentraciones de GSH y poliaminas y vías metabólicas que involucran al tripanotión (**FIGURA 22**). En LmTryS, al parecer la movilidad del extremo C-terminal permitiría bloquear el sitio activo proveyendo de un mecanismo que regula la actividad, mediante el cambio conformacional del sitio activo para desocuparlo y poder captar sustrato nuevamente. Estos cambios pueden ser debidos a diferencias en la orientación del dominio o pueden ser conducidos por las concentraciones de sustratos. Los aminoácidos responsables del posicionamiento del C-terminal del sitio activo de la amidasa, está estrictamente conservado tanto en la TryS de *Leishmania* como en la de *C.fasciculata*, con la excepción de Glu-181 que esta reemplazada por un aspartato. En los tripanosomas la secuencia del C-terminal difiere respecto de *Leishmania*, esto abarca parte del sitio con actividad amidasa y por lo tanto difieren en el modo de regulación de la actividad.



**FIGURA 22.** Reacciones de acoplamiento e hidrólisis catalizadas por la TryS-Amidasa. Por reacción entre Glutatión y espermidina (I) y luego entre la N1-Glutationil espermidina y el Glutatión (II), se forma el tripanotión. Las reacciones de hidrólisis (amidasa) ocurren en los pasos sucesivos (III y IV).

El fosfinato (**FIGURA 23**) es un inhibidor mimético del estado de transición que se ubica en el sitio de unión S2 y S3, y se comporta como un inhibidor bisustrato lento obligatorio y competitivo para GSH y espermidina, pero no para ATP. Esta última observación es compatible con la hipótesis que un acil fosfato electrofílico es formado por la reacción de ATP y el glutatión, formándose un intermediario tetraédrico inestable, el cual es mimetizado por el fosfinato.<sup>68, 69, 72</sup> Los avances realizados hasta el momento han permitido encontrar inhibidores de estas enzimas, pero todavía se encuentran en desarrollo en las etapas previas a las alcanzadas con los de TR.<sup>70, 71</sup>



**FIGURA 23.**

Se ha estudiado el sitio activo de la TryS para determinar si presenta un tamaño y una amplitud similar a la de la TR de manera de poder acomodar tripanotión. De ser así, ciertos inhibidores de la TR podrían servir como inhibidores de la TryS. Los estudios sobre la TryS de *L. major* sugieren que esto no es así. Recientemente la enzima, ha sido cristalizada pero aún no se han hallado inhibidores que permitan co-cristalizarse.<sup>72</sup>

Al momento existen pocos inhibidores basados en los conocimientos de la TryS. Más allá de lo reportado por Oza y otros.<sup>69</sup> Gilbert y otros<sup>66</sup> han logrado mediante un método HTS ensayar más de 62000 compuestos contra la enzima, obteniendo 720 positivos. El resultado final comprende seis clases de inhibidores, que fueron analizados y re-preparados logrando su optimización y validación mediante estudios de estructura-actividad.<sup>66</sup>

### 1.3.2 Transportadores de poliaminas.

Las poliaminas existen predominantemente en su forma cargada a pH fisiológico y requieren de transportadores para ser internalizadas. Proteínas transmembrana regulan el transporte de moléculas endógenas y xenobióticos a través de la membrana plasmática. En mamíferos, existen dos superfamilias han sido identificadas: ATPasas del tipo ABC y transportadores dependientes de soluto. Se ha demostrado que el transporte de poliaminas se encuentra mediado por estas proteínas. Para el caso de mamíferos, este transporte estaría mediado por ATPasas del tipo ABC, se encuentran en estudio distintas proteínas transportadoras SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC47A1, SLC7A1, SLC3A2, SLC12A8A, y SLC22A16.<sup>73</sup>

Los parásitos en general sintetizan poliaminas de *novo*, exceptuando *T.gondii* y *T. cruzi*. Siendo justamente la síntesis de las poliaminas, la mayor fuente de ellas, esto aún no resulta suficiente para suplir el suministro necesario y todas las especies poseen transportadores.

Estudios previos en mamíferos con el objetivo de encontrar nuevas terapias contra el cáncer, se abordan dos estrategias que involucran transportadores de poliaminas:

- ✓ Inhibición directa, que evita la captación de poliaminas exógenas
- ✓ El uso de transportadores como medio para internalizar una prodroga.

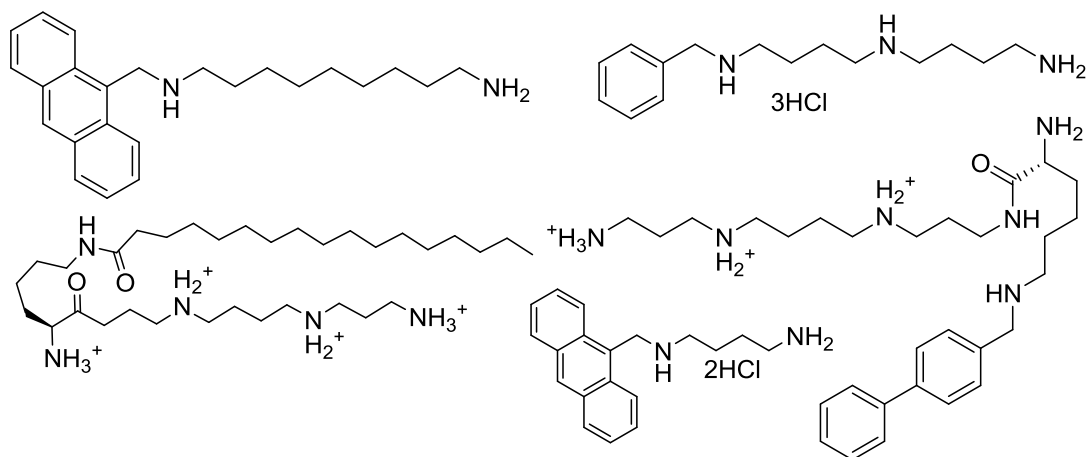
Este último enfoque permitió el diseño de prodrogas citotóxicas unidas a una poliamina para facilitar su transporte a través de la membrana, siendo específico para células capaces de captar selectivamente distintas poliaminas.

Muchas de los fracasos de terapias con inhibidores de la ruta de la poliaminas se deberían a que hay un influjo de poliaminas desde el exterior que suple la ausencia o la merma de síntesis en ciertos puntos del metabolismo. Esto es mayormente válido cuando se utiliza al DFMO como inhibidor de la ODC. En ensayos con un pre-tratamiento con DFMO, se constató que se incrementaba el transporte pero no se reducen los niveles de poliaminas internos.<sup>74</sup>

Diferentes trabajos han caracterizado transportadores de poliaminas específicos en parásitos protozoarios.<sup>75-77</sup> Carrillo y otros<sup>76</sup> describieron las propiedades bioquímicas y moleculares de un transportador con una alta afinidad por espermidina, que a su vez, es capaz de transportar también putrescina y L-Arg, aunque con menor afinidad. Este transportador denominado TcPAT12, tiene su homólogo en *L. major*, el LmPOT1 caracterizado por el grupo de Hasne y col.<sup>77</sup> Estos dos transportadores han mostrado similares parámetros cinéticos con valores de *Km* para espermidina de 14  $\mu$ M para la TcPAT12 y de 14,3  $\mu$ M para LmPOT1.

Estos resultados no son llamativos si se considera que el alineamiento de secuencia de estos dos transportadores ha mostrado que las porciones transmembrana poseen una alta homología, con la mayoría de sus residuos conservados. El transporte de putrescina, en cambio, es saturable y hay una alta afinidad por este compuesto y cadaverina, aunque requiere de un potencial de membrana para ejecutar esta función. A pesar del conocimiento del mismo, este transportador aún no ha sido caracterizado molecularmente.<sup>78</sup>

Hasta el momento se han identificado pocos inhibidores del transporte de poliaminas, tanto en células de mamíferos, como en parásitos. (FIGURA 24).<sup>79, 80</sup>

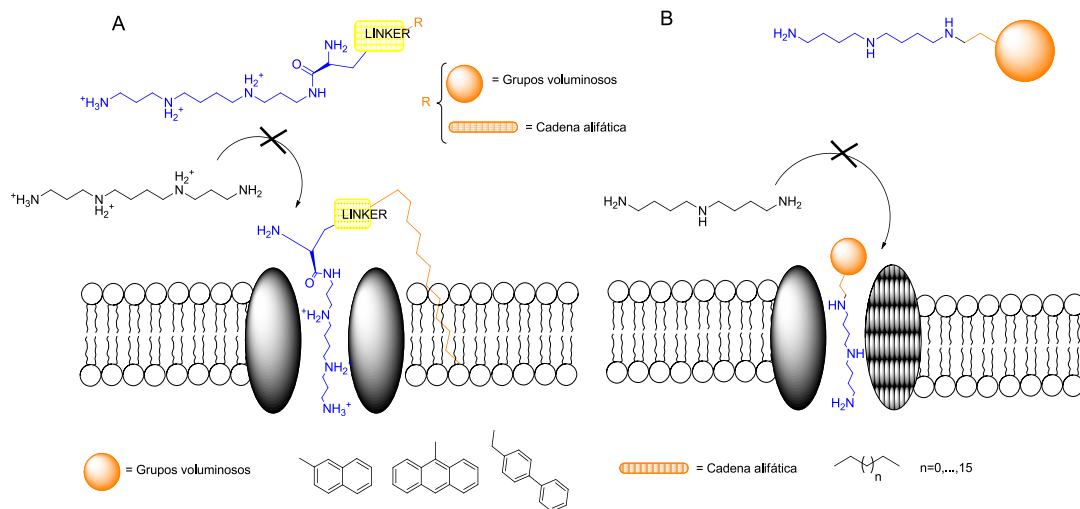


**FIGURA 24:** Estructuras halladas en la literatura que Inhiben el transporte de poliaminas, en su mayoría probadas en células de mamíferos.

Las aproximaciones en la búsqueda de inhibidores de los transportadores encontrados en la literatura se encuadran en dos modelos. El primero, utiliza el esqueleto de la molécula transportada a la cual se le agregan grupos voluminosos o cadenas alifáticas para bloquear la vía de entrada y el segundo, utiliza un *linker* ó enlazador entre una cola hidrofóbica o el grupo voluminoso. El enlazador le da un mayor flexibilidad a la porción que es reconocida y permite a la cadena hidrofóbica interactuar con la membrana plasmática, asegurando el anclaje a la misma. (FIGURA 25)

Estas aproximaciones parten de resultados de mecanismos observados en bacterias, siendo desconocido si los mismos se encuentran operativos en los transportadores parasitarios. Como se observa en la FIGURA 25 el mecanismo de captación de las poliaminas resultaría diferente ya que no se han hallado hasta el momento evidencias de la existencia de las proteínas extracelulares correspondientes al complejo transportador de las bacterias. En el caso de las células eucarióticas, incluyendo las levaduras, los genes que codifican transportadores de poliaminas sobre la membrana celular aún no han sido caracterizados completamente. Sin embargo, se conoce que la respuesta del transporte de las poliaminas en

levaduras es regulado positivamente por serin/treonin proteínas quinasas y de forma negativa, por una antizima en células de animales.<sup>73</sup>



**FIGURA 25.** (A) Modelo con enlazador químico entre la porción blanco y la de anclaje, (B) modelo sin porción enlazante.

Las estructuras de cristalografía de PotD y PotF, proteínas extracelulares pertenecientes al complejo transportador en *E.coli*, definieron las características de los sitios obligatorios de poliamina sobre estas proteínas. El arreglo y las propiedades químicas de aminoácidos en PotD y PotF pueden ser usados como una plantilla para los estudios de otras proteínas transportadoras de poliaminas.<sup>81</sup>

En general los estudios sobre inhibición de proteínas del metabolismo de poliaminas, tanto en tripanosomátidos, como en apicomplejos, se encuentran en constante desarrollo. Esto es debido a que no se han desarrollado inhibidores que permitan certificar una fuerte inhibición de estas enzimas y un concomitante efecto en el crecimiento de los parásitos.

El estudio de los transportadores de poliaminas no sólo tiene importancia para las enfermedades parasitarias, sino que también en oncología y en neurología, lo que empuja hacia la aparición de nuevos inhibidores.<sup>32</sup>



*“Qué pasa si miramos algo muy de cerca en detalle y perdemos la idea de totalidad?  
¿Ese detalle se transforma en otra cosa? ¿En qué se transforman los detalles cuando son aislados?”*

## **2. OBJETIVOS.**

## 2 OBJETIVOS

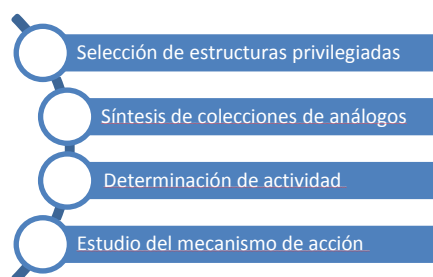
Las enfermedades parasitarias tienen un fuerte impacto en la salud pública de países en desarrollo. La malaria, la leishmaniasis y las tripanosomiasis son algunas de estas infecciones que son causadas por parásitos protozoarios. Estas enfermedades son endémicas en distintas zonas alrededor del mundo y producen la mayoría de las muertes por año dentro de las enfermedades infecciosas. La aparición de cepas resistentes a las drogas existentes contra la malaria y la falta de drogas adecuadas contra estas enfermedades requieren de un esfuerzo continuo tendiente a descubrir nuevos agentes quimioterapéuticos que sean mecanísticamente novedosos, no tóxicos y económicos.

### 2.1 Objetivos generales

El objetivo principal de este trabajo de tesis es contribuir al desarrollo de nuevos compuestos con prometedoras actividades antiparasitarias. Para ello nos proponemos desarrollar una estrategia que pueda ser usada como herramienta general para la búsqueda de nuevos compuestos activos y el estudio de su modo de acción.

#### 2.1.1 Objetivos Específicos

El desarrollo de nuevos compuestos antiparasitarios requiere de la adecuada selección de estructuras que provean de la actividad buscada. En particular, en este trabajo de tesis nos proponemos utilizar estructuras privilegiadas como bloque de construcción principal de las colecciones de compuestos a preparar para garantizar su actividad. Estas porciones



moleculares se incorporarán en las estructuras de los miembros de las bibliotecas preparadas mediante química robusta, para garantizar el fácil acceso a los productos finales. Todas las familias de compuestos sintetizados serán ensayados contra los parásitos responsables de la malaria (*Plasmodium falciparum*), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*); leishmaniasis visceral (*Leishmania donovani*) y la tripanosomiasis americana (*Trypanosoma cruzi*) y la africana (*Trypanosoma brucei*). Estos resultados serán usados para construir modelos de relación estructura-actividad y de este modo proveer de un racional que permita rediseñar nuevas generaciones de análogos.

Seguidamente, abordaremos la realización de estudios complementarios que permitan avanzar hacia un compuesto líder. Con este objetivo, se estudiarán rutas metabólicas afectadas por los compuestos para validar posibles mecanismos de acción en cada parásito; se realizarán la evaluación *in silico* de las propiedades farmacológicas-farmacocinéticos y se buscará diseñar y sintetizar análogos fluorescentes de los compuestos líderes para estudiar su incorporación y localización mediante microscopia.



*Supongamos que alguien quiere copiar pura y simplemente “**Las Meninas**” dijo **Picasso** a su amigo” llegaría un momento en que si fuese yo quien lo hiciera, me diría: “¿qué pasaría si pusiera este personaje un poco más a la derecha o a la izquierda”. Y trataría de hacerlo a mi manera, sin preocuparme de **Velázquez**. Esta tentativa me llevaría sin duda a modificar la luz o disponerla de otra forma, puesto que habría cambiado de sitio un elemento. Así, poco a poco, lograría hacer un cuadro*

### **3. ESTRATEGIA GENERAL.**

### 3 ESTRATEGIA GENERAL.

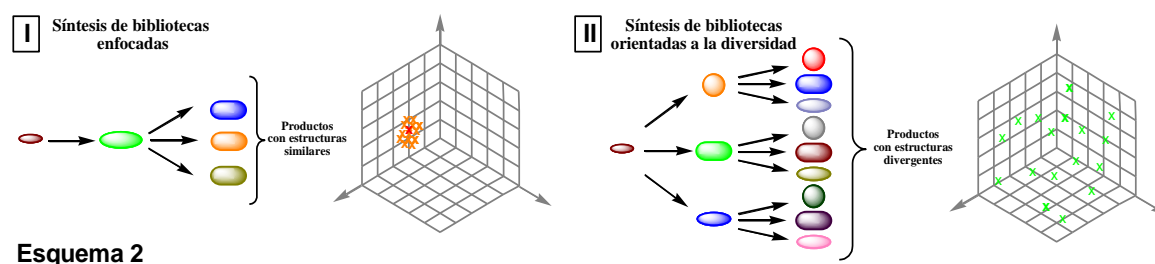
#### 3.1 Definición.

El tratamiento de las enfermedades que no poseen o que poseen drogas insuficientes requiere el constante desarrollo de nuevos medicamentos. El descubrimiento de estas nuevas drogas es un largo y costoso proceso que tiene como objetivo la identificación de compuestos que permitan curarlas o tratarlas. En los últimos años se han realizado avances considerables en muchos aspectos de este proceso. Sin embargo, la necesidad de generar nuevas estructuras sigue siendo uno de los pasos limitantes en la búsqueda de nuevos compuestos activos. Teniendo en cuenta que la secuencia del genoma humano ha sido prácticamente resuelta, se ha establecido que solo el 10 % de estos genes codifican para proteínas que pueden unirse a drogas. De estas 25.000 proteínas, sólo se han encontrado compuestos que las modulan para 1000 de ellas. Históricamente, la química medicinal se ha centrado en el dogma "un blanco-una droga" (del inglés: one drug-one target).<sup>82</sup> Este dogma surge, no tanto por un convencimiento de que efectivamente se pudieran diseñar y desarrollar drogas que interaccionen exclusivamente con un único blanco, sino como una simplificación necesaria que ha permitido avanzar en el desarrollo del numeroso arsenal de drogas con que contamos hoy día. Sin embargo, el grado de conocimiento de la genética y la bioquímica, en conjunto con los avances técnicos alcanzados en los últimos 50 años, han permitido considerar la implementación de estrategias alternativas en donde el objetivo de circunscribirse a único blanco se comienza a ver como una desventaja.

Desde los inicios de la civilización se ha utilizado el vasto arsenal con que cuenta la naturaleza para paliar los efectos de las enfermedades. El advenimiento de la Química Medicinal se abasteció de estructuras provenientes de ella, que se han convertido en drogas, siendo todavía la principal fuente de compuestos disponibles en el mercado, ya sea como tales o como productos inspirados en ellos.<sup>83,84,85</sup> A pesar del extensivo estudio a los que se ven sometidos, se desconoce en detalle el mecanismo de acción de muchas de estas drogas. En general, los estudios sugieren que la alta efectividad de estos compuestos se debe a que afectan múltiples blancos ya que han sido seleccionados a lo largo de la evolución para interaccionar con blancos moleculares, ser transportados y poder atravesar membranas celulares. Esta aparente paradoja, entre compuestos diseñados para interaccionar con único blanco y productos naturales que tienen como mecanismo de acción la interacción con blancos diversos, es considerada hoy día como una estrategia alternativa para el desarrollo de drogas. En efecto, en años recientes la búsqueda de drogas que interaccionen con múltiples

blancos es una tendencia creciente.<sup>86</sup> Se ha propuesto que ésta estrategia, en conjunto con otras, podría contribuir a acelerar la incorporación de nuevas drogas al mercado y revertir la baja performance que ha tenido la industria en la última década.

Hasta hoy, la naturaleza ha sido la principal fuente de nuevos compuestos, y eso se debe sin lugar a dudas, a que los productos naturales reúnen la mayor variedad de compuestos con estructuras diversas. El surgimiento de la química combinatoria tuvo inicialmente como propósito generar cantidades numerosas de compuestos como mezclas que luego de ser ensayados, mediante deconvolución, permitían encontrar la estructura activa. Esta aproximación si bien resultó muy atractiva, pronto se enfrentó a los problemas asociados con el estudio de mezclas complejas, donde efectos sinérgicos y antagónicos complicaban la identificación del componente activo en la mezcla.<sup>87</sup> El paso siguiente fue la síntesis en paralelo, que tenía la ventaja de generar colecciones de compuestos sintetizados en forma individual, lo que permitía obtener la actividad en forma específica para el compuesto que se estaba preparando. Más allá de las mejoras introducidas a esta aproximación, había un factor que no había sido tenido en cuenta y que recientemente ha sido considerado clave en la búsqueda de compuestos activos: La diversidad estructural de los productos preparados. La generación de bibliotecas de compuestos puede entonces dividirse en dos grandes grupos. Por un lado, la preparación de compuestos con estructuras similares, que es útil en la búsqueda de inhibidores de blancos de estructura conocida (Esquema 2-I) y por otro, en los casos en que el blanco es desconocido, es necesario explorar el espacio químico en toda su extensión de manera de aumentar las chances de encontrar compuestos activos (Esquema 2-II).<sup>88</sup>

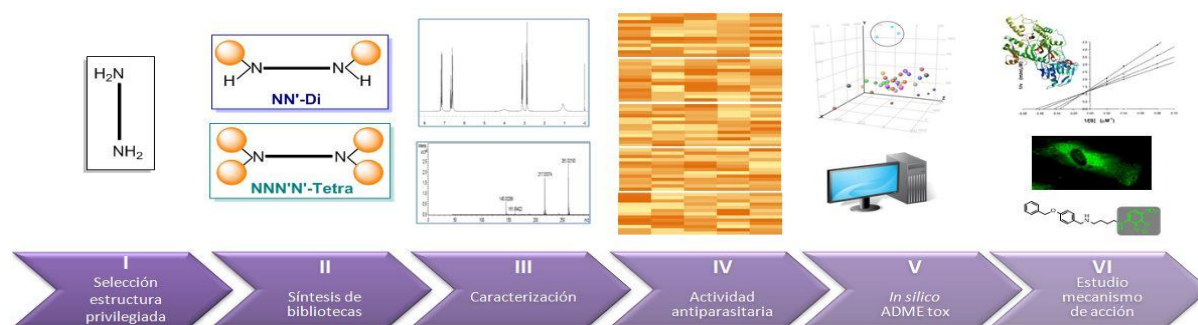


Otro concepto incorporado recientemente en la química medicinal es la existencia de "estructuras privilegiadas". Inicialmente fue definido por Evans al final de los años '80,<sup>89</sup> como "aquellos compuestos con la habilidad de poseer una estructura capaz de unirse a múltiples blancos". Este tipo de fragmentos moleculares constituyen bloques de construcción fundamentales que proveen de actividad a estructuras que las contienen.<sup>83</sup> Los productos naturales, poseen en sus estructuras porciones que son bloques de construcción incorporados

mediante una maquinaria biosintética que se ha perfeccionado a lo largo de la evolución. Sin embargo, más allá de su rol estructural, estas estructuras privilegiadas proveen de actividad a las moléculas que las contienen. Ejemplos claros de este tipo de estructuras son los cromanos, indoles, quinidinas, isoquinolonas, purinas, cumarinas, esteroides, etc. Existen incontables ejemplos de moléculas con amplio rango de actividades que contienen estas unidades estructurales. Es por eso que los esfuerzos de síntesis *de novo* de compuestos para el desarrollo de drogas, tiene en el uso de las estructuras privilegiadas un pilar fundamental.

Determinar las estructuras de todas las proteínas codificadas y expresadas por los genomas, resultan una labor que requiere del uso de herramientas como la cristalografía de Rayos X y la espectrometría de RMN, entre otras. Estos esfuerzos enmarcados dentro de la genómica estructural, permiten a posteriori determinar la función de las proteínas y las porciones de las mismas involucradas en su actividad. En los últimos años se comenzó a estudiar la factibilidad de usar pequeñas moléculas que permitan, no sólo identificar e inhibir las funciones de los enzimas y receptores. El alterar estas funciones mediante el uso de pequeñas moléculas, tanto que se inhiba o active una función de una proteína en particular, resulta un desafío tanto para la química como para la biología.<sup>90,91,92,88, 93</sup>

Otro aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de una estrategia tendiente a desarrollar nuevas drogas, es la factibilidad de su preparación mediante un esquema de síntesis adecuado. En efecto, la búsqueda de nuevas entidades química requiere de la preparación de colecciones de compuestos, para la cual es necesario un rápido acceso a los productos finales que van a ser ensayados. Es así, que es necesario plantear esquemas sintéticos de pocas etapas, que contengan reacciones robustas, no generen productos secundarios y sean de fácil purificación. En función de lo expresado hasta aquí es que diseñamos una estrategia general para abordar la búsqueda de nuevos líderes que conduzcan al desarrollo de nuevas drogas contra las enfermedades tropicales desatendidas. Según se muestra en la **FIGURA 26**, el esquema propuesto consta de 6 etapas.<sup>82,87,94,95, 96</sup>



**FIGURA 26.** Estrategia propuesta para el desarrollo de nuevos compuestos líderes.

La **Etapa I** consiste en la selección de una adecuada estructura privilegiada. Para ello es necesario encontrar moléculas con datos reportados de actividad biológica que posean porciones moleculares comunes, que incorporadas en las estructuras diseñadas generen compuestos con alta probabilidad de poseer la actividad buscada. Otro requisito a cumplir es que esta estructura pueda integrarse en la molécula objetivo mediante un esquema de síntesis de escasas etapas usando reacciones eficientes.

La **Etapa II**, comienza una vez que se ha seleccionado la estructura privilegiada. En primer lugar es necesario diseñar la estrategia de síntesis. Se debe considerar cuales serán los centros de introducción de diversidad, y como se explorara el espacio químico. La variabilidad entre los miembros de la biblioteca buscará cubrir un rango amplio de demanda estérica y electrónica lo que permitirá realizar completos estudios de relación estructura-actividad.

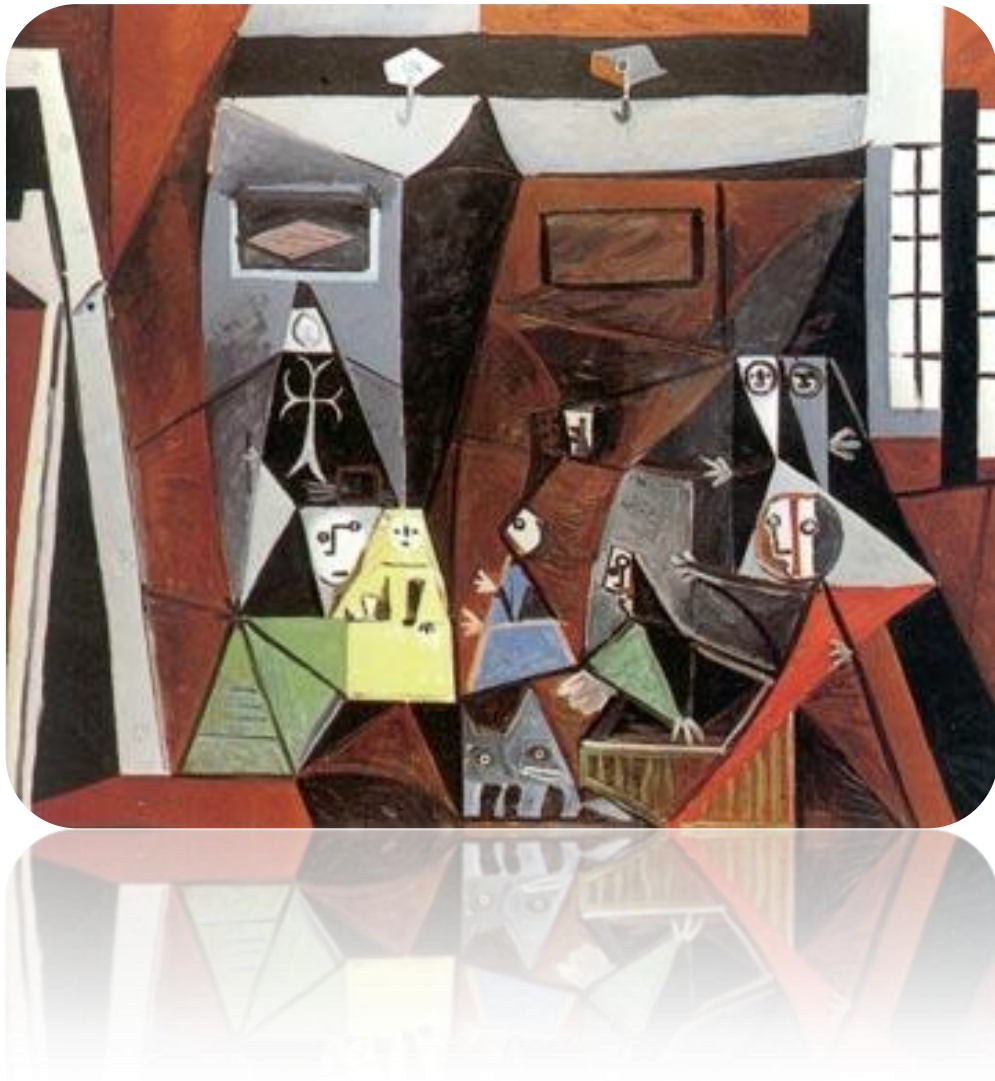
La **Etapa III**, si bien establecida como etapa siguiente a la II, su ejecución es necesaria para el progreso de la anterior. En efecto, a lo largo de la ejecución de la síntesis se comienza con la caracterización de los productos obtenidos mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa. Para el caso de bibliotecas de tamaños pequeño y mediano, es menester realizar la caracterización completa de los miembros de la colección. Para el caso de grandes colecciones, sólo se realiza la caracterización de una porción representativa de miembros seleccionados al azar por RMN, determinado la masa molecular de todos los productos. Finalmente, es necesario contar también con datos de pureza que garanticen la uniformidad de la muestra.

Dado que el objetivo del presente trabajo de tesis es la búsqueda de compuestos que sean activos contra los agentes etiológicos de distintas enfermedades, la **Etapa IV** consiste en la determinación de actividad antiparasitaria de las colecciones de compuestos preparados. Las familias de compuestos sintetizados serán ensayados contra los parásitos responsables de la malaria (*Plasmodium falciparum*), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*); leishmaniasis visceral (*Leishmania donovani*) y la tripanosomiasis americana (*Trypanosoma cruzi*) y la africana (*Trypanosoma brucei*). Dado los complejos ciclos de vida que presentan la mayoría de estos microorganismos, es necesario el ensayo de los mismos en su forma de vida libre (en los casos en que existe) y en la forma intracelular. Para que un compuesto pueda avanzar hacia etapas ulteriores de su estudio es necesaria una alta actividad en los estadíos intracelulares.

Cumplido la validación de actividad biológica, fin último de este trabajo, comienzan una serie de pasos que tiene por objeto el estudio del mecanismo de acción del compuesto y la predicción de sus propiedades físico-químicas con el objeto de posicionar el o los mejores candidatos como compuesto líder. En particular nuestra estrategia contempla dos etapas, la

primera es la **Etapa V** consistente en la determinación del perfil ADME-Tox (Administración, Dosificación, Metabolización, Excreción y Toxicidad) de las colecciones preparadas. El aprovechamiento de los métodos computacionales (*in silico*) ha permitido acelerar el proceso de desarrollo de drogas. Estos métodos recientemente han sido aplicados no sólo en las etapas iniciales de la búsqueda de estructuras activas, sino que han sido trasladados a la optimización de líderes. Estos desarrollos contribuyen a facilitar el acceso de compuestos a las etapas de ensayos clínicos evitando el progreso de candidatos que eventualmente fallarían debido a pobres perfiles físico-químicos. De este modo, usando distintos software y plataformas “on line”, determinaremos parámetros que permitan generar un ranking de los compuestos más activos con los mejores perfiles de propiedades.

Finalmente, abordaremos la **Etapa VI** que consiste en el estudio del mecanismo de acción de los productos más activos en cada parásito. Para ello, por un lado se buscará el o los posibles blancos moleculares determinando la actividad inhibitoria de enzimas críticas de rutas metabólicas seleccionadas convenientemente. Por otro lado, se buscará estudiar la incorporación y localización de los compuestos líderes utilizando microscopia, para lo cual se diseñarán y sintetizarán compuestos fluorescentes que poseen una alta similitud molecular con estos.



*Si no existe la organización, las ideas, después del primer momento de impulso, van perdiendo eficacia.*

#### ***4. DESARROLLO DE ETAPAS I A III.***

## 4 DESARROLLO DE ETAPAS I A III.

### 4.1 Etapa I- Selección de estructura privilegiada.



Teniendo en cuenta el importante rol que presentan las poliaminas en la bioquímica de los parásitos que son el blanco de este trabajo de tesis, en primer lugar se realizó una extensa búsqueda de compuestos con conocida actividad como disruptores este metabolismo. Se buscaron inhibidores diseñados para interactuar específicamente contra enzimas de esta vía metabólica incluyendo también los transportadores involucrados en su internalización. Adicionalmente, se buscaron compuestos que si bien no poseen un blanco molecular particular, presentan similitud con los metabolitos involucrados. En la **TABLA 2** se muestran compuestos que presentan actividad inhibitoria de enzimas de la biosíntesis de poliaminas y de otras involucrados en la formación de fosfolípidos,<sup>97,98,99</sup> tanto en *P. falciparum*, como en *L. donovani*. Como se puede observar, estos compuestos presentan gran diversidad habiendo derivados aromáticos, alifáticos, con distinto largo de cadena y presentado también distintos grupos funcionales. Lo que se sobresale como factor común en sus estructuras es la presencia de una porción con por lo menos 2 átomos de nitrógeno separados entre sí por una cadena con que presenta carbonos con hibridación  $sp^3$ .

Otra característica, de estas estructuras, es que contienen grupos aminos separados por cadenas alifáticas o poco voluminosas que proveen de libertad conformacional facilitando la interacción con sus receptores biológicos. Se conoce que en los sitios en donde se unen las poliaminas y/o sus precursores resultan amplios pero con escaso lugar para anclar los grupos amino.

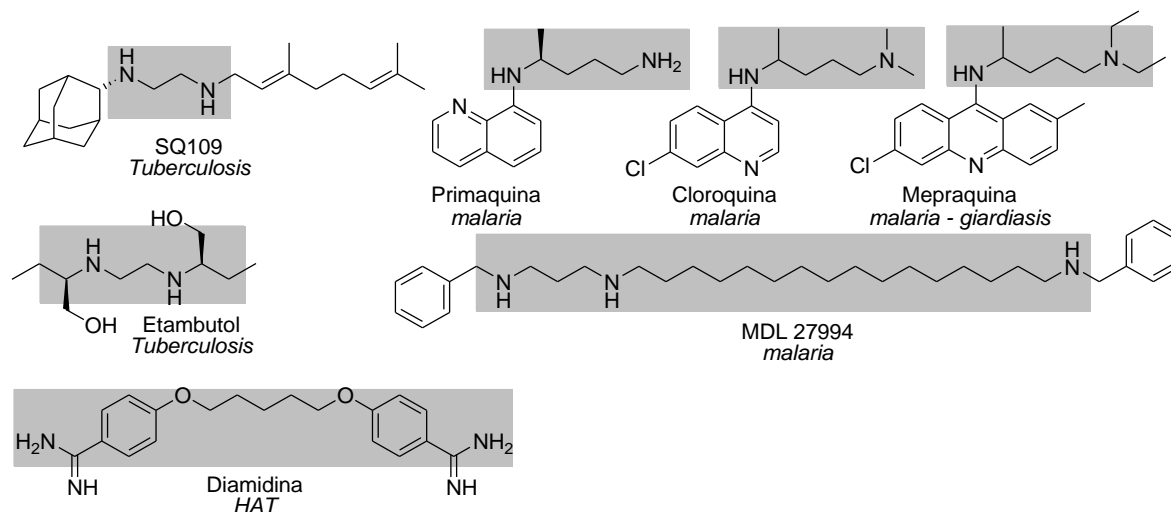
En cuanto a la caracterización de este último, diferentes compuestos con actividad antimalárica y leishmanicida preparados por distintos autores como se pueden observar en la **TABLA 2**, al incrementan el largo de la cadena carbonada aumenta la actividad. Esto ocurre no solo con poliaminas sino que se corrobora también para diaminas tetrasustituidas (**E20**).

**TABLA 2.** Poliaminas con actividad contra *Pf* o *Ld.* (p:promastigote):Actividad (IC<sub>50</sub>) promastigote *Ld.* (a): Actividad (IC<sub>50</sub>) amastigote 1<sup>(64,100,101,102)</sup>, 2<sup>(103,97)</sup>, 3<sup>(97,98,99)</sup>, 4<sup>(99)</sup>.

Designación	Estructura	Actividad IC <sub>50</sub> (μM)		Ref
		<i>L. donovani</i>	<i>P. falciparum</i>	
DFMO		30(p)	1250	1
APA		42(p), 5(a)	1	1
CGP40215A		18(p), >90(a)	1,8	1
4-MCHA		NA	1,4	1
MDL73811		40(p)	3	1
MDL27695		18	3	2
DAB		144(p)	-	
Bn3n12n3bn		40(p)	3	2
E20		NA	0,064	3
G23		NA	0,15	3
G24		NA	0,013	3
G22		NA	0,0011	3
G25		NA	0,00064	3
G19		NA	0,000003	3
2G25		NA	0,00065	4

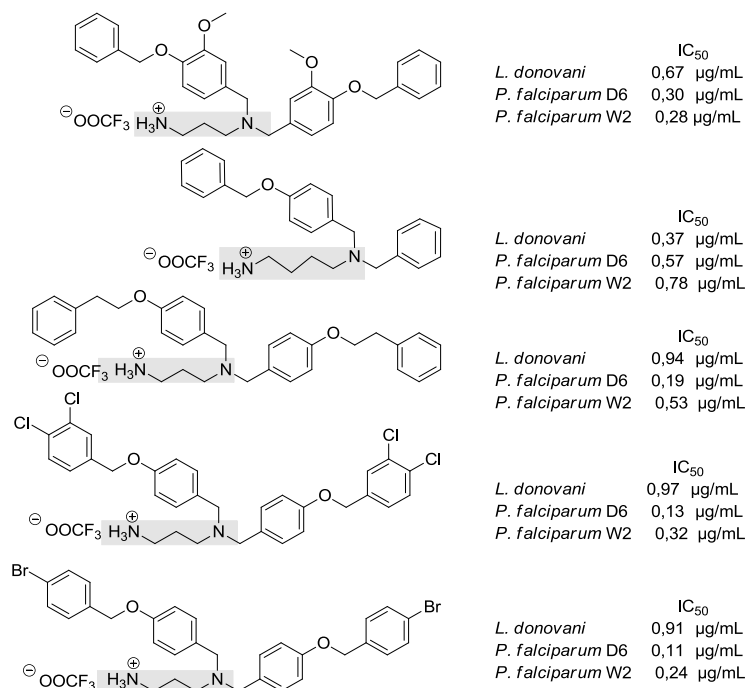
De esta comparación se desprende que para obtener actividad antimalárica, el largo de cadena entre sustituyentes, así como la carga presente sobre el o los grupos amino, resulta importante para su actividad. Este análisis nos llevó a buscar compuestos de conocida actividad, revisando incluso drogas utilizadas en el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas, que posean diaminas alifáticas en su estructura. Como resultado de esa búsqueda encontramos las moléculas presentadas en la **FIGURA 27**. Entre los compuestos seleccionados se encuentran moléculas con actividad antimalárica (cloroquina, mepacrina, primaquina y

MDL27994), tripanocida (diamidina, tripanosomiasis africana) e incluso antituberculosa (etambutol y SQ109). Es un hecho llamativo que muchos de los compuestos encontrados con esta unidad estructural sean activos contra los microorganismo responsables de variadas enfermedades desatendidas, siendo incluso drogas de uso.



**FIGURA 27.** Drogas que contienen diaminas alifáticas en su estructura.

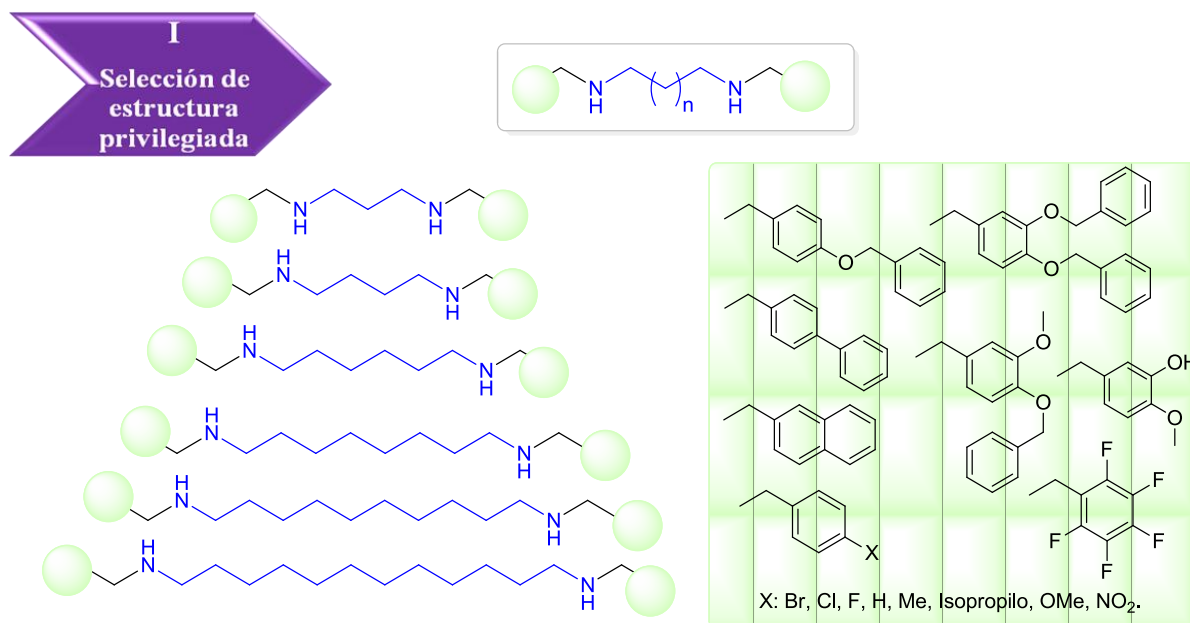
Como conclusión de este análisis es posible afirmar que las diaminas alifáticas constituyen un bloque de construcción ideal para preparar compuestos de gran diversidad estructural, teniendo a su vez características farmacofóricas, convirtiéndose de este modo en **estructuras privilegiadas**. Reportadas las colecciones de diaminas N, N disustituidas por Avery y otros,<sup>104</sup> que sirvieron de base estructural para los estudios posteriores realizados por la Lic Caminos A en nuestro laboratorio. Los compuestos desarrollados en ese trabajo presentan, junto con los realizados, por Bistonti y col,<sup>103, 32</sup> la particularidad de poseer anillos aromáticos sustituidos. Mientras que el trabajo de Avery incorpora éteres, metoxilos, e hidroxilos.<sup>104</sup> Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos generar bibliotecas de diaminas. Existen antecedentes en el uso de diaminas como estructuras privilegiadas en el desarrollo de nuevas entidades químicas variando el largo de cadena y los sustituyentes.



**FIGURA 28.** Poliaminas desarrolladas y evaluados contra *P. falciparum* y *L. donovani*.<sup>104</sup>

Para poder realizar de manera adecuada este estudio, se sintetizaran bibliotecas de de N, N'-disustituidos y N,N,N',N'-tetrasustituidas. para explorar porciones del espacio químico no estudiado hasta el momento.

En la **FIGURA 29** se muestran los puntos de modificación a partir de los que se buscará obtener un perfil estructura actividad. La selección de diaminas como estructura privilegiada, responde a que han sido poco estudiadas, dado que las aproximaciones reportadas procuraban aumentar el largo de cadena en conjunto con el número de nitrógenos. Nuestra aproximación permite aumentar el largo de cadena sin incorporar átomos de nitrógeno en el interior de la cadena, estrategia que ha empezado a ser investigad por otros grupos.<sup>105</sup> El estudio con compuestos con número creciente de grupos amino en la cadena, aporta grupos dadores y aceptores de puente Hidrogeno lo que aumenta la posibilidad de interacción con los blancos biológicos. En este caso la presencia de solo dos grupos aminos contribuye a disminuir la posibilidad de estas interacciones y por lo tanto acortar el número de interacciones.



**FIGURA 29.** Estructura base a partir de la cual se harán las bibliotecas a analizar.

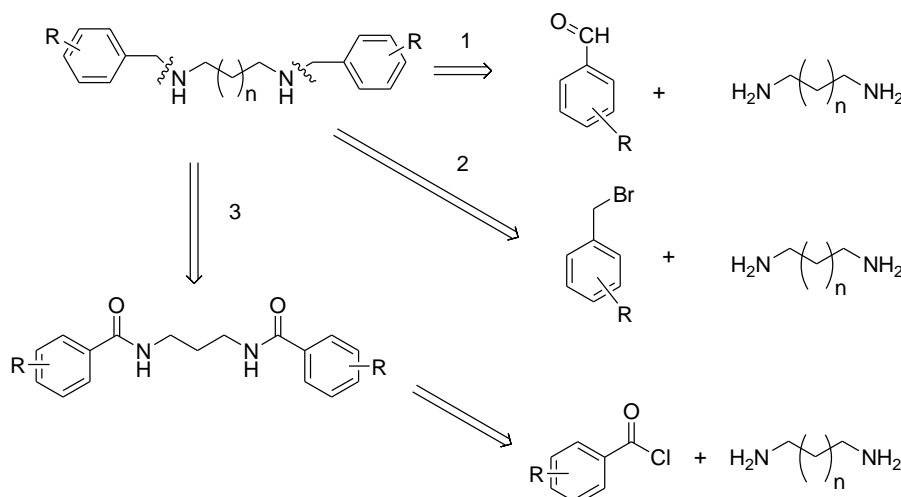
## 4.2 Etapa II

### 4.2.1 Síntesis de bibliotecas de N, N'-diaminas disustituidas.

**II**  
Síntesis de bibliotecas

La síntesis de diaminas disustituidas presenta distintas alternativas que han sido exploradas previamente por nuestro grupo con anterioridad.<sup>104,106</sup>

En el **ESQUEMA 3** se muestran distintos análisis retrosintéticos propuestos para preparar los derivados de diaminas.



**ESQUEMA 3.** Análisis retrosintético de obtención de aminas N,N'-disustituidas.

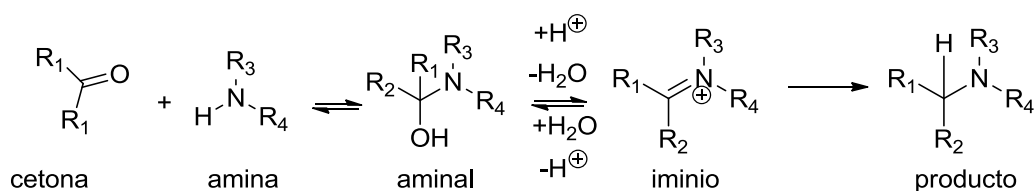
En la TABLA 3 se describen las ventajas y desventajas para cada una de los caminos representados en el ESQUEMA 3.

**TABLA 3.** Características de las reacciones. Ventajas y desventajas.

Condición/Reacción	Ventajas	Desventajas
1) Aminación Reductiva.	Reactivos accesibles, con posibilidad de realizarla en un solo paso (one-pot) permite formar una diimina con posterior reducción.	Necesidad de ajustar las condiciones de reducción en caso de hacerla en un único. Resulta de importancia la elección del reductor y de las características del solvente o mezcla de los mismos de manera de obtener una correcta dilución de los reactivos.
2) N-Alquilación.	Reactivos con cierta accesibilidad. Reacción de un solo paso, sin necesidad de reducción.	Formación de productos de polialquilación. Cierta toxicidad de los haluros de bencilos y accesibilidad comercial.
3) Formación diamida y reducción	Fácil formación y obtención de las diamidas a partir de cloruros de ácidos comerciales. No presenta formación de productos de polialquilación.	Requiere de pasos de reducción extras o del uso de $\text{LiAlH}_4$ , un reductor fuerte que puede alterar al producto de la reacción.

El análisis de la TABLA 3 nos permite concluir que la elección de la aminación reductiva es la mejor opción, debido a las dificultades asociadas a la preparación de los haluros de bencilo y debido a la versatilidad otorgada por los aldehídos (accesibles comercialmente) que permiten introducir diversidad a las bibliotecas.

La aminación reductiva es la reacción que ocurre cuando una amina primaria, secundaria reacciona con un aldehído o cetona, en presencia de un agente reductor. La reacción involucra un paso inicial de formación de un intermediario carbinol amina que se deshidrata para dar una imina. Las condiciones de la reacción en general son neutras o levemente ácidas. La subsecuente reducción mediante un agente reductor produce la amina alquilada como producto, **ESQUEMA 4**. A pesar de ello existen trabajos que proveen la evidencia de la reducción directa del carbinol a la amina.<sup>107</sup> Es importante el rol del agente reductor ya que debe ser selectivo hacia las iminas o el ion iminio, por sobre la reducción de las cetonas o aldehídos presentes en la mezcla de reacción.

**ESQUEMA 4.** La reacción de aminación reductiva.

En un primer paso, se produce la formación de la imina, siendo el paso en el que ocurre el equilibrio entre la hidroxiamina y el ion iminio o base de Schiff. En este paso es crítico, el control del pH y la presencia de agua en el medio de reacción, debido a que un desbalance de estos dos produce la modificación del equilibrio. Para este tipo de reacciones en donde se requiere el control de la cantidad de agua presente, el agregado de tamices moleculares, permite eliminar el agua, del medio de reacción. De esta manera se logra obtener una mejora

del rendimiento de la reacción al desplazar el equilibrio hacia la formación del ion iminio. El agregado de ácido acético en cantidades de 1 a 5 % también permite mejorar el rendimiento de la reacción. Los solventes más utilizados para este tipo de reacciones son el 1,2 dicloroetano, el tetrahidrofurano (THF) y el acetonitrilo anhidro, estando discutido el uso de metanol anhidro como cosolvente.<sup>108</sup>

El segundo paso de las aminaciones reductivas consiste en la reducción del intermediario imina o iminio. Esta reacción se realiza mediante dos metodologías. La primera es la hidrogenación catalítica utilizando platino, paladio o níquel, como catalizador, siendo la más utilizada a nivel industrial por ser efectiva y de bajo costo. Este tipo de reductores presenta el problema de la inespecificidad, ya que afecta a otros grupos susceptibles de ser reducidos. La segunda metodología involucra a los hidruros y estos son los elegidos cuando se trata de reacciones en baja escala y donde los grupos funcionales son diferentes.<sup>107, 109</sup> Inicialmente se probaron distintos hidruros disponibles variando condiciones de reacción (**TABLA 4**) y se observó que dependiendo del hidruro se obtenían distintas proporciones de producto coincidente con lo hallado en la literatura.<sup>107</sup> Los agentes deshidratantes, son necesarios para facilitar la formación de la imina para desplazar la reacción hacia los productos. Por otro lado, este desplazamiento es facilitado por la presencia del hidruro durante la formación de la imina.<sup>106</sup>

**TABLA 4.** Condiciones probadas en la optimización de las reacciones para obtener las bibliotecas.

Agente Reductor	Características	Condiciones	Resultados obtenidos
Borohidruro de Sodio (NaBH <sub>4</sub> )	Reductor no selectivo. No reduce esteres, amidas o ácidos carboxílicos o sales. Reduce aldehídos muy rápidamente	Dos pasos con evaporación de la mezcla inicial y posterior agregado del reductor.	Mayor rendimiento de la diamina disustituida. Rendimiento global de las reacciones entre (70-98)%
Triacetoxiborohidruro de sodio NaBH(OAc) <sub>3</sub>	Es más selectivo en la reducción de aldehídos respecto de cetonas y por sobre estos reduce primero los iminio	Un solo paso. pH ácido, 24 h agitación y reflujo.	Formación de diaminas disustituida y de la diamina tetrasustituida.

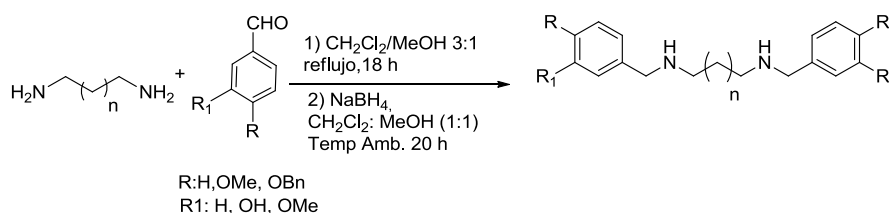
Muchas reacciones descritas en la literatura realizan la aminación reductiva en 1,2 dicloroetano, o THF anhidros para realizar la reacción. La necesidad de contar con un ambiente anhidro dependerá de la capacidad para desplazar la reacción hacia la base de Schiff, equilibrio que depende de la presencia de agua y protones. La elección del solvente requiere que ambos reactivos, en nuestro caso, la diamina y el aldehído sean solubles en el mismo. En cuanto a la utilización del agente reductor en reacciones con esqueletos similares se ha observado que es el Triacetoxiborohidruro de sodio, es el reactivo elegido.<sup>107</sup>

El hidruro utilizado no muestra diferencias significativas variando el solvente utilizado. A pesar de ello, trabajos de Abdel-Magid y otros,<sup>107</sup> demostraron que la formación de la imina ocurre más rápidamente en metanol, comparado con THF o 1,2 dicloroetano.

El Borohidruro de sodio ha sido reportado como agente reductor en las aminaciones reductivas en un solo paso (one pot) usando como solvente metanol anhidro o soluciones tampones acídicas como medio de reacción. A diferencia del cianoborohidruro de sodio, el borohidruro es menos toxico, no depende del medio ácido, pero en general requiere la formación completa de la imina. En cambio el triacetoxiborohidruro de sodio es un reductor más suave y selectivo debido a la estabilización que generan los grupos acetoxi sobre el protón unido al boro, sumado al hecho del efecto estérico que estos grupos generan alrededor del boro.<sup>110,108</sup>

Con resultados satisfactorios debido a mejor solubilidad de los reactivos, reemplazando con DCM el 1,2-dicloroetano mostro ser equivalente.

Por otro lado, se utilizó como solvente al Trimetilortoformiato (TMOF), solvente aprótico, utilizado cuando el aldehído presenta una demanda electrónica estabilizada y en química de fase sólida. Los rendimientos con este solvente resultaron en algunos casos inferiores a los obtenidos con DCM:MeOH. Si bien el TMOF actúa como solvente, es al mismo tiempo agente deshidratante también y puede reaccionar con el grupo amino, bajando de este modo el rendimiento de la reacción. El proceso de optimización nos lleva a un procedimiento general que necesita de dos pasos. Primero, se forma la imina en mezcla DCM:MeOH (3:1), seguidamente se cambia el solvente para una mezcla DCM:MeOH (1:1) y se agrega el borohidruro de Sodio ( NaBH<sub>4</sub>) **ESQUEMA 5**.



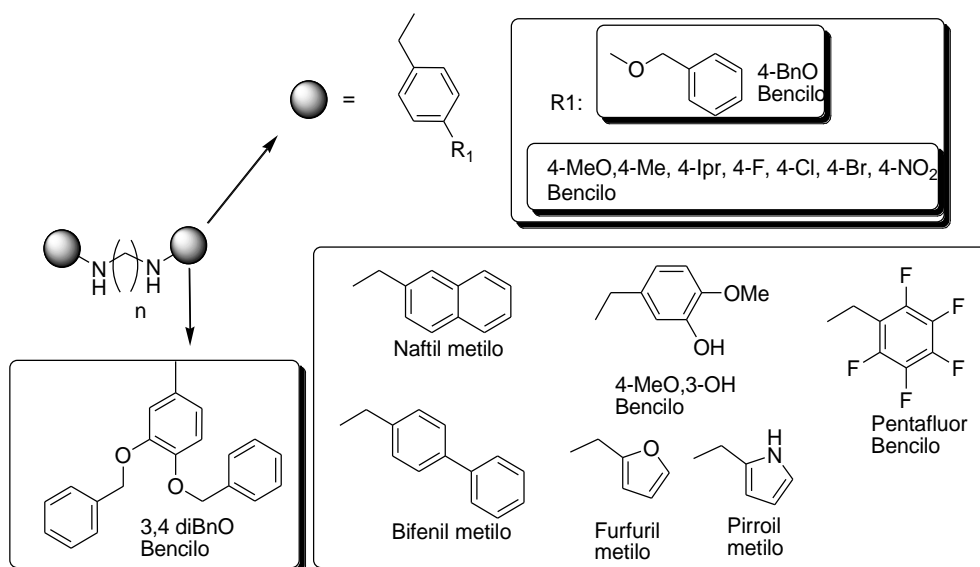
**ESQUEMA 5.** Aminación reductiva utilizada para la generación de las bibliotecas.

En la reacción, el aldehído que se encuentra en exceso es en general reducido al alcohol al mismo tiempo que se reduce la diimina.

Para promover la formación de la imina se han utilizado tamices moleculares que absorben las moléculas de agua, que fuerza la deshidratación del carbinol, con desplazamiento del equilibrio. En algunos casos se utilizaron tamices moleculares de 4 Å contribuyendo a mejorar el rendimiento.

En el paso 2 para el agregado del Borohidruro de sodio, se evapora el solvente inicial y se agrega mezcla diclorometano, metanol anhidros (1:1), obteniéndose la reducción completa de la diimina.

En la **TABLA 5** se muestran los rendimientos generales para toda la biblioteca En la **FIGURA 30** se resumen los distintos sustituyentes de la **TABLA 5**.



**FIGURA 30** . Resumen de las estructuras y abreviaturas usadas en la **tabla 5**.

**TABLA 5.** Diaminas preparadas en el curso de este trabajo de tesis. (Rend= % rendimiento), ID = número de identificación (ID), N,N,N',N'-tetrasustituidos sombreado en gris.

R	n	Rend.	ID
4-MeO Bencilo	3	67	1
	4	77	2
	6	86	3
	8	99	4
	10	60	5
	12	99	6
4-BnO Bencilo	3	78	7
	4	77	8
	6	30	9
	8	59	10
	10	66	11
	12	60	12
4-BnO, 3-MeO Bencilo	3	50	13
	4	84	14
	6	81	15
	8	88	16
	10	89	17
	12	99	18
4-MeO, 3-OH Bencilo	3	96	19
	4	80	20
	6	82	21
	8	-	22
	10	72	23
	12	46	24
Bencil	3	79	25
	4	73	26
	6	46	27
	8	94	28
	10	89	29
	12	99	30
4-Ipr Bencilo	3	44	31
	4	61	32
	6	33	33
	8	88	34
	10	86	35
	12	87	36
4-Me Bencilo	8	87	37
	10	93	38
	12	91	39

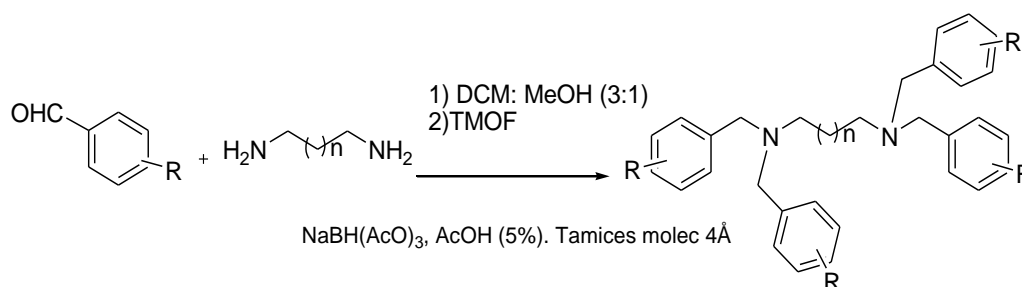
R	n	Rend.	ID
Pentafluor Bencilo	8	35	40
	10	10	41
	12	15	42
4-F Bencilo	8	73	43
	10	85	44
	12	88	45
4-Cl Bencilo	8	88	46
	10	75	47
	12	54	48
4-Br Bencilo	8	99	49
	10	99	50
	12	96	51
Naftil metilo	3	12	52
	4	16	53
	6	88	54
	8	91	55
	10	87	56
	12	79	57
Bifenil metilo	3	59	58
	4	76	59
	6	75	60
	8	51	61
	10	35	62
	12	36	63
3,4-diBnO Bencilo	3	10	64
	4	11	65
	6	11	66
	8	78	67
	10	57	68
	12	67	69
Furfuril metilo	3	54	70
	4	65	71
	6	63	72
	8	33	73
	10	78	74
	12	61	75

R	n	Rend.	ID
Pirroil Metilo	3	11	76
	4	15	77
	6	17	78
	8	16	79
	10	14	80
	12	6	81
4-NO <sub>2</sub> Bencilo	3	12	82
	4	64	83
	6	77	84
	8	90	85
	10	99	86
	12	60	87
Bencilo	3	27	88
	4	26	89
	6	17	90
	8	27	91
	10	28	92
4-MeO	3	30	93
	4	25	94
	6	10	95
	8	16	96
	10	28	97

#### 4.2.2 Síntesis de bibliotecas de diaminas N,N,N',N'-tetrasustituidas.

En estudios previos de nuestro grupo se sintetizaron con rendimientos que en general fueron bajos, una serie de diaminas tetrasustituidas valores de rendimientos bajos.

Con el objetivo de mejorar los rendimientos obtenidos, se ensayaron distintos solventes para analizar un ambiente libre de agua tal que la formación de la iminia fuese aún más eficiente. Para ello se probaron las reacciones de formación de la N,N,N',N'-tetrasustituida utilizando trimetilortoformiato (TMOF), en medio ácido (ácido acético 5%). Este solvente permite una mejor disolución de las diaminas y de los aldehídos en las condiciones de reacción.



**ESQUEMA 6.** Obtención de diaminas N, N, N',N'-tetrasustituidas.

Se obtuvieron diferentes rendimientos con la técnica descrita anteriormente (DCM:MeOH 3:1)) de la obtención de las diaminas, que fue mejorada con el uso del TMOF, aunque no de forma significativa. En la **TABLA 6** se muestran los resultados obtenidos de una reacción en one-pot y en paralelo.

En general las reacciones dieron un rendimiento promedio de 20% usando DCM:MeOH (3:1) como solventes y de 40% con TMOF, en ambos casos se usaron tamices moleculares de 4 Å. No se expandió el estudio, la accesibilidad al amino para la segunda aminación reductiva resulta significativamente impedida debido al efecto estérico. En este punto decidimos interrumpir la preparación de otros análogos debido al pobre perfil antiparasitario mostrado en estudios previos y a la dificultad de preparación.

**TABLA 6.** Síntesis de las diaminas N, N, N', N' tetrasustituidas.

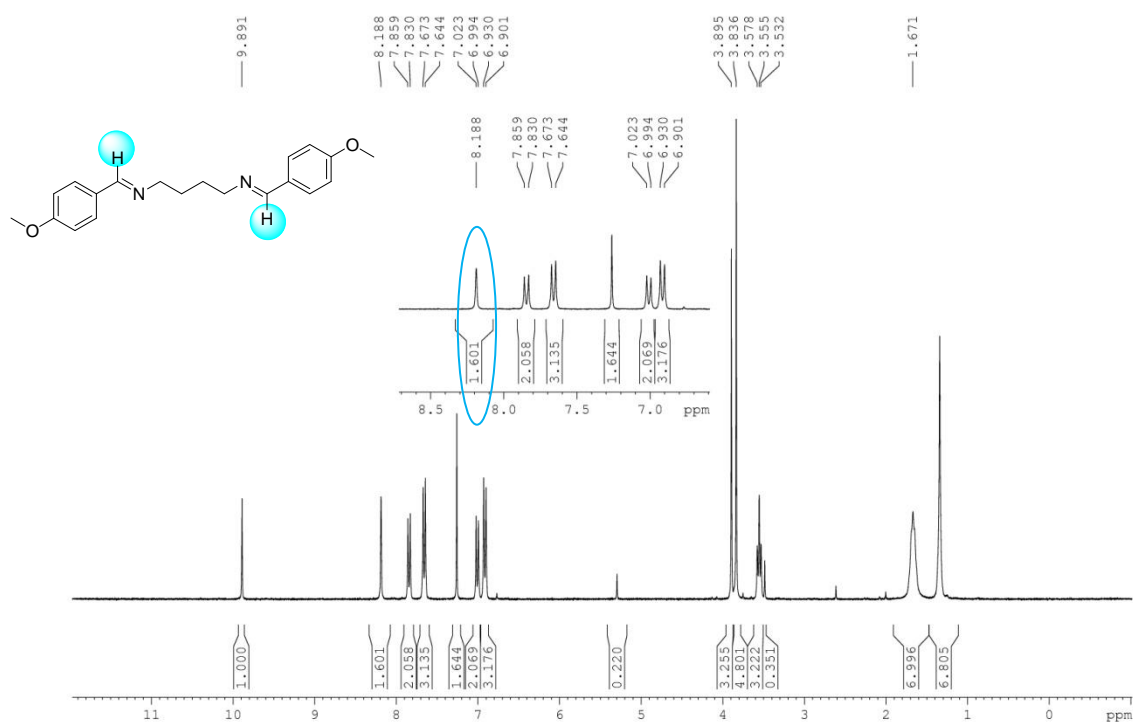
Rendimiento %				Rendimiento %			
n	R	DCM	TMOF	n	R	DCM	TMOF
3	H	17	39	3	OMe	75	
4	H	26	-	4	OMe	43	
6	H	17	-	6	OMe	10	38
8	H	27	40	8	OMe	16	
10	H	28	40	10	OMe	28	42

### 4.3 Etapa III.

#### 4.3.1 Caracterización de los productos preparados.

La caracterización de los compuestos se realizó principalmente mediante experimentos resonancia magnética nuclear de protones y de carbono 13 y espectrometría de masa.<sup>110</sup>

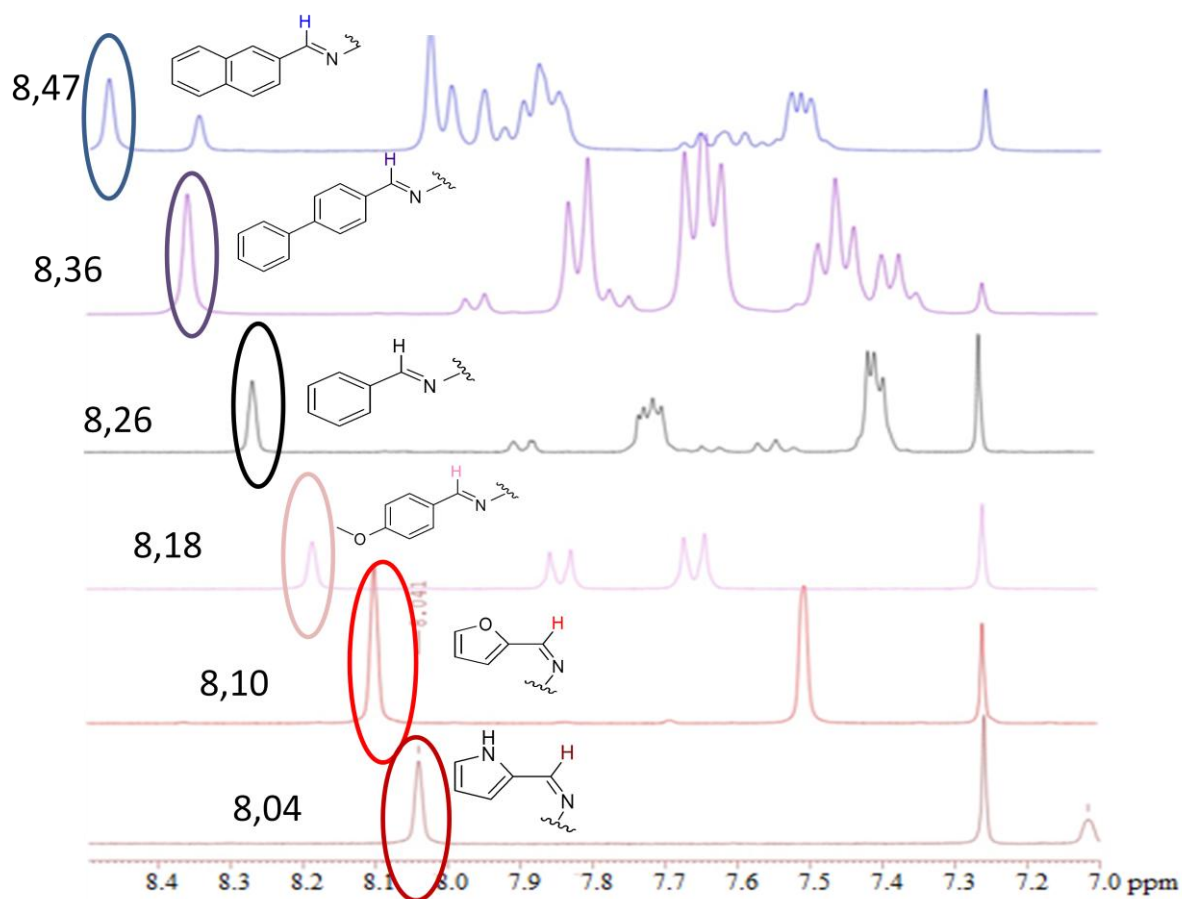
Durante el proceso de optimización de las reacciones para la obtención de las bibliotecas descripta previamente se comprobó se produjera la formación de las diiminas. Su presencia se demuestra por la aparición en su espectro de 1HRMN de un singlete asignable al protón unido al carbono de la imina (H-C=N) a 8,18 ppm que integra para dos protones y un triplete a 3,55 ppm que integra para cuatro protones que corresponden a los protones del metileno adyacente al nitrógeno. (FIGURA 31)



**FIGURA 31.** Espectro <sup>1</sup>H RMN de la formación de la diimina.

Durante el curso de la reacción analizada se observan las señales de la diamina sin reaccionar (triplete a 1,67 ppm) y la monoimina que se evidencia por la presencia de un triplete a 3,55 ppm asignable al metileno adyacente a la. Uno de los aspectos observados y que confirmaba la presencia de la imina es el protón de la misma a 8,18 ppm, para los derivados de fenilo. Esta señal, en general se desplaza hacia campos bajos cuando los sustituyentes son los anillos con heteroátomos o en aquellos que presentan funciones oxigenadas. En cambio se desplaza hacia campos altos cuando el sustituyente es bifenilo o naftilo. (FIGURA 32). Las moléculas

que poseen en su estructura bases de Schiff se han estudiado como agentes antibacterianos, en especial cuando esta base se halla próxima a un anillo. En nuestro caso estas fueron aisladas habiéndose caracterizado espectroscópicamente los intermediarios, únicamente para confirmar el curso de la reacción. Debido a que la actividad de las iminas depende de la densidad electrónica del sustituyente se abordarán en trabajos posteriores.<sup>111</sup>



**FIGURA 32.** Espectros de <sup>1</sup>HRMN que muestra la zona en donde se producen los desplazamientos del protón del iminio.

Debido a que estructuralmente estos compuestos solo difieren en el largo de la cadena carbonada, presentan espectros de <sup>1</sup>H RMN y de <sup>13</sup>C RMN similares. Se resumen en la **TABLA 7** las señales características de cada una de las familias preparadas.

**TABLA 7.** Resumen de las principales características de los  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN de la biblioteca. (CAC : Carbono aromático cuaternario; micd:metilenos internos de la cadena de la diamina)

Sustituyente	Señales características $^1\text{H}$ RMN ( $\delta$ )	Señales características $^{13}\text{C}$ RMN ( $\delta$ )
<b>Bencilo</b>	7.28-7,30 (m, 10 H, aromáticos); 3.78-3,82 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> ); 2,67-2.72 (t, 4 H, NCH <sub>2</sub> ); 1.49-1,52 (m, x H, C2-H y C7-H); 1,30 1-1.38 (s, y H, C3-H al C6-H).	140,3 (C, cac); 128,4 ; 128,2 y 126,9 (CH, cac) 54,0 (CH <sub>2</sub> , Ar-CH <sub>2</sub> ); 49,3 (CH <sub>2</sub> , N-CH <sub>2</sub> ); 29,9 -20,0 (micd).
<b>4-Benciloxi Bencilo</b>	7,42-7,38 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo);7,24- 7,23 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,93 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H ); 5,05 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -O); 3,72 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -N); 2,61 ( t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH <sub>2</sub> ); 1,51 (m, x H, C2-H y C5-H); 1,32 (m, y H, C3-H y C4-H).	157,9 ( C4'-O, cac); 137,1 (C1''-CH <sub>2</sub> - O, cac); 132,3 (C1', cac); 129,5 (CH, C3'' y C5'' ); 128,6 (CH, C2' y C6'); 127,9 (CH, C4''); 127,5 (CH, C2'' y C6''); 114,8 (CH, C3' y C5'); 70,0 (CH <sub>2</sub> , O-CH <sub>2</sub> ); 53,2 (CH <sub>2</sub> , Ar-CH <sub>2</sub> -N); 49,1 (CH <sub>2</sub> , N-CH <sub>2</sub> ); 29,7 -27,2 (micd).
<b>4-Benciloxi, 3-Metoxi Bencilo</b>	7,40-7,39 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 6,84-6,81 (m, 6 H, aromáticos ); 5,14-5,12 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -O); 3,89 (s, 6 H, O-CH <sub>3</sub> ); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -N); 2,64-2,61 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH <sub>2</sub> );1,56-1,46 (m, x H, C2-H y C7-H ); 1,37-1,29 (s, y H, C3-H al C6-H).	149,7 ( C5'-OMe, cac); 147,6 (C4'-O,cac); 137,3 (C1''-CH <sub>2</sub> -O, cac); 133,4 (C1'-CH <sub>2</sub> -N, cac); 128,5 (CH, C3'' y C5'' ), 127,8 (CH, C4''), 127,3 (CH, C2'' y C6''); 120,3 (CH, C2'), 114,0 (CH, C3'), 112,0 (CH, C6'); 71,1 (CH <sub>2</sub> , OCH <sub>3</sub> ); 56,0 (CH <sub>3</sub> , O-CH <sub>3</sub> ); 53,7 (CH <sub>2</sub> , Ar-CH <sub>2</sub> -N); 49,3 (CH <sub>2</sub> , N-CH <sub>2</sub> ); 29,8-26,0 (micd)
<b>4-Metoxilo</b>	7,26-7,21 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,86 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 3,79-3,78 (s, 6 H, O-CH <sub>3</sub> ); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> ); 2,59 (t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH <sub>2</sub> ); 1,48-1,40 (m, x H, C2-H y C5-H ); 1,33-1,26 (m, y H, C3-H y C4-H).	158,6 (C-OMe, cac); 132,5 (C, cac); 129,3 y 113,8 (CH, cac); 55,2 (CH <sub>3</sub> , O-CH <sub>3</sub> ); 53,4 (CH <sub>2</sub> , Ar-CH <sub>2</sub> ); 49,2 (CH <sub>2</sub> , N-CH <sub>2</sub> ); 29,9-21,0 (micd).
<b>3-Hidroxi, 4-Metoxilo</b>	7.28-7,30 (m, 10 H, aromáticos); 3.78-3,82 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> ); 2,67-2.72 (t, 4 H, NCH <sub>2</sub> ); 1.49-1,52 (m, x H, C2-H y C7-H); 1,30 1-1.38 (s, y H, C3-H al C6-H).	146,7 (C-OMe, cac); 146,7 (C-OH, cac); 134,1 (C, cac); 118,9, 115,8, 112,4 (CH, cac); 56,1 (CH <sub>3</sub> , O-CH <sub>3</sub> ); 53,1 (CH <sub>2</sub> , Ar-CH <sub>2</sub> ); 49,0 (CH <sub>2</sub> , N-CH <sub>2</sub> ); 29,9 - 27,4 (CH <sub>2</sub> ,micd).
<b>Bifenilo</b>	7,42-7,38 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo);7,24- 7,23 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,93 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H ); 5,05 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -O); 3,72 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -N); 2,61 ( t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH <sub>2</sub> ); 1,51 (m, x H, C2-H y C5-H); 1,32 (m, y H, C3-H y C4-H).	140,7 (C1' bifenilo, cac); 140,6 (C4 bifenilo, cac); 135,5 (C1 bifenilo, cac); 129,4; 128,8; 127,3 y 127,0 (CH, carbonos aromáticos bifenilos); 52,1 (BiFen-CH <sub>2</sub> -NH-); 48,0 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 28,9; 28,8; 28,2 y 26,8 (micd).

**TABLA 7 . Continuación(1).**

Sustituyente	Señales características <sup>1</sup> HRMN (δ)	Señales características <sup>13</sup> C RMN (δ)
<b>2-Naftilo</b>	7,40-7,39 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 6,84-6,81 (m, 6 H, aromáticos ); 5,14-5,12 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -O); 3,89 (s, 6 H, O-CH <sub>3</sub> ); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -N); 2,64-2,61 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH <sub>2</sub> ); 1,56-1,46 (m, x H, C2-H y C7-H ); 1,37-1,29 (s, y H, C3-H al C6-H).	136,3 (C2 naftol, cac); 133,4 y 132,7 (C5 y C10 naftol, cac); 128,2; 127,7; 127,7; 127,0; 126,6; 126,1 y 125,7 (CH, carbonos aromáticos naftoles); 53,4 (Naft-CH <sub>2</sub> -NH-); 48,7 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 29,2 - 27,0 (micd)
<b>3,4 di-benciloxi Bencilo</b>	7,26-7,21 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,86 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 3,79-3,78 (s, 6 H, O-CH <sub>3</sub> ); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> ); 2,59 (t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH <sub>2</sub> ); 1,48-1,40 (m, x H, C2-H y C5-H ); 1,33-1,26 (m, y H, C3-H y C4-H).	149,0 (ArC3, cac); 148,9 (ArC4, cac); 137,1 (Ar'C1, cac); 128,5; 127,8; 127,4; 127,2; 122,6; 116,1 y 114,7 (CH, carbonos aromáticos); 71,1 (ArC3-O-CH <sub>2</sub> -); 71,0 (ArC4-O-CH <sub>2</sub> -); 51,4 (Ar-CH <sub>2</sub> -NH-); 46,7 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 26,9; 26,3 y 23,7 (micd)
<b>4-Nitro bencilo</b>	7,28-7,30 (m, 10 H, aromáticos); 3,78-3,82 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> ); 2,67-2,72 (t, 4 H, NH-CH <sub>2</sub> ); 1,49-1,52 (m, x H, C2-H y C7-H); 1,30 1-1,38 (s, y H, C3-H al C6-H).	148,2 (C4 arilo, cac); 147,0 (C1 arilo, cac); 128,6 (CH, C2 y C6 arilo); 123,6 (CH, C3 y C5 arilo); 53,2 (Ar-CH <sub>2</sub> -NH-); 49,3 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -) y 27,8 (micd).
<b>4-Fluor Bencilo</b>	7,42-7,38 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 7,24- 7,23 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,93 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H ); 5,05 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -O); 3,72 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -N); 2,61 (t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH <sub>2</sub> ); 1,51 (m, x H, C2-H y C5-H); 1,32 (m, y H, C3-H y C4-H).	161,9 (d, J=244,6Hz, C4 arilo, cac); 135,8 (d, J=2,8Hz, C1 arilo, cac); 129,7 (d, J=8,2Hz, C2 y C6 arilo); 115,1 (d, J=21,2Hz, C3 y C5 arilo); 53,1 (Ar-CH <sub>2</sub> -NH-); 49,2 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 29,8; 29,5 y 27,3 (micd).
<b>4-Cloro Bencilo</b>	7,40-7,39 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 6,84-6,81 (m, 6 H, aromáticos ); 5,14-5,12 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -O); 3,89 (s, 6 H, O-CH <sub>3</sub> ); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -N); 2,64-2,61 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH <sub>2</sub> ); 1,56-1,46 (m, x H, C2-H y C7-H ); 1,37-1,29 (s, y H, C3-H al C6-H).	139,0 (C4 arilo, cac); 132,5 (C1 arilo, cac); 129,4 (CH, C2 y C6 arilo); 128,5 (CH, C3 y C5 arilo); 53,3 (ipAr-CH <sub>2</sub> -NH-); 49,4 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 30,0; 29,5 y 27,3 (micd).
<b>4-Bromo Bencilo</b>	7,26-7,21 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,86 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 3,79-3,78 (s, 6 H, O-CH <sub>3</sub> ); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> ); 2,59 (t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH <sub>2</sub> ); 1,48-1,40 (m, x H, C2-H y C5-H ); 1,33-1,26 (m, y H, C3-H y C4-H).	139,6 (C4 arilo, cac); 131,4 (CH, C2 y C6 arilo); 129,8 (CH, C3 y C5 arilo); 120,6 (C1 arilo, cac); 53,4 (Ar-CH <sub>2</sub> -NH-); 49,4 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 30,1; 29,6 y 27,3 (micd).
<b>4-Metilo</b>	7,20 (d, 4 H, J=8,0Hz, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,13 (d, 4 H, J=8,0Hz, ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -NH-); 2,61 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 2,34 (s, 6 H, Ar-CH <sub>3</sub> ); 1,50 (m, x H, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -) y 1,27 (m, y H, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ))	137,5 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 136,4 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,0 (CH, C2 y C6 arilo); 128,1 (CH, C3 y C5 arilo); 53,8 (Ar-CH <sub>2</sub> -NH-); 49,5 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 30,1; 29,6 y 27,4 (-NH-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ) y 21,1 (Ar-CH <sub>3</sub> ).
<b>4-Isopropilo</b>	= 7,25 (d, 4 H, J=7,7Hz, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,185 (d, 4 H, ArC3-H y ArC5-H, J=8,2Hz, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, ipAr-CH <sub>2</sub> -NH-); 2,90 (hept, 2 H, J=6,9Hz, Ar-CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ); 2,63 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 1,50 (m, 4 H, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 1,27 (m, x H, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -) y 1,25 (d, y H, J=6,9Hz, Ar-CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ).	147,5 (C4 arilo, cac); 137,9 (C1 arilo, cac); 128,1 (CH, C2 y C6 arilo); 126,4 (CH, C3 y C5 arilo); 53,9 (ipAr-CH <sub>2</sub> -NH-); 49,6 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 33,8 (Ar-CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ); 30,1; 29,6 y 27,4 (micd)

**TABLA 7 . continuación (2).**

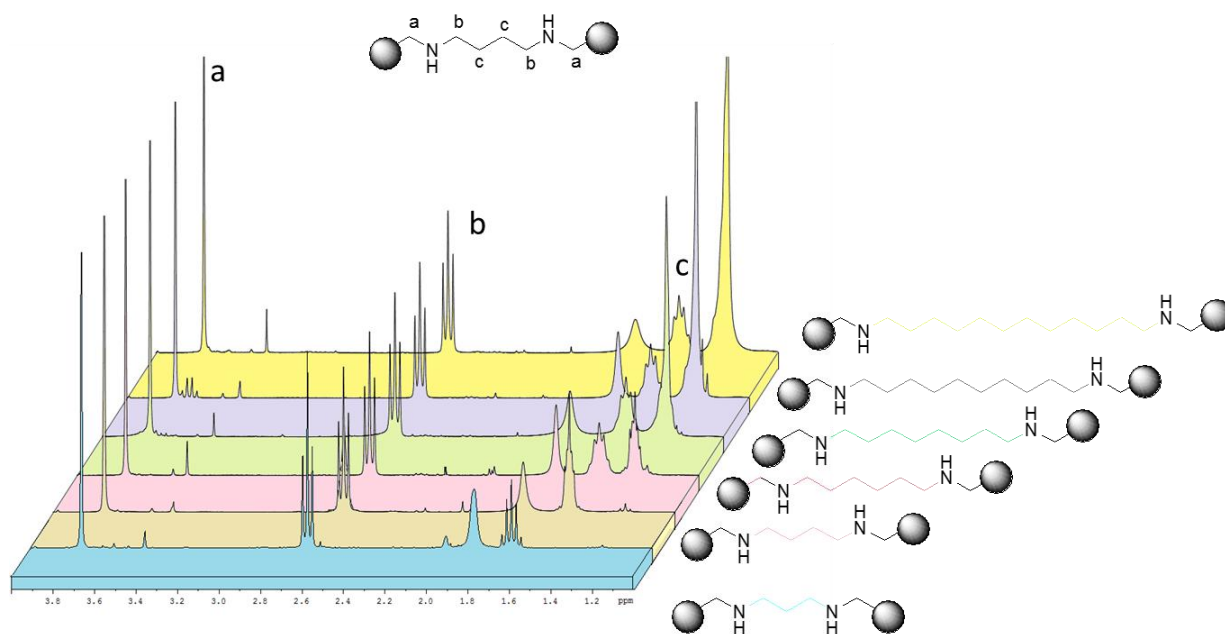
Sustituyente	Señales características <sup>1</sup> H-RMN (δ)	Señales características <sup>13</sup> C RMN (δ)
<b>Pentafluor bencil</b>	7,26 (m, 4 H, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 6,99 (m, 4 H, ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,74 (s, 4 H, Ar-CH <sub>2</sub> -NH-); 2,59 (t, 4 x, J=7,2 Hz, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 1,49 (m, 4 H, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -) y 1,26 (m, y H, de micd).	161,9 (d, J=244,4Hz, C4 arilo, cac); 136,2 (d, J=2,8Hz, C1 arilo, cac); 129,6 (d, J=7,9Hz, C2 y C6 arilo); 115,1 (d, J=20,9Hz, C3 y C5 arilo); 53,3 (Ar-CH <sub>2</sub> -NH-); 49,4 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 30,0-27,3 (micd).
<b>Pirroilo</b>	6,72 (m, 2H, C2-H Pirroilo); 6,12 (m, 2H, C3-H Pirroilo); 6,02 (m, 2H, C4-H Pirroilo); 3,78 (s, 4 H, Pirr-CH <sub>2</sub> -NH-); 2,61 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 1,50 (m, x H, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -) y 1,26 (m, y H, de micd).	126,6 (C5 Pirroilo, carbono cuaternario); 117,5 (CH, C2 Pirroilo); 107,9 (CH, C3 Pirroilo); 106,6 (CH, C4 Pirroilo); 49,1 (Fur-CH <sub>2</sub> -NH-); 46,4 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 30,0 - 27,1 (micd)
<b>Furfurilo</b>	7,34 (m, 2H, C5-H furanilo); 6,30 (m, 2H, C4-H furanilo); 6,16 (m, 2H, C3-H furanilo); 3,76 (s, 4 H, Fur-CH <sub>2</sub> -NH-); 2,59 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 1,47 (m, x H, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -) y 1,28 (m, y H, de micd).	154,1 (C2 furanilo, carbono cuaternario); 141,7 (CH, C5 furanilo); 110,1 (CH, C4 furanilo); 106,7 (CH, C3 furanilo); 49,2 (Fur-CH <sub>2</sub> -NH-); 46,2 (-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -); 29,9 - 27,2 (micd).

Abreviaturas: x: corresponde a 4H correspondientes a los NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- estos en cadenas de n>10 suelen estar compartidos con y; y: corresponden a NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-; cac: carbono aromático cuaternario; micd: metilenos internos de la cadena de diamina.

En la mayoría de ellos se pueden distinguir señales características indicativas de formación de los productos, en primer lugar del metileno del grupo bencilo que aparece como un singlete alrededor de 3,80 ppm y un triplete a 2,66 ppm correspondiente al metileno adyacente a los nitrógenos. Se observan además, señales para los metilenos alifáticos entre de 2,71 ppm y 1,25 ppm, habiéndose comprobado que la asignación de todas las señales son coincidentes con los oportunamente reportados por otros autores para compuestos similares. En el espectro de <sup>13</sup>CRMN se pueden observar las señales de carbonos de los metilenos de los grupos bencilos y al metileno adyacente al N a desplazamientos de 53,6 ppm y 48,7 ppm respectivamente, como señales características. Se realizaron además los espectros de IR.

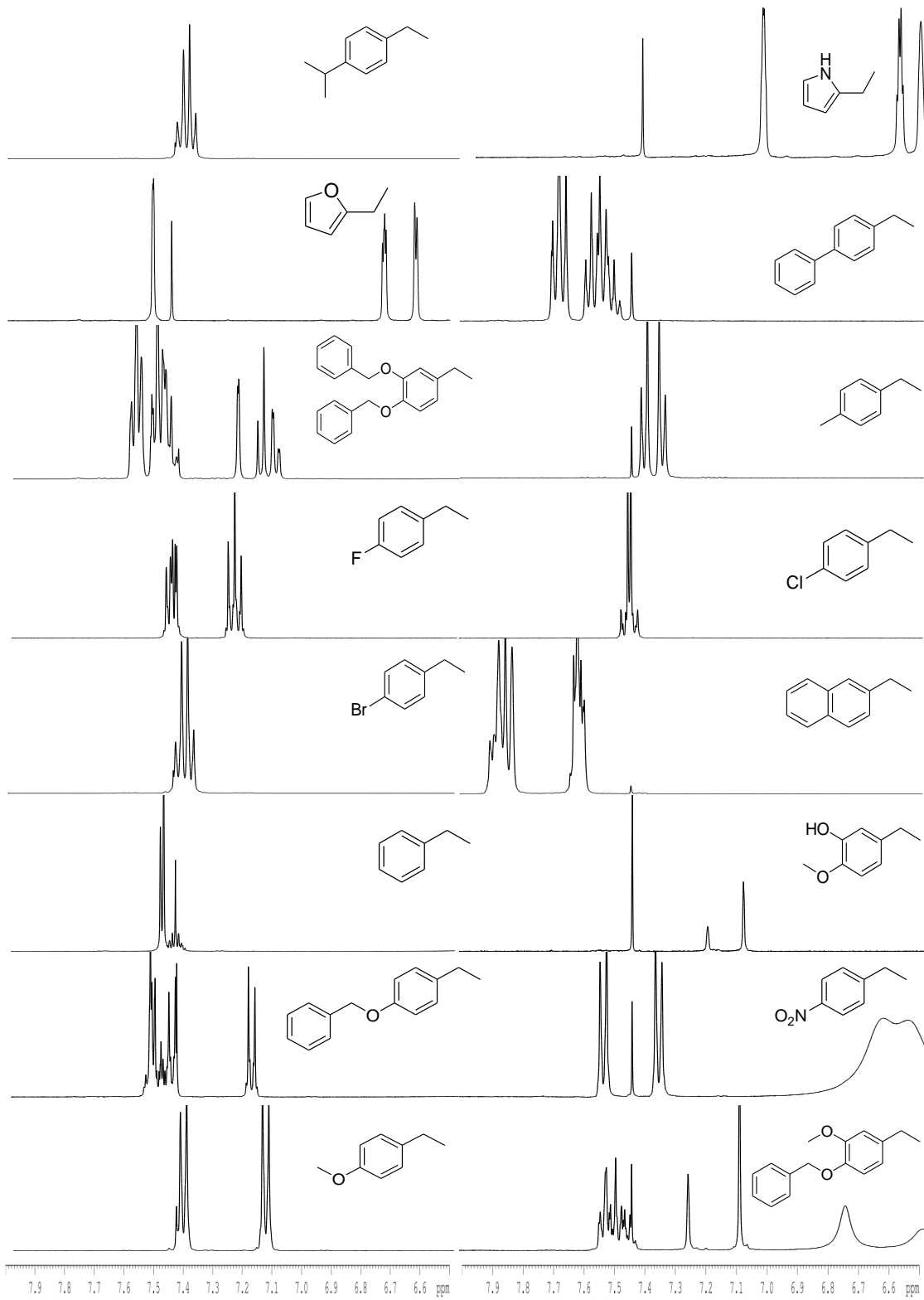
En la **TABLA 7** podemos observar un resumen de los aspectos generales de las señales de espectros de <sup>1</sup>HRMN y <sup>13</sup>CRMN de los compuestos. Otra forma de observar las similitudes y diferencias que se presentan en los espectros de cada familia, resulta en contemplar como cambia la señal en la de los metilenos internos a medida que el largo de cadena se incrementa (**FIGURA 33**). El singlete correspondiente al metileno entre el anillo bencilico y el amino, no se encuentra alterado y en general para toda la biblioteca se encuentra sobre el mismo rango de desplazamiento químico (δ = 3,78–3,76 ppm). El triplete a un desplazamiento entre δ= 2,65 y 2,60 ppm corresponde a los metilenos entre el amino y la cadena interior de la

diamina.



**FIGURA 33** . Espectros en la zona entre 4,00 y 1,00 ppm de una colección de análogos.

En la **FIGURA 33**, se pueden apreciar la zona del espectro que va de 6,00 ppm a 9,00 ppm que en donde se pueden observar los desplazamientos correspondientes a los protones unidos al anillo aromático. Por otro lado los espectros de IR también presentan a lo largo de las familias que componen esta biblioteca similitudes, solo cambiando de forma relativa en la región dactilar del espectro, y en algunas señales particulares. Las señales características encontradas con mayor o menor intensidad son las:  $\nu = 3392(\text{R-NH-R1})$ ; 1253 y 1033 (Ar-O-C); 1177 (C-N-C); 818 (aromático disustituido) $\text{cm}^{-1}$ .



**FIGURA 34.** Espectros de <sup>1</sup>H RMN (escala no se muestra corresponde a δ =6,5–8,0 ppm)



*“Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.”*

## **5. DESARROLLO DE ETAPAS IV A VI.**

## 5 DESARROLLO DE ETAPAS IV A VI

### 5.1 Breve reseña de aproximaciones al descubrimiento de drogas.

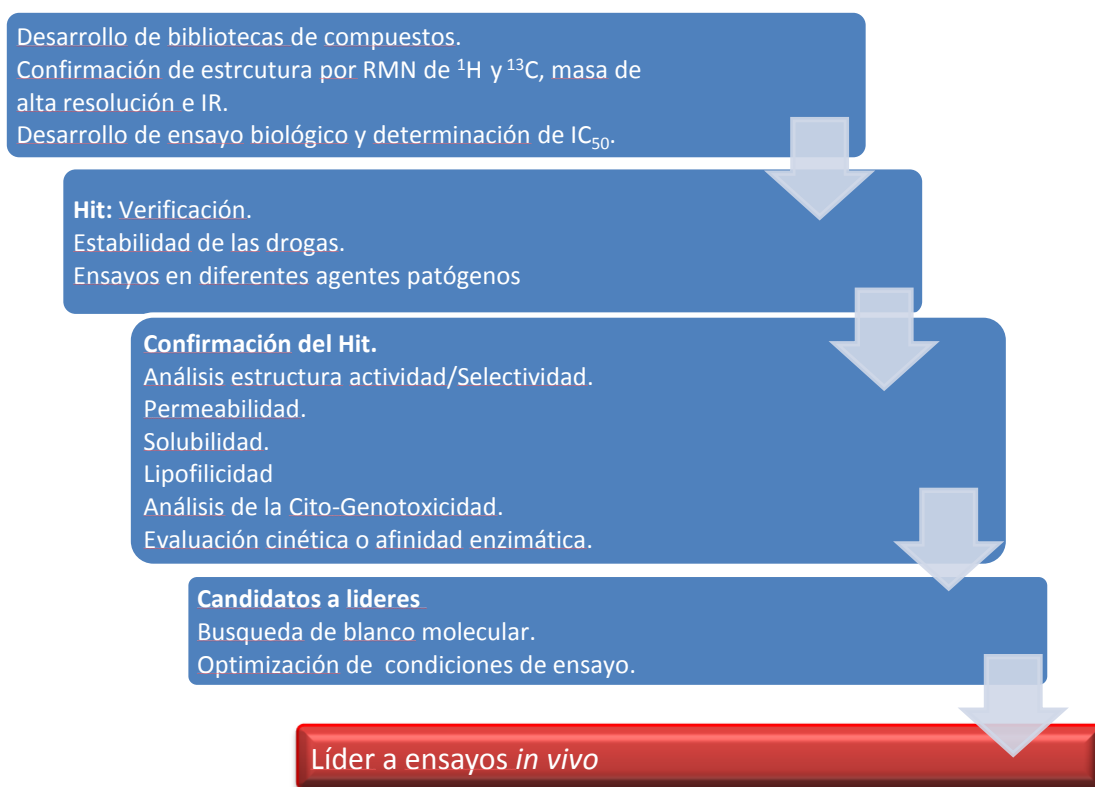
La química medicinal es por naturaleza una ciencia interdisciplinaria en donde el conocimiento de la química orgánica, resulta necesario para poder comprender los mecanismos por los cuales las reacciones e interacciones ocurren en la naturaleza.

El desarrollo de compuestos líderes requiere el conocimiento del blanco biológico y de una tecnología adecuada para su evaluación.<sup>84, 85</sup>

Durante ese trayecto los compuestos líderes, sufren modificaciones tendientes a mejorar su especificidad hacia el blanco molecular y al mismo tiempo optimizar su farmacocinética y farmacodinamia. Un claro entendimiento de las características químicas y físicas de las moléculas y como ellas afectan la actividad de los compuestos, acorta los tiempos y permite alcanzar el objetivo (**FIGURA 35**).

Una de las maneras de estudiar las moléculas y sus interacciones con los blancos biológicos, son los estudios de la Relación estructura–actividad (del inglés SAR). Los métodos para correlacionar cuantitativamente características estructurales con la actividad biológica fueron introducidos por Hansch y Fujita.<sup>112 113</sup> Este método asigna parámetros a los grupos químicos, de forma tal que al optimizar el modelo matemático descriptivo que relaciona la actividad biológica y una serie de descriptores o parámetros. De este modo, una modificación en la estructura química puede ser valorada en el cambio de la actividad del fármaco.

Las hipótesis de partida para relacionar las estructuras con las propiedades químicas y físicas pueden realizarse a través de un análisis cualitativo (SAR) o un análisis cuantitativo que puede ser en dos (2D-QSAR) o tres dimensiones (3D-QSAR). La finalidad del QSAR es construir un modelo que permita predecir actividad de un compuesto, su selectividad, y sus propiedades farmacocinéticas (ADME) y sus niveles de toxicidad. Todo esto depende de la manera en que las relaciones y los datos utilizados sean formulados.<sup>113</sup>



**FIGURA 35.** Organigrama para el desarrollo de drogas.

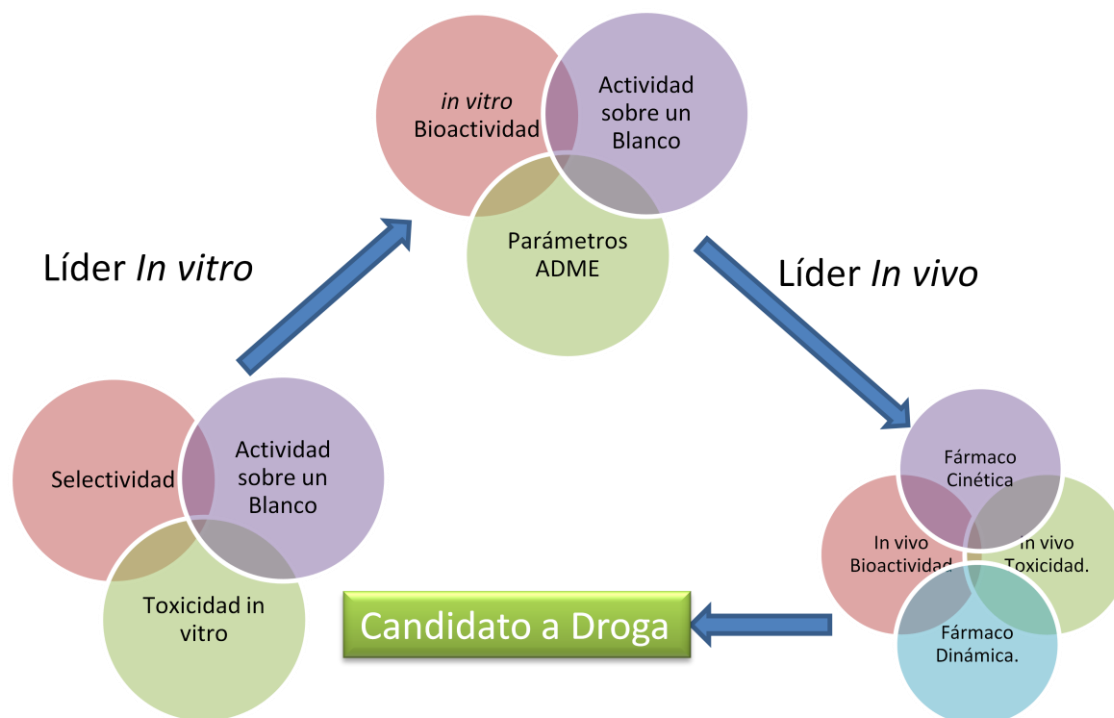
El uso de regresión lineal múltiple, los métodos de reconocimiento de tendencias como lo son las proyecciones parciales de cuadrados mínimos o el análisis de componentes principales, son las herramientas que permiten optimizar las funciones que relacionan la actividad biológica con los parámetros elegidos.

El éxito del modelo depende de la precisión de los datos iniciales, los descriptores y las herramientas estadísticas utilizadas y lo más importante su validación.<sup>114,115</sup>

Durante el desarrollo de compuestos líderes las moléculas candidatas pueden clasificarse dentro de dos grandes grupos: aquellas específicas y las no específicas. Las primeras, actúan en blancos moleculares, por ejemplo un transportador o una enzima, siendo sus actividades y potencias susceptibles a pequeños cambios en la estructura. En este caso se suele cumplir que poseerán actividades hacia los mismos blancos moleculares con similares valores de inhibición.<sup>116, 117</sup> En cambio, los compuestos no específicos no tienen un sitio de acción conocido y poseen en general baja potencia. Estructuras variadas poseerá similares actividades.<sup>118</sup> Debido a que en el presente trabajo de tesis partiremos de una estructura privilegiada que presenta cierta similitud con metabolitos presentes en los parásitos, nos posiciona en la segunda categoría.

En la actualidad, la química medicinal se nutre de muchas herramientas que permiten partir

desde distintas hipótesis y plataformas para desarrollar un fármaco. Todas ellas presentan caminos en donde necesariamente la química orgánica de síntesis y su entendimiento tienen vital importancia. A pesar de ello los experimentos sobre los organismos o blancos, requieren de interpretación y de conocimiento acerca de la biología involucrada. En la **FIGURA 36** se representa un camino de optimización de líderes para obtener un candidato a droga.



**FIGURA 36.** Optimización multiparamétrica de líderes comenzando desde un *in vitro* pasando a través de un compuesto químico optimizado.<sup>119</sup>

En el proceso se puede observar que en las distintas fases parámetros como la citotoxicidad, la alta actividad contra en blanco y contra el parásito juegan un rol importante en la elección del candidato. Este proceso tiene además en cuenta la farmacodinamia y farmacocinética del compuesto, que comienza a tener importancia a medida que nos aproximamos a la elección de los candidatos adecuados para las pruebas *in vivo*.<sup>119</sup>

En este punto es donde la quimiometría juega un rol importante permitiendo obtener de manera sencilla distintos parámetros que nos ayudan a seleccionar los mejores candidatos.

La quimiometría fue definida como “la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos.”<sup>120</sup>

La quimiometría aplicada intenta solucionar problemas tanto descriptivos como predictivos. En cuanto al uso descriptivo, las propiedades de sistemas químicos son modeladas con la

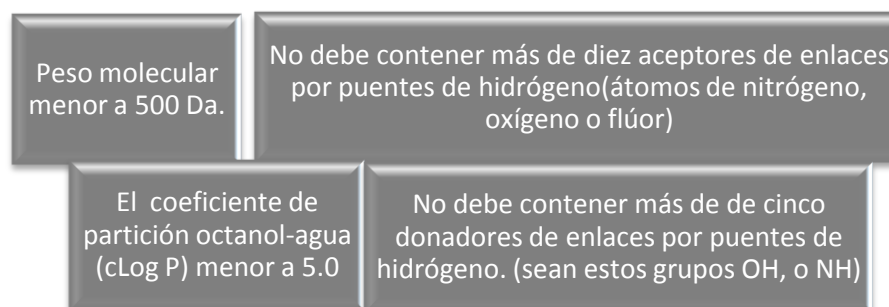
intención de aprender las relaciones subyacentes y la estructura del sistema (p. ej., el modelado y la parametrización de compuestos que son utilizados para realizar estudios de QSAR. En usos predictivos, las propiedades de sistemas químicos son modeladas con la intención de predecir nuevas propiedades o comportamiento de interés. En ambos casos, el número de datos puede llegar a ser pequeño y provenir de complicados algoritmos que dependen de múltiples variables que sin la herramienta de cálculo adecuada sería imposible llevar a cabo este tipo de empresas. Es por ello, que la quimiometría requiere de la informática para poder procesar rápidamente esta información permitiendo un rápido acceso a modelos que sean útiles en la selección y optimización de candidatos.

Estas aproximaciones resultan de importancia en la búsqueda de nuevas moléculas que permitan combatir enfermedades y resulta una estrategia económica ya que reduce las chances de fracaso en las etapas subsiguientes de desarrollo de un hit.<sup>120</sup>

### 5.1.1 Definición de lo descriptores fisicoquímicos utilizados.

El estudio de las relaciones estructura actividad cualitativamente se realiza analizando las propiedades fisicoquímicas y descriptores que permiten definir las cualidades de las moléculas. Los parámetros incluidos en estas reglas y otros que son de utilidad en la predicción del comportamiento farmacocinético y dinámico de los candidatos

Las reglas de Lipinsky son parámetros empíricos que permite evaluar cualitativamente que tan adecuado podría resultar un candidato a droga con una determinada actividad biológica o farmacológica. Estos parámetros son uno de los filtros de “druglikeness” (cuan similar es a una droga a otra ya conocida) más conocidos y aceptados para drogas de administración oral. Estas reglas describen las propiedades moleculares que tienen importancia farmacocinética en el cuerpo humano, incluyendo la absorción, distribución, metabolismo y excreción, aunque no predice si un compuesto será o no farmacológicamente activo. En general, una droga activa de administración oral no debe violar más de una de las reglas (ver **FIGURA 37**)



### FIGURA 37. Reglas de Lipinsky.-

En este contexto abordaremos la utilización de diversos programas y plataformas disponibles en internet para calcular estas propiedades. Los programas utilizados fueron:

1. **Molinspiration Cheminformatics.** (<http://www.molinspiration.com>)
2. **ChemDoodle.** (<http://www.chemdoodle.com>)
3. **OSIRIS Property Explorer.** (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>)
4. **Marvin.** (<http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch>)
5. **COSMOQuick** (<http://www.cosmologic.de>)

Los siguientes son los parámetros fueron establecidos por los programas antes mencionados. OSIRIS, posee además un simulador de riesgos de toxicidad. Las alarmas de riesgo de toxicidad son un indicador desarrollado a partir de las porciones de las moléculas, por lo que, en ningún caso quieren decir que sean una predicción de toxicidad totalmente confiable. Aún así, no deberían ser descartadas hasta el análisis *in vivo* correspondiente. Estos datos juntos con los obtenidos respecto a un conjunto de análisis QSAR, contra diferentes enzimas o inhibidores *in silico* que se obtiene mediante simulación en el sitio [www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com), se encuentran en el **Apendice 3** y forman parte de los datos analizados en esta tesis.

A continuación se definen los parámetros calculados y usados en este trabajo:

**Peso molecular (PM)** determinado por cálculo y mediante espectrometría de masa.

**Número de átomos donores y aceptores de Protones.**

**LogP:** (cLogP, miLogP): calculado por dos metodologías de cálculo distintas que presentaron un alto grado de correlación. Es el índice de polaridad de la molécula y describe la hidrofobicidad del compuesto y por lo tanto su capacidad de atravesar membranas lipídicas/ se relaciona directamente con la energía de solvatación de los compuestos. **miLogP** es considerado un estándar en la predicción del LogP. Los cálculos con Molinspiration han mostrado buenas correlaciones con los valores de LogP obtenidos de manera experimental sobre la base de 12202 moléculas ( $r^2 = 0.944$ ,  $r = 0.972$ , desviación estándar = 0.428).<sup>121</sup>

**LogD:**(logP medido o calculado a pH=7.40)

**LogBB :** se cálculo mediante el programa COSMOquick v.1.2. Se comparan los valores de miLog y, PM. Obtenidos con otros programas para verificar los cálculos. Éste es definido como el logaritmo de la concentración de un compuesto en el cerebro sobre la concentración plasmática, medida en equilibrio. Experimentalmente es obtenido en ratas. El cálculo depende

de valores de LogP y TPSA como descriptores principales. El modulo del programa COSMO quick utiliza la ecuación <sup>122, 123, 124, 125</sup>:

$$\log BB = 0.0046(\pm 0.0006)M_0 - 0.0173(\pm 0.0012)M_2 - 0.0027(\pm 0.0021)M_3 + 0.1878(\pm 0.1048)$$

Siendo M<sub>0</sub>: logP, M<sub>2</sub>: PSA y M<sub>3</sub>: descriptor  $\sigma$ .

Se considera que los valores menores a -1 son para compuestos con baja permeabilidad y los mayores a 0,3 con difusión libre.

**Área de superficie polar (Å<sup>2</sup>)** (PSA, del inglés: Polar Surface Area): este parámetro correlaciona fuertemente con la absorción en el intestino, el ensayo de permeabilidad con monocapas caco-2 y otros (es la suma de las áreas de Van der Waals de los átomos polares). En nuestro estudio es importante ya que nos permite estimar si un compuesto podrá atravesar la barrera hematoencefálica, que para algunas enfermedades parasitarias es de vital importancia que esto suceda. <sup>126</sup>

**Volumen (Å<sup>3</sup>)**: calculado a partir de programas de libre acceso en internet (www.molinspiration.com) y mediante el sistema de cálculo del programa MarvinSketch. Se verificó la correlación entre los cálculos de ambos programas.

**Superficie de Van der Waals**: su cálculo se realizó en la plataforma MarvinSketch. Tiene importancia por las interacciones que puedan ocurrir en sitios activos especialmente en los bolsillos lipofílicos. Se relaciona con los valores de LogP y LogBB.

**Energía de Dreiding**: es el cálculo de la energía de la conformación de una estructura en 3D, mediante el uso de un campo de fuerza simple definido como Dreiding. Este es un campo de fuerza genérico, que encontramos útil para predecir la dinámica de las estructuras orgánicas. En su definición la Energía de dreiding utiliza constantes de fuerza y parámetros de geometría basados en consideraciones de hibridación simples en vez de campos de fuerzas individuales constantes y los parámetros geométricos que dependen de la combinación particular de átomos en los enlaces, el ángulo, o términos de torsión. Así todas las distancias de enlaces son sacadas de radios atómicos, y hay sólo una fuerza constante para cada uno de los enlaces, ángulos, e inversiones y sólo seis valores diferentes para barreras torsionales (Marvin).

**Energía MMFF94**: energía de la molécula relacionada con su estructura 3D usando el campo de fuerza (MMFF94).(Marvin).

**Druglikeness(dgl)**: Existen diferentes aproximaciones para determinar el “parecido a drogas”, algunos basados en otros en el cLogP y pesos moleculares. La aproximación utilizada por Osiris se basa en 5300 subestructuras diferentes y estas son asociadas a una puntuación de parecido a drogas determinados. De este modo el puntaje final de la molécula

en estudio es calculado a partir de la sumatoria de los valores de los distintos fragmentos presentes en la molécula. (Osiris)  $d = \frac{\sum v_i}{\sqrt{n}}$

Donde  $v_i$  es el valor del puntaje del fragmento presente en la molécula y  $n$  es el número de fragmentos presentes en la misma.

### **Puntaje como droga (Drug Score-ds-)**

Este término combina los datos de similitud a drogas (druglikeness), cLogP, logS, peso molecular y la toxicidad, en un valor que permite obtener un ranking en base a sus propiedades globales como droga a calificar. Se realiza mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$ds = \prod \left( \frac{1}{2} + \frac{1}{2} s_i \right) \cdot \prod t_i$$
$$s = \frac{1}{1 + e^{ap+b}}$$

$ds$ : es el puntaje de la droga.

$s_i$  es la contribución calculada directamente del cLogP, logS, peso molecular y el druglikeness (el valor de cuanto es parecido a una droga).

( $p$ ) es una constante que proviene de la segunda ecuación que describe la curva.

Los parámetros  $a$  y  $b$  tienen valores de (1, -5), (1, 5), (0.012, -6) y (1, 0) respectivos a cLogP, logS, peso molecular y druglikeness.  $t_i$  son los valores de la contribución desde los 4 tipos de riesgo de toxicidad evaluados y presenta valores que van para  $t_i$  desde 1.0, 0.8 y 0.6 riesgos, bajo, medio alto respectivamente.

**Riesgo de toxicidad.:** El riesgo de toxicidad alerta acerca del peligro que presenta la estructura respecto a los distintos efectos para el organismo, entre los que se incluyen mutagenicidad, reacciones alérgicas, efectos sobre el aparato reproductor y su capacidad tumorigénica. Este parámetro es una alerta quedando descartada la posibilidad de riesgo en los casos de compuestos con valores que parecerían de riesgo y viceversa.

Estas predicciones son presunciones calculadas por lo que no se pueden tomar como valores que sean parte de un estudio específico. Es por esto que ausencia de riesgo toxicológico solo quedara demostrada una vez que los compuestos sean sintetizados y logren pasar con éxito los ensayos respectivos.

El procedimiento mediante el cual se calculan los parámetros involucrados, se lleva a cabo mediante la descomposición en pequeños fragmentos de la molécula en estudio. Los cuales poseen valores conocidos previamente de cada uno de los parámetros de toxicidad. En el caso de encontrarse algunos de esos fragmentos dentro de la composición de una molécula, esto marca un puntaje y es lo que termina al ser sumados y de acuerdo al aporte de cada



máxima de 4,75ng/mL. Los resultados obtenidos indican que solo un 13% de los compuestos muestran citotoxicidad (**FIGURA 39**). En macrófagos-monocitos THP-1, a 10  $\mu$ M y tomando como punto de corte el 60 % de sobrevida del cultivo. El porcentaje de compuestos no citotóxicos resulto del 48%, siendo sólo el 12%, citotóxicos por debajo del 20% de sobrevida del cultivo.



**FIGURA 39** .El diagrama de círculos muestra la biblioteca ideal en cuanto a valores de citotoxicidad mayores a 4760 ng/ml (no citotóxicos a esa concentración) y el comportamiento de la biblioteca de esta tesis.

Para la línea celular a partir de la cual es infectada con *Tc* en el HTS para amastigotes, BESM (musculo esquelético embrionario bovino) el porcentaje de compuestos que resultaron no citotóxicos con un 60% de sobrevida del cultivo, para una concentración de 10  $\mu$ M fue del 31 %, siendo el 69 %, con 20% de sobrevida del cultivo.

Esto demuestra el diferente comportamiento en la citotoxicidad de estos compuestos, siendo dependiente de los distintos medios y cultivos en los cuales se ensayo la biblioteca. Se demuestra en la tabla los distintos comportamientos en las diferentes líneas celulares. El porcentaje en general de citotoxicidad resulta aceptable para continuar con los diferentes estudios sobre los parasitos.(**TABLA 9** )

**TABLA 9** .Resumen de citotoxicidad a 10  $\mu$ M (se toma como referencia un porcentaje mayor a 60% de sobrevida sobre los blancos sin compuesto y sin parasito).

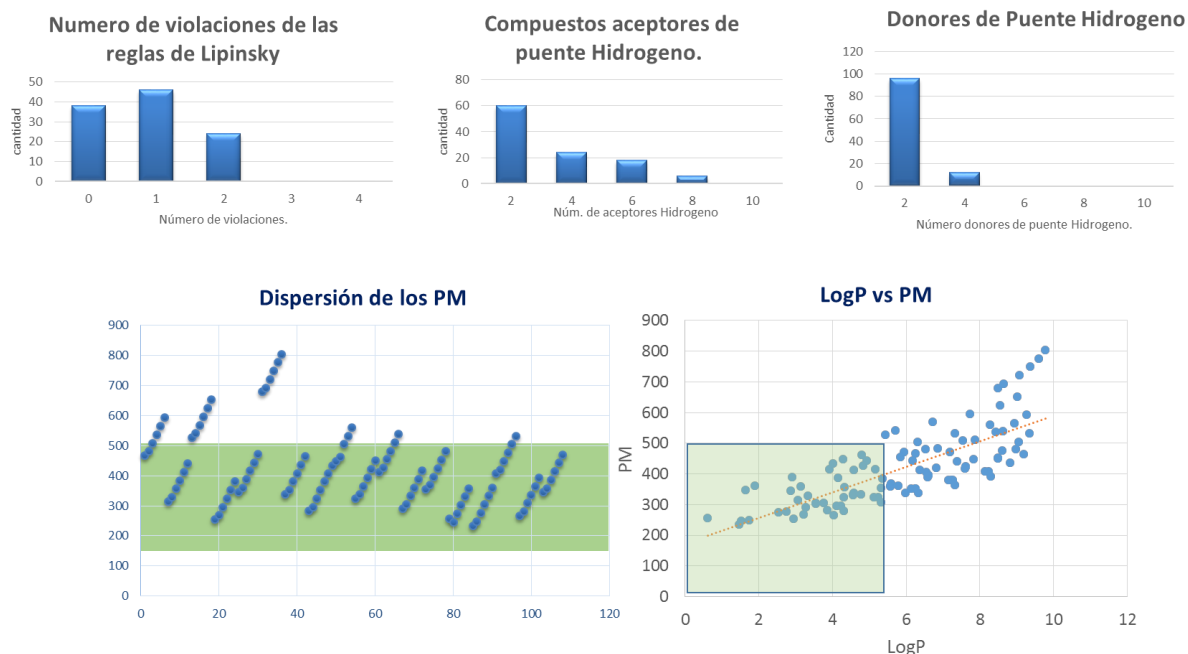
	a 10 $\mu$ M BESM	a 10 $\mu$ M THP-1	a 10 $\mu$ M fibroblastos
% de compuestos no citotóxicos	31	48	34

### 5.3 Resultados generales de los cálculos fisicoquímicos realizados a la biblioteca.

A partir de los cálculos realizados, la posibilidad de obtener una caracterización multiparamétrica de las bibliotecas resulta factible. Teniendo en cuenta esto y la posibilidad de obtener los datos biológicos junto con la diversidad de origen de los mismos, nos da un margen de análisis amplio y enriquecedor. Siendo uno de los objetivos de esta tesis enriquecer

el conocimiento de la biología a partir de la química.

Los parámetros calculados se muestran en las tablas del apéndice A. pero de manera ilustrativa se muestran como resultan algunos datos obtenidos respecto de las reglas de Lipinsky inicialmente. (**FIGURA 40**)



**FIGURA 40.** Comportamiento de la biblioteca respecto de las reglas de Lipinsky.

Como podemos observar en la **FIGURA 40**, la biblioteca en su conjunto presenta una elevada cantidad de compuestos que cuadran dentro de la regla y en el caso de las violaciones en general se deben el elevado logP respecto de la regla. Muy pocos se encuentran por fuera de esta regla debido al elevado PM. Por lo que en general, si lo comparamos con otras bases de datos de compuestos. a priori esta pequeña biblioteca encuadra dentro de los parámetros buscados en el inicio de la estrategia planteada, en la búsqueda de una estructura privilegiada. Además puede ser modificada de manera robusta y que posee un ADME con características sencillas de ser modificables para una posterior optimización de los líderes.



“No podemos resolver problemas pensando de la misma manera que cuando los creamos.”

## ***6. RESULTADOS Y ANALISIS DE ACTIVIDAD EN APICOMPLEJOS.***

## 6 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE ACTIVIDAD EN APICOMPLEJOS.

### 6.1 Introducción.



Teniendo en cuenta la estrategia inicial, una vez completada la síntesis y caracterización de los compuestos diseñados, se estableció un cronograma de evaluación de su actividad biológica. Para el caso de los parásitos incluidos en el Phylum *Apicomplexa*, el enfoque de análisis resulta diferente respecto del tomado para los tripanosomátidos. Entre las razones se encuentran el metabolismo, las diferencias en cuanto a la presencia del tripanotión y la posibilidad de realizar una mayor cantidad de análisis sobre los tripanosomátidos respecto a los apicomplejos.

### 6.2 Poliaminas y su metabolismo en *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*.

El Phylum *Apicomplexa* está conformado por un grupo de protistas caracterizados por la presencia del complejo apical. Son protozoos unicelulares, parásitos intracelulares obligados que <sup>127,127,128,113, 112</sup> parasitan al hombre y distintos animales. Sus estructuras móviles se encuentran ausentes, exceptuando ciertas etapas (gametas)<sup>110</sup>. Es un grupo variado y en él se encuentran organismos que causan enfermedades al ser humano o a los animales relacionados con él y entre sus especies se encuentran *Plasmodium spp*, *Babesia spp*, y los coccidios como *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Toxoplasma gondii*, entre otros.<sup>90-97, 91,82,84,85,86</sup>

Un aspecto interesante de este Phylum, se encuentra no sólo en las distintas formas de evolución de cada una de las especies que la integran, sino también en las diferencias que se han ido hallando en su metabolismo. Las rutas metabólicas presentes pueden ser racionalizadas a partir del entendimiento de su evolución. Para los parásitos, el hecho de compartir con los hospederos rutas y vías metabólicas ha generado a lo largo de la evolución similitudes y diferencias entre sus miembros. Estas variaciones son desde la perspectiva de la química medicinal muy importantes, para entender el mecanismo de acción de ciertas drogas, mejorar los tratamientos actuales y encontrar blancos prometedores para el diseño de nuevos agentes quimioterapéuticos.<sup>95b,94b,93b,31c,91,84\_88</sup> En años recientes ha surgido la

quimiogenómica como estrategia para abordar esta problemática.<sup>92b, 21, 128 21, 128 21, 129, 98b, 99, 97b, 96b</sup> Esta nueva aproximación requiere el cribado sistémico de colecciones de compuestos contra una familia de blancos moleculares (quinasas, receptores, proteasas, etc) con el

objetivo de encontrar nuevas drogas y nuevos blancos. Las diferencias en los metabolismos en el Phylum permiten, encontrar posibles blancos moleculares para desarrollar drogas específicas para una u otra enfermedad mediante una aproximación quimiogenómica.

A partir de lo observado en las diferencias de los metabolismos entre *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii* se pueden racionalizar los resultados de actividad anti-proliferativa de un mismo compuesto. Al conocer las diferencias metabólicas es posible comenzar un análisis exhaustivo sobre las bases de la actividad en cada uno. En la **FIGURA 41** se puede observar las diferencias entre las rutas metabólicas relacionados a las vías de las poliaminas para *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* y *Babesia bovis*.

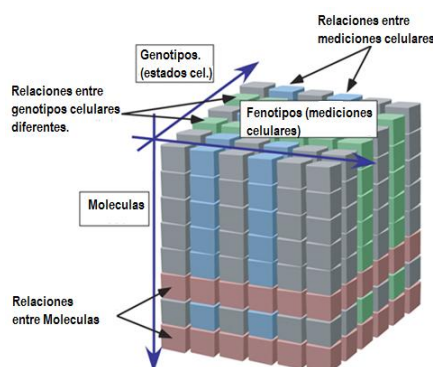


**FIGURA 41.** Diferencias en el metabolismo relacionado con poliaminas entre *Pf* (*Plasmodium falciparum*), *Tg* (*Toxoplasma gondii*) y *Bbo* (*Babesia bovis*).

Un programa de desarrollo de drogas antimaláricas requiere optimizar candidatos que sean activos en uno o en varios estadios del ciclo de vida del parásito, independientemente de la fuente de donde provenga el mismo (química combinatoria, tamizado virtual, síntesis orientada a la diversidad). Una vez obtenido un "hit", como se ha mencionado previamente, es modificado para poder realizar estudios de relación de estructura-actividad. Las aproximaciones de quimiogenómica y "droga-gen-droga" permiten adelantar ciertos pasos en la optimización del compuesto desde dos puntos de vista diferentes. En el caso de droga-gen-droga, requiere trabajar en una zona segura del proteoma parasitario, en donde las proteínas utilizadas como blanco coexistan en ambos proteomas (del parásito y del hospedero) y posean drogas de perfil farmacológico y clínico conocido. Este conjunto de proteínas deberá contar, para ser un blanco privilegiado, de drogas desarrolladas que hayan pasado numerosos estudios SAR, ADME, etc; siendo estas los candidatos para ser optimizados como nuevas drogas.<sup>129</sup>

Una aproximación quimiogenómica resulta más compleja, pero tiene la ventaja que el origen de los datos puede ser diverso y que también provee información relevante acerca del comportamiento de una biblioteca química que es puesta a prueba.

Siguiendo este razonamiento el hecho de que los apicomplejos presenten diferencias en el metabolismo de las poliaminas, permite observar el comportamiento de un compuesto en uno y otro parásito, encontrando distinta actividad entre uno y otro blanco de acción. Este acercamiento conceptual nos ayuda a interpretar de manera integral el comportamiento de un compuesto (**FIGURA 42**).



**FIGURA 42.** Aproximación quimiogenómica.

Teniendo en cuenta los conceptos de Schreiber, S. L.<sup>90</sup> y diferentes grupos en el área de la quimiogenómica en la última década buscaremos explicar el comportamiento observado en los ensayos de actividad contra apicomplejos de los compuestos preparados de la presente tesis.

### 6.3 Breve reseña sobre los ensayos biológicos realizados.

#### 6.3.1 Determinación de la actividad en *Plasmodium falciparum*.

Las mediciones de actividad fueron realizadas por el Dr. Babu Tekwani en el National Center for Natural Products Research de la Universidad de Mississippi, en Estados Unidos de América. La actividad antimalárica de los compuestos fue determinada *in vitro* en dos cepas de *P. falciparum*, una sensible a cloroquina (D6, *Sierra Leona*) y otra resistente (W2, *IndoChina*). El ensayo se basa en evaluar el efecto de los compuestos en el crecimiento de cultivos asincrónicos de *P.f*, determinado por el ensayo de actividad de la lactato deshidrogenasa (pLDH). (ver Materiales y Métodos).

### 6.3.2 Determinación de la actividad en *Toxoplasma gondii*.

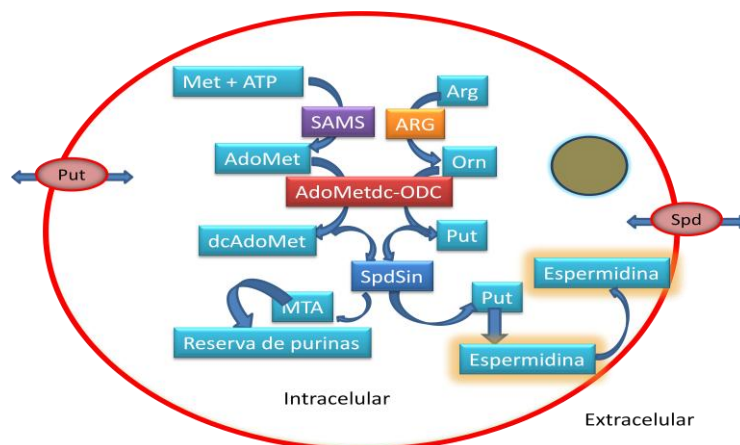
Las mediciones de actividad fueron realizadas por el Dr. Gustavo Arrizabalaga, de la Universidad de Indiana, en Estados Unidos de América.

Con el objetivo de determinar valores de inhibición de crecimiento de *T. gondii* en un modelo de infección de fibroblastos se realizó un estudio exploratorio a dos concentraciones (1µM y 10µM). Los parásitos expresan GFP y β-gal como sondas para monitorear el crecimiento. (Ver materiales y métodos.)

### 6.4 Reseña de las vías metabólicas relacionadas con poliaminas presentes en *Plasmodium falciparum*.

*Plasmodium spp* presenta la vía de las poliaminas de manera completa, sintetizando poliaminas, siendo sus mecanismos de síntesis y regulación más sencillos, respecto a los de mamíferos. En la **FIGURA 43** se muestra el diagrama de la síntesis y regulación con sus respectivas enzimas. Al igual que en mamíferos, la biosíntesis comienza con la metionina que es adenosilada con ATP a través de AdoMet sintetasa (SAMS), por otro lado la arginina (Arg) es descarboxilada por ARG a Ornitina (Orn), que luego es descarboxilada por la actividad de enzima sumamente regulada, la ODC(Ornitina descarboxilada) produciendo putrescina. Espermidina y espermina son formadas por las actividades catalíticas de las enzimas, Espermidina sintasa, Espermina sintasa, y la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAM-dc).

130



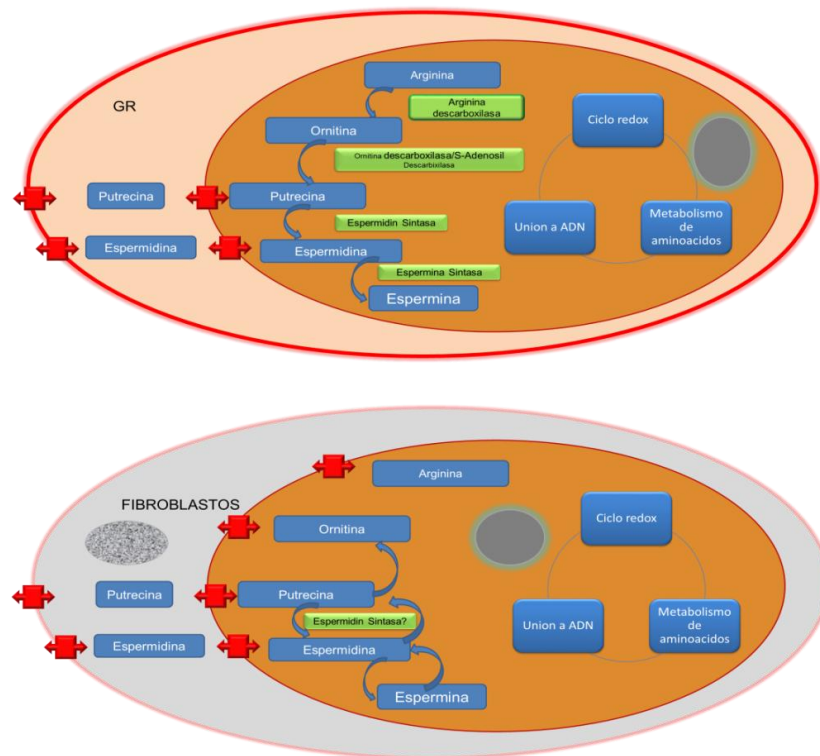
**FIGURA 43.** Metabolismo de poliaminas y transportadores en *P.f.*

La inhibición de la ODC ha sido ampliamente estudiada (**FIGURA 47**) a partir del desarrollo del DFMO y sus posteriores usos como agente antimalárico, se han encontrado también diferentes inhibidores incluso para la SpmSin,<sup>131</sup> recientemente caracterizada.

Existen transportadores tanto de putrescina como de espermidina, pero no han sido caracterizados completamente aún. Un detalle significativo es que *Pf* carece de enzimas de retroconversión que permitan mantener un "pool" de poliaminas de modo que sea más flexible en lo que se refiere a demanda y necesidad y permitiendo modular concentraciones según el ambiente en el que se encuentra.<sup>130</sup>

### 6.5 Reseña de las vías metabólicas relacionadas con poliaminas presentes en *Toxoplasma gondii*.

*Toxoplasma gondii* (*Tg.*), si bien es un apicomplejo, difiere de manera considerable en el metabolismo de las poliaminas respecto a *P.f.* Estas diferencias se pueden apreciar en la **FIGURA 44**.

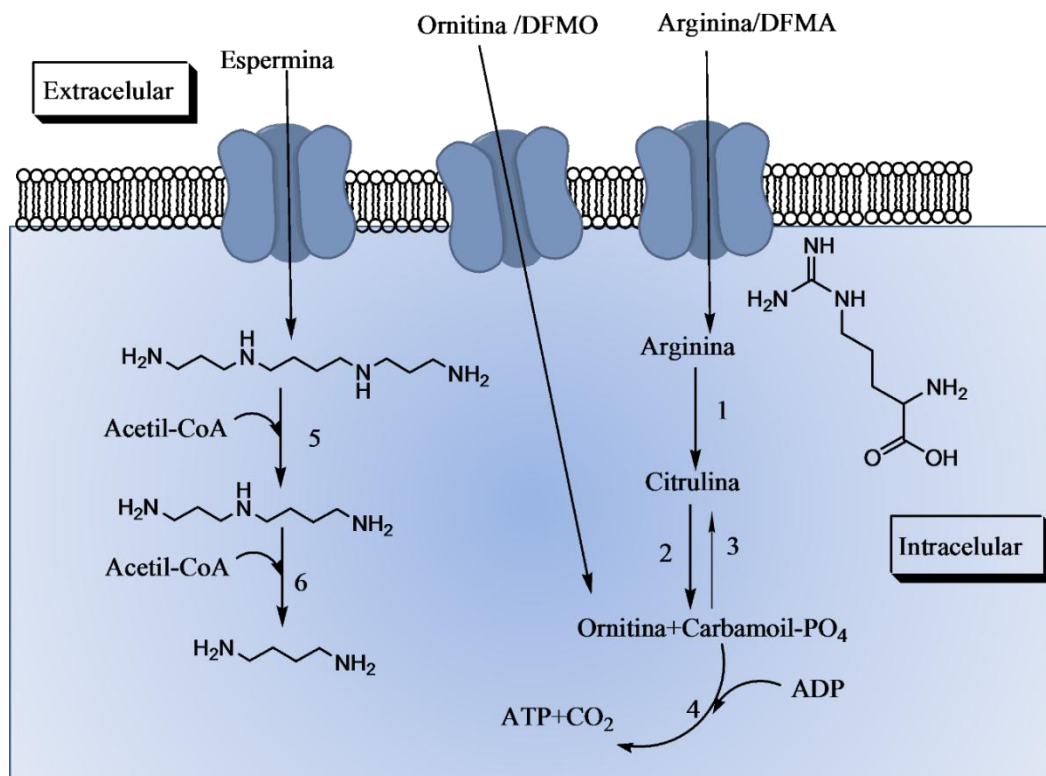


**FIGURA 44.** Diferencias metabólicas entre *P.f.*(arriba infectando eritrocito) y *T.g.*(abajo infectando fibroblasto) en un medio intracelular.

*Tg.* posee un mecanismo de interconversión y transporte carece de enzimas que interconecten los mecanismos de incorporación de arginina y ornitina con el metabolismo de poliaminas, provocando que estos aminoácidos sean utilizados de manera indistinta para el metabolismo

de proteínas o el energético. Además de estas diferencias, *Tg* es un parásito intracelular obligado y por lo tanto el mecanismo por el cual infecta al ser humano, que es un hospedero accidental en el ciclo de vida, resulta crucial. Entre las posibles diferencias, existe la posibilidad que transportadores de poliaminas se encuentren presentes y puedan ser reclutados en el fibroblasto y que en cambio en el glóbulo rojo, estos sólo sean parte del pool de transportadores que vienen acarreados de la células de la progenie. Por lo que la posibilidad de regularlos por parte del *Pf* resulta menor respecto a la capacidad de *Tg*. para poder utilizar la maquinaria del hospedero, al menos en este estadio, en donde se estudio a *Pf*. Es así que el estudio de propiedades como LogP y TPSA, que se relacionan fuertemente a la capacidad de los compuestos de atravesar membranas lipídicas, resulta altamente relevantes.

La **FIGURA 45** nos muestra el mecanismo de retroconversión de la espermidina en *Tg*.



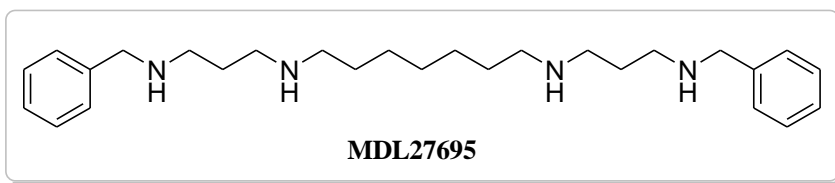
**FIGURA 45.** Metabolismo de poliaminas en *Tg*. 1. Arginina deaminasa, 2: Ornitina carbamoil transferasa (en catabolismo) 3. Ornitina carbamoil transferasa (en anabolismo). 4. Carbamato kinasa 5. Espermidina/Espermina N<sup>1</sup>-acetiltransferasa SSAT 6. Poliamina Oxidasa. PAO.<sup>21</sup>

Las enzimas que son importantes resultan ser la Espermidina/Espermina N<sup>1</sup>-Acetiltransferasa (SSAT) y la Poliamina oxidasa (PAO), ambas presentes en el hospedero y que podrían ser blancos específicos en *Tg*, debido a las diferencias respecto del ser humano.<sup>21</sup>

## 6.6 Análisis de los resultados actividad sobre en *Plasmodium falciparum*.

### 6.6.1 Antecedentes.

Un extenso estudio realizado por el grupo investigación del Merrell Dow Research Institute-MDRI (Ohio, EE.UU.) dio lugar, entre muchos otros análogos preparados, a un compuesto denominado



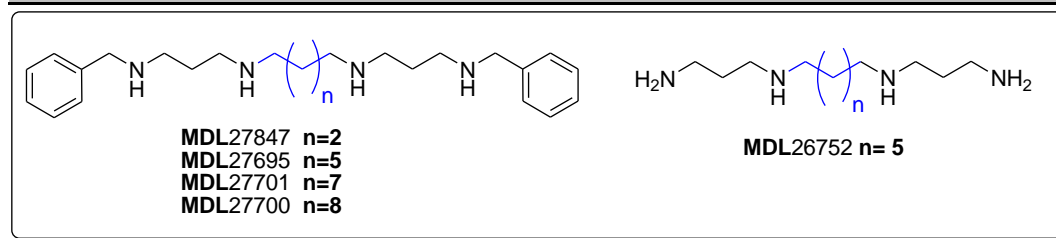
**MDL26795.** Este compuesto fue seleccionado como líder, debido a que presentó un mejor índice terapéutico respecto a los otros compuestos de la serie, siendo igualmente potente en cepas sensibles y resistentes a cloroquina. El valor  $IC_{50}$  contra *Pf* fue de 3,0  $\mu$ M y su valor de  $IC_{90}$  fue de 4,4  $\mu$ M, habiendo sido ensayado también en ratones con un régimen de administración oral de 4 días, la cual fue realizada tanto en presencia como en ausencia de DFMO.<sup>132, 133, 99 98</sup> Los autores demostraron además que la actividad de este compuesto no se debería a efectos inhibitorios sobre la síntesis de DNA o a su estabilidad y tampoco actuaría sobre la síntesis de proteínas.<sup>98-99</sup> La actividad inhibitoria de los análogos MDL aumenta con el incremento del largo de cadena (desde 4 a 12) entre los aminos internos. Esto se relacionaría con una mayor liposolubilidad de los análogos y la posibilidad de ingreso de éstos a los eritrocitos. Esta hipótesis fue corroborada usando poliaminas con sus aminos libres, que resultaron al menos 1000 veces menos activo que los productos. También se pudo corroborar que la familia de compuestos MDL eran acumulados en los eritrocitos, incluso mejor que los análogos con las aminas libres.<sup>133 134,122-116</sup> Estos análogos reprimirían la biosíntesis de poliaminas, y podrían tener además, un mecanismo por el cual se retrasa el crecimiento del parásito, ya que incluso la incorporación de las poliaminas de manera exógena no revierte la inhibición del crecimiento. Además de estas observaciones, el grupo de Bitonti y col., encontró que el DFMO posee un efecto citostático y el de los compuestos de la serie MDL es sinérgica con el DFMO, siendo esta combinación citotóxica. En parte debido a que el DFMO actuaría sobre la ruta de poliaminas disminuyendo las reservas de las mismas que acarreamo una menor protección sobre el ADN y ARN. Mediante la comparación con la velocidad a la que se observa inhibición por parte del MDL 27695, este grupo postuló que el efecto tóxico mayoritario se debería a la interacción con las proteínas de la ruta biosintética de las poliaminas, a pesar de que se desconoce el blanco molecular.<sup>82-103, 133, 134, 116-117</sup>

Con el objetivo de establecer la relación entre la similitud molecular y la actividad, se realizaron una serie de simulaciones de compuestos presentes en la literatura, que poseían un esqueleto de poliamina y habían sido ensayados como antiparasitarios. Este análisis nos

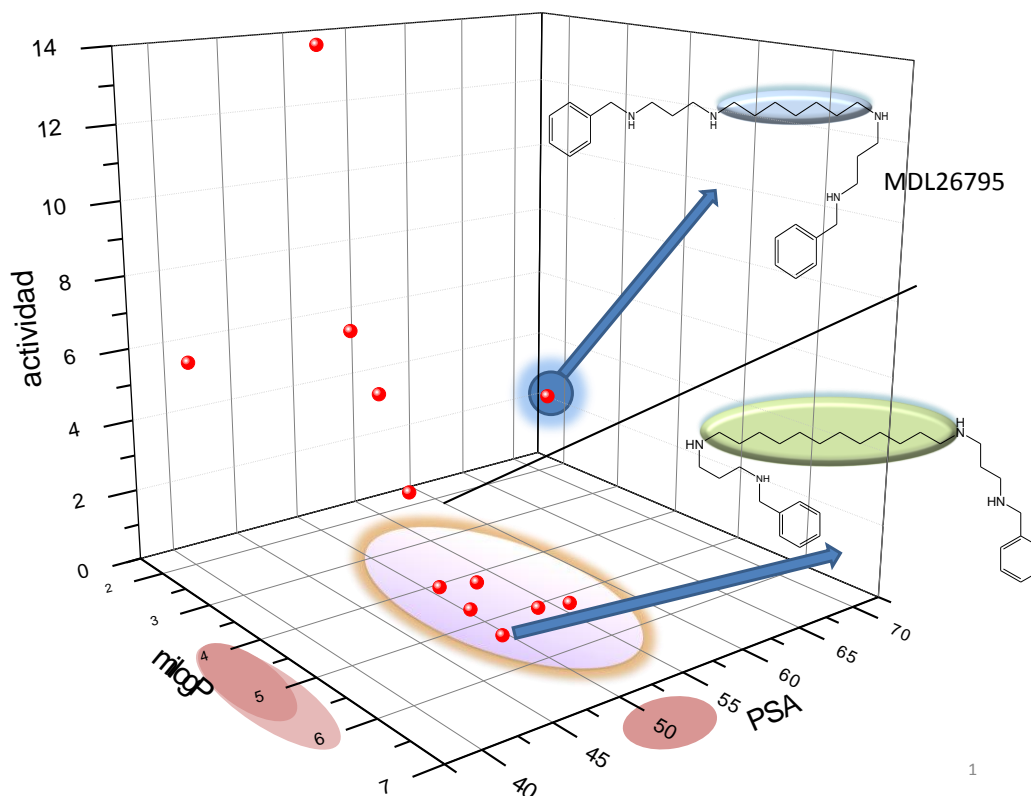
permitiría, una vez obtenido los datos de actividad, correlacionar la similitud con la actividad encontrada para nuestros productos. Con ese propósito se hizo una búsqueda exhaustiva, encontrando 30 compuestos ensayados como antimaláricos entre los que se encuentra los análogos MDL, pieza fundamental en nuestro esquema, que se encuentran resumidos en la **TABLA 10**.

**TABLA 10**, Valores de miLogp, TPSA ( $\text{\AA}^2$ ), PM (Peso molecular en uma), ACEP (Número de aceptores de puente Hidrogeno), DADOR (Número de dadores de puente Hidrogeno), Volumen ( $\text{\AA}^3$ ); IC<sub>50</sub> en  $\mu\text{M}$ , contra *Pf*; n: número de metilenos entre aminos centrales de los derivados de MDL, enmarcados en azul. <sup>135</sup>

	miLogp	TPSA	PM	ACEP	DADOR	volumen	IC 50 $\mu\text{M}$
<b>MDL26752</b>	-0.61	76,11	244,427	4	6	278,44	4300
<b>MDL27847</b>	2,632	48,108	382,596	4	4	406,683	14
<b>MDL27695</b>	4,147	48,108	424,677	4	4	457,089	3
<b>MDL27701</b>	5,158	48,108	452,731	4	4	490,692	0,69
<b>MDL27700</b>	5,663	48,108	466,758	4	4	507,494	0,48



Teniendo en cuenta lo hallado por los investigadores del MDRI en *Plasmodium falciparum* y en *P. berghei* y el estudio sobre los parámetros (miLogP, PSA, número de átomos donores y aceptores de Hidrógenos (HBD) y pKa) queda de manifiesto que esto permite suponer que tanto la presencia de los grupo amino, y lo anillos aromáticos, son requeridos para su actividad biológica. El análisis todos los compuestos en conjunto permite observar cómo se agrupan los valores de actividad y los parámetros calculados (**FIGURA 46**).



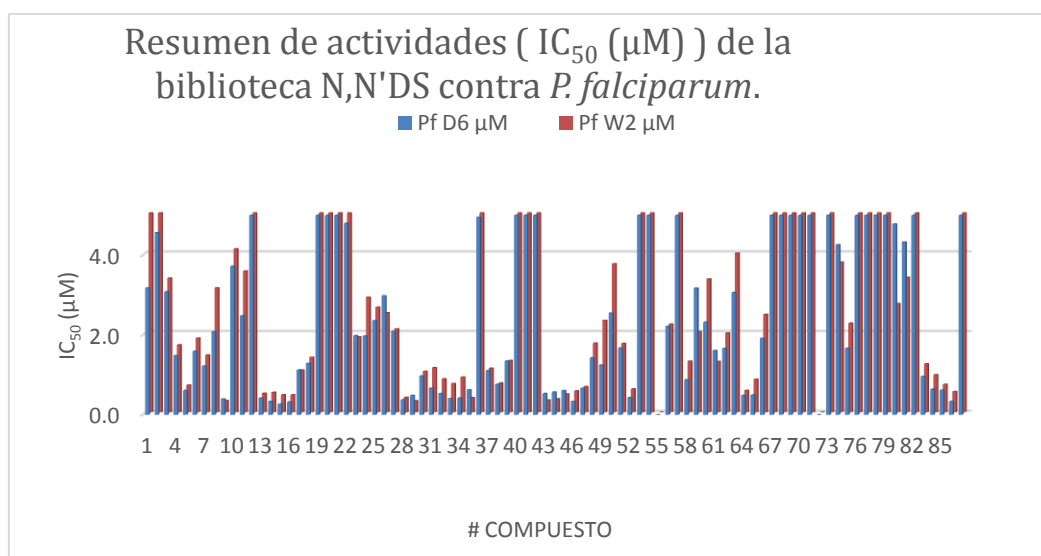
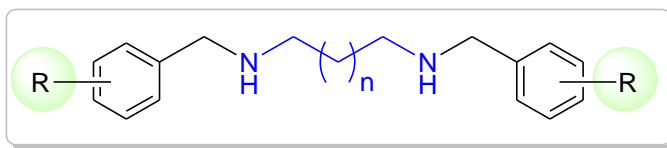
**FIGURA 46.** Relación entre Actividad anti *Plasmodium falciparum* ( $IC_{50}$ ) en  $\mu M$ , PSA ( $\text{\AA}^2$ ) y miLogP para compuestos previos presentes en la literatura (ver tabla 2).<sup>104, 135</sup>

En la **FIGURA 46** se observa que los compuestos con mejor actividad presentan valores de PSA (TPSA en  $\text{\AA}^2$ ) entre 48 y 55 (resaltados en la **FIGURA 46**) y de miLogP entre 4 y 6.

Las similitudes los valores hallados respecto de la biblioteca de diaminas N,N, Di-sustituidas de Labadie y otros,<sup>104</sup> nos permiten ahondar en el análisis de estructuras, tomando como base las semejanzas en determinados parámetros fisicoquímicos.(**TABLA 11**)

Este análisis convalida el uso de las diaminas disustituidas como una prominente estructura para generar compuestos antimaláricos.

La primera biblioteca preparada tuvo dos puntos de introducción de diversidad. Por un lado el largo de la cadena de la diaminas(n) y por el otro, los sustituyentes en los anillos aromáticos (R) con funciones oxigenadas en distintas posiciones del anillo. La variabilidad del largo de cadena permite estudiar cómo se ve afectada la actividad por la separación de los grupos amino. El tipo de sustituyente y su posición aporta información crucial sobre la demanda estérica necesaria para la actividad y la polaridad.



**FIGURA 47:** compendio de actividades de los compuestos de la biblioteca contra *Pf* en valores de IC<sub>50</sub> (µM)

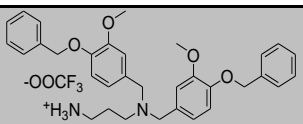
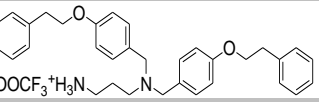
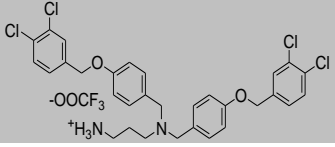
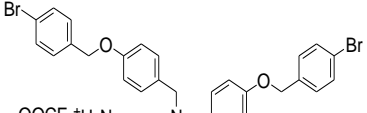
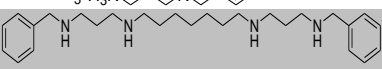
En una primera observación de las actividades (**FIGURA 47**) nos permite concluir que para *Pf*, 44 compuestos se encuentran por debajo de 2µM de actividad lo que nos indica que el criterio de elección de la estructura privilegiada resulto adecuado. Por otro lado, los patrones de comportamiento no se modifican de forma considerable, al menos unas 10 veces, entre la cepa sensible y resistente a Cloroquina, esto nos permitiría inducir que el mecanismo por el cual actúa la Cloroquina no sería el afectado por el conjunto de la biblioteca.

La biblioteca en su conjunto posee valores interesantes de inhibición de *Pf*, incluso 7 compuestos son apenas 10 veces menos activos que Cloroquina en la cepa sensible (D6) y 6 de ellos son activos a ese nivel en la cepa resistente (W2). Estos resultados son prometedores ya que en estudios con bibliotecas de miles de compuestos han resultado en hits con actividades similares o incluso más elevadas que luego necesitan ser mejorados para llegar a líder.

## 6.7 Análisis de estructura basados en la actividad sobre *Plasmodium falciparum*.

Los resultados sobre la cepa D6 demostraron que cuando se trata de los derivados de Bencílicos de las diaminas N, N'DS, las mejores actividades se obtienen para cadenas largas (n= 8, 10), manteniendo los niveles de actividad para el análogo de 1,12-dodecildiamina (n=12). Este patrón se mantuvo en los ensayos para *P.f* resistentes a Cloroquina (cepa W2).

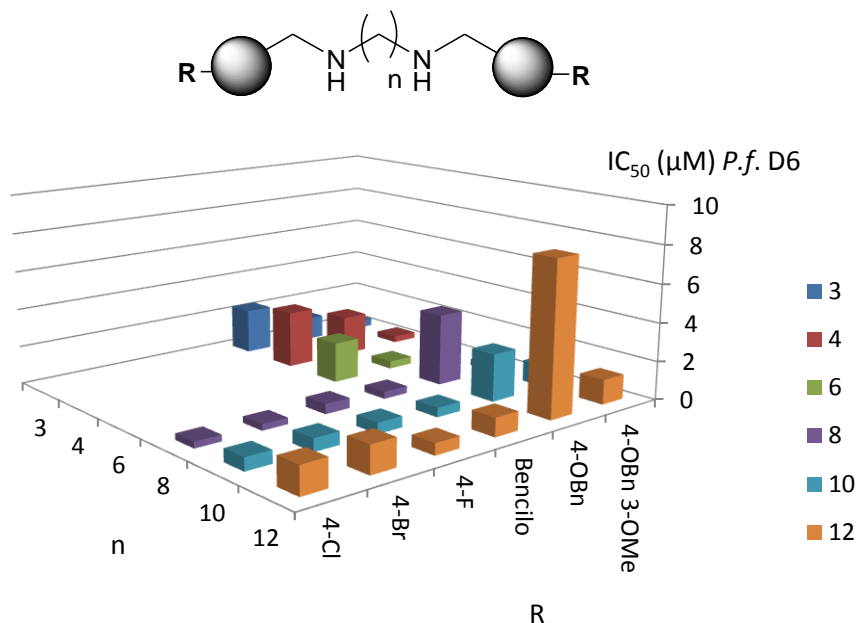
**TABLA 11** Inhibición del crecimiento para IC<sub>50</sub> *Pf*D6(μM) y los parámetros calculados: miLogP, TPSA y ACE (Núm Aceptores de Pte.H) y DAD(Núm dadores de Pte.H), E.rot (enlaces rotantes), Vol (volumen).

Estructuras	IC <sub>50</sub> <i>Pf</i> D6(μM)	miLogP	TPSA	PM	ACE	DAD	Vol.
	0,56	2,564	67,82	527,6	6	3	509,8 1
	1,23	3,384	49,35	467,6	4	3	458,7 2
	0,31	5,952	49,35	605,4	4	3	512,8 7
	0,21	4,978	49,35	625,4	4	3	494,4 9
	3,00	4,147	48,11	457,0	4	4	457,09

La presencia de análogos que no mostraron actividad antimalárica, como es el caso de los que poseen el R=3-OH,4-MeO como sustituyente, tiene varias interpretaciones posibles. En general, estos compuestos resultaron mucho más polares que el resto de la colección, siendo por ende poco solubles, incluso en DMSO, lo cual dificultó su ensayo. En algunos casos esto pudo ser suplido realizando diluciones suplementarias en DMSO, pero este hecho cambia la relación de solvente en el ensayo lo que requiere de estudios complementarios y por tanto debe ser considerado a la hora de observar la actividad. Desde la perspectiva de la interacción con el parásito, la falta de actividad podría justificarse debido a que la alta polaridad lo que dificulta el pasaje a través de membrana, teniendo concentraciones efectivas de bajas a nulas.

En el **FIGURA 48** se observa un grafico que correlaciona las actividades de las diaminas N,N'DS de las bibliotecas con funciones oxigenadas y aquellos análogos derivados de halógenos en posición 4 del anillo bencilico.

En un primer análisis, se observan las diferencias en las actividades para los análogos de cadena larga que poseen funciones oxigenadas respecto de los que poseen los halógenos.

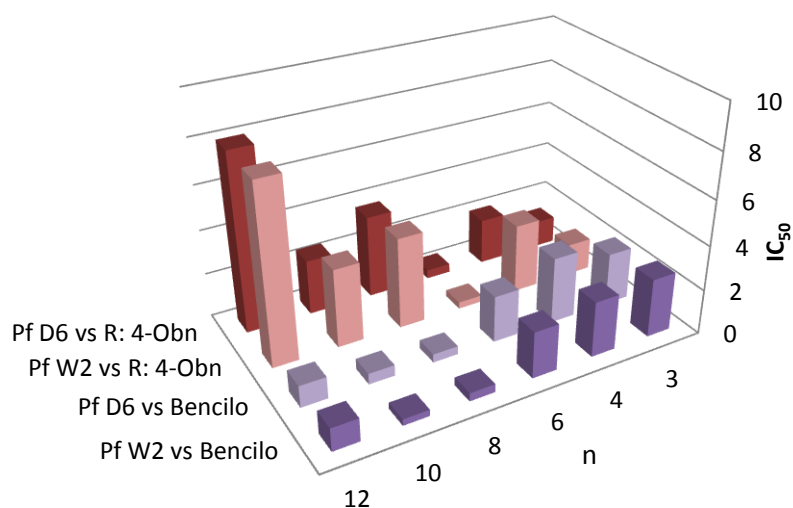


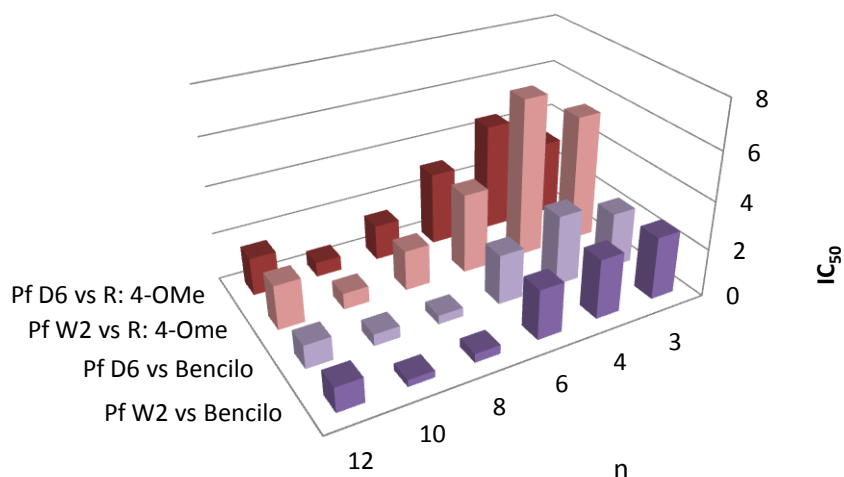
**FIGURA 48.** Actividades en IC<sub>50</sub> (μM) de las diaminas N,N'-DS contra *Pf* D6.

Para el caso de los compuestos con sustituyentes halogenados en el grupo bencilo (R=4-X,, **FIGURA 48**) se observa claramente que no existe dispersión en los valores de actividad, siendo el promedio de actividad (IC<sub>50</sub>) entre los derivados de un n=8 de 0,4 μM para un valor de 0,37 para el derivado de bencilo. Y para los casos de n = 10 y 12, los promedios aumentan 0,63 μM y 1,15 μM, en comparación con el 0,48 y 0,97 del análogo de bencilo. Por otro lado, se observa correlación respecto al largo de cadena, en donde a medida que aumenta el largo de cadena comienza a observarse que tanto en los compuestos con funciones halogenadas, como también para los compuestos con funciones oxigenadas ocurre una pérdida de actividad. Este grupo de derivados con halógenos en posición 4 presenta valores promedio de TPSA de 24Å<sup>2</sup> que se diferencian respecto de la familia MDL que posee los valores promedio de TPSA de 50 Å<sup>2</sup>.

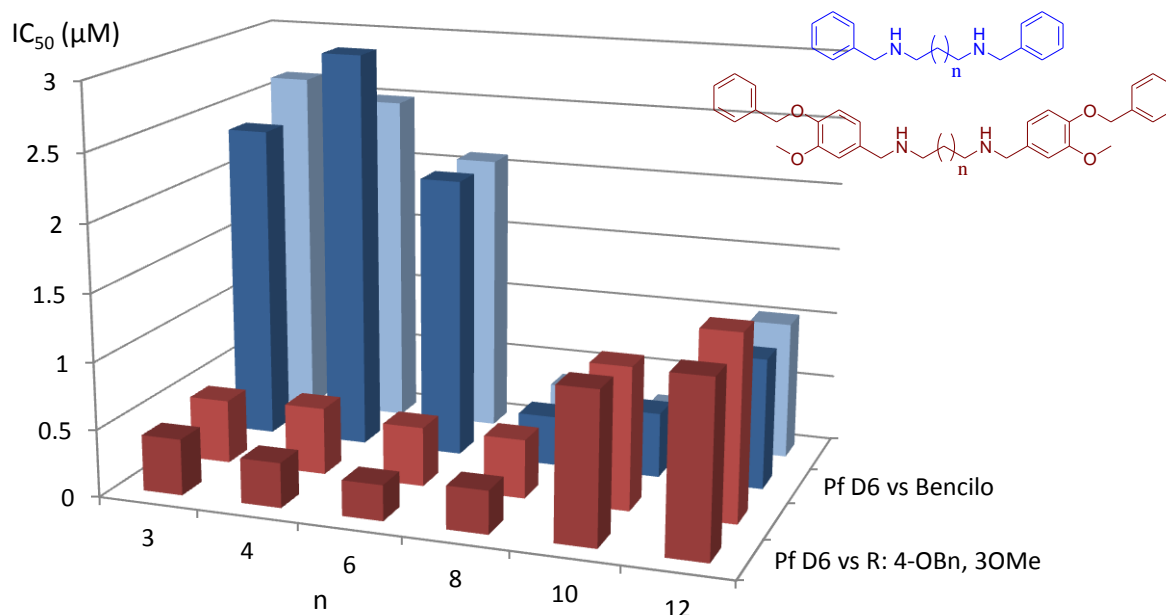
Esto acentúa la importancia de los grupos aminos que permiten mejorar su capacidad de atravesar membranas. Los compuestos que poseen grupos benciloxi (R=4-BnO), tienen una mayor dispersión en sus valores de actividad. En general los compuestos con funciones oxigenadas mostraron una tendencia generalizada de valores altos, que se ve interrumpida.

Los derivados de hexildiamina nos permiten encontrar una explicación a este efecto en los valores de TPSA (de 50 Å) y de miLogP resultan muy similares para esta familia respecto de los MDL ya que el número de átomos con la posibilidad de recibir o aportar puentes hidrógenos es la misma. Lo que cambia entre uno y otro, es la presencia de otros anillos aromáticos en nuestra biblioteca. Estos grupos aumentan el carácter hidrofóbico de la molécula incrementando su demanda estérica.. La **FIGURA 49** nos permite observar que tanto para las cepas W2, como para las D6, las diferencias de actividad no son significativas. También se puede observar que la actividad presenta un gran descenso para el compuesto **9** (**N<sup>1</sup>, N<sup>6</sup>-bis (4-(benciloxi) bencil)hexano-1,6-diamina**). Para comprobar si el éter es quien forma parte del mecanismo por el cual la molécula es más activa, observamos el comportamiento de la familia de derivados de R= 4-MeO y allí encontramos un patrón diferente de actividad. Por un lado, el máximo de actividad se mueve hacia el compuesto con un largo de cadena de 10 átomos de carbono con un comportamiento que resulta similar a los derivados de bencilo siendo de este modo un mecanismo distinto a los análogos de R=4-BnO. Para confirmar esta tendencia y comprobar realizamos la comparación con los resultados de los análogos de R=4-BnO 3-MeO(**FIGURA 50**)





**FIGURA 49.** Comparación de las actividades ( $IC_{50}$   $\mu$ M) presentes contra las dos cepas de *Pf* analizadas. Arriba, familia de análogos del 4-BnO. Abajo los análogos de 4-MeO. En ambos se compararán respecto a los derivados de bencilo.



**FIGURA 50** Comparación de las actividades ( $IC_{50}$   $\mu$ M) contra las dos cepas de *Pf*

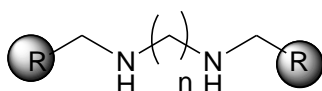
Podemos observar que para los compuestos con funciones oxigenadas R= 4-BnO como para R=4-BnO, 3-MeO, ocurre un cambio para el análogo de hexilendiamino. En efecto para estos últimos un aumento del número de carbonos resulta en una pérdida de actividad y sólo parece depender de la distancia entre nitrógenos. Esto marca una diferencia respecto de los compuestos MDL ya que en ellos el aumento de la distancia entre aminos internos, genera una mejoría en la actividad.<sup>135</sup>

Respecto de la sustitución en la posición 3 del anillo, el metoxilo mejora aun más la actividad de los compuestos con un largo de cadena corto, respecto de los análogos de bencilo y derivados de R=4-BnO.

Una de las primeras conclusiones a las que se puede arribar de manera general para todos los análogos preparados es la importancia que adquiere la presencia de los dos grupos amino en la actividad. Es notable que los derivados N, N'-disustituidos que tienen solo dos nitrógenos, poseen un perfil de actividad comparable a los compuestos proveniente del MDRI que poseen cuatro nitrógenos en su estructura (**TABLA 12**). Este hecho puede ser justificado en diferentes estudios que han señalado que una menor la densidad de carga mejora la capacidad de los compuestos para atravesar membranas. Por otro lado, la presencia de grupos que pueden soportar cargas, como los grupos amino, abren la posibilidad de que las drogas se acumulen en organelas.

La cloroquina, es una base diprótica débil que, en su forma neutra, puede difundirse libremente por la membranas, por ejemplo. Se conoce que esta sería la manera mediante la cual ocurre la entrada en el eritrocito, al parásito en su forma intraeritrocitaria y a la vacuola digestiva interna que es su sitio primario de acción. Dentro de la vacuola el pH ácido de la misma produce que el estado de equilibrio de la cloroquina cambie hacia la forma diprotonada (y dicatiónica), que es mucho más apolar. Este mecanismo de “trampa de base débil”, juega un papel clave en la acumulación de cloroquina dentro de la vacuola digestiva.<sup>136</sup> (**TABLA 12**). Ha sido reportado que *Plasmodium* modifica el transporte de metabolitos de los eritrocito infectados.

**TABLA 12** .Datos calculados y actividades contra *Pf* D6 en valores de IC<sub>50</sub> para algunos de los compuestos de la biblioteca MDRI y los compuestos con funciones oxigenadas. (Vol.: volumen en Å<sup>3</sup>)

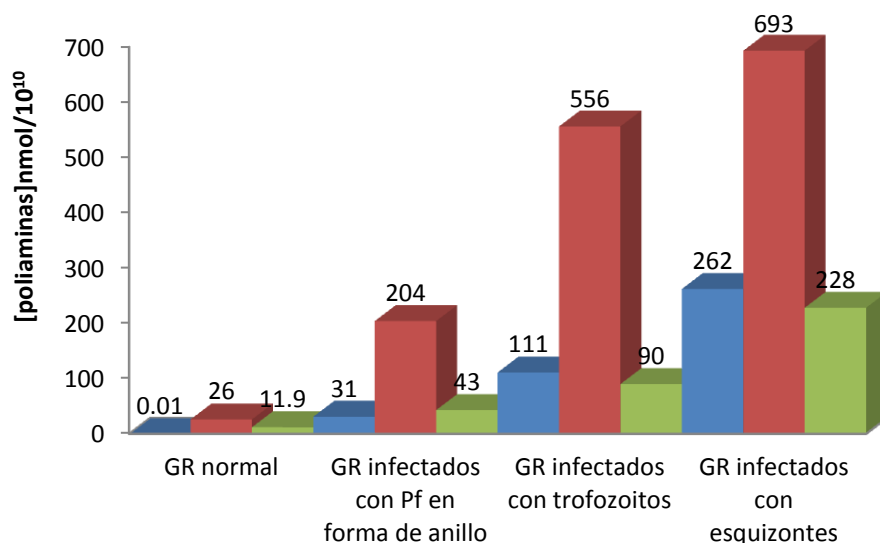


Compuesto	milogP	TPSA	PM	ACEP	DADOR	Vol.	IC <sub>50</sub> μM	n	R
MDL26752	-0.611	76.11	244.427	4	6	278.44	4300	7	
MDL27847	2.632	48.108	382.596	4	4	406.683	14	2	
MDL27695	4.147	48.108	424.677	4	4	457.089	3	5	
MDL27701	5.158	48.108	452.731	4	4	490.692	0.69	7	
MDL27700	5.663	48.108	466.758	4	4	507.494	0.48	8	
25	2.951	24.054	254.377	2	2	264.266	2.36	3	
26	3.221	24.054	268.404	2	2	281.068	2.98	4	
27	4.232	24.054	296.458	2	2	314.671	2.09	6	
28	5.242	24.054	324.512	2	2	348.275	0.37	8	
29	6.252	24.054	352.566	2	2	381.879	0.48	10	
30	7.263	24.054	380.62	2	2	415.482	0.97	12	
7	6.254	42.522	466.625	4	2	458.658	1.22	3	
8	6.524	42.522	480.652	4	2	475.458	2.08	4	
9	7.535	42.522	508.706	4	2	509.061	0.39	6	
10	8.435	42.522	536.76	4	2	542.665	3.73	8	
11	8.938	42.522	564.814	4	2	576.269	2.48	10	
12	9.271	42.522	592.868	4	2	609.872	8.03	12	
13	5.433	60.99	526.677	6	2	509.748	0.42	3	
14	5.704	60.99	540.704	6	2	526.549	0.33	4	
15	6.714	60.99	568.758	6	2	560.153	0.26	6	
16	7.725	60.99	596.812	6	2	593.757	0.32	8	
17	8.551	60.99	624.866	6	2	627.39	1.12	10	
18	9.01	60.99	652.92	6	2	660.964	1.29	12	

Los niveles normales de poliaminas en los eritrocitos no infectados son en general bajos con concentraciones aproximadas de 1,9;18 y 86 pmol/10<sup>8</sup> células para putrescina, espermidina y espermina, respectivamente. Para el caso de los eritrocitos infectados con *Plasmodium*, se ha observado un aumento en la concentración de poliaminas(**FIGURA 51**) (1720, 5090, 1270 pmol/10<sup>8</sup> células por putrescina, espermidina y espermina, respectivamente).<sup>130 137</sup> Por otro lado, en ensayos de captación de poliaminas se ha demostrado que el flujo de putrescina en los eritrocitos infectados aumenta en un 60% con respecto a los no infectados. En especial la importación de Putrescina hacia el GR infectado aumenta de manera dependiente de la concentración respecto del GR no infectado. A partir de estas observaciones en eritrocitos infectados con *P.knowlesi* ha sido posible caracterizar un transportador de putrescina que no

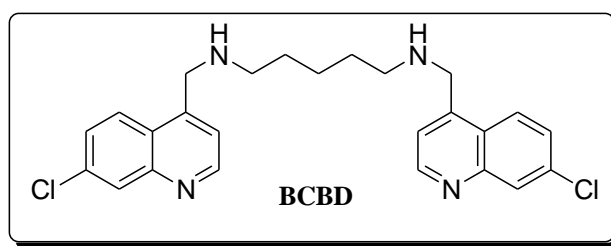
se encuentra alterado por la presencia de espermidina o espermina en el medio extracelular.

137



**FIGURA 51.** Perfil de poliaminas en GR infectados y control de GR sin infectar. (datos tomados de Singh y otros <sup>137</sup>) (Putrescina en Azul, Espermidina en Rojo, Espermina en Verde).

La existencia de estos transportadores en *Plasmodium spp* tiene al parecer un impacto directo en cuanto a la utilidad de los mismos como blancos moleculares, ya que puede producir a partir de todos los



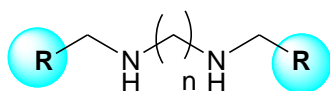
metabolitos subsiguientes. Se demostró que N<sup>1</sup>, N<sup>4</sup>-bis-(7-cloroquinolina-4-il) butano-1,4-diamina (**BCBD**), inhibe la incorporación de putrescina en eritrocitos infectados con *P. knowlesi* (*Ki* de 43,2 mM) así como el crecimiento *in vitro* de *P. knowlesi* (*IC*<sub>50</sub>= 0,02 μM para el BCBD y de 0,05 μM para la Cloroquina). La adición de poliaminas exógenas falla en invertir el efecto inhibitorio de BCBD *in vitro*, lo cual demuestra la fuerte inhibición del transporte y su importancia metabólica.

Teniendo en cuenta la conducta encontrada, los datos de actividad de la colección de los derivados N,N,N',N' diaminas tetrasustituidas (**NNN'N'-Tetra**) nos son útiles para comparar su perfil de actividad, con el encontrado para los derivados anteriores. En particular, estos derivados **NNN'N'-Tetra** poseen una demanda estérica similar a la familia de los 3,4-dibenciloxi, pero poseen menor densidad de carga sobre el nitrógeno por ser aminas terciarias. Es así que se prepararon análogos con sustituyentes 3,4-dibenciloxi y con los mismos largos de cadena explorados para las otras familias de compuestos. Los resultados de actividad antimalárica obtenidos para esta nueva colección mostraron la necesidad de poseer aminas

secundarias garantizar la actividad. Por otro lado, se observó cierta correlación en derivados de las diaminas disustituidas sin sustituyente sobre los anillos aromáticos (R=H), en donde los miembros con cadenas de 8 y 10 átomos de carbono presentaron las mejores actividades. En el caso de los sustituyentes más voluminosos, las mejores actividades las poseen los derivados R=4-BnO, siendo el derivado con n=6, el más activo. En el caso de los derivados R=3,4-diOBn el patrón resulta con dos mínimos de actividad, para n=3 y para n=8. Un dato llamativo es la actividad que presentan los análogos con n=3, en este caso, los tres derivados de N, N'-di poseen actividades similares. Este dato llamativo resalta la importancia de poseer aminas secundarias y ese efecto es mucho más importante que el volumen y tipo de sustituyente que presenta el anillo aromático.

En la **TABLA 13** se muestran los parámetros calculados de cuatro análogos preparados a partir de la propilendiamina. Mediante el uso de modulo de cálculo del programa (Marvinsketch 6.10)

**TABLA 13.** Comparación de propiedades fisicoquímicas para un mismo largo de cadena y diferentes volúmenes de sustituyentes



R	n	PSA2D	Energía de Dreiding kcal/mol	TPSA	VandWvol	VandW 3D
Bencil	3	33,22	40,37	43,1	262,42	442,31
4-BnO -Bencil	3	51,68	96,93	79,5	456,97	751,25
3,4diOBn-Bencil	3	70,14	163,49	107,1	650,58	1063,6
N,N, N',N'-Bencil	3	8,88	168,61	91,95	441,71	727,38

(PSA2D: superficie polar en 2D, TPSA: valor de PSA según las especies polares. VandWvol: Volumen de la superficie de Van der Waals según especies mas importantes, VandW 3D: Volumen de Van der Waals de la molécula en 3D )

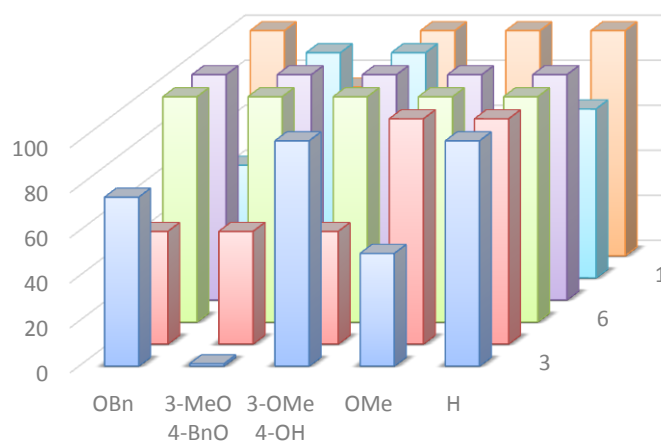
La disminución del valor de superficie 2D, de las N,N,N',N'-tetra está relacionado con la demanda estérica, que obviamente no se ve reflejado en la energía de Dreiding, ni en los otros indicadores de volumen que reflejan las interacciones de Van der Waals. Esto refuerza la observación empírica de la necesidad de carga sobre los grupos amino, para obtener actividad

biológica, ya que la demanda estérica en sí no resulta significativamente mayor a la de los derivados con sustituyente 3,4-dibenciloxi, en comparación

## 6.8 Análisis de los resultados actividad sobre *Toxoplasma gondii*.

Retrotrayéndonos a lo expuesto en el comienzo del capítulo, es interesante recordar el uso diferencial de las poliaminas por parte de los apicomplejos. Este hecho representa entonces una oportunidad para entender como un compuesto puede estar afectando esta ruta metabólica y así postular posibles blancos de acción para los compuestos preparados en este trabajo de tesis. Sin embargo es necesario tener en cuenta algunas diferencias sustanciales entre los ensayos realizados sobre *Toxoplasma gondii* comparados con los previamente analizados para *Plasmodium falciparum*. En primer lugar, el cultivo se realiza en fibroblastos infectados. Estas células no presentan el mismo comportamiento respecto de las células Vero usadas en ensayo directo de citotoxicidad y también posee diferencias respecto al glóbulo rojo, hospedadora del agente etiológico de la malaria, usado en el ensayo de inhibición del crecimiento de *Pf*. Sin bien poseemos los resultados de los ensayos directos sobre células Vero, el análisis de la citotoxicidad de los compuestos en las pruebas de actividad antiproliferativa de *Tg* permite tener otro resultado de citotoxicidad. En los ensayos en células infectadas, como los realizados para *Pf* y *Tg*, se está evaluando la capacidad de las moléculas para ser transportadas dentro del parásito, debiendo incorporarse primero a la célula hospedadora. A su vez, un compuesto no solo se enfrenta al pasaje transmembrana, sino que debe sortear también los mecanismos de detoxificación por parte de la célula.

Los resultados de actividad obtenidos para los primeros 30 análogos preparados se muestran en el **FIGURA 54**. Los ensayos se realizaron con los análogos a una concentración 1  $\mu\text{M}$ , y se evaluó tanto la viabilidad del parásito como la de los fibroblastos.



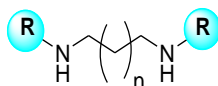
**FIGURA 52.** Actividad proliferativa sobre *Tg*. 100% indica ausencia de actividad o citotoxicidad a 1  $\mu\text{M}$  (ver tablas), 0 % indica actividad antiproliferativa con mantenimiento de viabilidad del fibroblasto.

Como se observa en la **FIGURA 52**, sólo para análogos de cadena corta ( $n = 3$  y 4) se obtuvieron buenos valores de inhibición a 1  $\mu\text{M}$ , con porcentajes de inhibición del 50% o menores. Cabe destacar que muchos de estos compuestos que no resultan activos a la concentración ensayada, pero poseen a concentraciones más altas (10  $\mu\text{M}$ ) un comportamiento diferente al encontrado a concentraciones menores, con mayores porcentajes de inhibición, siendo desafortunadamente también más citotóxicos para fibroblastos.

Con el objeto de determinar un valor ajustado de actividad y poder realizar una comparación con la actividad antimalárica, se eligieron los mejores candidatos y se determinaron sus valores de  $\text{IC}_{50}$ , cuyos resultados se presentan en la **TABLA 14**.

Los resultados de esta primera aproximación, indican que el comportamiento respecto a *P.f* resulta diferente, a pesar de que los compuestos más activos en *Tg*, resulten activos también en *P.f*. Otro aspecto interesante a tener en cuenta es la falta de analogía en la actividad entre *P.f* (ambas cepas) y *Tg*. Una posible explicación a esta diferencia podría no tener que ver con que las células hospederas resultan diferentes entre ensayos y a que el fibroblasto posee mecanismos de desintoxicación que podrían estar actuando y generando una diferencia en el modo de acción de los compuestos.

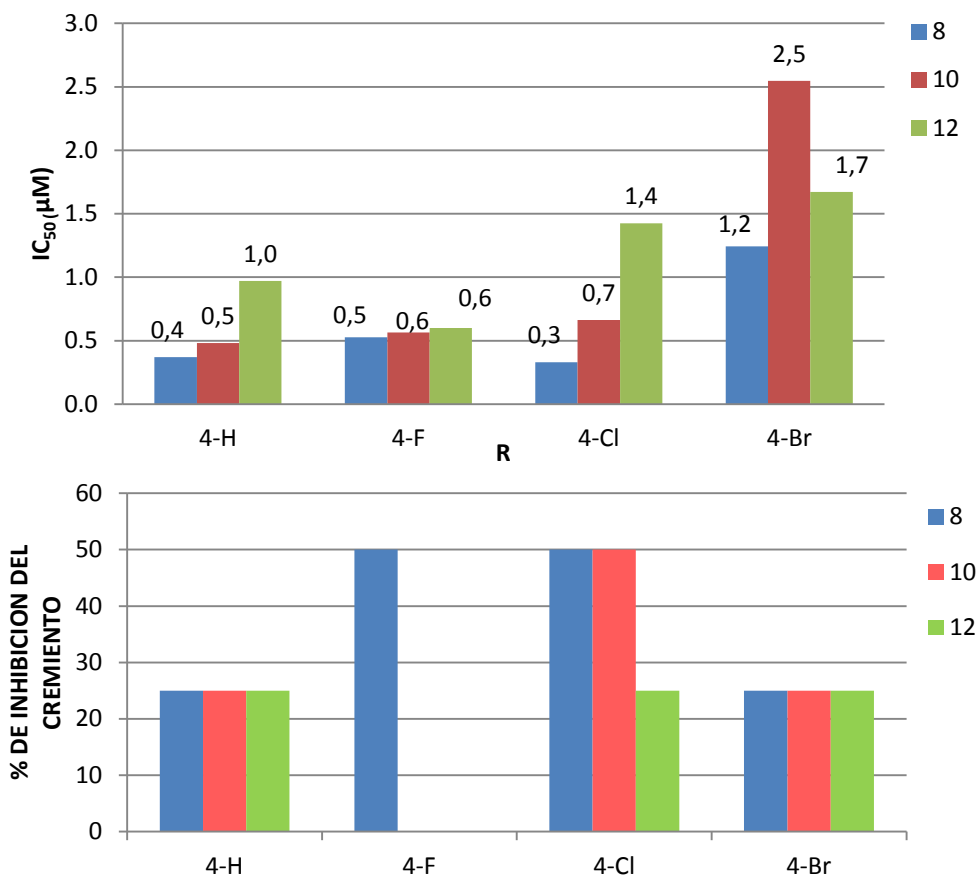
**TABLA 14.** Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos seleccionados contra *Tg* y sus propiedades fisicoquímicas.



n	R	IC <sub>50</sub> (μM)	TPSA	PM	ACEP	DADOR	volume
1	naftilo	1,74	24,054	354,4	2	2	352,25
2	naftilo	1,59	24,054	368,5	2	2	369,051
4	naftilo	4,45	24,054	396,5	2	2	402,655
1	4-BnO	2,97	42,522	466,6	4	2	458,658
1	4-BnO ,3-MeO	1,53	60,99	526,6	6	2	509,748

Este aspecto no puede ser descartado y requiere de estudios específicos que permitan confirmar que los compuestos fueron efectivamente excretados o metabolizados por las células hospedadoras

Siguiendo el mismo razonamiento usado en el análisis de la actividades obtenidas en *Pf*, se analizó el comportamiento de la biblioteca de análogos preparados para estudiar el efecto de la densidad electrónica sobre el anillo aromático. Los resultados obtenidos fueron comparados con la actividad antimalárica (**FIGURA 53**). Allí se aprecian diferencias en el comportamiento de varios compuestos, por un lado los análogos de R=4-F, el derivado N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(4-fluorobencil)octan-1,8-diamina **43** que posee una muy buena actividad antipalúdica (IC<sub>50</sub>= 0,5 μM) y al mismo tiempo posee actividad anti toxoplasma (inhibe un 75% el crecimiento a una concentración 1 μM). De igual modo ocurre con los análogos de 4-Cloro, tanto para *Pf* como para *Tg*, que presentan actividades de (0,3 μM, y 75% de inhibición) para el derivado de octilen diamina.

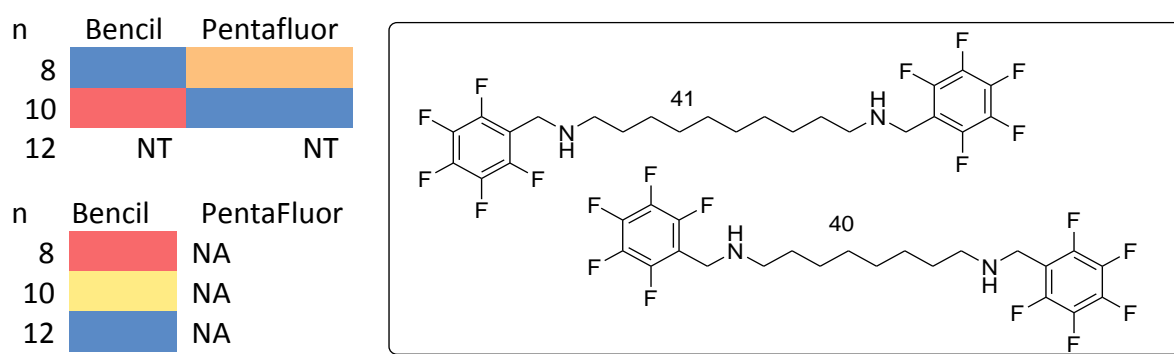


**FIGURA 53.** Comparación de la actividades de los compuestos entre *T. gondii* (% de inhibición de crecimiento) y los valores de IC<sub>50</sub>(µM) *P. falciparum* D6. Los derivados 4-F de n =10, 12, resultan inactivos.

En general la biblioteca en su conjunto no presentó un buen perfil de actividad sobre *T. g.*, a diferencia de las actividades en *Pf.*, con *T.g* sólo 10 compuestos con un porcentaje de inhibición mayor al 50% y de ellos solo 4 con un porcentaje mayor a 75, resultan interesantes. En los derivados 4-F, 4-Cl y 4-iPr, la actividad aumenta a medida que aumenta el número de carbonos, mientras que los derivados 4-Br y 4-Me tiene un comportamiento independiente del largo de cadena (**FIGURA 54**). Los compuestos seleccionados para realizarle una curva de crecimiento fueron los presentados en la **TABLA 12**, quedando los derivados halogenados para ser analizados posteriormente.

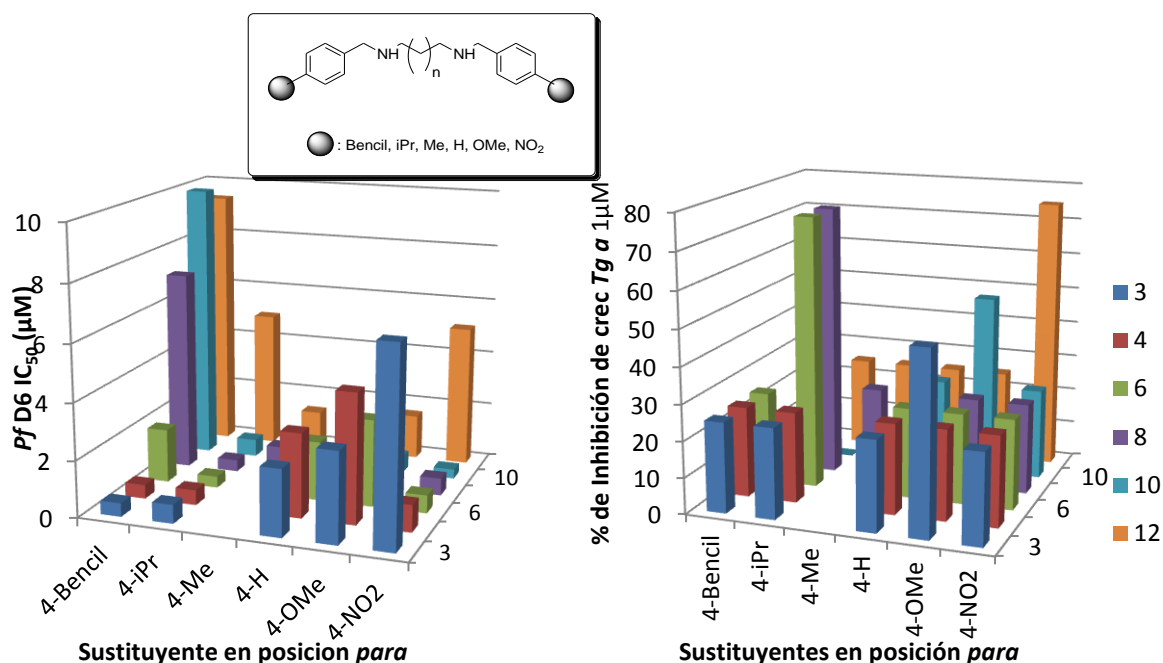
Un dato interesante en el análisis de esta biblioteca surge de observar los valores de inhibición que poseen los derivados de Bencil pentafluor bencilo respecto de su análogo bencílico. Los compuestos N1, N8-bis (perfluorobencil) octan-1,8-diamina (**40**), N1, N10-bis (perfluorobencil) decil-1,10-diamina (**41**) presentan actividad anti toxoplasma, pero no presentan actividad antimalárica. Esta particularidad luego fue chequeada, pero no se pudo obtener una curva de inhibición correcta, ya que solo se encontró inhibición del crecimiento a concentraciones altas. Esto no se repitió en *Tg* para los análogos bencílicos, aunque como

hemos visto previamente, estos últimos, si fueron activos en *Pf*. La **FIGURA 57** muestra con mayor claridad los resultados obtenidos tanto en *Tg* como en *Pf*.



**FIGURA 54.** Compuestos 28-30 (derivados de Bencil) 40-42(derivados de PentaFluor), y diferencias en las actividades contra *Tg*.(arriba),y contra *Pf*D6, abajo.(NA: no activo, ( $IC_{50} > 4,75ng/ml$ ); NT: No testeado)

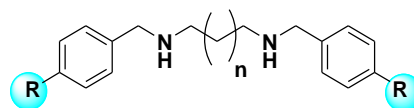
El resto de la biblioteca fue analizada comparando el comportamiento en *Pf* y *Tg* determinando la importancia que tiene la demanda estérica en la acción de estas moléculas. Para ello se comparan los valores de  $IC_{50}$  obtenidos en los ensayos de *Pf* y los de inhibición para *Tg*, de las familias que presentan grupos no halógenos en posición *para* y con un volumen menor al de un grupo benciloxi (**FIGURA 55**). Por tanto, se comparan las actividades de la familia derivada de 4-*i*Pr con los respectivos, 4-Metoxilo, 4-Nitro, 4-Metilo y con el 4-Bencilo En las tres primeras, la similitud es a partir de la posición 4 y el espacio tridimensional que ocupan los sustituyentes, siendo este espacio menor al encontrando para Bifenilo. En este análisis observamos al Metoxilo y al grupo Nitro sólo en cuanto al lugar que ocupan en el espacio y no en cuanto las propiedades del grupo en sí mismo, ya que pueden generar interacciones diferentes respecto del metilo y el isopropilo.



**FIGURA 55.**Actividades antimaláricas y anti toxoplasma de los derivados con diferentes volúmenes en posición *para*.

Los derivados de bifenilo poseen una gran demanda estérica, rigidez y baja polaridad en el sustituyente. Estos derivados fueron activos contra *Pf* y muy poco activos contra *Tg* y solo en los casos en que las cadenas carbonadas eran cortas, siendo posible que esté relacionado con su capacidad de formar  $\pi$ -Stacking e interacciones de Van der Waals. Para racionalizar este comportamiento comparando cálculos de parámetros topológicos. En la **TABLA 12** se observa que las familias con sustituyentes isopropilo como para los derivados nitro y metilo poseen similares valores de complejidad del anillo, superficie polar en 3D de las fuerzas de Van der Waals, y la Energía de Dreiding. Como se puede observar existen marcadas diferencias en los parámetros para estos cuatro descriptores. Estas características similares no se ven expresadas de igual modo respecto de la actividad biológica. Se observa un patrón de actividad en *P. falciparum* muy diferente para estas cuatro familias respecto de *Tg*. Una hipótesis sustentable, puede estar basada en un diferente metabolismo de los compuestos en el fibroblasto y comparado con el glóbulo rojo. Como ha sido mencionado anteriormente, los procesos de detoxificación y metabolismo pueden afectar la actividad de un dado compuesto.

**TABLA 15.**Resultados de las simulaciones de los derivados n=6, R=iPr, Me, NO<sub>2</sub>, Bifenilo para los distintos sustituyentes.



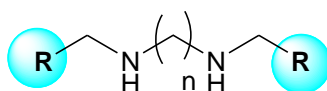
	iPr	Me	fenilo	NO <sub>2</sub>
<b>Sup.Polar 2D (pH=7.40)</b>	33,22	33,22	33,22	124,86
<b>Sup. polar 3D VdW</b>	719,9	598,41	479,32	615,77
<b>E. Dreiding (kcal/mol)</b>	85,95	54,66	107,61	70,1
<b>Complejidad de A.</b>	85	73	247	85

En particular, los análogos con el grupos nitro pueden generar radicales libres y especies tóxicas, siendo a veces mas tóxicos para el parásito que para el hospedador.<sup>138,139</sup> En el caso que estos mecanismos operen de manera diferencial, justificarían las diferencias encontradas en ambos parásitos. La imposibilidad de ensayar los compuestos con el parásito libre es en este sentido un inconveniente.

**TABLA 16.**Actividades de las bibliotecas seleccionadas según el tamaño

n	R=pirroilo		R= furfurilo		R= Naftilo	
	Pf D6 (μM)	Tg %Inh. (1 μM)	Pf D6 (μM)	Tg %inh. (1 μM)	Pf D6 (μM)	Tg %Inh. (1 μM)
3	NA	CT	NA	25	6,24	100
4	NA	NT	NT	25	5,54	75-80
6	6,59	NT	5,95	25	NT	NT
8	4,26	25	4,79	25	2,21	NT
10	1,67	25	4,33	25	7,69	50
12	NA	25	6,85	25	0,88	50

**CT: Citotóxico para fibroblasto, NR: no realizado, NT: No testado; NA: No activo**



Teniendo en cuenta, los interesante resultados encontrados para los derivados de bifenilo, decidimos completar el estudio con la determinación de actividad de los análogos de naftilo,

furfurilo y pirroilo.. Si bien la síntesis cursó sin inconvenientes, dos de los análogos no pudieron ser ensayados. Los resultados de actividad antimalárica se presenta en la **TABLA 16**.

El análisis de los resultados muestra ciertas particularidades que requieren ser estudiadas con detenimiento. Contrariamente a lo encontrado anteriormente, esta familias presentaron compuestos inactivos contra *P f* y con cierta nivel de actividad contra *Tg* .En general las actividades fueron menores y por lo tanto esta zona del espacio químico no resultaría de interés. En el caso de los derivados de pirroilo, fueron inactivos o de baja actividad tanto en *Pf* y como en *Tg*

Para el caso de los derivados de furfurilo, si bien todos resultaron activos, tanto en *Pf* como en *T.g* quedan fuera de rango para considerarlos como líderes. Una vez más existe un comportamiento asimétrico de los compuestos hacia los dos parásitos, en donde se observan una modesta actividad antimalárica, y pero una moderada a nula actividad anti toxoplasma Esto indicaría que el modo de acción sería diferente en ambos parásitos, pero debido a la falta de una tendencia marcada y diferencias de actividad, su análisis no resulta pertinente. Para la familia del naftilo las actividades siguieron la tendencia esperada, siendo moderadamente activos en ambos parásitos, siendo más activos los análogos más largos en *Tg* y los de cadenas más cortas lo de mejor actividad antimalárica. Un caso llamativo es el análogo (R=naftilo, n=3) que presenta la mejor actividad contra *P f*. Este resultado se correlaciona perfectamente con el encontrado para el derivado de bifenilo, lo que indicaría que la combinación de anillos aromáticos condensados y diaminas cortas generan análogos con gran potencial como agentes antimaláricos.



*“Cada día sabemos más y entendemos menos.”*

## **7. POLIAMINAS Y TRIPANOSOMATIDOS.**

## 7 POLIAMINAS Y TRIPANOSOMATIDOS.

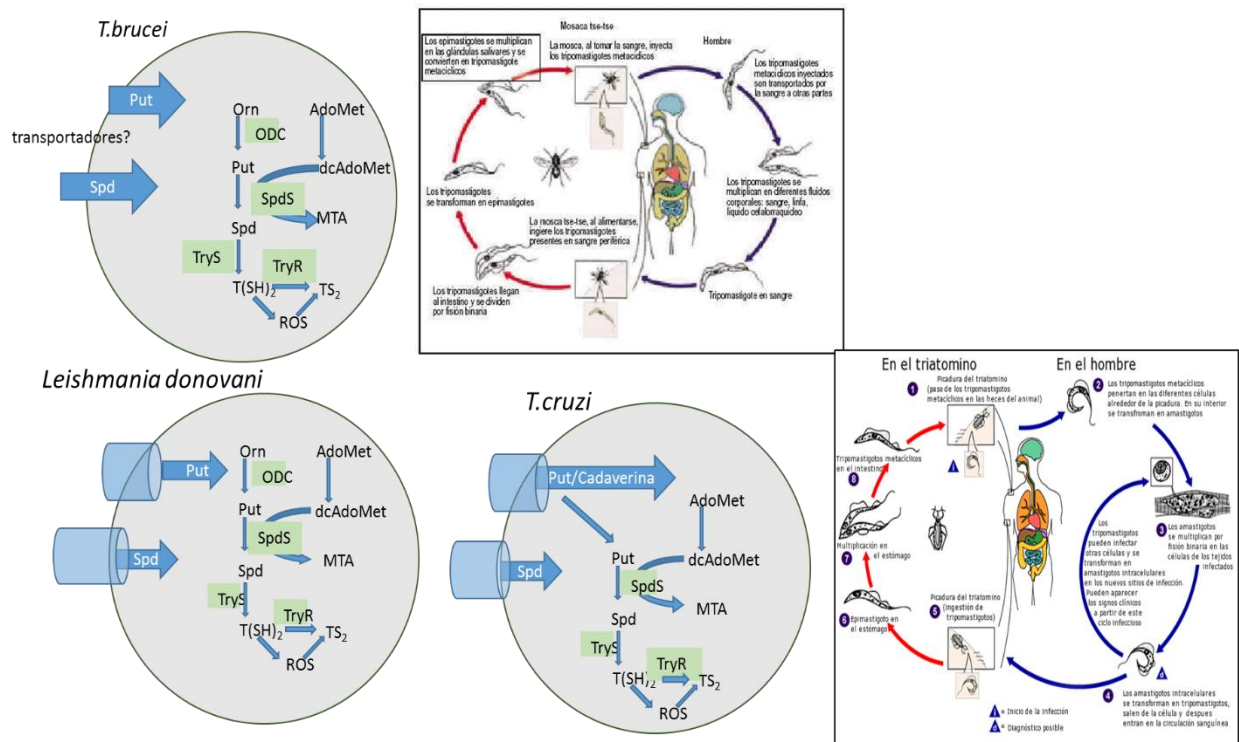
### 7.1 Poliaminas y su metabolismo en tripanosomatidos.



Los tripanosomátidos presentan similitudes y diferencias metabólicas los convierten en un objeto de estudio muy atractivo. Una de las diferencias más importantes se da en el ciclo de vida. *T. cruzi* y *L. donovani* poseen un estadio intracelular, mientras que *T. brucei* no lo posee.

La poliaminas juegan un importante rol importante en el ciclo de vida de los tripanosomátidos, siendo necesarias en la invasión, proliferación intracelular y la progresión de la infección.<sup>140</sup>

En cuanto a su metabolismo, *Tb* y *Ld* son similares pero difieren respecto de *Tc* debido a que esta última no posee la ODC (FIGURA 56). La ausencia de esta enzima en *T* convierten a este organismo en auxotrofo para putrescina.<sup>62, 141</sup>



**FIGURA 56** Comparación de rutas metabólicas de poliaminas en tripanosomátidos y sus ciclos de vida

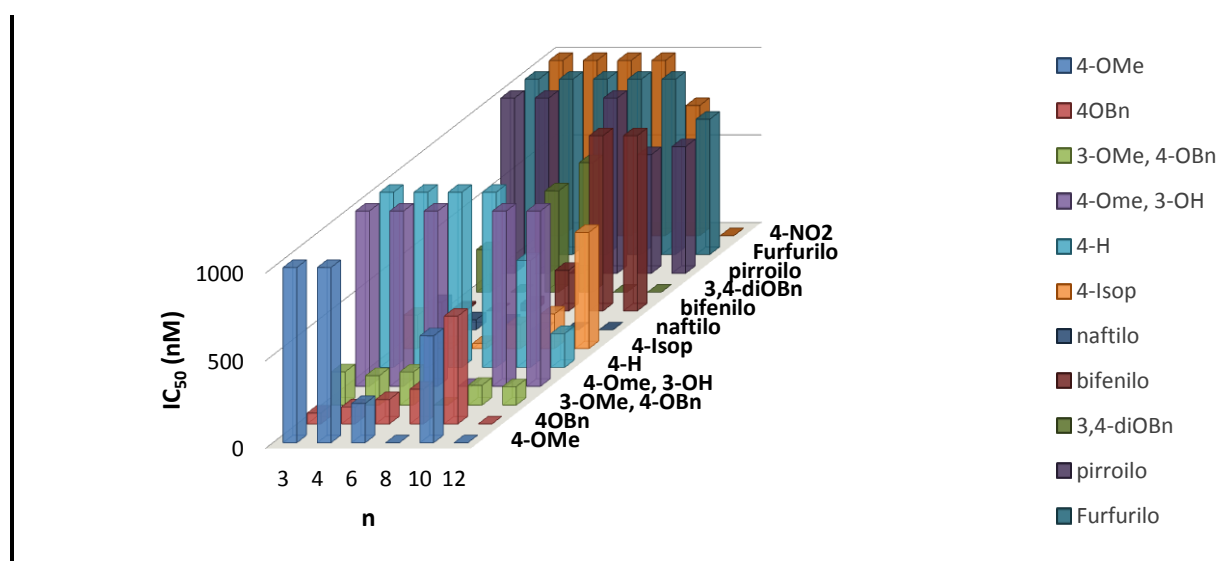
De manera resumida la biosíntesis incluye la espermidina sintasa (SpdS; EC 2.5.1.16) que transfiere un grupo aminopropilo proveniente de la S-adenosilmetionina descarboxilada (dcAdoMet) a la putrescina, generando espermidina, que continua hacia la formación de tripanotión.<sup>142,143,144</sup> Existe evidencias de la existencia de una ruta catabólica de las poliaminas, integrada por las enzimas poliamino-oxidasa (PAO, EC 1.5.3.13) y la

espermidina/espermina N-acetiltransferasa (SSAT, EC 2.3.1.57). Esta vía catabólica en tripanosomátidos no se ha sido validada aún

Existe consenso acerca de la existencia e importancia de los transportadores de poliaminas de bajo peso en las tres especies en estudio. En efecto, han sido identificados transportadores en *Tc*, *Ld* y *Tb*.<sup>145, 77, 76, 140</sup> Para el caso de *Tc*, los estudios en el genoma han permitido identificar unos 374 genes que representan canales iónicos, transportadores dependientes de ATP y transportadores secundarios.<sup>76</sup> Entre estos, se logró encontrar una familia de permeasas de aminoácido/auxina (AAAP, de su sigla en inglés) cuyo estudio permitió caracterizar un transportador de alta afinidad para espermidina, que en *T. cruzi* se biosintetiza en baja proporción.<sup>63, 146</sup>

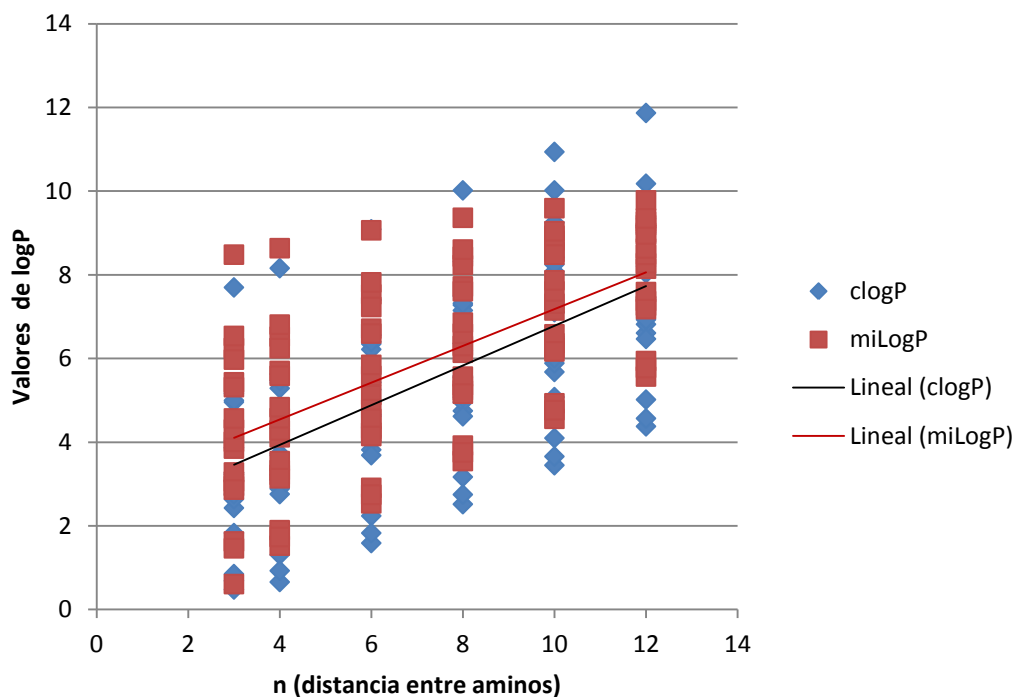
## 7.2 Actividad de las colecciones sobre *T. brucei brucei*.

En la **FIGURA 57** se muestran los resultados de la evaluación de las familias de compuestos estudiados en este trabajo de tesis en la forma sanguínea de *T. brucei brucei*. Uno de los problemas comúnmente encontrados en la determinación de actividad biológica de compuestos es la solubilidad. Si bien se cuenta con soluciones madre de los compuestos en DMSO, una vez que se adiciona al medio, el compuesto puede precipitar. Es por ello que los distintos compuestos tuvieron, en algunos casos problemas de solubilidad en el medio de cultivo utilizado. Sin embargo, salvo algunas excepciones, la mayoría de los compuestos pudieron ser ensayados.

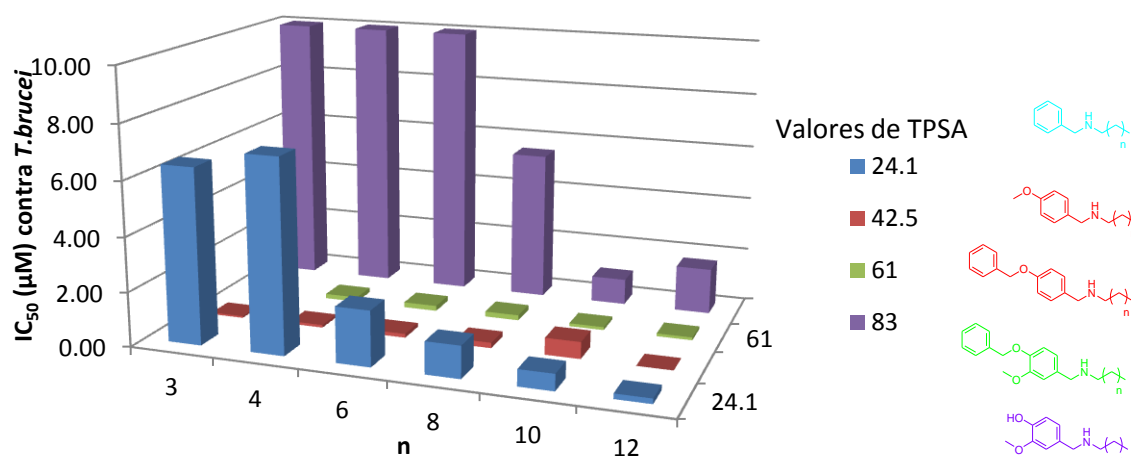


**FIGURA 57** .Gráfico de actividad contra *T. brucei brucei* forma sanguínea IC<sub>50</sub> (nM). Sustituyentes en posición 4 del anillo (eje Y) y largo de cadena (eje X).

A partir de estos datos se analizaron ciertos parámetros fisicoquímicos que influyen no sólo en la actividad de los compuestos, sino también en sus propiedades toxicológicas y farmacológicas. En particular es importante a la hora de evaluar el desempeño de la biblioteca el cumplimiento de las reglas de Lipinsky y la capacidad de atravesar membrana usando los valores de LogP, PM, TPSA.(FIGURA 58 y 59)



**FIGURA 58.** Correlación entre los valores de LogP calculados para la biblioteca y los valores de correlación de las respectivas líneas de tendencia.



**FIGURA 59.** Valores IC<sub>50</sub> medidos de la biblioteca de análogos con funciones oxigenadas contra n (largo de cadena) según el valor de TPSA (Å<sup>2</sup>)

La observación de la **FIGURA 58** claramente demuestra que, independientemente del sustituyente del anillo aromático, la lipofilidad es altamente dependiente del largo de la

cadena alifática, teniendo de este modo mejor perfil farmacofórico los análogos de mayor número de carbonos. Por otro lado, en la **FIGURA 59** se aprecia que los compuestos con cadenas de 10 y 12 átomos de carbono poseen el mejor perfil de actividad, con valores de TPSA entre 24,1 y 83. Los derivados con sustituyentes 4-Benciloxi y 4-Benciloxi, 3-Metoxi poseen buenas actividades en los análogos de cadena corta con valores de TPSA entre 42,5 y 61.

Un aspecto crítico para que un compuesto sea un buen candidato para el tratamiento de la tripanosomiasis africana, es que los compuestos sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. De este modo, además de la actividad, deberán cumplir este requisito, para lo cual deberán poseer valores de logBB entre 0,3 y 1,0. Como resultado de este análisis, los compuestos más activos que presentan el mejor perfil farmacológico son los mostrados en la

**TABLA 16.** Muestra los valores de inhibición  $IC_{50}$  contra *T. brucei*, y los valores de LogBB calculados junto con otros predictores.

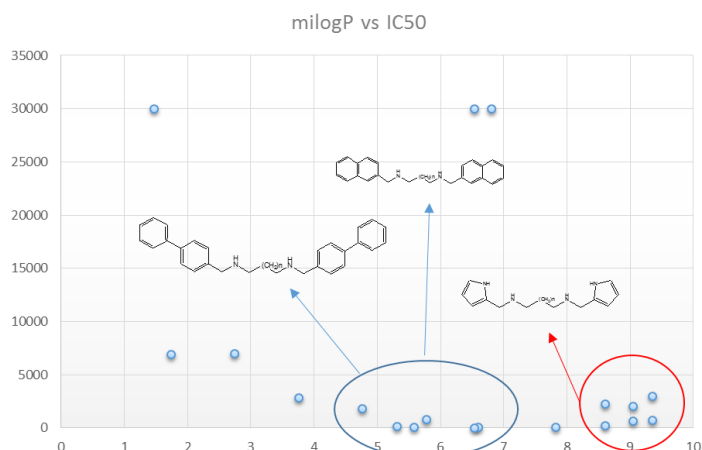
The diagram shows a piperazine ring with two nitrogen atoms. Each nitrogen atom is bonded to an R group (represented by a blue circle) and a hydrogen atom. The two nitrogen atoms are also connected to a chain of n carbon atoms, forming a piperazine derivative.

n	R	$IC_{50}(\mu M)$	area $\text{\AA}^2$	Volume $\text{\AA}^3$	logBB
12	Bencil	0,19	483,18	528,16	1,01
10	Bencil	0,61	443,03	485,64	0,85
8	Bencil	1,18	411,73	443,85	0,74
12	4-BnO	SP	674,4	780,69	1,26
10	4-BnO	0,62	634,89	738,68	1,11
8	4-BnO	0,2	595,35	696,58	0,96
12	4-BnO , 3OMe	0,11	738,95	837,91	1,08
10	4-BnO , 3OMe	0,11	708,46	797,35	0,97
8	4-BnO , 3OMe	0,19	661,7	755,4	0,78

Al momento de contar con estos compuestos y sus resultados de actividad decidimos expandir el estudio hacia el espacio químico adyacente con el fin de explorar cuales era la respuesta frente a una mayor demanda espacial y a la presencia de heteroátomos en el anillo. Se prepararon con este fin, derivados de metilen-bifenilo, metilen-naftilo, metilen-furfurilo y metilen-pirroilo y se compararon con los derivados de bencilo. Los resultados de la actividad de esta nueva familia y la lipofilidad calculada se muestran en la **FIGURA 60**

	naftilo	bifenilo	Bencilo	pirroilo	Furfurilo
3	156	11	6450	30000	30000
4	57	NT	7080	30000	6942
6	45	42	2030	NT	6958
8	NT	232	1175	2278	2825
10	NT	2030	610	677	1829
12	NT	2983	193	723	772

Activo	No Activo
50	30000

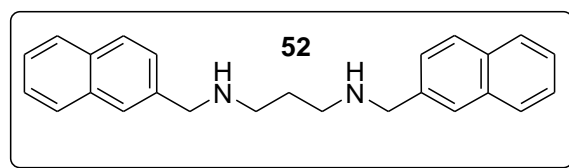


**FIGURA 60.** Los valores de la tabla corresponden al  $IC_{50}$  (nM). En el gráfico se muestran los valores de  $miLogP$  vs  $IC_{50}$  en nM, destacándose las estructuras correspondientes a cada uno.

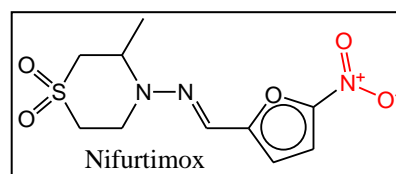
Los análogos con sustituyentes pirroilo y furfurilo presentaron valores de TPSA entre 40 y 55  $\text{\AA}^2$  y de  $miLogP$  menores a 6,11; presentando en su mayoría, pesos moleculares menores a 500 Da. Estos compuestos cumplen entonces con tres de las reglas de Lipinsky, teniendo perfiles atractivos como candidatos a drogas. Los compuestos más activos de esta región del espacio químico explorado resultaron aquellos que presentan bajo peso molecular. Esto ocurre en particular con los derivados de naftilo y bifenilo y si bien el mapa de calor (**FIGURA 60**) muestra derivados de furfurilo y pirroilo activos de alto peso molecular, estos no resultan significativos al observar el comportamiento general de la biblioteca. Es interesante notar que estas dos familias muestran correlación entre el largo de cadena y actividad, disminuyendo su  $IC_{50}$  a medida que aumenta el largo de cadena.

Un problema encontrado en el caso de los análogos del naftilo de  $n= 8,10, 12$  (**52**, **53**, **54** y el derivado de pirroilo de  $n=4$  (**77**) es que resultaron poco solubles y no pudieron ser ensayados. Una posible solución a este problema fue preparar los clorhidratos correspondientes. Si bien se completó la preparación, los ensayos no se pudieron terminar para ser incluidos.

Como conclusión de este estudio, se puede mencionar que en los análogos de furfurilo y pirroilo, existe aumento de la actividad en el sentido opuesto al encontrado para los derivados de bencilo, fueron más activos a medida que aumenta la distancia entre los grupos amino. Esta diferencia en el perfil de actividad, nos indicaría un posible cambio en el blanco molecular relacionado al volumen del sustituyente. Si bien resulta necesario el estudio diferenciado de los mecanismos, los resultados prometedores de los derivados de naftilo los posiciona como interesantes líderes para un futuro desarrollo.

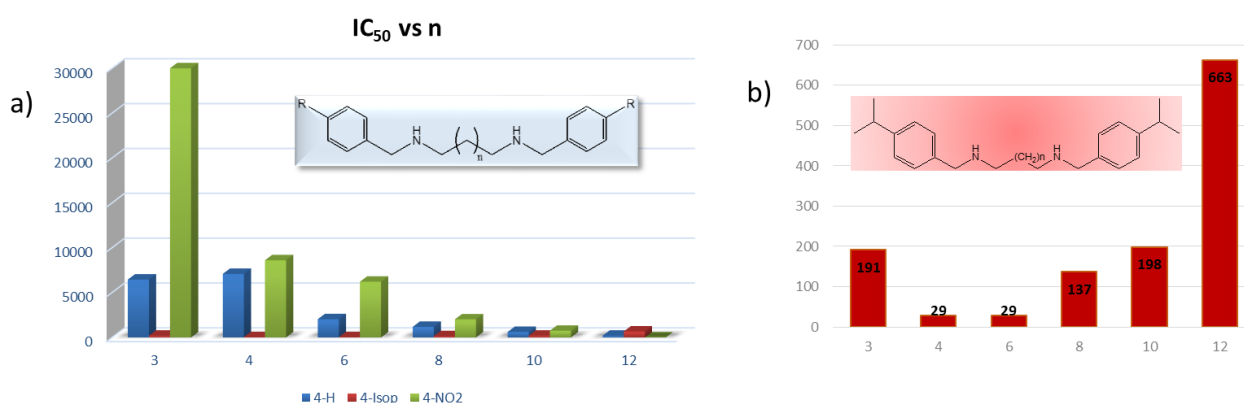


Otros porción del espacio químico estudiado proviene de derivados 4-Nitro y 4-iPr.(FIGURA 61 ) El uso de nitroderivados unidos a heterociclos como farmacóforos ha sido ampliamente utilizado, tanto en drogas antibacterianos, como



triptanocidas. En este último caso, se destaca el Nifurtimox, usado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. El modo de acción de esta droga ha sido ampliamente estudiado e involucra la generación de especies reactivas de oxígeno y recientemente Wilkinson y otros, encontraron que una nitroreductasa tipo II presente sólo en el parásito, que produce la activación generando derivados citotóxicos.<sup>70, 147</sup>

El análisis de los resultados para los derivados nitro e isopropilo mostraron una interesante correlación entre el largo de cadena y la actividad, comportamiento observado también para los análogos de bencilo, si bien los valores de inhibición de estos últimos no fueron mejores. (FIGURA 61). En el caso de los derivados nitro, este comportamiento nos permite inducir que existiendo correlación entre la actividad y el largo de cadena, la activación por una nitroreductasa y la liberación de metabolitos tóxicos no sería el principal mecanismo de acción. De todos modos, esto no debe ser descartado y requería estudios ulteriores con la enzima.



**FIGURA.61** (a) Actividad tripanocida (IC<sub>50</sub>, nM) en forma sanguínea de *T. brucei*. n=largo de cadena; R= H; i-Pr y NO<sub>2</sub>. (b) Correlación actividad-largo de cadena para los derivados de isopropilo.

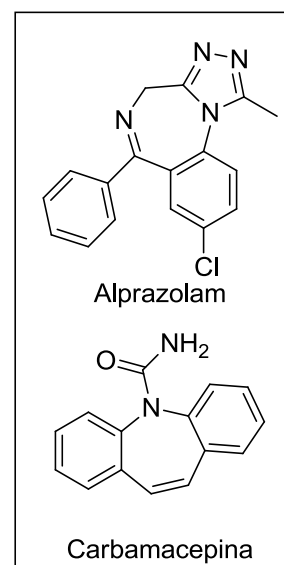
Para el caso de los derivados de R=4-iPr el comportamiento resulta diferente respecto de los otros dos. En primer lugar, el perfil de toda la serie es mejor que los anteriores, teniendo el menos activo un valor de IC<sub>50</sub>= 600 nM (n=12) siendo los más activos los derivados de cadena corta (n =4 y 6, IC<sub>50</sub>= 29 nM) ) (FIGURA 61b). Es de destacar en esta serie de análogos, los nitro derivados mostraron un comportamiento diferencial con respecto a los que poseen isopropilos en sus estructuras. En efecto, estos últimos poseen una relación estructura-actividad que sigue la misma conducta encontrada para los derivados R= 4-BnO , 4-fenil entre

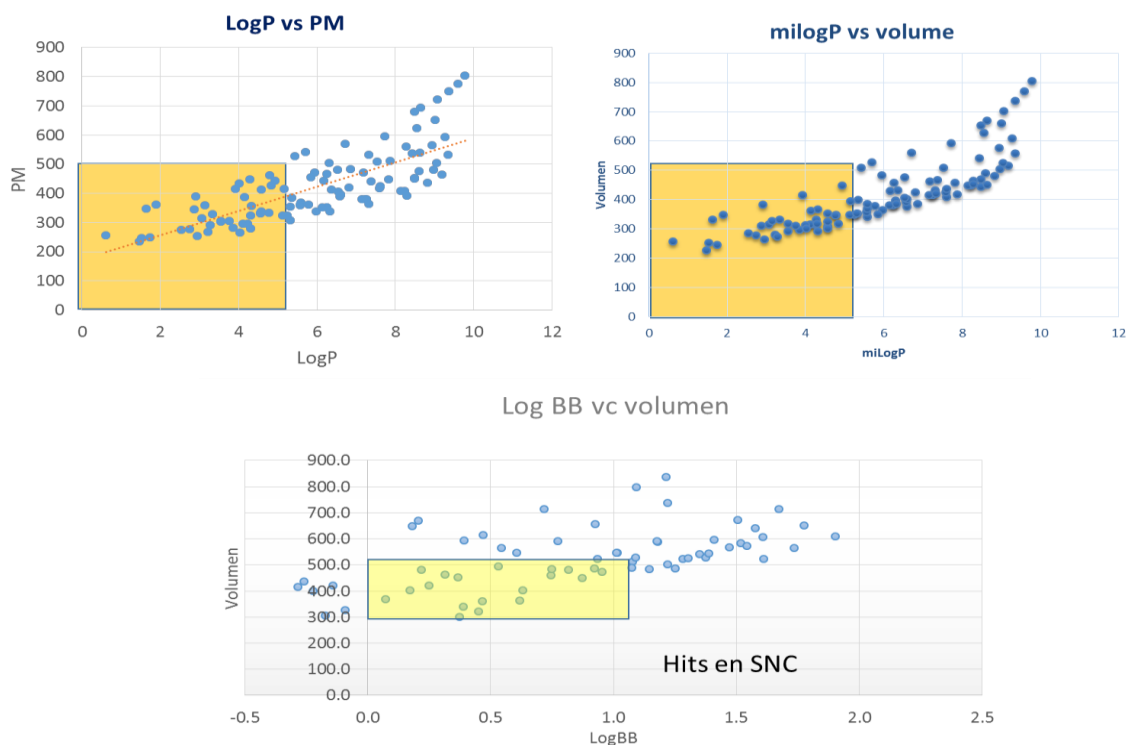
otros. En todos estos casos los compuestos con diaminas de 4 ó 6 átomos de carbono fueron los más activos, disminuyendo la actividad a medida que aumenta el largo de cadena. Por el contrario, en el caso de los compuestos R=4-NO<sub>2</sub> los mismos tuvieron un comportamiento contrario, aumentando la actividad con el largo de cadena. Este hecho llamativo podría indicar un respuesta ligada a la menor densidad electrónica en el anillo aromático que producen los grupos nitro, teniendo el isopropilo un comportamiento opuesto.

Contando con la actividad de la totalidad de los compuestos preparados se completó el análisis del perfil farmacológico determinándose los valores de ADME. Es importante destacar en este punto, que tanto ClogP, PSA y la polarizabilidad son parámetros ligados fuertemente al transporte pasivo a través de la membrana hematoencefálica. En cambio, la lipofilicidad es un factor determinante en la farmacocinética y farmacodinámica de las drogas. En todos los casos estudiados de drogas que actúan a nivel del Sistema Nervioso Central, como es el caso de carbamazepinas, alprazolam y otros, el aumento del LogP produce un aumento en capacidad de atravesar la membrana mediante mecanismos pasivos.

En cambio, el aumento de la superficie polar (PSA o TPSA), con la concomitante disminución del LogP, contribuye negativamente a la difusión BH (Barrera Hematoencefálica).

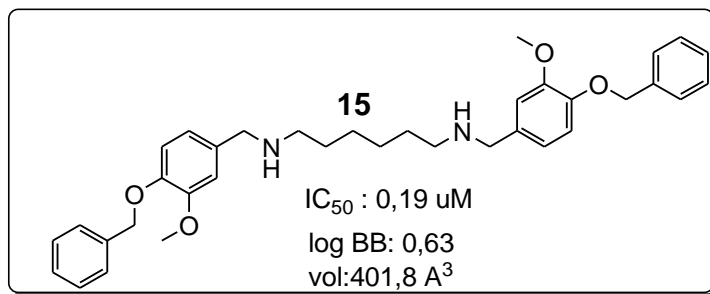
En la **FIGURA 62** se muestran las correlaciones entre parámetros farmacológicos para todos los compuestos preparados. Como se puede observar existe un 27 % de la colección con valores de Log P y PM, menores a 5 a 500 respectivamente. A su vez, un 27 % posee un volumen menor a 500 Å<sup>3</sup> y una miLogP menor a 5. Finalmente, el 30% posee valores de Log BB entre 0,3 y 1,0 y volumen entre 300 y 500 Å<sup>3</sup>.





**FIGURA 62.** Correlación entre PM vs.logP, miLogP vs.volumen y logBB vs.volumen

Tomando los análogos que cumplen estos requisitos y los mejores perfiles de actividad antiparasitaria, podemos concluir que los compuestos **15**, **31**, **32** y **58** son los que poseen el mejor perfil como posibles drogas contra la tripanosomiasis africana. En función de los valores de ADME encontrados, los mismos tendrían altas chances de cruzar la barrera hematoencefálica, hecho que desde luego deberá ser demostrado experimentalmente.



### 7.3 Actividades de las colecciones sobre *T. cruzi* y *L. donovani*.

#### 7.3.1 Introducción.

En trabajos pioneros de Bitonti y otros. y Woster y otros,<sup>148,149,150</sup> se estudiaron derivados de poliaminas tanto en parásitos, como en líneas celulares de cáncer. El racional detrás de este esfuerzo se encontraba en el rol fundamental que juegan estos metabolitos en el desarrollo en células, en el metabolismo redox, y en relación con el ADN. Ejemplo de estos esfuerzos se

encuentran los análogos de la familia MDL, mencionados previamente. Estos compuestos fueron ampliamente estudiados, tanto en líneas celulares oncológicas, como en tripanosomátidos y *Plasmodium spp.*<sup>98</sup> En el caso de la actividad en tripanosomátidos, y en especial para *Ld*, fue posible identificar el modo de acción, teniendo tanto *in vitro* como *in vivo*, un efecto sinérgico con el D,L- $\alpha$ -DFMO.<sup>132</sup> Al estudiar el efecto conjunto de las poliaminas naturales y las drogas de la familia de los MDL y el D,L- $\alpha$ -DFMO, observaron que la biosíntesis de poliaminas era inhibida por el D,L- $\alpha$ -DFMO por inhibición específica de la ODC. Esto a su vez producía una disminución de los niveles de putrescina y espermidina, en cambio, el MDL 27695 no alteraba los mismos. En el estadio epimastigote, *Tc* es incapaz de sintetizar putrescina *de novo* desde ornitina o arginina, siendo el tratamiento con D,L- $\alpha$ -DFMO inefectivo, sin elevar la concentración de putrescina.<sup>75, 76, 140</sup> Esto contrasta con los otros tripanosomatidos que contienen ODC activa, como *Ld*, *Tb* y *C. fasciculata*, en los cuales el tratamiento con D,L- $\alpha$ -DFMO incrementa su concentración.<sup>151</sup>

Con respecto al mecanismo de acción de diaminas en su actividad contra células cancerosas y sobre las interacciones con el ADN, los estudios desarrollados por Burns y otros,<sup>79</sup> Casero Jr y otros,<sup>152,153</sup> Igarashi y otros<sup>154,155,156</sup> sirven como punto de partida para postular probables mecanismos de acción.<sup>145</sup> En efecto, los estudios permitieron a los autores postular que grupos amino interaccionarían con los grupos fosfodiéster del esqueleto de los ácidos nucleicos, mientras que las porciones aromáticas de los anillos acrecentaría la afinidad en los sitios hidrofóbicos (posiblemente mediante una unión intercalativa). Esto último pudo demostrarse en los resultados sobre líneas celulares de cáncer en donde se pudo obtener una mejora de hasta 300 veces en el poder citotóxico mediante modificaciones sobre los anillos aromáticos de un esqueleto central de diaminas N,N'-disustituidas.<sup>157,108</sup> Estos antecedentes, sumado al hecho de contar con las actividades en tres parásitos que poseen un metabolismo de poliaminas distinto y en el caso de *Tc* y *Ld*, resultados en otro estadios de sus ciclos de vida, nos permitirán analizar que características proveen los mejores perfiles de actividad y cuales son las propiedades fisicoquímicas necesarias que permiten obtener los mejores resultados.. De manera complementaria, el estudio de exposición prolongada (MTA), estudios enzimáticos y de rescate, permitirán obtener evidencias sobre el mecanismo de acción y proponer posible blancos de acción que contribuyan en el mecanismo.

## 7.1 Resultados obtenidos del ensayo de HTS.

Los estudios con derivados de poliaminas mayormente han sido ensayados en epimastigotes de *Tc* o promastigotes de *Ld*, sin haberse determinado la actividad en el estadio amastigote de ambos parásitos. Doyle, Engel y otros han demostrado que los ensayos en amastigotes intracelulares resultan mejores predictores de la actividad *in vivo* respecto de los estudios en epimastigotes. Los ensayos en epimastigotes no son útiles en modelos crónicos, mientras que los ensayos en amastigote tanto axénicos como intracelulares, permiten predecir mejor el comportamiento, pero lo que no permiten los estudios intracelulares es determinar si el compuesto recibe modificaciones que lleven a su actividad.<sup>158</sup> El estudio inicial de las actividades se realizó en los estadios promastigotes (*Ld*) y epimastigote (*Tc*), habiendo además determinado la actividad en el estadio amastigote de ambos parásitos. El hecho de poder determinar la actividad en ambos estadios permite obtener un perfil de relación estructura-actividad comparativo entre estadios.

Los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de epimastigotes y amastigotes de *Tc* para toda la colección se presentan en la **FIGURA 63**. En primer lugar se debe aclarar que no fue posible obtener todos los resultados en epimastigotes debido a problemas de solubilidad. Sin embargo, este problema no existió en el ensayo de amastigotes, probablemente debido a que los medios en los que se realizan ambos ensayos son diferentes.

El análisis de la actividad en epimastigotes mostró que los compuestos con funciones oxigenadas (R= 4-benciloxi y R= 4-benciloxi 3-metoxi-) se halla en niveles submicromolares, mientras en general la actividad del resto de la biblioteca se encuentra a nivel micromolar, lo que muestra la bondades de la estructura privilegiada seleccionada, convirtiéndose en un excelente objeto de estudio.

El análisis de la **FIGURA 63** muestra que existen zonas calientes, donde se observa una mayor actividad de los compuestos y que estas difieren de un estadio u otro. Estas diferencias podrían deberse a activaciones intracelulares en el hospedador que generarían compuestos más activos u otro mecanismo que permita facilitar el ingreso al parásito aumentando la concentración interna. Este es el caso de los análogos de isovainillina, que tienen una mejor actividad en amastigotes que en epimastigotes.

<b>A</b>	4-MeO	4-BnO	4-BnO 3-MeO	3,4-diOBn	4OMe 3OH	4-H	naftilo	Bifenilo	4-iPr	4-NO2	Furfuiloilo	Pirrololoilo
3												
4												
6											NT	
8							NT					
10												
12												



<b>E</b>	4-MeO	4-BnO	4-BnO 3-MeO	3,4-diOBn	4OMe 3OH	4-H	naftilo	Bifenilo	4-iPr	4-NO2	Furfuiloilo	Pirrololoilo
3												
4				SP				SP	[			
6								SP			SP	
8							SP	SP				
10				SP			SP					
12	NT	NT		SP			SP	SP	SP	SP		



**FIGURA 63.** Arriba: Mapa de calor amastigotes de *T. cruzi* cepa Y en células de musculo fetal bovino BESM ( $IC_{50}$ , 30 se refiere a mayor de 20  $\mu M$ , o citotoxicidad a 10  $\mu M$ ). Abajo: Mapa de calor del comportamiento en epimastigote de *T. cruzi*. SP: problemas de solubilidad. NT: No ensayado

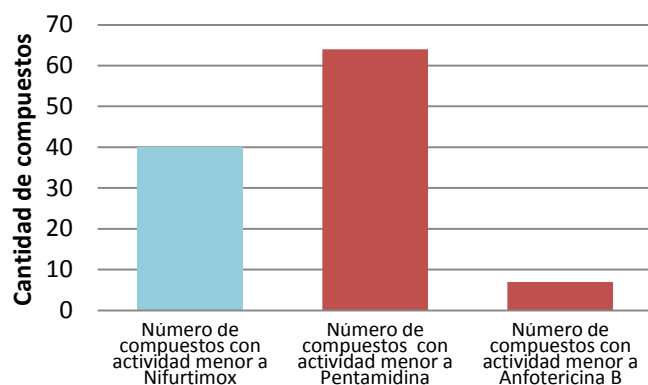
La **FIGURA 64**, permite observar el relativo éxito de las bibliotecas obtenidos en función de la comparación con las drogas de referencias usadas como control (cuyos descriptores farmacológicos se muestran en la **TABLA 16**) en el ensayo con los parásitos extracelulares.

**TABLA 17** Propiedades de las tres drogas usadas como control.

	milogP	TPSA	AC	DA	Ld ( $IC_{50}$ )	Tc ( $IC_{50}$ )
<b>Anfotericina</b>	2,489	319,609	18	13	0,001	
<b>Pentamidina</b>	0,709	108,708	8	0	4,4	
<b>Nifurtimox</b>	1,494	118,218	6	6		2.1

AC: aceptores de pte H, DA: Número de atomos dadores de pte. H.

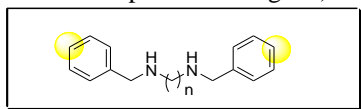
En el caso de *T.c.* 40 compuestos fueron más activos que nifurtimox y para *L.d.* más de 63 y 7 resultaron más activos que pentamidina y anfotericina B, respectivamente.



**FIGURA 64.** Comparación de actividad parasitaria de la colección contra drogas control.

El análisis de los resultados obtenidos requiere un estudio comparativo por familia. En el caso de los análogos de *N,N'*-bis-bencil-diamina, las diferencias en las actividad se pueden racionalizar a partir de la modificación sobre la posición *para*, con la presencia de la función oxigenada. La **TABLA 18** muestra los parámetros mostrados previamente para estos derivados (R=H), junto con las actividades en amastigotes y epimastigotes de *Tc* y en promastigote de *Ld*.

**TABLA 18 .** Características fisicoquímicas e IC<sub>50</sub> (μM). (ac: Aceptores de puente Hidrogeno; da: dadores de puente Hidrogeno)



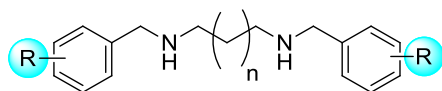
n	Solubilidad	miLogP	TPSA	ac	da	<i>L.d</i> (p)	<i>T.c</i> (e)	<i>T.c</i> (a)
3	-2,87	2,951	24	2	2	2,8	10	1
4	-3,14	3,221	24	2	2	5,0	10	20
6	-3,68	4,232	24	2	2	4,1	10	20
8	-4,22	5,242	24	2	2	3,3	10	30
10	-4,76	6,252	24	2	2	0,6	8,1	20
12	-5,3	7,263	24	2	2	0,6	0,5	30

Como se puede observar en las formas extracelulares la actividad mejora con el aumento de la cadena carbonada. El resultado de actividad obtenido tanto por nuestros colaboradores, como por otros grupos de trabajo sobre compuestos estos compuestos ó similares, se encuentran dentro del mismo rango para cepas diferentes de *Ld* o *Tc*. La particularidad de esta familia, es que el miembro más activo en el estadio amastigote es el de n=3, en cambio en las formas libres ocurre los mejores resultados se dieron para las compuestos de cadenas largas.

En el caso de los análogos oxigenados, se observa en los compuestos de n=6, que las actividades en epimastigotes de *T.c.* para los análogos de R=4-Metoxi y los R=3-Hidroxi-4-Metoxi, los cuales eran inactivos, pasan a tener actividad en amastigotes. (**TABLA 19**) Ambas

familias poseen diferencia importantes en el número de átomos donores y aceptores de puente hidrógeno, distinta densidad electrónica sobre el anillo, diferencias en superficie polar, etc.

**TABLA 19.** Resumen de actividades y propiedades fisicoquímicas de análogos con funciones oxigenadas.



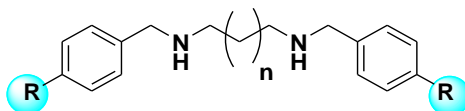
R	n	sol	miLogP	TPSA	ac	da	L.d (p)	T.c (e)	T.c (a)
4-metoxi	1	-2,91	3,06	42,52	4	2	1,24	10	20
	2	-3,18	3,33	42,52	4	2	8,52	10	20
	4	-3,72	4,32	42,52	4	2	6,73	10	0,2
	6	-4,26	5,35	42,52	4	2	1,56	10	30
	8	-4,8	6,37	42,52	4	2	1,45	2,3	20
	10	-5,34	7,37	42,52	4	2	1,75	NT	30
R	n	sol	miLogP	TPSA	ac	da	L.d (p)	T.c (e)	T.c (a)
3-hidroxi-4-metoxi	1	-2,31	1,63	82,98	6	4	NA	10	30
	2	-2,85	1,89	82,98	6	4	NA	10	30
	4	-3,39	2,91	82,98	6	4	43,75	10	3,2
	6	-3,93	3,92	82,98	6	4	44,41	10	30
	8	-4,2	4,93	82,98	6	4	4,49	10	13
	10	-5,01	5,94	82,98	6	4	4,31	3,938	30

De las dos series, sólo existen dos derivados de 4-metoxi que puedan calificar como buenos candidatos. Por una lado, en promastigote de *L. donovani* encontramos en los derivados de 4-Metoxi (n=3) posee una actividad cercana a 1  $\mu\text{M}$ : Si bien estos compuestos no poseen índice de selectividad alto (ver anexo) presenta características que pueden ser interesantes en futuras campañas de optimización, que incluyen su estructura simple y fácil preparación. Por otro lado, en *T. cruzi*, resulta atractivo la actividad en amastigotes del derivado de la 1,6-hexilendiamina que presenta actividad submicromolar (0,2  $\mu\text{M}$ ). Para el caso del amastigote de *L. d.* no se determinó el  $\text{IC}_{50}$ , pero en el estudio de HTS a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  presentó una inhibición del crecimiento del 65% (ver Apéndice), para un nivel de citotoxicidad a esa concentración del 56%.

Este tipo de comportamientos de los compuestos se intenta explicar a partir de la solubilidad de los mismos a membranas y su posterior concentración dentro de las células.

Para entender aún mejor la posible relevancia del aporte del volumen, en esta posición en la actividad de estos análogos. Se comparan los derivados 4-Benciloxi, 4-Benciloxi 3-Metoxi (TABLA 20).

**TABLA 20:** Comparación de actividad en tripanosomatidos para derivados oxigenados.

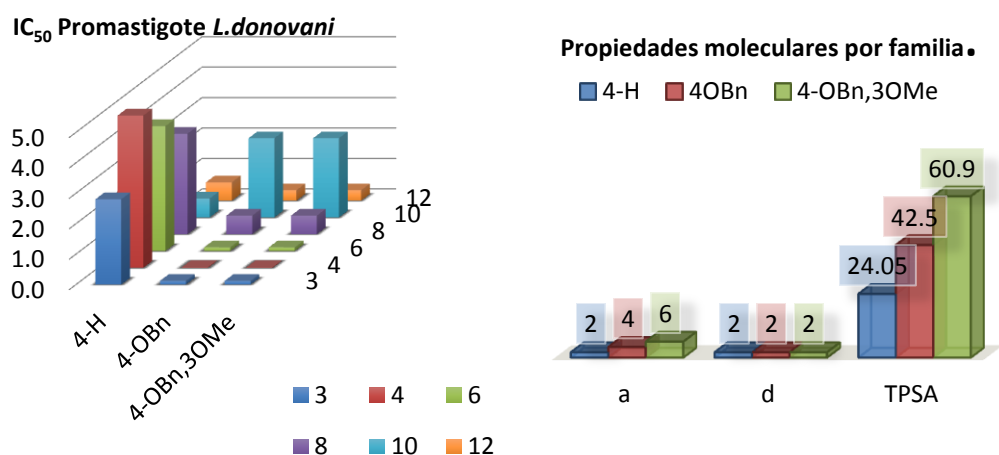


n	4-H			4-BnO			4-BnO , 3-MeO		
	<i>L.d</i> (p)	<i>T.c</i> (e) $\mu$ M	<i>T.c</i> (a) ( $\mu$ M)	<i>L.d</i> (p)	<i>T.c</i> (e) $\mu$ M	<i>T.c</i> (a) ( $\mu$ M)	<i>L.d</i> (p)	<i>T.c</i> (e) $\mu$ M	<i>T.c</i> (a) ( $\mu$ M)
1	11,01	10,00	1,00	0,26	0,78	1,40	0,23	0,81	30,00
2	18,63	10,00	20,00	0,04	0,76	20,00	0,24	0,73	20,00
4	13,83	10,00	20,00	0,24	1,83	0,36	0,21	0,74	20,00
6	10,17	10,00	30,00	1,14	0,99	12,0	0,22	0,82	20,00
8	1,76	8,10	20,00	4,60	10,00	14,0	0,02	0,80	20,00
10	1,58	0,56	30,00	0,57	NT	30,00	1,10	0,97	30,00

*T. cruzi* (a) : amastigotes de *T. cruzi* el valor representado indica 30, no activo, citotóxico a 20  $\mu$ M ; y 20 :No citotóxico, no activo a la concentración de 20  $\mu$ M; cuando hay un valor distinto de 20 o 30 indica el IC<sub>50</sub>. NT: No testeado; SP: problemas de solubilidad.

En el caso de amastigotes de *Tc*, los derivados R=4-BnO presentan actividad dependiente del largo de la cadena carbonada, siendo el más activo el derivado con n=6 que posee un excelente IC<sub>50</sub> de 0,36  $\mu$ M. Con estos datos, la hipótesis a confirmar en modelos animales, es si estos compuestos permiten para tratar ambas etapas de la enfermedad. A diferencia de los que ocurre en epimastigotes, los derivados de R=3-MeO,4-BnO son prácticamente inactivos en amastigotes.

Continuado con el análisis, en la **Figura 65** se grafica la relación entre la actividad en promastigotes de *Ld* y el largo de cadena. Se observa que los miembros con cadenas cortas son más activos. A su vez, la actividad mejora a medida que aumenta el número de átomos aceptores de puente hidrogeno, a pesar de que no cambia la cantidad de átomos donores. Esto supone un aumento del TPSA y del miLogP, lo cual por un lado, aumenta la permeabilidad de membrana y por otro las interacciones en el sitio de unión. Este hecho queda demostrado al observar el comportamiento de la familia de R=4-BnO en amastigotes de *Ld* en donde 4 de ellos son activos a nivel intracelular (ver anexo).



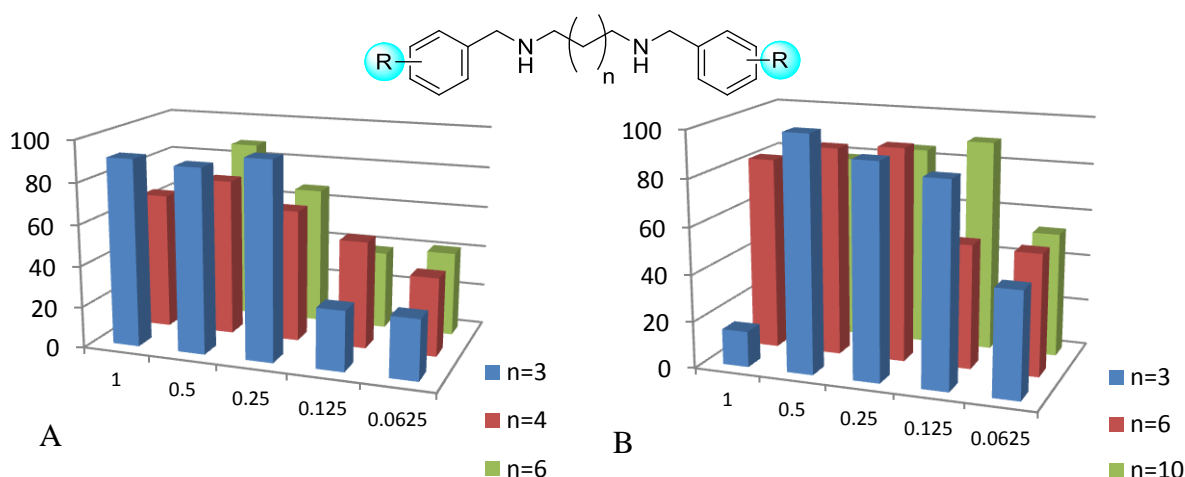
**FIGURA 65.** Extracto de las actividades (IC<sub>50</sub>) de Promastigotes de *L.d* en  $\mu\text{M}$  y las propiedades moleculares de la familia.(a: aceptores de pte H, d: dadores de pte)

Para reafirmar los conceptos observados en *Tc*, los valores en *Ld* resultan aún más llamativos si observamos la tabla de actividad y los porcentajes de inhibición obtenidos en amastigotes, sobre los análogos con funciones oxigenadas. Como se dijo anteriormente, los resultados corresponden a un porcentaje de inhibición respecto a Anfotericina B, ya que se trata de un solo punto de la curva de dosis que se le aplica por única vez al cultivo. Como podemos observar en la **FIGURA 66** hay zonas en donde en las actividades en promastigotes fueron buenas y que mejoraron notoriamente en amastigotes. Nuevamente observamos una correlación entre lo observado en *Tc* y *Ld*, Lo que indicaría que en ambos casos el blanco molecular podría ser el mismo. Cabe destacar que las células mamíferas utilizadas son de distinta línea celular y por lo tanto las citotoxicidades resultan diferentes.

Amastigote % inhib.a 10 $\mu\text{M}$		N					
		3	4	6	8	10	12
R	4H	95*	34,1	34,16	-44,8	40,2	NT
	4OMe	67,4	59,5	84,01	NT	8,16	16,7
	4OBn	66,7	76*	88*	76,4	48,1	NT
	3OMe,4OH	55,47	-67,6	-0,9	-45,8	68,89	NT
	3OMe,4OBn	105*	66,3	91*	25,2	90*	NT
Promastigotes IC <sub>50</sub>		n					
R	H	11,01	18,63	13,83	10,17	1,75	1,76
	OMe	1,24	8,52	6,73	1,56	1,45	1,82
	OBn	0,26	0,031	0,24	1,14	4,6	1,18
	3-OH,4-MeO	NA	NA	43,76	44,41	4,5	NT
	3-MeO,4-BnO	0,23	0,24	0,21	0,22	1,2	1,23

**FIGURA 66 .** Mapas de calor y valores de porcentaje de inhibición e IC<sub>50</sub>. Para el porcentaje de inhibición a 10  $\mu\text{M}$  de Anfotericina B es de 100%.(\*. porcentajes corresponden a otra concentración de compuesto evaluada).

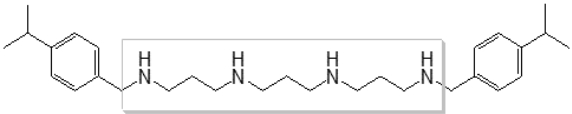
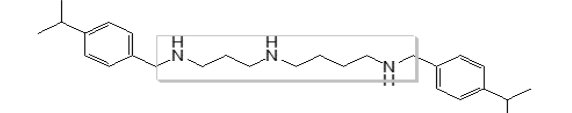
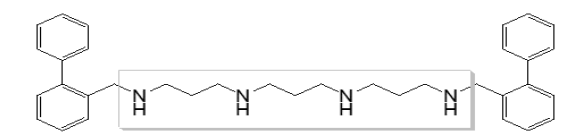
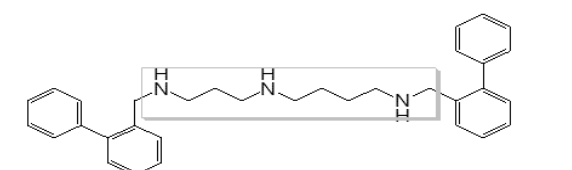
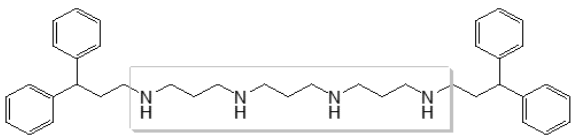
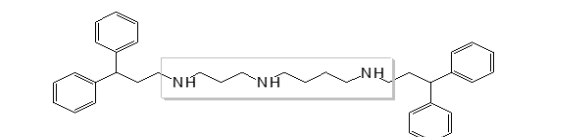
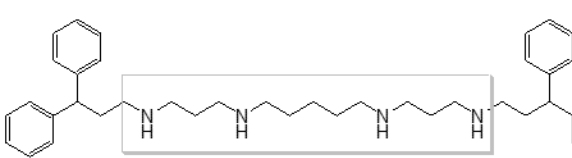
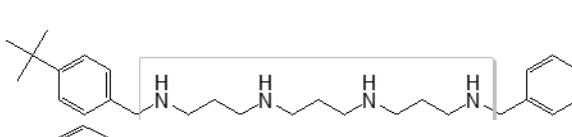
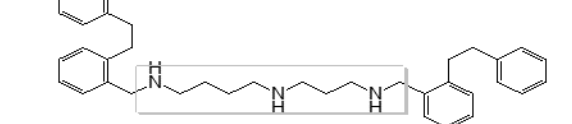
Además de estudiar los compuestos a una concentración fija (10  $\mu\text{M}$ ) se extendió el estudio a concentraciones inferiores para refinar los resultados de los compuestos que presentaban el mejor perfil en epimastigotes. En este estudio se realizaron diluciones sucesivas y se observó la inhibición del crecimiento obteniendo resultados muy alentadores. En la **FIGURA 67** se muestran los valores de inhibición obtenidos a cada concentración. Como se observa en la **FIGURA 67A** las mejores actividades para los análogos de los distintos largos de cadena, ocurre a una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$ , lo que resulta un excelente valor de actividad. Dentro de los análogos activos se encuentra también el derivado de  $n=6$ , R=4-BnO que fue el más activo en *Tc* intracelulares. Teniendo en cuenta esta observación, es posible postular un modelo en el que el anclaje de los grupos aminos y cierto espacio intermedio que permite acomodar la cadena dejando a ambos lados los grupos bencílicos que ocuparían sitios hidrofóbicos.



**FIGURA 67.** Porcentajes de inhibición (amastigotes *Ld*). n = número de carbonos concentraciones ( $\mu\text{M}$ ), para los A) R=4-Benciloxi. B) R=3-hidroxi4-Benciloxi.

Uno de los puntos analizados en los estudios de Woster y Bitonti, es el número de grupos aminos y los sustituyentes a partir de los aminos externos, en función del volumen ocupado y las propiedades fisicoquímicas. En la **TABLA 21** se resumen los análogos estudiados por Woster y sus actividades antitumorales.

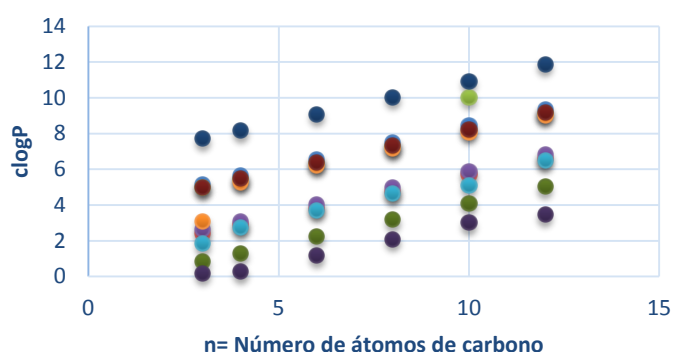
**TABLA 21.**

#	Estructura	IC <sub>50</sub> (μM)	logP	SP(2D)
W1		4,1	4,83	66,44
W2		4,2	5,65	49,83
W3		4,2	5,64	61,86
W4		4,0	6,46	49,83
W5		4,1	6,65	66,44
W6		4,6	7,47	49,83
W7		3,8	7,61	66,44
W8		4,2	5,43	66,44
W9		4,2	8,24	49,83

(IC<sub>50</sub>: en células tumorales L1210)<sup>159</sup>

Estos compuestos solo se ensayaron frente a células tumorales y se pueden comparar con los valores de citotoxicidad de las colecciones de derivados de diaminas sintetizados. Este trabajo es importante también para analizar como la actividad es modulada por la cantidad de grupos amino. Los resultados resumidos en la **TABLA 21** muestran que en este caso los sustituyentes de diferente volumen y las distancias entre los nitrógenos produjeron no afectaron la actividad. En nuestra biblioteca, que posee menor número de átomos de nitrógeno, se

esperarían cambios debido a la modificación de la superficie polar y de las interacciones puente hidrogeno que tienen impacto en otras propiedades como la solubilidad. El análisis de la lipofilidad de la colección de compuestos preparados se muestra en la **FIGURA 68**. Como se puede apreciar, clogP es dependiente del sustituyente de anillo aromático y proporcional al número de carbonos de la cadena, lo que globalmente produce un rango amplio que va desde 0 hasta 12. La diferencia con los compuestos reportados por Woster radica en la mayor cantidad de nitrógenos presentes en la molécula, lo que modula la lipofilidad, siendo menos susceptibles al efecto de los sustituyentes.

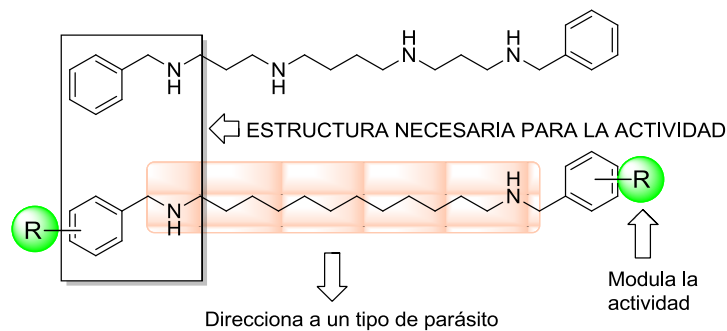


**FIGURA 68.** Relación entre clogP y el aumento del número de carbonos. (cada color representa una familia de la biblioteca)

En nuestro caso, la menor cantidad de nitrógenos y el aumento de la cadena carbonada provocan que la colección posea parámetros farmacológicos variables, generando compuestos con un amplio perfil de actividad. En particular, un aumento de la lipofilidad, tendría efectos importantes en la actividad en los parásitos intracelulares debido a una mejor penetrabilidad de membranas.

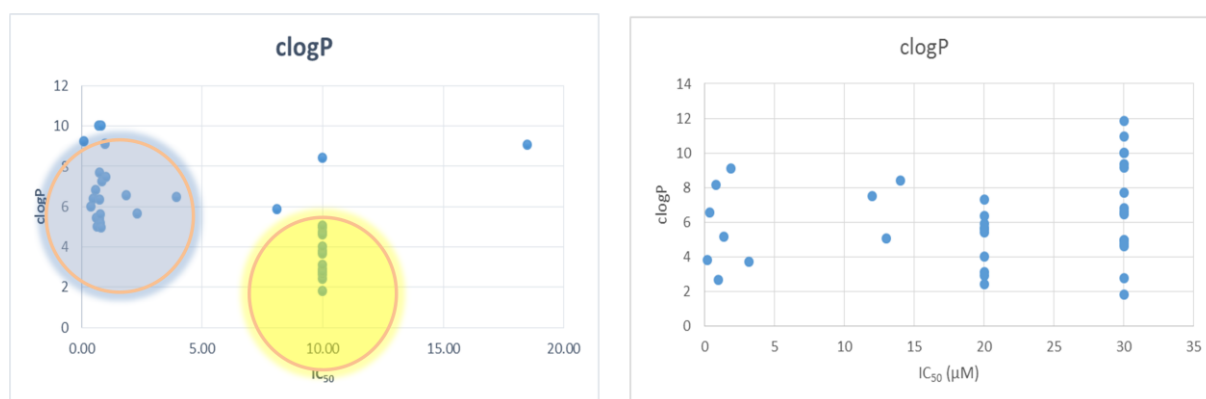
En esta punto es posible discutir la generación de un modelo farmacofórico para los derivados de diaminas. En primer lugar, partiendo de los derivados de poliaminas reportados por Woster y col, Fairlamb y col y Bitonti y col,<sup>103, 132, 134,160,161</sup> surge un posible modelo que poseería 4 centros de unión o anclado relacionado a la cantidad de nitrógenos presentes en los análogos más activos. (**FIGURA 69**) Para este análisis consideremos la actividad en *Pf* del derivado MDL 27847, (14  $\mu$ M), mientras el derivado equivalente de nuestra colección, el análogo **29** ( $N^1, N^{10}$ -dibencil-decano-1,10-diamina) posee una  $IC_{50}$  es 0,48  $\mu$ M, siendo 28 veces más activo. En cuanto a la actividad de MDL 27847 en promastigote de *Ld*,<sup>32</sup> presenta una inhibición a una concentración de 1,0  $\mu$ M, mientras que el análogo **29** posee un  $IC_{50}$  comparable (1,75  $\mu$ M ) que avala la simplificación molecular. Otro aspecto a tener en cuenta

es que los derivados N,N,N',N'-tetrasustituídos no fueron activos en ambos estadios de los dos parásitos (ver **Apéndice 4**), demostrando que la actividad requiere de aminas secundarias que cumplirían un rol esencial. Todos lo discutido hasta ahora nos permite aseverar que el largo de la cadena carbonada de la diamina direcciona la actividad hacia un determinado parásito, mientras que los sustituyentes del anillo aromático modulan esta actividad.



**FIGURA 69**

Continuando con el análisis de los derivados con sustituyentes oxigenados decidimos explorar el impacto del número de aceptores de enlace hidrógeno tanto en la forma libre, como en la intracelular de *Tc*. Tomando los análogos con sustituyentes R=H, 4-MeO, 4-BnO, 3-OH-4-MeO, 3-MeO-4-BnO y 3,4-diBnO (compuestos **1** al **30** y **58** al **63**) correlacionamos la actividad contra el clogP. (**FIGURA 70**) El análisis nos permite identificar que los compuestos que poseen un clogP bajo fueron los más activos y aquellos en donde el clogP resulta intermedio poseen niveles de actividad bajos.

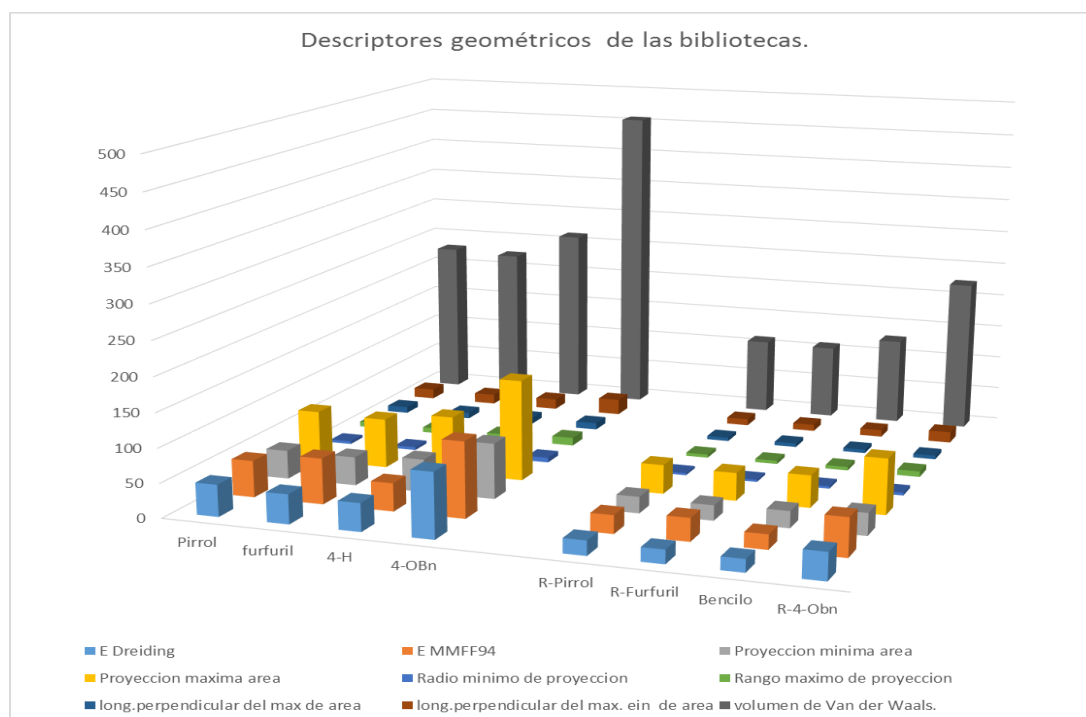


**FIGURA 70.** A la izquierda correlación entre  $IC_{50}$  HTS epimastigote *Tc* ( $\mu M$ ) y el clogP, a la derecha  $IC_{50}$  HTS amastigote *Tc* ( $\mu M$ ) y el clogP.

Este análisis para amastigote de *Tc* resulta similar, repitiéndose el patrón en los compuestos más activos, encontrándose valores más dispersos, no siendo tan claro como el observado en epimastigotes. A pesar de ello resulta claro que los más activos presentan valores de clogP intermedios.

Esto confirmaría el hecho de que los compuestos más activos requieren valores de  $\log P$  entre 4 y 6, para obtener un buen perfil de inhibición en amastigotes. Desde luego, que un compuesto se encuentre dentro de este rango de  $\log P$  no garantiza que sea activo y del mismo modo, si no lo cumple no deberá ser descartado

Teniendo en cuenta estos resultados es necesario responder cual es la influencia de la demanda estérica en la actividad. Resulta evidente la necesidad de ampliar el análisis con análogos que nos permitan determinar la importancia de los oxígenos en la actividad y su relación con el volumen de los grupos unidos a estos átomos. De este modo, para ampliar el análisis y explorar la influencia del tamaño del anillo adyacente al amino y la presencia de heteroátomos, se sintetizaron los análogos con anillos pirrólicos y furónicos. Al momento no existen datos en la literatura que indiquen si la reducción del tamaño del anillo, manteniendo la distancia entre los grupos amino, produce un cambio importante en la actividad sobre los parásitos. Entre las diferencias que presentan estos heterociclos se puede mencionar que poseen distinta densidad electrónica respecto del fenilo y menor tamaño. En la **FIGURA 71**, se pueden apreciar las diferencias en los valores de los descriptores topológicos de los análogos de metileno furfuroilo y metileno pirroilo comparados con el bencilo y el 4-benciloxibencilo. Los gráficos derecho e izquierdo claramente demuestran que los mismos siguen la misma tendencia en muchas de las propiedades, siendo por lo tanto la porción bencilamina la que gobierna los parámetros topológicos.



**FIGURA.71** Descriptores topológicos. Del lado izquierdo: análogos N,N'DS, del lado derecho: bencilaminas sustituidas correspondientes.

Esta comparación nos lleva a analizar la importancia de estos predictores respecto de la actividad de los compuestos. La primera conclusión a la que podemos arribar es el peso que tiene en la actividad el volumen de Van der Waals, que se aprecia en la diferencia de este parámetro entre el grupo 4-Benciloxi respecto del bencilo, metilen pirroilo y metilen furfuroilo. Al observar las actividades contra tripanosomatidos (**TABLA 22**) hallamos que los compuestos fueron activos contra los amastigotes de *Tc*, y que en cambio sólo los compuestos **7** y **70** inhiben el crecimiento de los amastigotes de *Ld* a una concentración de 10 µM. Si bien, no son citotóxicos para células VERO, presentaron actividad antiproliferativa contra fibroblastos y células musculares. Una de las características sobresalientes del compuesto **7** es que presentó actividad en todos los estadios de los dos tripanosomátidos. (**TABLA 22**).

**TABLA 22.** Actividad anti-tripanosomátidos de compuestos seleccionados.

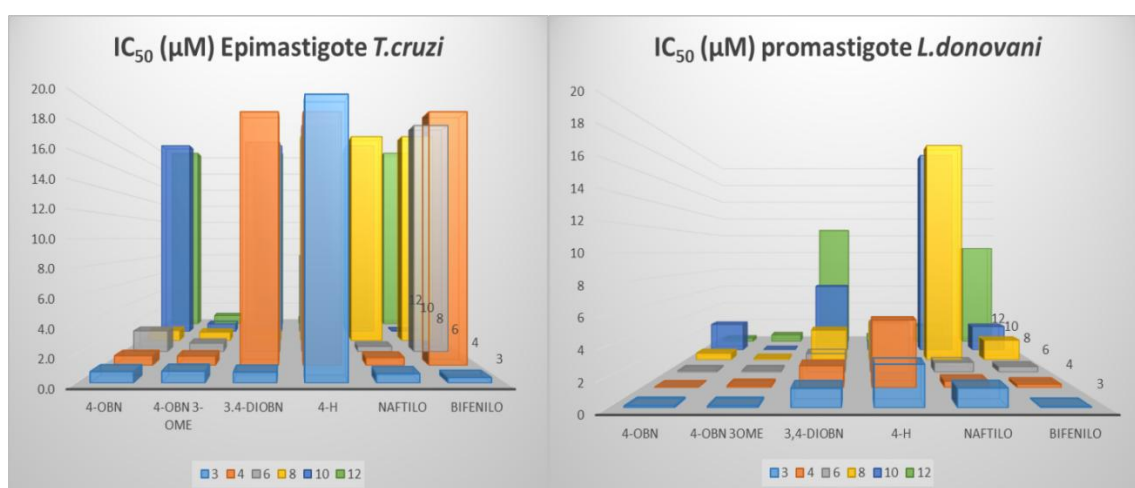
#	n	R	<i>T. cruzi</i> (e)µM	<i>T.c</i> (a). IC <sub>50</sub> (µM)	<i>L.d</i> (p) µM	% Inh. crec. <i>L.d</i> (a)	C. en HTS de <i>L.</i> <i>donovani</i>	LogD (pH=7.4)
<b>25</b>	3	Bencilo	10	1,0	2,8	0	No citotoxico	-0,96
<b>7</b>	3	4-BnO - bencilo	0,78	1,4	0,12	95	5µM (No citotoxico).	2,24
<b>70</b>	3	Metilen pirrolilo	30	0,96	NA	1,8	No citotoxico	-1,59
<b>76</b>	3	Metilen - furfurilo	30	3,2	25,14	0	No citotoxico	-0,52

*T. cruzi* (e): IC<sub>50</sub> µM en *Tc*, Epimastigote. *Tc* amast: IC<sub>50</sub> µM de *Tc*, Amastigote. *Ld* (e): IC<sub>50</sub> µM en *Ld*, promastigote. % Inh. crec en *Ld* (a): % Inh. crec en amastigotes de *Ld* en Fibroblastos a 10 µM. (0: No inhibe). C en HTS de *Ld*: Crecimiento celular; No Citotóxico: No inhibición total del crecimiento mayor a 50% a 10 µM.

De las familias preparadas con heterociclos a excepción de los análogos **70** y **76**, el resto de los miembros no fueron ensayados (por problemas de solubilidad). (ver anexo) En particular **70** presenta actividad en el estadio amastigote de ambos parásitos, siendo un compuesto pequeño que presenta una solubilidad y un estado de protonación particular, debido a que posee cuatro nitrógenos, lo que le confiere un bajo valor de LogD. Se pudo constatar que tanto para los derivados con anillos pirrolicos y furánicos a medida que aumentan el largo de cadena la actividad antiparasitaria mejora tanto para epimastigote (*Tc*) como promastigote (*Ld*), pero no existe correlación entre los dos estadios. En el caso de la familia de análogos de pirrol, los mejores compuestos en las formas libres de *Tc* y *Ld* resultaron ser de cadena larga y **70** (n=3) sólo presentó actividad contra amastigotes de *Tc*. En el caso de los derivados con

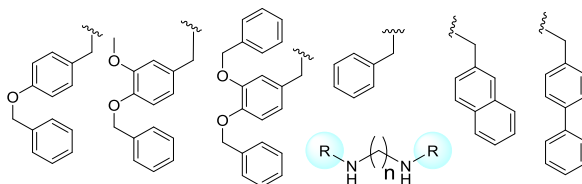
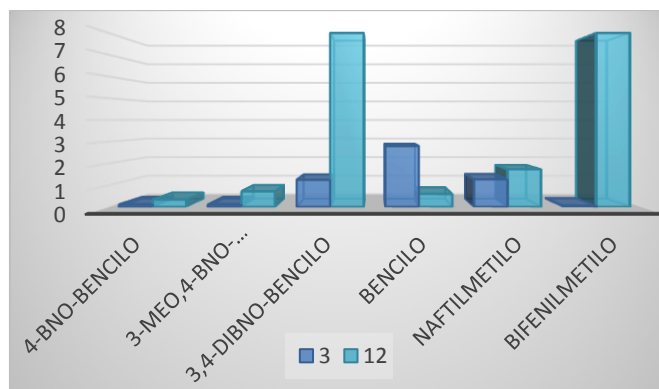
anillos furónicos, las mejores actividades en las formas libres también pertenecen a derivados de 10 y 12 átomos de carbono. Sin embargo, no mostraron actividad en amastigotes de ambos parásitos. En conclusión, el cambio del carbociclo por los heterociclos no produjo una mejora significativa en la actividad.

Continuando con el estudio de la influencia de la demanda estérica en la actividad, comparamos los derivados de naftilometilo, bifenilmetilo y 3,4-dibenciloxi-bencilo. La importancia del espacio químico alrededor del grupo amino quedó plasmada en las diferencias de las actividades que se encuentran en la literatura de compuestos similares y lo discutido hasta el momento. En la **FIGURA 72** se muestran los resultados de actividad en las formas libres de *Ld* y *Tc* de las colecciones de estos análogos comparado con sin sustituir derivados y los oxigenados mencionados previamente.



**FIGURA 72**

La primera conclusión a la que se puede arribar observando estos resultados es la disminución de actividad cuando se pasa de los derivados R=4-BnO y R=4-BnO ,3-MeO a R=3,4-diBnO, en particular para los derivados de mayor largo de cadena. Los derivados de bifenilmetilo y naftilmetilo sigue un comportamiento similar y es opuesto al de los derivados de bencilo.(**FIGURA 72**) Estas tendencias quedan claramente reflejadas cuando se comparan los derivados de las diaminas de mayor y menor número de átomos de carbono. (**FIGURA 73**).



**FIGURA 73.**

Si comparamos estos resultados con lo reportado por Woster (**TABLA 21**) queda reflejadas claras diferencias de comportamiento, dado que en nuestro caso la actividad antiparasitaria es altamente sensible al cambio de los sustituyentes de los nitrógenos, contrariamente a la actividad antitumoral reportada por este autor.<sup>149</sup>

Habiendo discutido como influye la demanda estérica en la actividad, queda pendiente una serie de compuestos que poseen distintos sustituyentes que permiten ponderar el impacto de la densidad electrónica del anillo aromático sobre la actividad. La estructura general consiste en N,N'-bis-bencil-diaminas que poseen halógenos, metilo e isopropilo en la posición 4 del anillo aromático. Si bien se prepararon con el propósito de ser incluidos en este análisis, se excluyen los derivados de pentafluorbencilo, ya que no presentaron actividad significativa. Los resultados de actividad contra tripanosomatidos para esta colección de compuestos se muestran en la **TABLA 23**. Es llamativo que esta serie de análogos presenta actividad submicromolar en la diez de los quince análogos contra epimastigotes de *Tc*, mientras que en amastigotes sólo tres derivados mostraron actividad con  $IC_{50}$  mayor a 30  $\mu M$ . Por otro lado, en *Ld* existe una mejor correlación entre las actividades en promastigotes y amastigotes en donde diez análogos poseen actividad submicromolar y en amastigotes, siete compuestos fueron activos. En particular, los derivados de 4-bromo-bencilo mostraron una excelente actividad con un  $IC_{50}$  que osciló entre 1,10 y 6,3  $\mu M$  para los 3 largos de cadena preparados.

**TABLA 23.** Mapa de calor y actividad antiparasitaria de derivados halogenados.



$T_c$ epimastigotes $\mu\text{M}$	n	4-F	4-Cl	4-Br	4-Me	4-iPr	4-F	4-Cl	4-Br	4-Me	4-iPr	$T_c$ Amastigote %
	8	0,67	0,59	0,57	0,48	0,65	NA	NA	31,7	NA	NA	
	10	0,65	0,68	1,01	0,62	0,32	NA	NA	NA	36,7	NA	
	12	0,16	SP	1,53	1,02	SP	NA	NA	58,3	NA	NA	

$L_d$ Promastigote $\mu\text{M}$	n	4-F	4-Cl	4-Br	4-Me	4-iPr	4-F	4-Cl	4-Br	4-Me	4-iPr	$L_d$ Amastigote %
	8	1,7	0,7	2,1	0,85	0,2	14,1	43	1,1	NA	NA	
	10	0,6	0,6	1,9	0,5	0,9	NA	20	3,1	NA	62,4	
	12	0,18	0,8	0,61	0,8	2,7	42,1	17	6,3	NA	NA	

NA: No activo o No inhibición total del crecimiento mayor a 90% a 10  $\mu\text{M}$ . SP: No solubles

En la **TABLA 24**, se muestra que el número de violaciones de las reglas de Lipinsky, que en la mayoría de los casos es de uno. Los valores de TPSA son los mismos y las variaciones ocurren en los coeficientes de partición (milogP y clogP), que es correlativo al aumento tanto del peso molecular, como del número de carbonos de la cadena.

**TABLA 24.** Valores de los descriptores topológicos de los diferentes análogos en posición *para* del bencilo .

R	n	clogP	miLogP	TPSA	PM	Aceptores	Donores	N.v.L	DS
4-H	8	4,96	5,242	24,054	324,5	2	2	1	0,3
4-H	10	5,89	6,252	24,054	352,5	2	2	1	0,23
4-H	12	6,82	7,263	24,054	380,6	2	2	1	0,18
4-F	8	5,08	5,569	24,054	360,4	2	2	1	0,26
4-F	10	6,01	6,58	24,054	388,5	2	2	1	0,2
4-F	12	6,93	7,59	24,054	416,6	2	2	1	0,16
4-Cl	8	6,19	6,598	24,054	393,4	2	2	1	0,19
4-Cl	10	7,11	7,608	24,054	421,4	2	2	1	0,15
4-Cl	12	8,04	8,482	24,054	449,5	2	2	1	0,13
4-Br	8	6,36	6,86	24,054	482,3	2	2	1	0,15
4-Br	10	7,28	7,871	24,054	510,3	2	2	2	0,12
4-Br	12	8,21	8,632	24,054	538,4	2	2	2	0,1
4-Me	8	5,59	6,139	24,054	352,5	2	2	1	0,24
4-Me	10	6,52	7,15	24,054	380,6	2	2	1	0,19
4-Me	12	7,45	8,148	24,054	408,6	2	2	1	0,15
4-iPr	8	7,15	8,236	24,054	408,6	2	2	1	0,09
4-iPr	10	8,08	8,823	24,054	436,7	2	2	1	0,08
4-iPr	12	9,01	9,19	24,054	464,7	2	2	1	0,07

DS: DrugScore, N.v.L: número de violaciones de la regla de Lipinsky.

Estos descriptores son sensibles a variaciones de tamaño y movilidad, pero el cambio de halógenos no se modifica el número de aceptores o donores de puente hidrógeno, sin el consecuente impacto en el TPSA. En estos derivados, este último descriptor no se modifica, debido a que todos los compuestos poseen sólo dos grupos aminos. Un estudio comparativo de los derivados de  $n = 10$  de otros descriptores topológicos no mostraron mayores diferencias. De este modo, queda claro que la respuesta encontrada en esta familia debe ser racionalizada desde los cambios en la densidad electrónica del anillo aromático.

## 7.2 Nuevos conceptos en probadas teorías.

El concepto " una molécula un blanco " condujo al descubrimiento de muchas drogas y probablemente conducirá a la aparición de muchos agentes quimioterapéuticos más en el futuro. Sin embargo, una modulación equilibrada en función del ataque a varios objetivos, puede proveer de avances efectos terapéuticos y un perfil de efectos secundarios favorable comparado a la acción de un ligando selectivo. Especialmente al tratar enfermedades con procesos multifactoriales, en los cuales se reflejan distintas respuestas del organismo. La modulación fina de las actividades de compuestos en una biblioteca, muchas veces corresponden a sectores dentro de la molécula en los que se encuentran derivados halogenados. Estos permiten mediante el aporte electrónico o estérico modular las interacciones con blancos.

El concepto del enlace halógeno (o enlace-X) se ha interpretado como un contribuyente de importancia en la especificidad del reconocimiento en una amplia clase de compuestos halogenados. La interacción producida para generar esa especificidad es entendida fácilmente desde el punto de vista electrostático, donde una corona electropositiva, el agujero  $\sigma$ , sirve como un ácido de Lewis para atraer una variedad de bases de Lewis electrónicamente ricas, en la manera análoga a un puente hidrógeno clásico.

Con el objetivo de estudiar este efecto en los derivados halogenados preparados se estudio la distribución de la densidad de carga electrónica dentro del marco de la Teoría Funcional de la densidad con un nivel de Teoría en B3LYP/6-31G(d). Además, se obtuvieron los mapas de potencial molecular electrostático (MEP) de los compuestos. Se estudió observó la substitución del hidrógeno en posición *para* por los distintos sustituyentes, con el objetivo de observar el efecto sobre el anillo de aquellos átomos atrayentes de electrones (p. ej., átomos

de halógeno) y el resultado del reemplazo del hidrógeno por sustituyentes donantes de electrones como el grupo de metilo. Esto abre la posibilidad de estudiar más detenidamente los resultados obtenidos a nivel biológico y tratar de explicar los motivos por los cuales observamos estas actividades.

El potencial electrostático molecular,  $V(r)$ , creado en el espacio alrededor de una molécula por sus electrones y núcleos, es una propiedad física real que puede ser determinada experimentalmente por métodos de difracción, como así también computacionalmente. El potencial está pensado sobre la base que una molécula es primero "vista" o "sentida" por otra especie química que se aproxima.  $V(r)$  ha sido utilizado extensamente para interpretar y predecir la reactividad molecular de un amplio rango de sistemas químicos en reacciones electrofílicas y nucleofílicas, y en el estudio de procesos de reconocimiento biológico.

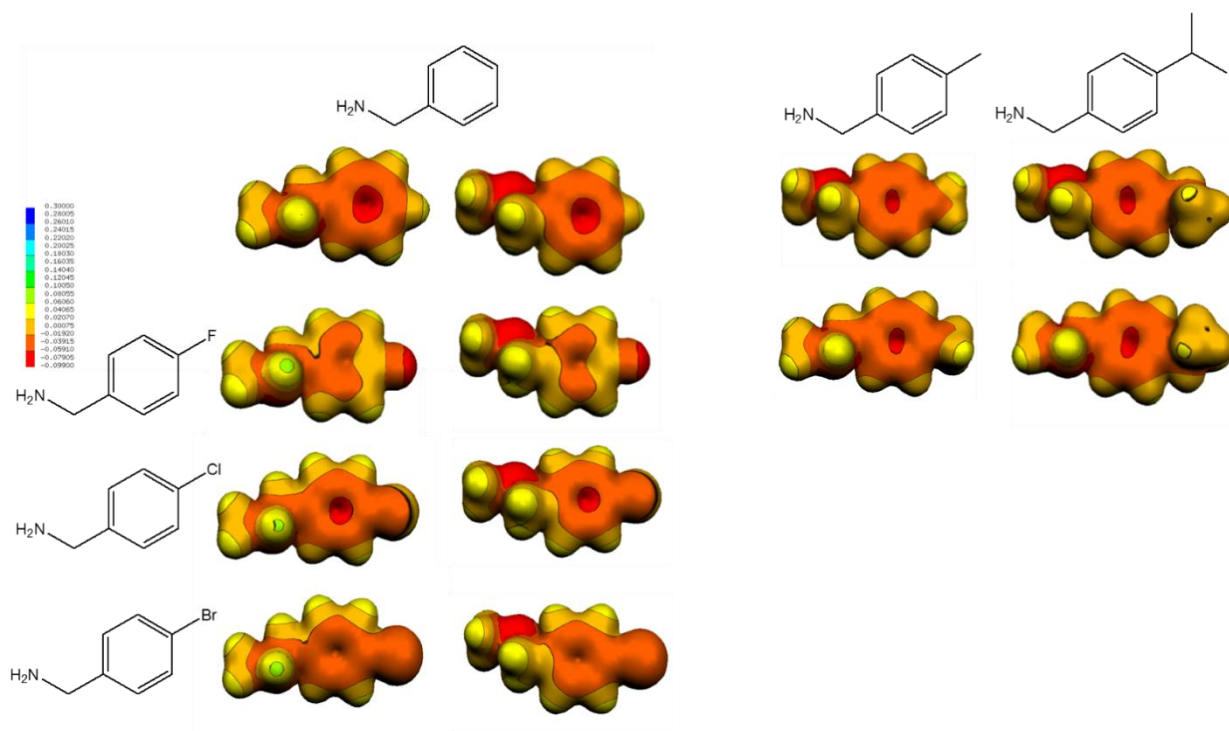
Generalmente, una molécula u otra especie química se tratan como una distribución estática de la carga electrónica alrededor de una estructura nuclear rígida. Su potencial eléctrico, denominado potencial electrostático se expresa rigurosamente por la siguiente ecuación:

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|R_A - r|} - \int \frac{\rho(r') dr'}{|r' - r|}$$

donde  $Z_A$  es la carga de los núcleos,  $A$  localizados en  $R_A$ , y  $\rho(r')$  es la función densidad electrónica de la molécula. El signo de  $V(r)$ , indica las regiones donde los efectos de los núcleos, o de los electrones, son dominantes. Así, un electrófilo aproximándose inicialmente será atraído hacia las regiones donde  $V(r)$  es negativo, y en particular hacia los puntos donde  $V(r)$ , posee sus mayores valores negativos.

En la **FIGURA 74** se representan los mapas tridimensionales del Potencial Electrostático de carga (MEPs) para la porción de la molécula que modula la actividad, los derivados de la fenilmetanamina, correspondiente (sus derivados *para* -F, -Cl, -Br, por un lado y por el otro -CH<sub>3</sub> y -Isopropilo), como porción de la molécula de base de la diamina N, N'-disustituida.

Para comparar las propiedades de la fenilmetanamina y sus análogos, se muestra el trazado del MEP sobre la superficie de Van der Waals, representando potenciales electrostáticos sobrepuestos en una superficie de densidad de carga constante de electrones (0.001 e/au.). El área coloreada en el gráfico representa el potencial electrostático [ $V(r)$ ]. Como es conocido, el potencial electrostático es, por definición, la energía de interacción de un punto de carga positivo con los núcleos y los electrones de una molécula. El potencial electrostático proporciona una medida representativa de la distribución de la carga total molecular. La codificación con colores de estos mapas de MEP está en la gama de -0,0455 au (más profundo rojo) a +0,0235 au (más profundo azul) en total



**FIGURA 74**

La zona nucleofílica, de potencial electrostático negativo (rojo), está localizada alrededor del nitrógeno. Se observa también el aumento en el área de naranjada (potenciales intermedios) y de potenciales negativos para los derivados de R=4-Bromo y 4-Cl respecto del 4-F. Lo interesante es el comportamiento similar que se puede observar en los derivados 4-metil y 4-isopropil. Al compararlos con los derivados de R=4-Metoxi, se aprecia que la carga negativa se distribuye hacia el oxígeno dejando al centro del anillo con menor potencial. Al comparar las actividades antiparasitarias, obtenidas por estas familias nos permite observar cual es la necesidad de densidad electrónica sobre el anillo, para un mismo largo de cadena. En este punto nos encontramos con la presencia o ausencia de estos enlaces C-X y los agujeros- $\sigma$ , la importancia de estos reviste en que permiten en ambos casos, la formación de enlaces que contribuyen a la actividad.

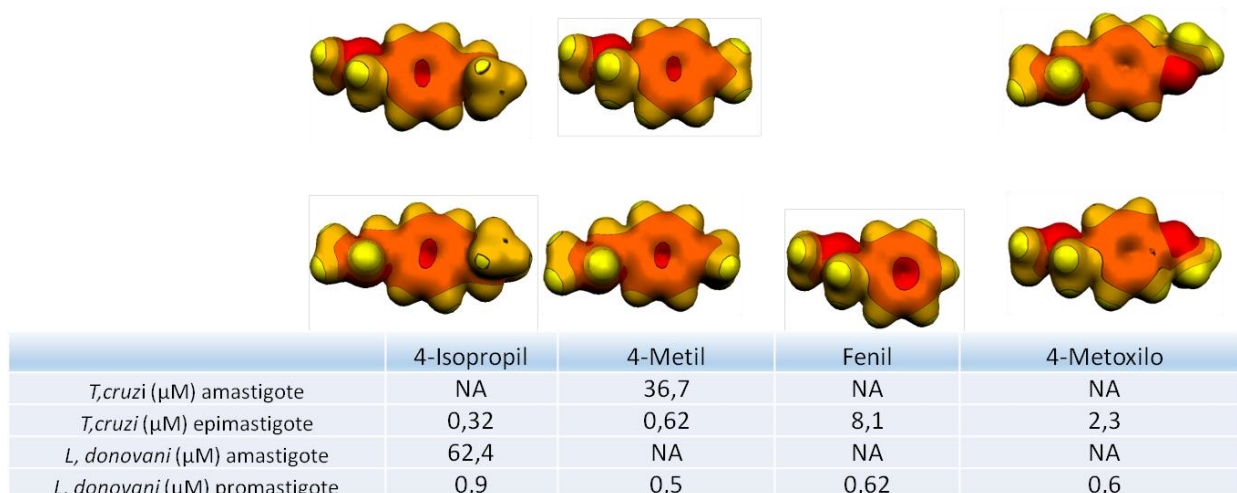
Los enlaces C-X (X: Halógenos) son enlaces de la gama de las interacciones moleculares cortas que son análogas a los enlaces puente Hidrogeno clásicos. Las diferencias parten de que es un halógeno polarizado sustituyente al hidrógeno como el ácido en el par ácido/base de Lewis. Tales interacciones ocurren con regularidad en las estructuras de muchos complejos de proteína de ligando, pero sólo recientemente han sido reconocidas en sistemas biológicos como una clase distinta con características físicas bien definidas.

El término "el agujero- $\sigma$ " fue presentado por Clark<sup>124</sup> para describir las regiones de potencial positivo electrostático que están presentes sobre las superficies externas de muchos halógenos

unidos covalentemente a distintos átomos. Estas regiones positivas, descubiertas por Brinck<sup>162</sup> pueden actuar recíprocamente electrostáticamente con sitios negativos por ejemplo electrones p-electrones de pares solitarios, dando lugar a enlace no covalente. El agujero  $\sigma$  es formado cuando un átomo de halógeno participa en un enlace covalente sigma y ocurre un reordenamiento de la densidad electrónica del átomo acompañante abandonando una región de carga, disminuyendo negativamente sobre su lado externo. Esta región, que está a lo largo de la extensión de la enlace, se denomina agujero-  $\sigma$ . Antiguamente no se entendía como un halógeno podía interactuar sobre cargas negativas de otros compuestos. Esta interacción entre estas regiones cargadas electrostáticamente de forma positiva (agujeros  $-\sigma$  positivos) y sitios negativos de la misma molécula o distinta son llamados unión a agujeros  $\sigma$  y permitió explicar esas interacciones.<sup>162</sup>

En resumen, debido a la anisotropía de la distribución de la carga en el enlace C-halógeno, se forma una región electrostática cargada, sobre la extensión del enlace. Al estar polarizado, se forma un extremo positivo sobre el átomo de C que a su vez atrae la densidad electrónica del anillo aromático, haciéndolo menos reactivo a una sustitución electrofílica, pero más propenso a una interacción nucleofílica.

La necesidad de densidad electrónica en el anillo, para mejorar la actividad sobre las formas intracelulares queda evidenciada en los derivados de metilo e isopropilo, ya que hay una pérdida de actividad tanto para el bencilo como para el análogo con con metoxilo, respecto de los derivados halogenados



**FIGURA 74.**

Se observa también que la necesidad de carga total sobre resulta necesaria para la actividad ya que si bien pierden actividad en amastigotes, estos últimos resultan activos en las formas libres de ambos parásitos.(FIGURA 74 ) estas diferencias nos llevan concluir, que en la posición para del bencilo la presencia de halógenos produce una modulación fina de la actividad producto del enlace C-X. Como mencionamos anteriormente, los halógenos más pesados muestran tanto carácter electrofilico a lo largo de los enlaces de C-X, como carácter nucleofilico a lo largo del vector perpendicular a estos enlaces. Por otro lado, debido a una combinación de electronegatividad extrema y la polarizabilidad limitada, los átomos de flúor con frecuencia actúan como buenos aceptadores de puente hidrógeno, por lo cual estos derivados poseen características que resultan diferentes al resto de la biblioteca, pero semejantes a la del derivado de bencilo.

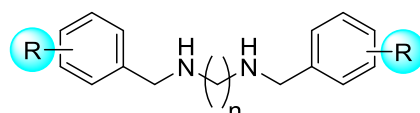
Habiendo completado este estudio y resulta necesario estudiar el mecanismo de acción de los compuestos en estudio. Una vez obtenidos los resultados de actividad epimastigote o promastigote y el estadio amastigote, para *Ld* y *Tc*, resulta de interés explorar el determinar el modo de acción. Para ello se tomaron algunos compuestos con buena actividad en las formas libres y se realizó el ensayo MTS. Por otro lado, se ensayaron las dos bibliotecas contra una de las enzimas de la vía metabólica, la Tripanotion Sintetasa (TryS) y por otro, mediante una serie de experimentos de exposición a concentraciones saturadas de distintas moléculas de las vías metabólica en estudio.

### 7.3 Resultados y análisis del Ensayo de mínima concentración tripanocida (MTS).



El MTS desarrollado por Doyle y otros, permite determinar  $IC_{50}$  con cepas Y de *Tc* en células musculares.<sup>158, 163</sup> Al mismo tiempo, se puede determinar la citotoxicidad de los compuestos inoculados en el cultivo, brindando además, información de su modo de acción. Esto es posible mediante la exposición continúa de un cultivo de amastigotes intracelulares en células musculares (BESM) al compuesto en estudio. En este ensayo, se determina el tiempo de vida del cultivo (en días), tomando como punto de partida el primer día posterior al agregado del compuesto en estudio hasta la aparición de tripomastigotes en el medio. Como controles positivos, se utiliza el comportamiento frente a distintas concentraciones de Benznidazol, Pozaconazol y K777. A partir de los 15 días, se deja de cambiar el medio RPMI adicionado con el compuesto y sólo se hace recambio del medio RPMI, hasta completar los 40 días, observándose cada dos días la

aparición de tripomastigotes y la viabilidad del cultivo. Se considera que un compuesto posee baja actividad, cuando muestra presencia de tripomastigotes en el cultivo antes de los 6 días de comenzado el ensayo. Alternativamente, un compuesto puede presentar un comportamiento tripanostático, que corresponde a la aparición de tripomastigotes entre los 6 y los 20 días. A modo de ejemplo, Pozaconazol y K777 son tripanocidas ya que presentan crecimiento de las células de cultivo sin desarrollo de tripomastigotes hasta los 40 días después de iniciado el ensayo. Tendiendo en cuenta que el ensayo MTS requiere un largo tiempo, el mismo no está indicado como ensayo de cribado y se utiliza para determinar el modo de acción y como filtro previo a los ensayos *in vivo*. De este modo, tomando los resultados en las formas libres de *Tc* y *Ld* se seleccionaron para este ensayo, trece compuestos que presentaban variedad de sustituyente, largo de cadena y actividad. En la **TABLA 25**, se muestran los compuestos elegidos para el ensayo MTS, los resultados obtenidos y su comparación con el HTS.



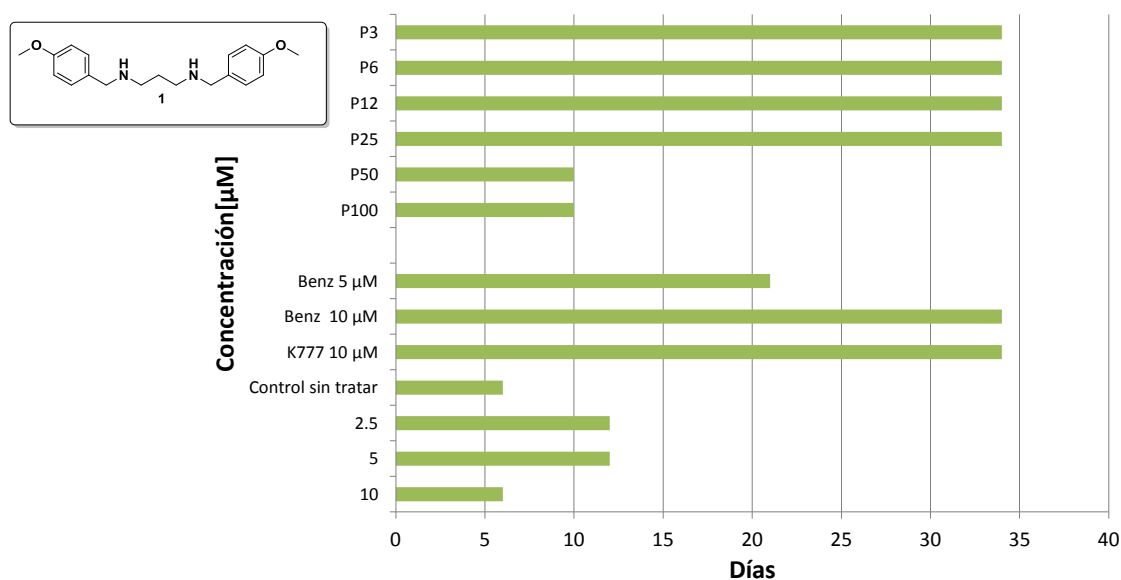
**TABLA 25.** Resultados de actividad de compuestos seleccionados en el ensayo MTS.

#	n	R	HTS (IC <sub>50</sub> μM)	MTS *	Resultado
1	3	4-MeO	1,4	12	Tripanoestático
5	10	4-MeO	20	20	Tripanoestático
6	12	4-MeO	>20	20	Tripanoestático
7	3	4-BnO	20	2	Citotóxico
8	4	4-BnO	20	2	Citotóxico
11	10	4-BnO	14	2	Citotóxico
14	4	4-BnO ,3-MeO	>20	12	Tripanoestático
15	6	4-BnO ,3-MeO	20	8	Citotóxico
16	8	4-BnO ,3-MeO	20	2	Citotóxico
20	4	4-MeO , 3-OH	>20	12	Tripanoestático
25	3	4-H	1	20	Tripanoestático
26	4	4-H	20	20	Tripanoestático
29	10	4-H	13	20	Tripanoestático

\* días de supervivencia.

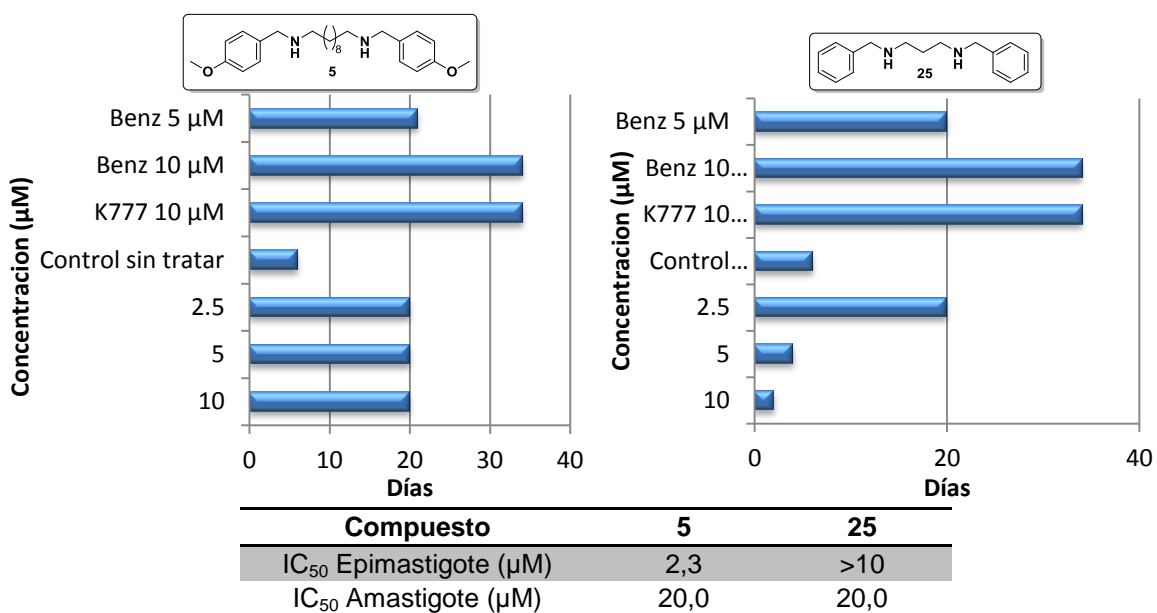
El análisis de la **TABLA 25** muestra que no se obtuvo ningún compuesto con actividad tripanocida, encontrándose 8 análogos tripanoestáticos y 5 derivados citotóxicos. Los compuestos que presentaron el mejor perfil en este ensayo fueron **5**, **6**, **25**, **26** y **29** que se mantuvieron durante 20 días sin aparición de tripomastigotes en el medio, lo cual marca el arresto del ciclo celular de *Tc*. Los compuestos **1**, **14**, **20** permanecieron sólo por 12 días sin aparición de tripomastigotes, mientras **7**, **8**, **11**, **15** y **16** fueron citotóxicos. Es interesante el

comportamiento registrado por el compuesto **20**, que no presenta actividad en los ensayos de los distintos estadios, pero mostro moderada actividad citoestática. Con fines comparativos analizaremos en detalle el comportamiento de los compuestos **1**, **5** y **25**. El compuesto **1** presentó una muy buena actividad en amastigotes ( $IC_{50}= 1,4 \mu M$ ), a pesar de ello, sólo mantuvo en arresto el ciclo celular por 12 días a una concentración de  $2,5 \mu M$ . (**FIGURA 75**)



**FIGURA 75.** Resultado de actividad del compuesto **1** en el ensayo MTS de *Tc*.  
PX, P=Posaconazol X= concentración  $\mu M$ .

Contrariamente a lo esperado, el compuesto **5** ( $N^1, N^{10}$ -bis-(4-(benciloxi)-3-metoxibencil)decano-1,10-diamina) el cual presenta un  $IC_{50}$  en amastigotes de *Tc* de  $20 \mu M$ , **FIGURA 76**, en lugar de ser menos activo que **1**, su actividad es similar. Este hecho resulta interesante, ya que teniendo en cuenta los valores de  $IC_{50}$  en amastigotes el compuesto **5** resultaría eliminado de una selección normal en la búsqueda de candidatos. Estos compuestos son activos en epimastigotes, presentan actividad tripanostática y poseen una respuesta diferencial en el ensayo en amastigotes. Esta diferencia se fundamenta en los tiempos de exposición de los ensayos, teniendo en cuenta además que el MTS simula una situación de exposición contante de compuesto a una concentración determinada en largo período de tiempo.



**FIGURA 76.** Resultado de actividad de los compuesto **5** y **25** en el ensayo MTS de *Tc*..

Para el caso del compuesto **25** ( $N^1, N^4$ -dibencil-butano-1,4-diamina) a una concentración de 2,5 µM presenta su mejor actividad tripanostática, teniendo un IC<sub>50</sub> en amastigotes de 2 µM y siendo no activo en epimastigotes. A pesar de esta ausencia de actividad en las formas extracelulares, este compuesto resultó activo en ambas formas intracelulares de *Ld* y *Tc*, y para el caso de *Tb* su IC<sub>50</sub> es de 7,08 µM. Este patrón de comportamiento es interesante ya que a partir de los resultados obtenidos podemos concluir que para este tipo de análogos pequeños, la actividad resulta prometedora en estas especies en estadios crónicos y mejorar su capacidad resultaría importante en nuestro objetivo de mejorar las drogas existentes.

#### 7.4 Evaluación de los resultados sobre la Tripanotion Sintetasa.

En la introducción se mostró que gran parte de los desarrollos obtenidos en poliaminas en el campo de las enfermedades provocadas por los tripanosomátidos están orientados en la búsqueda de la inhibición de las dos enzimas distintivas en esta familia, la Tripanotion Sintetasa (TryS) y Tripanotion Reductasa (TryR). Ambas presentan un sitio de unión a poliaminas pero la funcionalización de las mismas es diferente.

En estudios sobre células tumorales los desafíos se encuentran en la búsqueda de inhibidores específicos de la síntesis o del catabolismo, con resultados dispares tanto en uno, como el otro caso. En su mayoría el problema recurrente radica en que los compuestos resultan muy activos contra la enzima, pero al llevarlos a los estudios contra el parásito e incluso contra animales o formas intracelulares, no resultan tener tanta eficacia. El modelo de trabajo

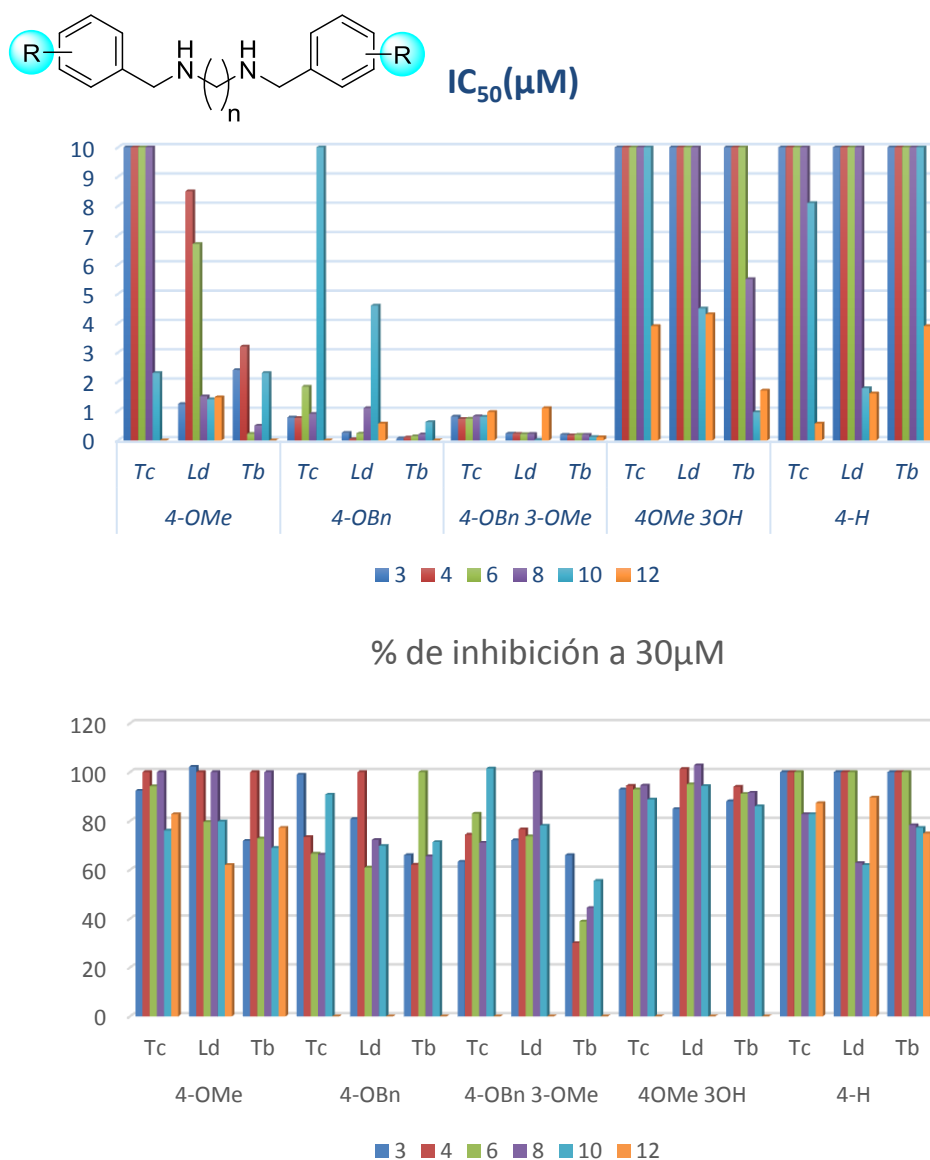
desarrollado en el hallazgo del K777 resulto exitoso, en gran medida por que el blanco requería como inhibidor estructuras específicas y modulables. Esto permitió, una vez obtenido el líder, enfocarse sobre las necesidades farmacológicas y farmacodinámicas, sin perder de vista el corazón del compuesto activo.<sup>13</sup>

En nuestro caso el enfoque resulta diferente ya que poseemos estructuras activas con muy buenos perfiles de actividad y la evaluación en las enzimas resulta necesaria. Un método plausible de ser utilizado en este contexto es la utilización de la técnica de pulldown de proteínas. Otros métodos más directos requieren de la medida enzimática con las proteínas clonadas o con cepas que sobreexpresen o se encuentren inhibidos ciertos genes. Una de las ventajas de contar con los tres parásitos de esta familia, resulta en que al menos para el caso de *Tc* la ODC se encuentra ausente, por lo que estudios sobre esta enzima en caso de poseer un compuesto activo de cadena corta específicamente en *Ld* y *Tb* y no en *Tc* indicaría que el posible blanco de acción sería esta enzima. Este último enfoque se enmarca sobre los aspectos observados de la quimiogenómica y en cómo a partir de la biología se comienza a encontrar respuestas de las actividades químicas. En nuestro caso el enfoque resulta diferente ya que poseemos estructuras activas con muy buenos perfiles de actividad sobre los microorganismos patógenos, sin conocer el blanco de acción. Un método plausible para determinarlos es la técnica de *pulldown* de proteínas. Otros métodos más directos requieren de la medida enzimática en proteínas seleccionadas o con cepas que sobreexpresen o poseen inhibidos ciertos genes. Debido a la disponibilidad de ensayos útiles que permiten determinar el rol de ciertas enzimas en la actividad, nos inclinamos por esta opción para abordar el estudio del mecanismo de acción.<sup>72,164</sup>

En la introducción se mostró que gran parte de los desarrollos obtenidos en poliaminas en el campo de las enfermedades provocadas por los tripanosomátidos estaban orientados en la búsqueda de la inhibición de las dos enzimas distintivas en esta familia, la Tripanotión Sintetasa (TryS) y Tripanotión Reductasa (TryR). Ambas presentan un sitio de unión a poliaminas pero la funcionalización de las mismas es diferente. Teniendo en cuenta que la estructura privilegiada que seleccionamos para nuestro desarrollo contenía una diamina y que la tripanotión sintetasa posee como sustrato la espermidina, era posible participara en el mecanismo de acción. Si bien la espermidina posee un grupo amino interno, se ha observado que este grupo no es crítico en la unión a la enzima siendo posible un anclaje por medio de interacciones hidrofóbicas en el sitio de alojamiento de la porción alifática de la espermidina. De este modo, seleccionamos compuestos de la primera serie (**1** al **25**) y algunos de los derivados halogenados para realizar un estudio sobre la TryS y fueron ensayados por el grupo

del Dr. Marcelo Comini (Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay), determinándose la actividad inhibitoria por dos metodologías diferentes. Por un lado, se realizaron ensayo de actividad por punto final. Este ensayo se basa en la determinación de fosfato inorgánico, liberado por hidrólisis del ATP, siendo la metodología clásica seleccionada para el estudio con estas enzimas. Este fosfato se acompleja con el colorante catiónico trifenilmetanol (verde de malaquita)/fosfomolibdato (reactivo BIOMOL GREEN™) midiéndose la absorbancia a 650 nm. Por otro lado, se realizó el ensayo cinético de actividad por acoplamiento de la reacción de hidrólisis del ATP a la oxidación del NADH, a través la piruvato quinasa (PK) y la lactato deshidrogenasa (LDH), midiéndose la absorbancia del NADH a 340 nm de manera continua.

Los resultados obtenidos se muestran en la **FIGURA 77**. Como se puede observar ninguno de los compuestos ensayados a una concentración de 30  $\mu$ M tiene una actividad por debajo del 30 %. La falta de correlación entre la actividad antiparasitaria y la inhibición de la TryS indicarían una participación marginal de la enzima en el mecanismo de acción. Más allá de eso, se pueden sacar algunas conclusiones analizando las estructuras de los compuestos que presentaron las mejores inhibiciones. Como tendencia general, los compuestos con sustituyentes oxigenados fueron más activos con diaminas de cadena corta (n=3,4,6), siendo el resto más activo con cadenas largas (n=8,10,12). En particular no se observa una clara tendencia, con la excepción de la actividad en la enzima de *Tb*. En este caso, existe un efecto aditivo de los sustituyentes oxigenados, en donde la actividad de los derivados R=4-MeO fue similar a la de los R=4-BnO, siendo más activos los análogos R=4-BnO, 3-MeO. Estos resultados indican un efecto aditivo de los sustituyentes posiblemente debido al llenado de un bolsillo hidrofóbico del sitio activo. Esta última colección mostró también dependencia con el largo de cadena siendo el derivado de la 1,6-hexilendiamina el más activo. (actividad remanente por debajo del 40%).



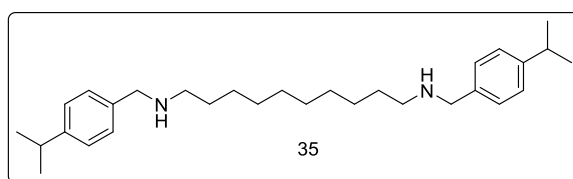
**FIGURA 77.** Arriba: Actividad antiparasitaria contra *Tc*, *Ld* y *Tb* IC<sub>50</sub> (µM), de compuestos con sustituyentes oxigenados. Abajo: Porcentaje de inhibición de la TryS (método de punto final)

Los derivados que tenían como objetivo determinar el rol de la densidad electrónica del anillo aromático en la actividad antiparasitaria, arrojaron mejores resultados. (TABLA 26). En términos generales, la actividad remanente fue menor al 70 % a 30 µM, con sólo cuatro compuestos completamente inactivos.

**TABLA 26.** Inhibición de TryS a una concentración de 30µM

	<i>T. cruzi</i>			<i>Leishmania infantum</i>			<i>T. brucei (Comini y col)</i>			<i>T. brucei (Oza y col.)</i>		
	8	10	12	8	10	12	8	10	12	8	10	12
H	100	100	87,3	100	100	89,6	100	100	83,6	100	100	74,9
F	96	80,6	56,3	69,6	78,9	63,2	101,5	81	81,3	85,7	81	81
Cl	87,9	73,3	56,9	78	52,9	48,5	80,9	87,2	71,3	69,7	63,9	57,6
Br	93,7	75,2	69,2	61,8	81,3	74,1	90,3	90,4	74,6	73,4	62,6	52,5
Me	92,3	91,9	100	91,9	70,7	100	85,2	70,7	100	78,4	61,8	100
Isopropil	65,6	46,5	100	77,4	52,2	100	74,5	98,1	100	56,8	48,9	100
pentaF	86,6	83,3	100	83,9	86	100	89,7	86	100	86,5	91,8	100

Un punto aparte es que a pesar de las mutaciones que se encuentran entre las enzimas de *Tb* de Comini y de Oza,<sup>68</sup> las inhibiciones son equivalentes. El derivado



$N^1,N^{10}$ -bis(4-isopropilbencil)decano-1,10-diamina (**35**) posee una actividad comparable para las enzimas de las distintas especies, por lo que podría considerarse el mejor candidato ensayado. Desafortunadamente, dado que la concentración a la que inhibe la enzima es muy alta, requerirá de ulteriores etapas de desarrollo para mejorar su actividad. Lo que resulto llamativo de este derivado es que produce la pérdida de actividad de la enzima clonada por Comini y otros.<sup>65</sup> Al comparar las secuencias de las enzimas de las tres especies, sólo existen tres aminoácidos diferentes que habrían sido alterados durante la ampliación por PCR, dos de los cuales se encuentran en regiones próximas a los sitios de unión del sustrato. Este hecho, podría justificar el comportamiento encontrado, pero serán necesarios otros estudios para demostrarlo. Evaluación de los resultados sobre estudios de crecimiento en cultivos suplementados.

## 7.5 Evaluación de los resultados de los ensayos de crecimiento en cultivos suplementados.

Una de las posibles estrategias para determinar la participación de una determinada enzima en el mecanismo de acción consiste incubar los parásitos en presencia de metabolitos y el compuesto en estudio. En nuestro caso, dada las estructuras de los compuestos, era necesario conocer si enzimas de la biosíntesis de poliaminas estaban involucradas en el mecanismo. Por este motivo, el grupo de la Dra. Sigrid Roberts (Pacific University Oregon, Estados Unidos) realizó estudios con cultivos de *Ld* suplementados sobre la misma selección de compuestos utilizado en los ensayos de TryS. Se determinó la respuesta de los parásitos crecidos en

medios suplementados con espermidina (Esp) o putrescina (Put) a una concentración alta de los metabolitos (200  $\mu\text{M}$ ) y distintas concentraciones del compuesto en estudio. Por un lado, los ensayos con Put permiten evaluar la participación de la espermidina sintetasa o de la arginasa en el mecanismo, mientras que los resultados de cultivos suplementados con Esp aportaron información sobre la intervención de la espermina sintasa y de la TryS.

Los resultados en cultivos suplementados con Put indicaron que la mayoría de los compuestos seleccionados no mostraban diferencia con cultivos sin suplementar (**FIGURA 78**) y sólo 10 de los 48 derivados ensayados presentaron un escaso grado de protección.

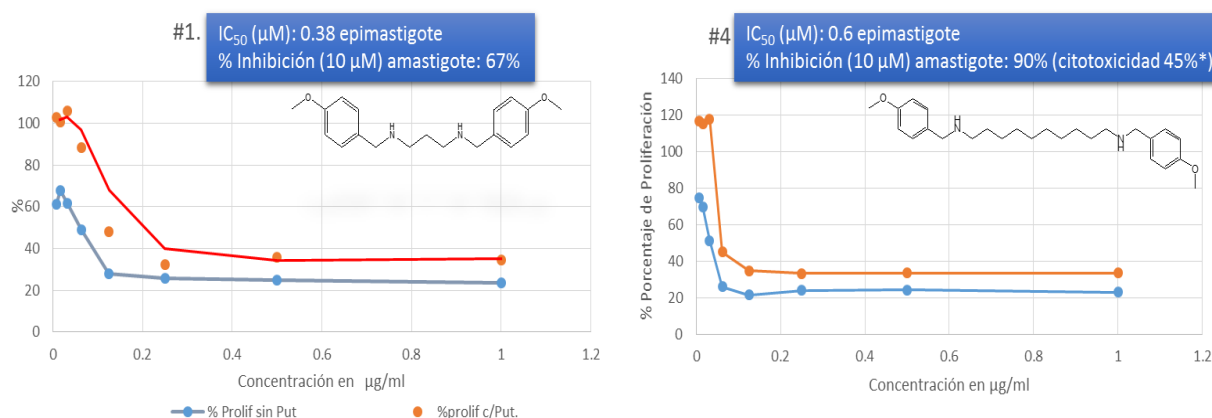
	4-OMe	4-OBn	4-OBn 3-OMe	3,4-diOBn	4OMe 3OH	4-H	4-Isop
3	Rojo	Azul	Azul	NT	Azul	Azul	NT
4	Rojo	Azul	Azul	NT	Azul	Azul	NT
6	Rojo	Azul	Azul	NT	Azul	Azul	NT
8	Rojo	Rojo	Rojo	NT	Rojo	Rojo	Rojo
10	Rojo	Rojo	Rojo	NT	Rojo	Rojo	Rojo
12	Rojo	Rojo	Rojo	NT	Rojo	Rojo	Rojo

	4-F	4-Br	4-Cl	4-Me	PentaFluor
8	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
10	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
12	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo

**FIGURA 78.** Resultado en cultivos suplementados. Azul: compuestos que en presencia o ausencia de Put, mostraron la misma actividad. Rojo: compuestos con comportamiento diferente respecto de la curva sin el agregado de Putrescina. NT: No testeado.

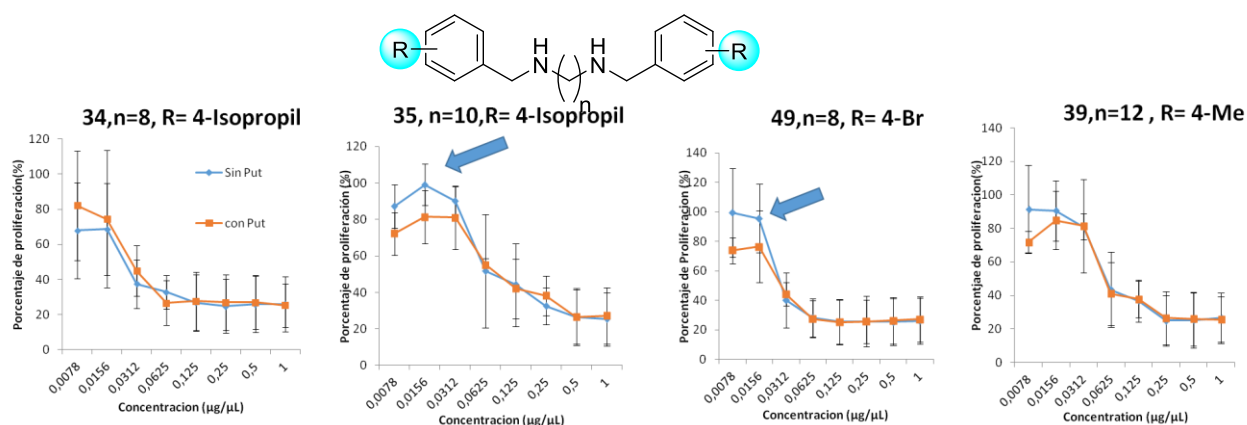
Los resultados de los derivados con sustituyentes oxigenadas mostraron **1** y **4** (derivados R=4-MeO) poseen una moderada protección en presencia de Put.<sup>143</sup>



**FIGURA 79.** Compuestos con actividad antileishmanicida, en presencia o ausencia de Put.

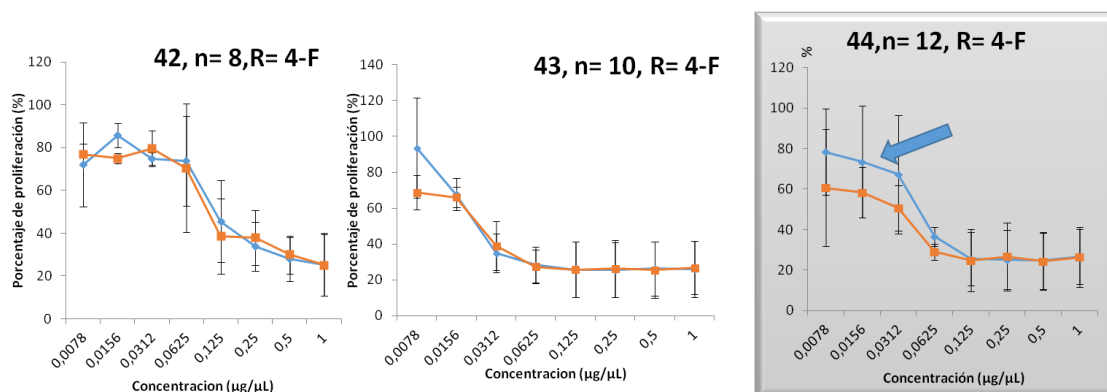
En la **FIGURA 80** se pueden observar los comportamientos de cuatro compuestos que presentaron una diferencia en la viabilidad a concentraciones bajas de al menos un 20 %. En este caso encontramos que a diferencia de los compuestos **1** y **4**, en derivados **39**, **38** y **48**,

posee un aumento de la actividad queda claramente reflejada en las curva de crecimiento en presencia de Put. De este modo, no ocurre una protección, sino una potenciación del efecto de los compuestos. En los casos en que se produce un efecto protector la incorporación del metabolito sugiere que el compuesto está interfiriendo en su metabolismo corriente arriba, en cambio en casos como este, en donde aumenta su actividad el efecto serian en enzimas que se encuentran corriente abajo. Una posible explicación de este efecto es que el compuesto estaría interfiriendo mecanismos de detoxificación, regulación u otros en donde participa putrescina y el gran exceso del metabolito impediría su completa metabolización, contribuyendo a un aumento de la actividad antiproliferativa.



**FIGURA 80.** Porcentaje de proliferación vs concentración de los compuestos, en presencia o ausencia de Putrescina (Put).

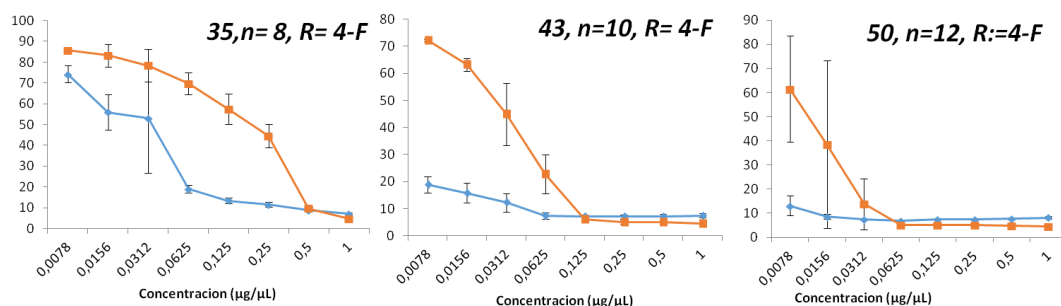
En el caso de los análogos de 4-Fluor bencilo se observa un comportamiento particular. (FIGURA 81).



**FIGURA 81.** Derivados de 4-FluorBencilo, en presencia de Putrescina (línea naranja) o ausencia (azul)

En este caso se aprecia una correlación entre el aumento del largo de cadena y la disminución de la actividad en presencia de Put. Este dato indicaría que la inhibición de la enzima mejora con compuestos de cadena más larga.

Como mencionamos previamente, se realizaron además ensayos con cultivos suplementados con espermidina. Los resultados para los análogos de 4-Fluor bencilo mostraron protección. Siguiendo la misma tendencia que en el ensayo con Put.(**FIGURA 82**)



**FIGURA 82.** Derivados de 4-FluorBencilo, en presencia de espermidina (línea naranja) o ausencia (azul).

Es para destacar en esta familia que la protección respecto a la Esp es más acentuada a medida que disminuye el largo de cadena, o en otro sentido, a medida que aumenta el número de carbonos observamos una mejoría en la afinidad del compuesto al blanco.

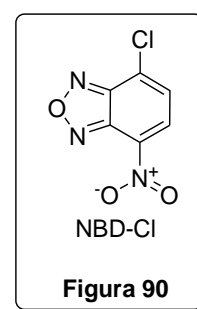
El sitio activo de SpdSin parece tener una cavidad hidrófoba relativamente grande adyacente a un sitio negativamente cargado, al cual se une un grupo amino de la putrescina cargada, con otro grupo amino situado en la cavidad hidrófoba en si forma libre para ser aminopropilado por la S-denosilmetionina descarboxilada.<sup>144,165</sup> La mayoría de los estudios de la SpdSin y sobre la espermina sintasa (humana) ha revelado que los mejores inhibidores interaccionan con el sitio de unión del AdoMet descarboxilado de modo competitivo, siendo el S-Adenosil-1,8-diamino-3-tioctano uno de los compuestos que arrojó los mejores resultados. Estudios por difracción de rayos X posteriormente permiten obtener una visión aun más precisa de las interacciones en el sitio activo de la enzima.<sup>166</sup>

Como conclusión de estos estudios realizados tendientes a encontrar evidencias sobre el mecanismo de acción, podemos decir que los resultados obtenidos no avalan a la TryS como el blanco de los compuestos preparados. En lo referente a los ensayos con cultivos suplementados, la protección encontrada para algunos derivados en el ensayo con Put y espermidina evidencian la participación de algunos de las enzimas corriente abajo de la espermidina en el mecanismo de acción. Sin embargo, la falta de correlación y el escaso efecto encontrado en todos estos ensayos, indicarían una participación minoritaria de estas enzimas en el mecanismo

## 7.6 Síntesis y caracterización de derivados fluorescentes. Aplicación en estudios por microscopia de fluorescencia

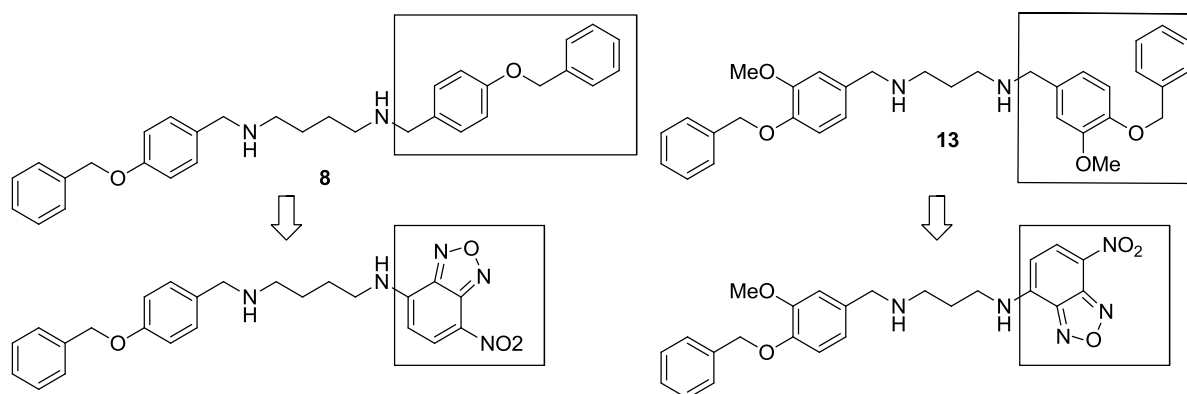
Entre los posibles estudios tendientes a dilucidar el mecanismo de acción, determinar la forma en que los compuestos se internalizan y su localización aportan información crucial. Para estudiar la incorporación y la localización de compuestos activos tradicionalmente se ha utilizado análogos marcados con isotopos radiactivos. Esta metodología tiene las ventajas de poseer una alta sensibilidad sin necesidad de introducir modificaciones sustanciales en la molécula. La desventaja evidente de usar compuestos radiactivos es el requerimiento de infraestructura adecuada y habilitada para tal fin y el limitado arsenal de precursores y reactivos marcados para realizar la síntesis. Alternativamente, el uso de sondas fluorescentes, soluciona la problemática que genera el uso de material radioactivo, pero inevitablemente es necesario introducir modificaciones estructurales que alteran la demanda estérica y electrónica. Dada la situación planteada y las disponibilidades de infraestructura optamos por diseñar y preparar análogos fluorescentes de los análogos más activos y estudiarlos mediante microscopía de fluorescencia.

Para preparar un compuesto que posea un marcador fluorescente existen dos estrategia, por una lado se puede usar la molécula intacta incorporando el marcador a través de los grupos funcionales que ésta posee y por otro, se puede reemplazar una porción de la molécula por el fluoróforo. La primera estrategia se suele usar con productos naturales y moléculas complejas ó donde la sustitución de una porción es, desde el punto de vista sintético, costosa. La segunda opción es la elegida en compuestos de estructura simple o en las que sus rutas de preparación son conocidas y en general de pocos pasos. Dadas las características de las familias de compuestos preparados, nos inclinamos por la segunda estrategia, siendo necesario seleccionar un fluoróforo que debe ser de tamaño y polaridad similar a la porción a reemplazar. Del amplio arsenal de fluoróforos existentes, en primera instancia seleccionamos BODIPY, pireno, fluoresceína, *N*-Metilantranilato y el 7-nitro-1,2,3-benzoxadiazol (NBD) como posible candidatos. De todos estos, elegimos el NBD,(**FIGURA 83**) debido a su tamaño reducido, baja polaridad, reducido costo y simplicidad de su incorporación.



Para diseñar el compuesto marcado se debe tener en cuenta que posibilidades presenta la molécula, para que la intervención produzca la menor alteración de sus propiedades. En el caso de los compuestos **8** y **13**, seleccionados como molde para el diseño, la incorporación del

fluoróforo debería realizarse en remplazo del sustituyente de uno de los nitrógenos, para evitar el aumento de la demanda estérica y mantener la basicidad de la molécula.



**FIGURA 83** Compuestos usados como molde para la síntesis de análogos marcados.

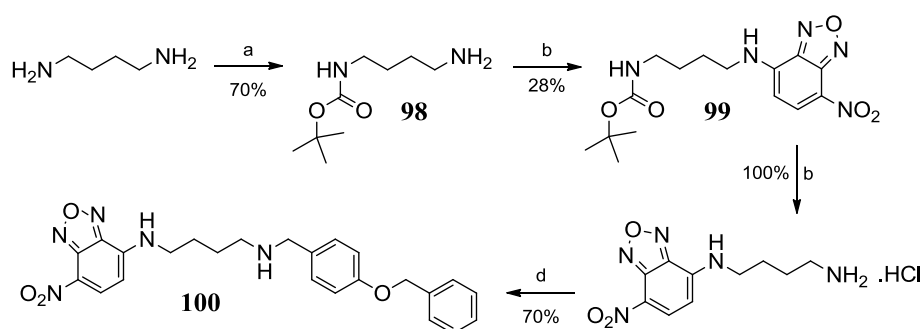
Balaban A y otros<sup>167</sup> describieron la reactividad de aminas primarias con el Cl-NBD. Dado que en general la aplicación de estos análogos depende de su capacidad de interactuar con membranas y esta depende de su lipofilicidad, mostrando que los análogos poseen una buena correlación entre el LogP y la hidrofobicidad experimental obtenida. En la **TABLA 27** se muestran los parámetros topológicos calculados para las sondas diseñadas y uno de los análogos reportados por Balaban y otros,<sup>167</sup> mostrando una muy buena correlación de todos los parámetros incluso en los valores calculados de actividad biológica. Si bien estos valores de actividad no se relacionan con las evaluadas en esta tesis, pronostican conductas similares para los tres compuestos

**Tabla 27.** Comparación de los análogos a sintetizar, respecto de la molécula de la literatura 3.

#	miLogP	TPSA	PM	vol
<b>100</b>	4,99	118,03	447,4	402,49
<b>2N</b>	4,31	127,27	463,4	410,78
<b>3N</b>	4,26	108,80	349,3	298,43

A partir de los valores de inhibición encontrados se decidió sintetizar el análogo **100** que requería de pasos simples para su preparación. Se diseñaron dos esquemas de síntesis en este contexto, el primero consistía en la generación de una diamina monoalquilada con NBD, desprotección del grupo amino y aminación reductiva para incorporar el grupo director de la

actividad. Alternativamente se podía realizar en primer lugar la aminación reductiva, para luego alquilar con el NBD. Más allá de los esfuerzos realizados los rendimientos globales fueron similares, realizando la aminación reductiva en primer lugar o comenzando con la alquilación de la diamina. En el **ESQUEMA 10** se describe la secuencia final. En primer lugar se monoprotegió la 1,4-butilendiamina con anhídrido de Boc y luego se alquiló el grupo amino libre con el Cl-NBD. Seguidamente se realizó la desprotección del grupo amino mediante un tratamiento ácido. Finalmente, se llevó a cabo la aminación reductiva usando TMOF obteniéndose un rendimiento del 70% de diamina-NBD (**100**).

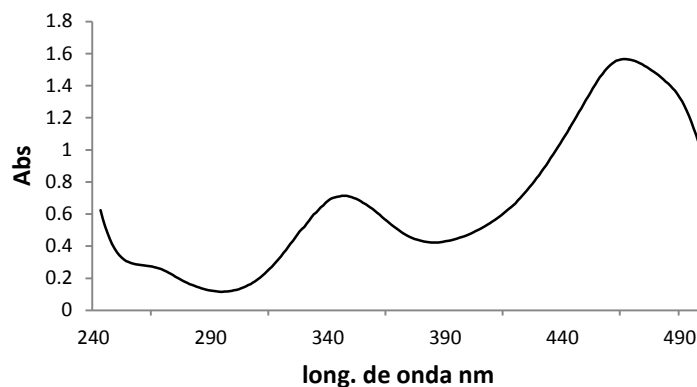


**ESQUEMA 10.**a) EtOH, TEA, (Boc)<sub>2</sub>O, b) NBD-Cl, THF, TEA, NaHCO<sub>3</sub>; c) MeOH, HCl 60 °C; d) TMOF; TEA (A) 4-Benciloxi-3-metoxi-benzaldehído, (B) 4-Benciloxi-benzaldehído; triacetoxiborohidruro de sodio.

Los dos últimos pasos requirieron de cierta modificación. Debido a que la reacción de aminación reductiva produce mejores rendimientos con la amina libre, se procedió a secar el clorhidrato generado en la etapa de desprotección y se neutralizó por el agregado de trietilamina en trimetilortoformiato como solvente. Seguidamente se agregó triacetoxiborohidruro de sodio, para realizar de manera más suave, la etapa de reducción de la imina formada.

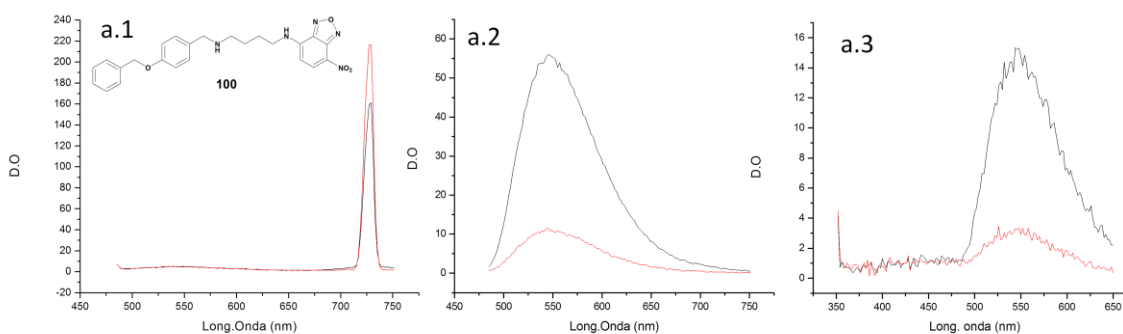
Una vez obtenido el producto se procedió a realizar su caracterización espectroscópica, adquiriéndose sus espectros de absorción y emisión. Los espectros fueron adquiridos disolviendo primero la muestra en DMSO y diluyéndose a la concentración de trabajo en agua, encontrándose que no ocurría un apagamiento de la intensidad de fluorescencia, sin variaciones significativas respecto a lo encontrado en la literatura para el NBD (4-amino-7-nitro-benzofurazano).

En la **FIGURA 84** se muestra el espectro de absorción de **100** que posee un desplazamiento de hacia el azul de su máximo de absorción respecto del espectro del Cl-NBD.



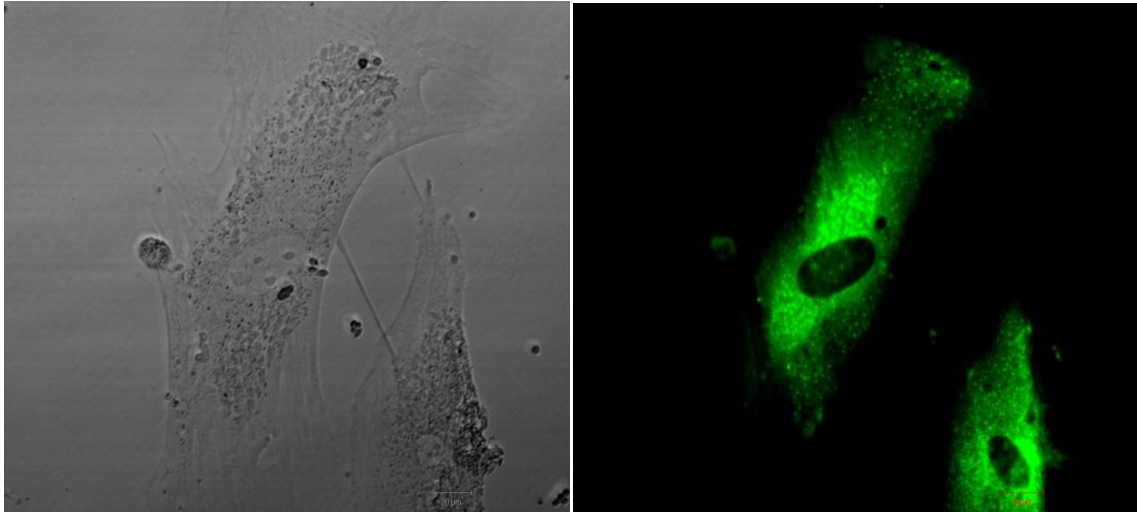
**FIGURA 84.** Espectro de absorcion del compuesto **100**.

Los máximos de absorción fueron usados para adquirir los espectros fluorescencia **FIGURA 85**. Sólo se observaron fenómenos de apagamiento de acuerdo al solvente y a la posibilidad de producirse distintas interacciones entre anillos alterando, de acuerdo al pH, el espectro de emisión del compuesto, comparado con el NBD.



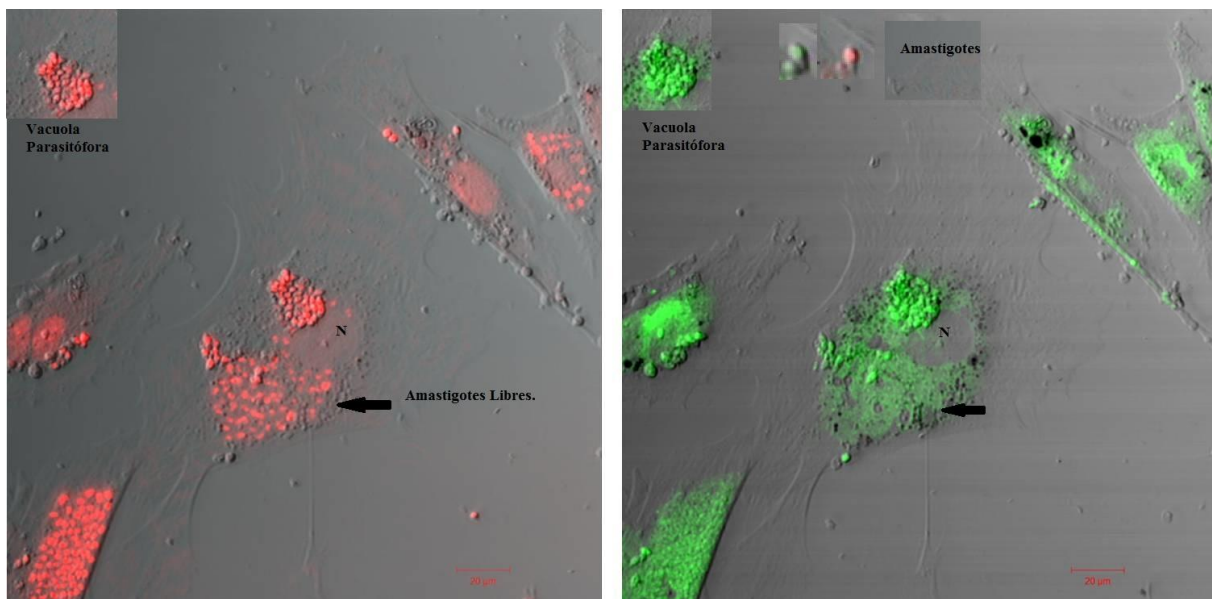
**FIGURA 85.** Espectros de emision de fluorescencia. a.1)  $\lambda_{exc}=270nm$ ; a.2)  $\lambda_{exc}=475nm$ ; a.3)  $\lambda_{exc}=345nm$ . La linea negra [50  $\mu M$ ], roja [5  $\mu M$ ].

Habiendo determinado las características espectroscópicas del análogo fluorescente, se procedió a realizar los ensayos de internalización en cultivos de amastigotes de *Tc* en presencia del análogo. Se inocularon los cultivos con **100** en el ensayo HTS y el MTS, encontrándose que en ambos ensayos el compuesto fluorescente no presentaba actividad tripanostática y no poseía una actividad comparable al resto de la familia de derivados sinterizados. Si bien esto no era esperado, facilita el ensayo, ya que el compuesto no es tóxico para el parásito. Los ensayos de los compuestos fluorescentes resultaron satisfactorios pudiéndose observar mediante microscopia confocal (**FIGURA 86**) y tinción con DAPI (**FIGURA 87**) una acumulación de la fluorescencia en los amastigotes, indicando que los compuestos resulta internalizados.



**FIGURA 86** . Imágenes de las células infectadas con amastigotes. Se observa acumulación de la fluorescencia en la zona donde se encuentran los amastigotes. (DAPI,  $\lambda_{exc}$ = 358 nm,  $\lambda_{em}$ =461 nm; **100**,  $\lambda_{exc}$ =475 nm,  $\lambda_{em}$ = 550 nm)

Podemos decir entonces que los compuestos de esta biblioteca se internalizan atravesando las membranas lipídicas, sin ser acumuladas en las mismas. Una de las preguntas que no se pueden responder de manera concisa es el lugar donde se acumulan estos compuestos y por tanto donde estarían actuando los análogos a los mismos. En la **FIGURA 87** se puede observar que donde se encuentra la vacuola parasitófora la señal resulta más intensa, a pesar que en la zona donde se hallan las marcas de DAPI mas uniformemente distribuidas, la señal del compuesto se torna más difusa



**FIGURA 87**. Se puede observar en la tinción con DAPI(rojo) y el compuesto fluorescente (verde) la coexistencia de la marca en ambos lugares de la célula. (DAPI:  $\lambda_{exc}$ : 358,  $\lambda_{em}$ :461, **100**:  $\lambda_{exc}$  :475,  $\lambda_{em}$ : 550nm)

Esto puede deberse a una mayor concentración del compuesto en los amastigotes, probando de algún modo que existe un transporte hacia su interior o que debido al pH interno de la vacuola se exagera la fluorescencia, para una misma cantidad de compuesto. Otro hecho destacable es que no se encuentra fluorescencia en el núcleo de la célula hospedadora, lo cual constituye un hecho interesante ya que no sería el blanco, lo cual indicaría que no existe interacción con el ADN, avalado por la escasa citotoxicidad encontrada. También estas imágenes permiten considerar que no se trata de inhibición del transporte de poliaminas por bloqueo de los transportadores debido a que no se observa acumulación de fluorescencia en la membrana, indicando que el compuesto atraviesa la membrana y actúa a nivel intracelular



***8. CONCLUSIONES.***

## 8 CONCLUSIONES

Las enfermedades desatendidas comprenden un conjunto de patologías que son pobremente atendidas desde los sistemas de salud y las empresas farmacéuticas. Recientemente mediante la colaboración de organismos no gubernamentales, entes de los estados y emprendimientos privados, esa desatención ha pasado a producir modelos sinérgicos de colaboración que han producido avances llevando a tener nuevos candidatos en fases clínicas después de mucho tiempo. (TABLA 28)

**TABLA 28.** Resumen de drogas utilizadas y en estudio contra los parasitosis estudiadas en la presente tesis

	<b>Drogas de uso habitual</b>	<b>Drogas en evaluación</b>
<i>L. donovani</i>	Anfotericina B (distintas posologías), Eflortina, Pentamidina	Diferentes formulaciones de Anfotericina
<i>T. brucei</i>	Eflortina, Melarsoprol, Pentamidina, Suramina.	Combinaciones entre Eflortina y otros
<i>T. cruzi</i>	Benznidazol, Nifurtimox.	Pozaconazol, K777, combinaciones Pozaconazol-Benznidazol
<i>T. gondii</i>	Clindamicina, Pirimetamina, Sulfametoxazol	S/D
<i>P. falciparum</i>	Cloroquina, Primacrina, Artemisinina.	Naftoquinona, Strictosamina, Protopina, Ferroquina, Tafenoquina, Sulfametoxazol-trimetoprima, Fosfomicidomina.

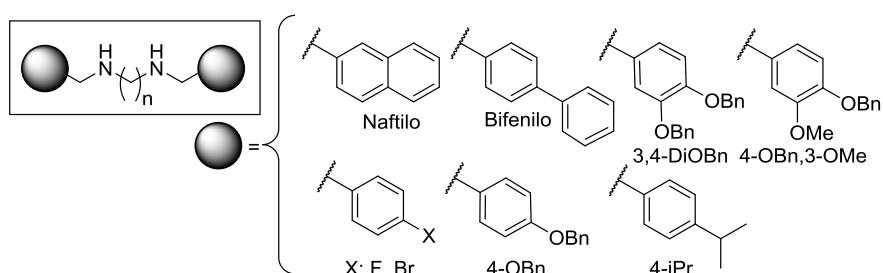
El objetivo principal de este trabajo de tesis fue generar una estrategia tendiente a realizar aportes en estos esfuerzos desde la órbita del sector científico nacional. A continuación se detallan las principales conclusiones alcanzadas fruto de este trabajo.

- ❖ Se planteó un esquema de trabajo general que pudo ser llevado adelante y sienta las bases para llevar adelante las etapas iniciales de desarrollo de drogas en el ámbito académico.



- ❖ Se postularon las diaminas alifáticas como una posible estructura privilegiada y se prepararon 97 derivados, 63 de los cuales fueron nuevos. El curso de las reacciones fue dependiente de la naturaleza de los aldehídos usados, obteniéndose los productos con rendimientos que en general fueron buenos.

- ❖ Se ensayó la actividad antiproliferativa sobre los agentes etiológicos de la leishmaniasis visceral, la tripanosomiasis africana, la enfermedad de Chagas, la toxoplasmosis y la malaria, en estadios intra y extracelulares. Además se han explorado diferentes espacios químicos que han permitido abrir nuevas expectativas respecto de nuevos líderes, apoyados éstos en estudios cercanos de inhibición de los diferentes parásitos contra los cuales resultaron activos.
- ❖ La mayoría de los compuestos estudiados resultaron activos contra todos los parásitos ensayados y presentan una baja citotoxicidad. De este modo, se encontraron miembros de la colección con promisorios perfiles de actividad que los posiciona como candidatos para las ulteriores etapas de desarrollo. (FIGURA 88 y TABLA 29).



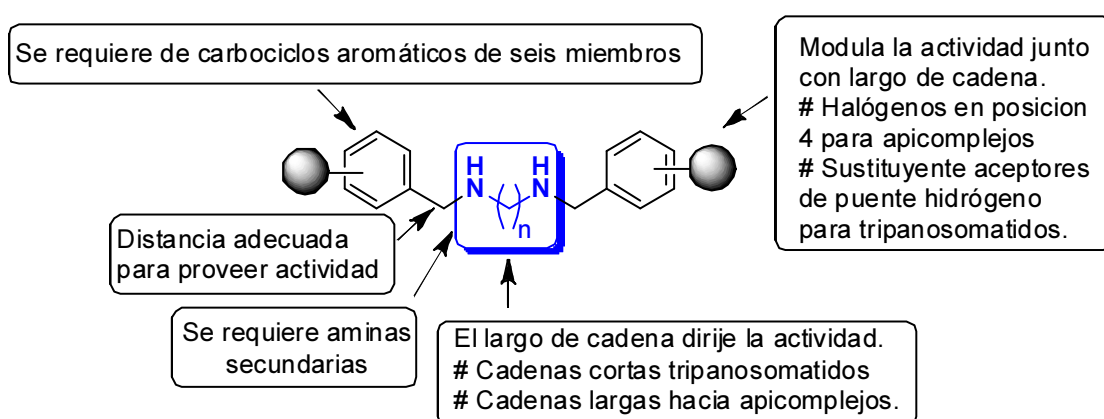
**FIGURA 88.** Estructura de los compuestos seleccionados.

**TABLA 29.** Compuestos seleccionados por mejor inhibición.

(ID)	n	R	<i>L. donovani</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. gondii</i>	<i>P. falciparum</i>
7	3	4-BnO bencilo	0,257	0,062	0,780	75	1,220
8	4	4-BnO bencilo	0,041	0,097	0,760	50	2,081
9	6	4-BnO bencilo	0,235	0,140	1,830	25	0,393
13	3	4-BnO ,3-MeO bencilo	0,227	0,190	0,810	100	0,418
15	6	4-BnO ,3-MeO bencilo	0,210	0,190	0,740	25	0,264
17	10	4-BnO ,3-MeO bencilo	0,016	0,110	0,800	25	1,120
31	3	4-iPr Bencilo	0,561	0,190	0,530	25	0,665
32	4	4-iPr Bencilo	0,680	0,029	0,370	75	0,403
33	6	4-iPr Bencilo	2,630	0,029	0,390	75	0,416
44	12	4-F Bencilo	1,544	0,197	0,650	50	0,331
50	12	4-Br Bencilo	3,722	0,078	1,01	100	0,420
51	3	Naftilmetil	1,132	0,080	1,53	100	6,240
52	4	Naftilmetil	3,582	0,156	0,640	90	5,540
61	10	3,4-diOBn bencilo	3,60	0,740	0,710	25	3,067
64	4	Bifenilmetil	0,146	0,011	0,370	25	1,917

*Ld, Tb, Tc* y *Pf* IC<sub>50</sub> (μM) *Tg* % de inhibición a 1 μM.

- ❖ Se realizaron simulaciones *in silico* de las propiedades estructurales y fisicoquímicas para lo cual se compararon distintos software y plataformas disponibles en la web.
- ❖ Los estudios de las densidades electrónicas, de propiedades fisicoquímicas y los descriptores topológicos resultaron útiles para racionalizar los resultados obtenidos y fueron usados para seleccionar los mejores candidatos a líderes.
- ❖ Dadas las características de los compuestos preparados, el metabolismo de poliaminas aparecía como el posible blanco de acción por lo que se abordaron estudios para validarlo como posible blanco de acción.
- ❖ Los estudios de inhibición enzimáticos y en cultivos de *Ld* suplementados mostraron que algunos análogos poseen capacidad de inhibir marginalmente enzimas de la biosíntesis de poliaminas, mostrando una participación menor en el mecanismo de acción.
- ❖ Se desarrolló un análogo fluorescente (**100**) y se estudió en amastigotes de *Tc*. Los resultados nos permiten concluir que el compuesto atraviesa tanto la membrana de la célula hospedera, como la del parásito, lo que lo posicionaría como una posible herramienta para estudiar el transporte de estructuras similares.
- ❖ Los resultados de microscopía mostraron que el derivado fluorescente no se encuentra anidado en una estructura celular determinada de la célula hospedadora. No se observó acumulación del análogo en el núcleo, lo que supone que no existe interacción con el ADN.
- ❖ En función de los resultados obtenidos, se propuso el siguiente modelo que describe los elementos principales que modulan la actividad de la colección.



- ❖ La estrategia desarrollada resultó novedosa y conveniente, siendo altamente productiva si ponderamos el tiempo invertido y la cantidad de compuestos activos encontrados, permitiendo generar buenos candidatos a drogas para las cinco parasitosis en estudio.

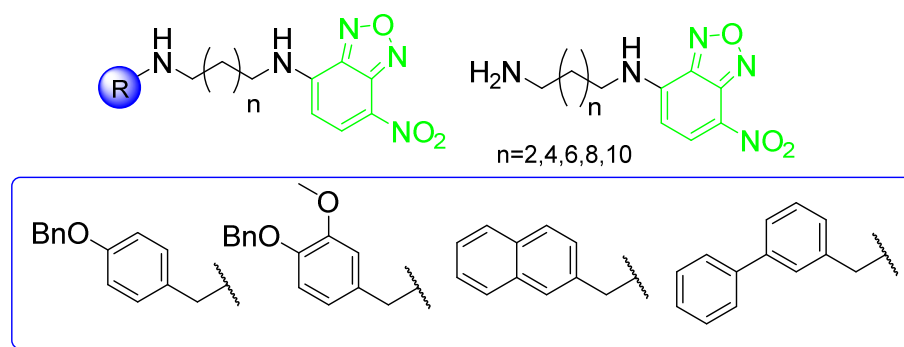


***9. PERSPECTIVAS.***

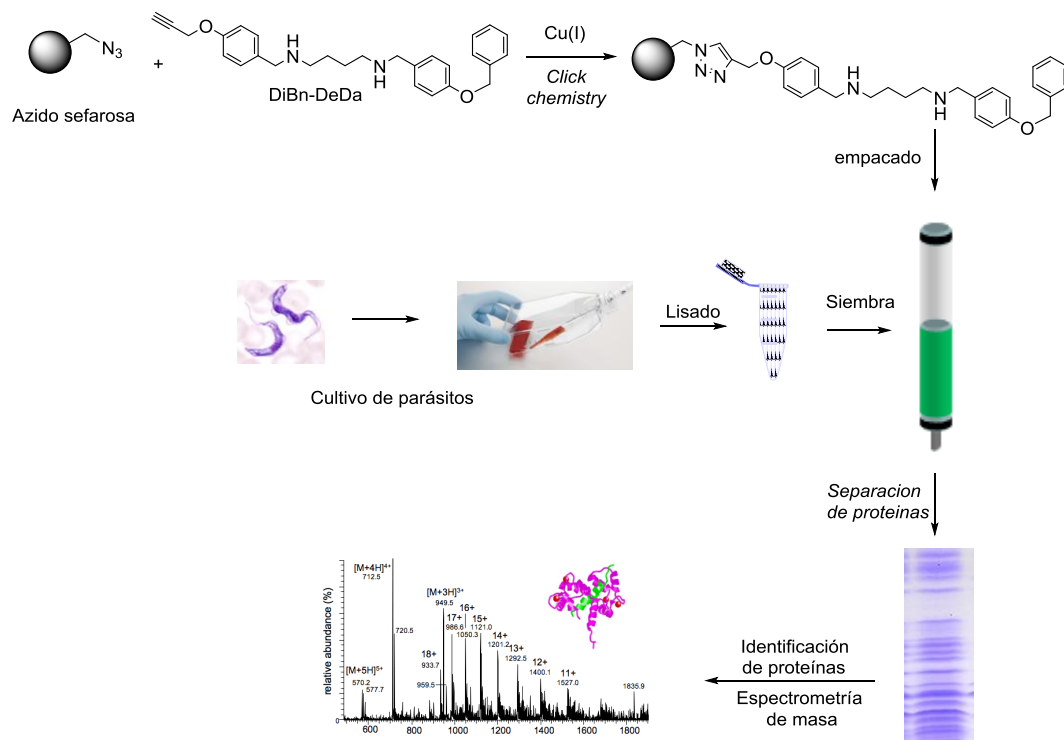
## 9 PERSPECTIVAS Y ESTUDIOS FUTUROS.

El desarrollo del presente trabajo de tesis ha dejado abiertos diversos interrogantes sobre las características estructurales que proveen la actividad y el mecanismo de acción en cada parásito estudiado. Para responder algunas de estas preguntas se abordarán los siguientes estudios:

- ❖ Se sintetizarán los derivados N-metilados de los compuestos más activos para estudiar el efecto de una carga permanente sobre los grupos amino.
- ❖ Para determinar la importancia de un segundo átomo de oxígeno como aceptor de puentes hidrógeno, se prepararán derivados 3,4-DiMeO y 2,5-diMeO bencilo.
- ❖ Se ampliará la biblioteca de análogos de NBD, sintetizando derivados monosustituidos y disustituidos para estudiar el transporte y la localización mediante estudios espectroscópicos y de microscopía en los distintos parásitos.



- ❖ Se buscará ampliar el estudio del efecto de agujeros-□ en la actividad de haloderivados con actividad biológica.
- ❖ En base a los compuestos seleccionados como mejores candidatos (**TABLA 28**), se optimizará su preparación a escala de gramos para realizar los ensayos en modelos murino de las distintas enfermedades.
- ❖ En vista que los compuestos preparados no parecen tener un único blanco de acción de diseño una estrategia general de “pull down” para capturarlos e identificarlos. (**FIGURA 89**)



## ***10. APÉNDICES.***

## 10 APÉNDICES.

### APENDICES A. Actividades contra la familia Apicomplexa.

ID	n	R	PM	<i>P.f</i> D6(ng/ml) (a)	IC <sub>50</sub> (μM)	<i>P.f</i> W2(ng/ml) (b)	IC <sub>50</sub> (μM)	<i>T.g</i> intrac 1uM % inh(c)	<i>Tg a</i> 1μM	<i>Tg a</i> 10μM (d)
1	3	4-MeO	314,42	1000	3,18	1700	5,407	50	++	NT
2	4	4-MeO	328,45	1500	4,57	2200	6,698	25	+++	+++
3	6	4-MeO	356,5	1100	3,08	1200	3,36	25	+++	+++
4	8	4-MeO	384,55	570	1,48	650	1,69	25	+++	C
5	10	4-MeO	412,61	250	0,60	280	0,67	50	++	C
6	12	4-MeO	440,66	700	1,58	820	1,86	25	+++	C
7	3	4-BnO	466,61	570	1,22	670	1,43	75	+	C
8	4	4-BnO	480,64	1000	2,08	1500	3,12	50	++	+++
9	6	4-BnO	508,69	200	0,39	150	0,29	25	+++	+++
10	8	4-BnO	536,75	2000	3,72	2200	4,09	25	+++	C
11	10	4-BnO	564,8	1400	2,47	2000	3,5	75	+	NT
12	12	4-BnO	592,85	4760	8,03	4760	8,03	ND	NT	NT
13	3	4-BnO 3-MeO	526,67	220	0,42	250	0,474	100	-	C
14	4	4-BnO 3-MeO	540,69	180	0,33	270	0,49	50	++	+++
15	6	4-BnO 3-MeO	568,75	150	0,26	250	0,439	25	+++	+++
16	8	4-BnO 3-MeO	596,8	190	0,31	260	0,435	0	C	C
17	10	4-BnO 3-MeO	624,85	700	1,12	660	1,05	25	+++	C
18	12	4-BnO 3-MeO	652,91	840	1,28	900	1,37	25	+++	C
19	3	4-OMe 3OH	346,42	5000	14,43	5000	1443	ND	ND	ND
20	4	4-OMe 3OH	360,45	NA	NA	NA	NA	75	+	+++
21	6	4-OMe 3OH	388,5	NA	NA	NA	NA	50	++	+++
22	8	4-OMe 3OH	416,55	2000	4,80	2300	5,52	25	+++	C
23	10	4-OMe 3OH	444,61	880		840	1,88	25	+++	C
24	12	4OMe 3OH	472,66	932,2	1,97	1362,5	2,88	25	+++	C
25	3	4H	254,37	600	2,35	670	2,63	25	+++	C
26	4	4H	268,4	800	2,98	670	2,49	25	+++	C
27	6	4H	296,45	620	2,09	620	2,09	25	+++	C
28	8	4H	324,5	120	0,37	120	0,369	25	+++	C
29	10	4H	352,56	170	0,48	100	0,28	25	+	C
30	12	4H	380,61	370	0,97	390	1,02	25	+++	C
31	3	4-Isopropil	338,52	225,2	0,66	377,8	1,11	25	+++	C
32	4	4-Isopropil	380,61	153,4	0,40	273,1	0,71	75	+	C
33	6	4-Isopropil	408,67	170	0,41	360	0,88	75	+	C
34	8	4-Isopropil	436,7	270	0,61	160	0,366	0	C	C
35	10	4-Isopropil	464,77	2300	4,94	2800	6,024	25	+++	C
36	12	4-Isopropil	352,56	390	1,10	390	1,106	25	+++	C
37	8	4-Me	380,61	290	0,76	280	0,735	0	C	C
38	10	4-Me	408,67	550	1,34	530	1,296	25	+++	C
39	12	4-Me	532,4	NA	NA	NA	NA	25	+++	-

ID	n	R	PM	(a)	IC <sub>50</sub> (μM)	(b)	IC <sub>50</sub> (μM)	(c)	Tg a 1μM	(d)
40	8	PentaF	560,51	NT	NT	NT	NT	50	++	NT
41	10	PentaF	360,48	190	0,52	110	0,31	25	+++	C
42	12	PentaF	560,51	5000	8,92	5000	8,92	ND	NT	NT
43	8	4-F	388,54	220	0,56	130	0,33	0	C	C
44	10	4-F	416,59	250	0,60	190	0,45	0	C	C
45	12	4-F	392,4	130	0,33	210	0,53	50	++	C
46	8	4-Cl	421,4	280	0,66	270	0,64	50	++	C
47	10	4-Cl	449,49	640	1,42	780	1,73	25	+++	C
48	12	4-Cl	482,3	600	1,24	1110	2,30	25	+++	C
49	8	4-Br	510,35	1300	2,54	1900	3,72	25	+++	C
50	10	4-Br	538,4	900	1,67	930	1,73	25	+++	C
51	12	4-Br	354,48	151,8	0,42	207	0,58	100	-	C
52	3	Naftil	368,521	2300	6,24	3200	8,68	100	-	C
53	4	Naftil	396,57	2200	5,54	2800	7,06	80	+/-	C
54	6	Naftil	424,287	NT	NT	NT	NT	ND	NT	NT
55	8	Naftil	452,67	1000	2,21	1000	2,21	ND	NT	NT
56	10	Naftil	480,72	3700	7,68	3400	7,07	25	++	C
57	12	Naftil	678,85	595,6	0,88	867,1	1,27	50	++	C
58	3	3,4-diOBn	692,88	2200	3,17	1400	2,02	25	+++	C
59	4	3,4-diOBn	720,23	1671,2	2,32	2407,2	3,34	25	+++	C
60	6	3,4-diOBn	748,99	1205,4	1,61	953	1,27	25	+++	C
61	8	3,4-diOBn	777,04	1292,4	1,66	1544,9	1,98	0	C	C
62	10	3,4-diOBn	805,09	2469,2	3,07	3213,1	3,99	0	+++	C
63	12	3,4-diOBn	406,5	195,4	0,48	221,4	0,54	25	+++	C
64	3	Bifenil	420,6	207,3	0,49	348	0,83	25	+++	+++
65	4	Bifenil	448,6	860	1,92	1100	2,45	25	+++	C
66	6	Bifenil	476,7	3400	7,13	3400	7,13	ND	ND	ND
67	8	Bifenil	504,7	>4760	ND	ND	ND	ND	ND	ND
68	10	Bifenil	532,81	>4760	ND	ND	ND	ND	ND	ND
69	12	Bifenil	232,32	>4760	ND	ND	ND	ND	C	C
70	3	Pirrol	246,35	>4760	ND	>4760	ND	ND	C	C
71	4	Pirrol	274,4	NT	ND	NT	ND	ND	NT	NT
72	6	pirrol	302,45	1993	6,58	2289,4	7,59	25	+++	C
73	8	Pirrol	330,27	1407,9	4,26	1243,2	3,76	25	+++	C
74	10	Pirrol	358,57	597,7	1,66	800,3	2,23	25	+++	C
75	12	Pirrol	234,29	>4760	ND	>4760	ND	25	+++	+++
76	3	Furfural	248,32	3477,2	14,01	>4760	ND	25	+++	+++
77	4	Furfural	276,37	4085,4	14,87	2200	7,96	25	+++	+++
78	6	Furfural	304,42	1810,9	5,95	2530,3	8,31	25	+++	++
79	8	Furfural	332,48	1591,1	4,78	905,3	2,72	25	+++	C
80	10	Furfural	360,53	1561,4	4,33	1220,3	3,38	25	+++	C
81	12	Furfural	344,36	2359,8	6,85	2526,9	7,33	25	+++	C
82	3	4-NO2	358,39	2359,8	6,58	434,2	1,21	25	+++	+++
83	4	4-NO2	386,44	344	0,89	363,7	0,94	25	+++	++
84	6	4-NO2	414,49	247,5	0,59	288,9	0,69	25	+++	C

ID	n	R	PM	(a)	IC <sub>50</sub> (μM)	(b)	IC <sub>50</sub> (μM)	(c)	Tg a 1μM	(d)
85	8	4-NO2	442,45	254,4	0,57	227,4	0,51	25	+	C
86	10	4-NO2	470,6	148,7	0,31	3265	6,93	75	+++	C
87	12	4-NO2	319,87	2389,1	7,47	140	0,43	NT	NT	NT
88	3	H	435	NA	NA	NA	NA	ND		
89	4	H	448.64	NA	NA	NA	NA	ND		
90	6	H	476.69	NA	NA	NA	NA	ND		
91	8	H	504.74	NA	NA	NA	NA	ND		
92	10	H	532.8	NA	NA	NA	NA	75	+++	+++
93	3	4-MeO	554.72	NA	NA	NA	NA	ND		
94	4	4-MeO	568.74	NA	NA	NA	NA	ND		
95	6	4-MeO	596.79	NA	NA	NA	NA	ND		
96	8	4-MeO	624.85	NA	NA	NA	NA	ND		
97	10	4-MeO	652.96	NA	NA	NA	NA	75	+++	+++

**Apendice B. Actividades obtenidas contra la familia Tripanosomatidea.**

ID	n	R	PM	<i>Tbrucei</i> uM	<i>Ld</i> (p)µM	<i>Ld(a) % inh a 10µM</i>	%CC*	<i>T.c</i> (e) (µM)	<i>T.c</i> (a)(µM)**
1	3	4-MeO	314	2,04	1,24	67,4	(c)	10	20
2	4	4-MeO	328	3,2	8,52	8,2	1,36	10	20
3	6	4-MeO	357	0,22	6,73	65,0	0,56	10	0,2
4	8	4-MeO	385	0,55	1,56	76,7	0,30	10	20
5	10	4-MeO	413	2,303	1,45	58,0	0,38	2,3	20
6	12	4-MeO	441	NT	1,47	88,2	0,26	NT	20
7	3	4-BnO	467	0,062	0,25	114	0,20	0,78	1,4
8	4	4-BnO	481	0,092	0,04	57,1	(c)	0,76	20
9	6	4-BnO	509	0,14	0,235	29,9	(c)	1,83	0,36
10	8	4-BnO	537	0,2	1,13	12,7	0,93	0,99	12
11	10	4-BnO	565	0,62	4,60	48	(c)	10	14
12	12	4-BnO	593	NT	0,57	SP	SP	NT	20
13	3	4-BnO 3-MeO	527	0,19	0,22	40,2	(c)	0,81	20
14	4	4-BnO 3-MeO	541	0,17	0,24	47	0,78	0,73	20
15	6	4-BnO 3-MeO	569	0,19	0,21	28,7	0,61	0,74	20
16	8	4-BnO 3-MeO	597	0,19	0,17	25,2	(c)	0,82	20
17	10	4-BnO 3-MeO	625	0,11	0,01	48,2	0,30	0,8	20
18	12	4-BnO 3-MeO	653	0,105	1,10	4,5	1,09	0,967	20
19	3	4OMe 3OH	346	10	NA	NA	1,17	10	20
20	4	4OMe 3OH	360	10	NA	NA	1,09	10	20
21	6	4OMe 3OH	389	10	43,76	NA	1,24	10	3,20
22	8	4OMe 3OH	417	5,5	44,41	NA	(c)	10	20
23	10	4OMe 3OH	445	0,96	4,49	45,2	0,92	10	13,0
24	12	4OMe 3OH	473	1,692	4,315	27,6	1,13	3,93	20
25	3	4H	254	6,45	11,01	NA	1,09	10	1,0
26	4	4H	268	7,08	18,62	46	0,56	10	20
27	6	4H	296	2,03	13,83	94	0,17	10	20
28	8	4H	325	1,18	10,17	NT	NT	10	20

ID	n	R	PM	<i>Tbruce</i> i uM	<i>Ld</i> (p)µM	<i>Ld(a)</i> % inh a 10µM	%CC*	<i>T.c</i> (e) (µM)	<i>T.c</i> (a)(µM)**
29	10	4H	353	0,61	1,76	NT	NT	8,1	20
30	12	4H	381	0,19	1,58	72,3	0,21	0,557	20
31	3	4-Isopropil	339	0,19	0,56	76,6	0,15	0,528	20
32	4	4-Isopropil	353	0,02	0,68	114	0,23	0,372	20
33	6	4-Isopropil	381	0,03	2,67	107	0,04	0,392	20
34	8	4-Isopropil	409	0,13	0,48	70,4	0,14	0,32	20
35	10	4-Isopropil	437	0,19	20,60	62	0,80	0,65	1,0
36	12	4-Isopropil	465	0,66	5,80	73	0,47	SP	20
37	8	4-Me	353	0,24	2,41	81	0,26	0,48	20
38	10	4-Me	381	0,08	1,31	NA	1,16	0,62	0,03
39	12	4-Me	409	0,08	1,95	79,3	0,37	1,02	20
40	8	PentaF	504	7,28	6,14	NA	1,18	7,34	20
41	10	PentaF	532	2,45	18,72	64	0,40	15,92	20
42	12	PentaF	561	NT	NT	SP	SP	SP	SP
43	8	4-F	360	1,13	4,71	14	0,98	0,67	20
44	10	4-F	389	0,19	1,54	70	0,3	0,65	20
45	12	4-F	417	0,06	0,43	42	0,66	0,16	20
46	8	4-Cl	392	0,19	1,78	43	0,66	0,59	20
47	10	4-Cl	421	0,07	1,42	20	0,58	0,68	20
48	12	4-Cl	449	0,20	1,78	16,7	1,16	SP	20
49	8	4-Br	482	0,23	4,35	NA	1,10	0,57	3,7
50	10	4-Br	510	0,07	3,72	3,1	1,23	1,01	1,3
51	12	4-Br	538	0,08	1,13	6,3	1,21	1,53	5,8
52	3	Naftil	354	0,15	3,58	67,5	0,06	0,64	20
53	4	Naftil	369	0,05	1,29	106	0,14	0,62	1,40
54	6	Naftil	397	0,04	2,03	91	0,18	0,47	20
55	8	Naftil	424	NT	NT	NT	NT	NT	NT
56	10	Naftil	453	NT	NT	18,9	(c)	NA	20
57	12	Naftil	481	NT	3,59	62,7	(c)	SP	20
58	3	3,4diOBn	679	0,24	1,84	78,7	0,35	0,75	20
59	4	3,4diOBn	693	SP	2,33	65	(c)	SP	0,82
60	6	3,4diOBn	720	0,57	2,13	84,6	0,211	18,49	1,9
61	8	3,4diOBn	749	0,73	3,67	44,0	0,59	0,71	20
62	10	3,4diOBn	777	NT	8,37	SP	SP	SP	20
63	12	3,4diOBn	805	NT	15,52	70,3	0,35	SP	20

ID	n	R	PM	<i>Tbrucei</i> uM	<i>Ld</i> (p)µM	<i>Ld(a) % inh</i> a 10µM	%CC*	<i>T.c (e)</i> (µM)	<i>T.c</i> (a)(µM)**
64	3	Bifenil	407	0,01	0,14	60,9	0,02	SP	20
65	4	Bifenil	421	SP	0,59	58,3	0,75	SP	20
66	6	Bifenil	449	0,04	1,01	101,1	0,11	SP	1,1
67	8	Bifenil	477	0,23	3,81	77,4	0,21	SP	0,72
68	10	Bifenil	505	2,03	4,71	NT	NT	0,10	1,4
69	12	Bifenil	533	2,98	19,61	56,0	(c)	SP	20
70	3	Pirrol	232	30	NA	1,8	1,21	NA	0,96
71	4	Pirrol	246	30	NA	NA	1,26	NA	20
72	6	pirrol	274	NT	NT	NT	NT	NT	NT
73	8	Pirrol	302	2,27	15,02	59,5	0,32	1,92	20
74	10	Pirrol	330	0,67	3,36	102,7	0,17	1,13	20
75	12	Pirrol	359	0,72	3,37	NA	0,30	0,55	20
76	3	Furfural	234	30	107,3	NA	1,25	30,0	3.2
77	4	Furfural	248	6,94	111,9	2,5	1,31	15,87	20
78	6	Furfural	276	6,95	46,10	43,6	0,67	6,04	20
79	8	Furfural	304	2,85	27,43	71,1	0,19	2,27	20
80	10	Furfural	332	1,82	16,06	88,1	0,23	1,60	20
81	12	Furfural	361	0,77	4,83	82,4	0,23	5,65	20
82	3	4-NO2	344	30	20	NA	1,21	8,19	20
83	4	4-NO2	358	8,6	7,33	44,9	0,63	6,40	20
84	6	4-NO2	386	6,21	5,77	78,4	0,25	2,18	20
85	8	4-NO2	414	2,01	3,95	59,1	0,26	1,77	20
86	10	4-NO2	442	0,74	2,11	84,4	0,24	1,96	20
87	12	4-NO2	471	NT	15,26	19,9	1,20	NT	20
88	3	H	435	NT	46,01	NA	(c)	NT	20
89	4	H	449	NT	NA	NA	(c)	NT	20
90	6	H	477	NT	NA	NA	(c)	NT	20
91	8	H	505	NT	NA	NA	(c)	NT	20
92	10	H	533	NT	NA	NA	(c)	NT	20
93	3	4-MeO	555	NT	8,96	NA	(c)	NT	20
94	4	4-MeO	569	NT	5,09	NA	(c)	NT	20
95	6	4-MeO	597	NT	7,54	NA	(c)	NT	20
96	8	4-MeO	625	NT	17,61	NA	(c)	NT	20
97	10	4-MeO	653	NT	53,60	NA	(c)	NT	20

(c)Citotxico para las Fibroblastos por debajo de 0,1% de crecimiento respecto del Control Negativo.

## Appendice C.

ID	VERO	IS PFD6	IS PFW2	IS Tb	IS Ld	IS Tc	clogP	sol	dgl	DS	miLogP	TPSA	AC	DO	Viol	Vol.
1	4760	4,8	2,8	7,4	12,2	1,5	2,43	-2,91	1,67	0,8	3,06	42,5	4	2	0	315,4
2	4760	3,2	2,2	4,5	1,7	1,4	2,89	-3,18	0,47	0,67	3,34	42,5	4	2	0	332,2
3	3200	2,9	2,7	40,1	1,3	0,9	3,82	-3,72	-3,74	0,37	4,32	42,5	4	2	0	365,8
4	4760	8,4	7,3	22,5	7,9	1,2	4,75	-4,26	-3,74	0,3	5,36	42,5	4	2	1	399,4
5	4760	19,0	17,0	5,0	7,9	5,0	5,68	-4,8	-3,74	0,23	6,37	42,5	4	2	1	433,0
6	4760	6,8	5,8	NT	7,3	NT	6,61	-5,34	-3,74	0,18	7,38	42,5	4	2	1	466,6
7	3600	6,3	5,4	124,4	30,0	9,9	5,17	-5,55	-7,02	0,2	6,25	42,5	4	2	1	458,7
8	2800	2,8	1,9	60,1	140,0	7,7	5,63	-5,82	-8,21	0,17	6,52	42,5	4	2	1	475,5
9	2800	14,0	18,7	39,3	23,3	3,0	6,56	-6,36	-12,4	0,13	7,54	42,5	4	2	2	509,1
10	4760	2,4	2,2	44,3	7,8	9,0	7,49	-6,9	-12,4	0,11	8,44	42,5	4	2	2	542,7
11	4760	3,4	2,4	13,6	1,8	0,8	8,42	-7,44	-12,4	0,09	8,94	42,5	4	2	2	576,3
12	4760	1,0	1,0	NT	14,0	NT	9,34	-7,98	-12,4	0,08	9,27	42,5	4	4	2	609,9
13	3500	15,9	14,0	35,0	29,2	8,2	4,96	-5,59	-2,57	0,2	5,43	61,0	6	2	2	509,7
14	2700	15,0	10,0	29,4	20,8	6,8	5,42	-5,86	-3,75	0,16	5,70	61,0	6	2	2	526,5
15	4760	31,7	19,0	44,0	39,7	11,3	6,35	-6,4	-7,96	0,12	6,71	61,0	6	2	2	560,2
16	2700	14,2	10,4	23,8	20,8	5,5	7,28	-6,94	-7,96	0,1	7,73	61,0	6	2	2	593,8
17	4760	6,8	7,2	69,3	476,0	9,5	10,02	-9,58	-9,75	0,07	8,55	61,0	6	2	2	627,4
18	4760	5,7	5,3	69,4	6,6	7,5	9,13	-8,02	-8,74	0,08	9,01	61,0	6	2	2	661,0
19	4760	NA	NA	1,4	NA	1,4	1,83	-2,31	1,13	0,78	1,63	83,0	6	4	0	331,4
20	4760	NA	NA	NA	NA	1,3	2,76	-2,85	-1,95	0,46	1,90	83,0	6	4	0	348,2
21	4760	NA	NA	NA	NA	1,2	3,69	-3,39	-4,28	0,37	2,91	83,0	6	4	0	381,8
22	4760	2,4	2,1	5,7	2,4	1,1	4,62	-3,93	-4,28	0,3	3,92	83,0	6	4	0	415,4
23	4760	5,4	5,7	12,2	5,4	1,1	5,08	-4,2	-4,28	0,26	4,93	83,0	6	4	0	449,0
24	4760	5,1	3,5	10,8	5,1	2,6	6,47	-5,01	-4,28	0,17	5,94	83,0	6	4	1	482,6
25	4760	7,9	7,1	31,2	7,9	1,9	2,64	-2,87	0,31	0,7	2,95	24,1	2	2	0	264,3
26	4760	6,0	7,1	22,2	6,0	1,8	3,1	-3,14	-0,93	0,54	3,22	24,1	2	2	0	281,1
27	4760	7,7	7,7	25,9	7,7	1,6	4,03	-3,68	-5,14	0,37	4,23	24,1	2	2	0	314,7
28	4760	39,7	39,7	122,2	39,7	1,5	4,96	-4,22	-5,14	0,3	5,24	24,1	2	2	1	348,3
29	4760	28,0	47,6	79,4	28,0	1,7	5,89	-4,76	-5,14	0,23	6,25	24,1	2	2	1	381,9
30	4760	12,9	12,2	33,8	12,9	22,5	6,82	-5,3	-5,14	0,18	7,26	24,1	2	2	1	415,5
31	4760	21,1	12,6	62,4	21,1	26,6	3,09	-3,53	-1,87	0,46	5,98	24,1	2	2	1	364,2
32	4490	23,9	15,3	76,9	29,3	31,7	5,29	4,88	-2,5	0,016	6,25	24,1	2	2	1	381,0
33	2296	15,0	8,4	33,0	13,5	14,3	6,22	-5,42	-6,71	0,12	7,23	24,1	2	2	1	414,6
34	2700	15,9	7,5	22,9	10,0	19,6	7,15	-5,96	-6,71	0,09	8,24	24,1	2	2	1	448,2
35	4760	17,6	29,8	4,5	2,1	15,3	8,08	-6,5	-6,71	0,08	8,82	24,1	2	2	1	481,8
36	4760	2,1	1,7	34,6	12,2	23,1	9,01	-7,04	-6,71	0,07	9,19	24,1	2	2	1	515,4
37	4760	12,2	12,2	43,1	16,4	25,9	5,59	-4,91	-5,68	0,24	6,14	24,1	2	2	1	381,4
38	4760	16,4	17,0	21,2	8,7	20,5	6,52	-5,45	-5,68	0,19	7,15	24,1	2	2	1	415,0
39	4760	8,7	9,0	NA	NA	NA	7,45	-5,99	-5,68	0,15	8,15	24,1	2	2	1	448,6
40	4760	NA	NA	NT	NT	NT	5,55	-7,36	-14,9	0,14	6,30	24,1	2	2	2	397,6
41	4760	NA	NA	69,5	25,1	0,8	6,48	-7,9	-14,9	0,11	7,31	24,1	2	2	2	431,2

ID	VERO	IS PID6	IS PMW2	IS Tb	IS Ld	IS Tc	clogP	sol	Dgl	DS	miLogP	TPSA	AC	DO	Viol	Vol,
42	4760	NA	NA	1,7	1,0	NA	7,41	-8,44	-14,9	0,09	8,28	24,1	2	2	2	464,8
43	4760	25,1	43,3	55,7	21,6	18,8	5,08	-4,85	-4,62	0,26	5,57	24,1	2	2	1	358,1
44	4760	21,6	36,6	45,7	19,0	16,7	6,01	-5,39	-4,62	0,2	6,58	24,1	2	2	1	391,7
45	4760	19,0	25,1	93,3	36,6	19,5	6,93	-5,93	-4,62	0,16	7,59	24,1	2	2	1	425,3
46	3500	26,9	16,7	29,7	12,5	8,3	6,19	-5,69	-2,77	0,19	6,60	24,1	2	2	1	375,3
47	4000	14,3	14,8	13,9	6,3	5,8	7,11	-6,23	-2,77	0,15	7,61	24,1	2	2	1	409,0
48	4760	7,4	6,1	16,4	7,9	9,6	8,04	-6,77	-2,77	0,13	8,48	24,1	2	2	1	442,6
49	4760	7,9	4,3	7,2	3,7	NA	6,36	-5,89	-6,21	0,15	6,86	24,1	2	2	1	384,0
50	4760	3,7	2,5	9,8	5,3	57,0	7,28	-6,43	-6,21	0,12	7,87	24,1	2	2	2	417,6
51	4760	5,3	5,1	88,5	31,4	NA	8,21	-6,97	-6,21	0,1	8,63	24,1	2	2	2	451,3
52	4760	31,4	23,0	5,6	2,1	20,3	5	-6,08	-2,01	0,19	5,32	24,1	2	2	1	352,3
53	4760	2,1	1,5	5,5	2,2	19,4	5,47	-6,35	-3,25	0,16	5,59	24,1	2	2	1	369,1
54	4760	2,2	1,7	SP	SP	SP	6,4	-6,89	-7,46	0,12	6,60	24,1	2	2	1	402,7
55	4760	NA	NA	10,5	4,8	SP	7,32	-7,43	-7,46	0,1	7,61	24,1	2	2	1	436,3
56	4760	4,8	4,8	2,7	1,3	SP	8,25	-7,97	-7,46	0,09	8,48	24,1	2	2	1	469,9
57	4760	1,3	1,4	11,8	8,0	SP	9,18	-8,51	-7,46	0,08	8,97	24,1	2	2	1	503,5
58	4760	8,0	5,5	3,1	2,2	9,2	7,7	-8,23	-4,35	0,08	8,48	61,0	6	2	2	653,0
59	4760	2,2	3,4	4,0	2,8	SP	8,16	-8,5	-5,54	0,07	8,64	61,0	6	2	2	669,8
60	4760	2,8	2,0	5,3	3,9	0,3	9,09	-9,04	-9,74	0,07	9,07	61,0	6	2	2	703,5
61	4760	3,9	5,0	4,7	3,7	8,7	10,02	-9,58	-9,75	0,07	9,37	61,0	6	2	2	737,1
62	4760	3,7	3,1	2,4	1,9	SP	10,94	-10,1	-9,75	0,07	9,59	61,0	6	2	2	770,7
63	4760	1,9	1,5	59,9	24,4	SP	11,87	-10,6	-9,75	0,06	9,78	61,0	6	2	2	804,3
64	2625	13,4	11,9	30,1	12,7	16,8	6	-7,04	1,09	0,27	6,54	24,1	2	2	1	407,1
65	4760	23,0	13,7	12,3	5,5	SP	6,47	-7,31	-0,26	0,16	6,81	24,1	2	2	1	423,9
66	4760	5,5	4,3	2,9	1,4	SP	7,4	-7,85	-4,47	0,1	7,82	24,1	2	2	1	457,5
67	4760	1,4	1,4	SP	SP	SP	8,32	-8,39	-4,47	0,08	8,61	24,1	2	2	1	491,1
68	4760	SP	SP	SP	SP	94,0	9,25	-8,93	-4,47	0,08	9,05	24,1	2	2	2	524,7
69	4760	SP	SP	SP	SP	SP	10,18	-9,47	-4,47	0,07	9,35	24,1	2	2	2	558,3
70	4760	SP	SP	SP	SP	SP	0,69	-1,33	0,49	0,77	0,61	49,8	4	2	0	256,0
71	4760	SP	SP	SP	SP	SP	0,66	-1,24	-1,01	0,49	1,53	55,6	4	4	0	251,0
72	4760	SP	SP	7,9	2,4	SP	1,59	-1,78	-5,22	0,38	2,54	55,6	4	4	0	284,6
73	4760	2,4	2,1	10,2	3,4	7,5	2,52	-2,32	-5,22	0,36	3,55	55,6	4	4	0	318,2
74	4760	3,4	3,8	22,2	8,0	11,8	3,45	-2,86	-5,22	0,33	4,56	55,6	4	4	0	351,9
75	4760	8,0	5,9	NA	NA	NA	4,38	-3,4	-5,22	0,28	5,57	55,6	4	4	1	385,5
76	4760	SP	SP	5,5	1,4	NA	0,85	-2,23	0,21	0,73	1,47	50,3	4	2	0	227,4
77	4760	1,4	NA	4,2	1,2	1,1	1,31	-2,5	-1,04	0,59	1,74	50,3	4	2	0	244,2
78	4760	1,2	2,2	8,6	2,6	2,6	2,24	-3,04	-5,25	0,44	2,75	50,3	4	2	0	277,8
79	4760	2,6	1,9	9,0	3,0	6,3	3,17	-3,58	-5,25	0,4	3,76	50,3	4	2	0	311,4
80	4760	3,0	5,3	8,5	3,0	8,3	4,1	-4,12	-5,25	0,35	4,77	50,3	4	2	0	345,0
81	4760	3,0	3,9	5,9	2,0	2,4	5,02	-4,66	-5,25	0,27	5,78	50,3	4	2	1	378,6
82	4760	2,0	1,9	38,6	13,8	1,6	0,48	-3,79	-9,13	0,41	2,87	115,7	8	2	0	310,9
83	4760	13,8	11,0	49,8	19,2	1,9	0,93	-4,06	-10,3	0,39	3,14	115,7	8	2	0	327,7
84	4760	19,2	13,1	45,1	18,7	5,3	1,84	-4,6	-14,5	0,35	4,15	115,7	8	2	0	361,3
85	4760	18,7	16,5	72,3	32,0	6,1	2,75	-5,14	-14,5	0,3	5,16	115,7	8	2	1	394,9

ID	VERO	IS PID6	IS PW2	IS Tb	IS Ld	IS Tc	clogP	sol	dgl	DS	miLogP	TPSA	AC	DO	Viol	Vol,
86	4760	32,0	20,9	4,2	2,0	5,2	3,66	-5,68	-14,5	0,25	6,17	115,7	8	2	1	428,5
87	4760	2,0	1,5	NA	NA	NA	4,57	-6,22	-14,5	0,2	7,18	115,7	8	2	1	462,2
88	4760	NA	NA	NA	NA	NA	5,82	-4,79	-2,11	0,24	6,24	6,5	2	0	1	441,5
89	4760	NA	NA	NA	NA	NA	6,28	-5,06	-3,33	0,19	6,51	6,5	2	0	1	458,3
90	4760	NA	NA	NA	NA	NA	7,21	-5,6	-7,54	0,15	7,52	6,5	2	0	1	491,9
91	4760	NA	NA	NA	NA	NA	8,14	-6,14	-7,54	0,12	8,42	6,5	2	0	2	525,5
92	4760	NA	NA	NA	NA	NA	9,07	-6,68	-7,54	0,1	8,93	6,5	2	0	2	559,1
93	4760	NA	NA	NA	NA	NA	5,4	-4,86	3,3	0,35	6,46	43,4	6	0	2	543,6
94	4760	NA	NA	NA	NA	NA	5,86	-5,13	2,1	0,29	6,74	43,4	6	0	2	560,4
95	4760	NA	NA	NA	NA	NA	6,79	-5,67	-2,11	0,13	7,75	43,4	6	0	2	594,0
96	4760	NA	NA	NA	NA	NA	7,72	-6,21	-2,11	0,11	8,56	43,4	6	0	2	627,6
97	4760	NA	NA	NA	NA	NA	8,65	-6,75	-2,11	0,09	9,02	43,4	6	0	2	661,2

## ***11. MATERIALES Y MÉTODOS.***

## 11 MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones generales

Las reacciones en atmósfera inerte se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno seco de alta pureza y los solventes y reactivos fueron transferidos con jeringa con presión positiva de nitrógeno seco. Las soluciones fueron evaporadas a presión reducida en evaporador rotatorio. Todos los materiales de partida fueron adquiridos en SIGMA-Aldrich.

Las soluciones fueron evaporadas a presión reducida en el evaporador rotatorio.

La estructura de los compuestos obtenidos fue elucidada a través de los datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protones y de carbono (RMN de  $^1\text{H}$  y RMN de  $^{13}\text{C}$ ), infrarrojo (IR) y espectrometría de masa de alta resolución.

### Datos físicos

Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo FTIR-8400, usando como patrón de calibración la banda  $1601\text{ cm}^{-1}$  del poliestireno.

Las muestras sólidas se midieron como dispersiones en pastillas de bromuro de potasio (KBr), obtenidas por compresión de una mezcla finamente pulverizada de aproximadamente 3 mg de muestra cada 100 mg de KBr seco.

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrómetro marca Bruker modelo Avance 300 MHz ( $^1\text{H}$ , utilizando la señal del tetrametilsilano como patrón de referencia interno) y a 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ , utilizando la señal del solvente,  $\text{CDCl}_3$ , como patrón de referencia interno). Las mediciones se realizaron disolviendo o suspendiendo la muestra en  $\text{CDCl}_3$  y en DMSO en los casos que fue necesario. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  fueron informados indicando los desplazamientos químicos de las señales ( $\delta$ ) y, a continuación entre paréntesis y en este orden, se detalló la multiplicidad de la señal, la integración de la señal, la constante de acoplamiento (J), y finalmente, la asignación de la señal. Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  fueron informados indicando los desplazamientos químicos de las señales ( $\delta$ ) y, a continuación entre paréntesis, tipo de carbono y su asignación. Los desplazamientos químicos fueron informados en unidades de partes por millón (ppm), relativas al patrón de referencia correspondiente y las constantes de acoplamientos en hercios. Las abreviaturas utilizadas para informar las multiplicidades de las señales fueron: s: singlete, d: doblete, t: triplete y m: multiplete. Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  reportados incluyen: espectros totalmente desacoplados BB (Inglés: Broad Band) y espectros con intensificación sin distorsión por transferencia de polarizabilidad

DEPT (Inglés: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) que permiten diferenciar carbonos cuaternarios, metínicos, metilénicos y metílicos.

Los espectros de masa de alta resolución fueron registradas en un Micromass Q-TOF micro Hybrid en el Departamento de Química Medicinal de la Universidad de Mississippi en los Estados Unidos y en LC MS-MS del servicio de Espectrometría de Masa de alta resolución del IQUIR-IBR.

Los espectros de absorción y emisión de fluorescencia fueron realizados bajo la tutela de la Dra. Julia Cricco, en el laboratorio de Biofísica y en el IBR.

### **Cromatografía**

Las CCD se realizaron sobre placas comerciales de aluminio cubiertas con sílica gel Merck (60F254) y se desarrollaron con sistemas de solventes adecuados a cada muestra. Las manchas se detectaron con lámpara de luz UV ( $\lambda = 254$  nm), por inmersión en una solución de p-anisaldehído (p-anisaldehído/ácido sulfúrico/ácido acético en etanol 95% (2,5 %: 2,5 %: 0,25 % v/v) ó en solución de ninhidrina (0,2 g en 100 mL de etanol) y posterior calentamiento para mejorar la sensibilidad de la detección. Un tercer revelador utilizado de forma alternativa fue el revelador de Permanganato de potasio.

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron sobre sílica gel Merck 60H eluyendo con los sistemas de solventes de polaridad creciente adecuados para cada muestra, acelerando la elución con presión de nitrógeno. Las siembras se realizaron con las muestras a purificar adsorbidas sobre sílica gel o en solución.

### **Reactivos, gases y solventes**

Los gases se secaron por pasaje a través de ácido sulfúrico concentrado.

Los solventes utilizados como eluyentes en CCD o cromatografía en columna fueron purificados por destilación. Los solventes de reacción fueron de calidad "Pro análisis" y en los casos necesarios se sometieron a ulterior purificación tal como se describe a continuación:

Diclorometano anhidro: destilado sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bajo atmósfera de nitrógeno y almacenado en botellas con tamices moleculares de 4 Å.

Metanol anhidro: destilado sobre hidruro de calcio bajo atmósfera de nitrógeno y almacenado en botellas con tamices moleculares de 4 Å.

### **Método general de obtención de diaminas N,N'-disustituidas**

Las reacciones fueron realizadas en dos etapas: en la primera etapa se formó la imina correspondiente y posteriormente se procedió a reducirla mediante un agente reductor.

#### ***1- Formación de imina***

A una solución de la diamina (1 eq) en una mezcla de diclorometano: metanol anhidros (3:1), se adicionó el aldehído (3 eq) disuelto en una mezcla diclorometano:metanol anhidros (3:1). Se dejó la mezcla de reacción bajo agitación magnética y con calentamiento a reflujo durante toda la noche. Se determinó mediante un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que la reacción se había completado. A continuación se evaporó el solvente y se continuó con la etapa de reducción sin purificar el producto obtenido.

### ***2- Reducción de la imina***

El crudo de la reacción anterior se redisolvió en una mezcla diclorometano:metanol (1:1). Se colocó la mezcla en un baño de hielo hasta alcanzar los  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , y se le agregó borhidruro de sodio (3 eq) en pequeñas porciones y se dejó reaccionar con agitación magnética a temperatura ambiente durante veinticuatro horas. Posteriormente, se tomó una alícuota de  $500\ \mu\text{L}$  de la misma, se le agregó agua para eliminar el exceso de borhidruro de sodio y luego se extrajo con éter etílico. Para determinar que la reacción se había completado, se sembró una CCD con la fase orgánica anterior y un estándar de la imina y se resolvió en una mezcla amoníaco:metanol: acetato de etilo (1:2:7), revelándola con ninhidrina.

El aislamiento del producto de la reacción se realizó mediante agregado de ácido clorhídrico 10 % gota a gota hasta que la mezcla de reacción se volvió ácida. Se agitó la mezcla por treinta minutos y luego se agregó amoníaco concentrado hasta que la mezcla presentaba pH básico. Se extrajo la mezcla con diclorometano, se secó los extractos orgánicos con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en el rotavapor.

### **Método alternativo 1 de obtención de diaminas $\text{N,N}'$ -disustituidas.**

Las reacciones fueron realizadas en una etapa, en donde se forma la imina correspondiente y posteriormente se procedió a reducirla mediante un agente reductor.

#### ***1- Formación de imina***

A una solución de la diamina (1 eq) en una mezcla de diclorometano: metanol anhidros (3:1), se adicionó el aldehído (3 eq) disuelto en una mezcla diclorometano: metanol anhidros (3:1). Se dejó la mezcla de reacción bajo agitación magnética y con calentamiento a reflujo durante toda la noche. Se determinó mediante un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que la reacción se había completado. A continuación se evaporó el solvente y se continuó con la etapa de reducción sin purificar el producto obtenido.

#### ***2- Reducción de la imina y obtención del compuesto final.***

El crudo de la reacción anterior se redisolvió en una mezcla diclorometano: metanol (1:1). Se colocó la mezcla en un baño de hielo hasta alcanzar los  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , y se le agregó borhidruro de

sodio (3 eq) en pequeñas porciones y se dejó reaccionar con agitación magnética a temperatura ambiente durante veinticuatro horas. Posteriormente, se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de la misma, se le agregó agua para eliminar el exceso de borhidruro de sodio y luego se extrajo con éteretílico. Para determinar que la reacción se había completado, se sembró una CCD con la fase orgánica anterior y un estándar de la imina y se resolvió en una mezcla amoniaco: metanol: acetato de etilo (1:2:7), revelándola con ninhidrina.

El aislamiento del producto de la reacción se realizó mediante agregado de ácido clorhídrico 10 % gota a gota hasta que la mezcla de reacción se volvió ácida. Se agitó la mezcla por treinta minutos y luego se agregó amoniaco concentrado hasta que la mezcla presentaba pH básico. Se extrajo la mezcla con diclorometano, se secó los extractos orgánicos con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en el rotavapor.

### **Método alternativo 2 de obtención de diaminas N,N'-disustituídas y N, N, N', N'-tetrasustituídas.**

Las reacciones fueron realizadas en una etapa, en donde se forma la imina correspondiente y posteriormente se procedió a reducirla mediante un agente reductor, en un mismo tubo de reacción.

#### ***Formación de imina y posterior reducción suave.***

A una solución de la diamina (1 eq) en TMOF, se adicionó el aldehído (3 eq) que en caso de encontrarse en estado sólido, se pesó inicialmente en el tubo de reacción. Agregándosele luego el solvente y la diamina. Se pesan y se agregan 50 mg de tamices moleculares. Se dejó la mezcla de reacción bajo agitación magnética y con calentamiento a reflujo durante toda la noche. Se determinó mediante un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que la reacción se había completado. A continuación se agrega el Triacetoxi Borohidruro de sodio (3eq). A posterior se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla, se le agregó agua para eliminar el exceso de borhidruro de sodio y luego se extrajo con éteretílico. Para determinar que la reacción se había completado, se sembró una CCD con la fase orgánica anterior y un estándar de la imina y se resolvió en una mezcla amoniaco: metanol: acetato de etilo (1:2:7), revelándola con ninhidrina.

El aislamiento del producto de la reacción se realizó mediante agregado de ácido clorhídrico 10 % gota a gota hasta que la mezcla de reacción se volvió ácida. Se agitó la mezcla por treinta minutos y luego se agregó amoniaco concentrado hasta que la mezcla presentaba pH básico. Se extrajo la mezcla con diclorometano, se secó los extractos orgánicos con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en el evaporador rotatorio.

### **Método alternativo 3 de obtención de diaminas N,N'-disustituidas y N, N, N', N'-tetrasustituidas.**

Las reacciones fueron realizadas en una etapa, en donde se forma la imina correspondiente y posteriormente se procedió a reducirla mediante un agente reductor, en un mismo tubo de reacción.

#### ***Formación de imina y posterior reducción suave.***

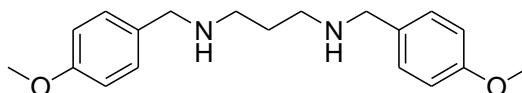
A una solución de la diamina (1 eq) en TMOF, se adicionó el aldehído (3 eq) que en caso de encontrarse en estado sólido, se pesó inicialmente en el tubo de reacción. Agregándosele luego el solvente y la diamina. Se pesan y se agregan 50 mg de tamices moleculares. Se agrega el Triacetoxi Borohidruro de sodio (3eq) y dejándose la mezcla de reacción bajo agitación magnética y con calentamiento a reflujo durante toda la noche. Se determinó mediante un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que la reacción se había completado.

A posterior se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla, se le agregó agua para eliminar el exceso de triacetoxi borohidruro de sodio y luego se extrajo con éteretílico. Para determinar que la reacción se había completado, se sembró una CCD con la fase orgánica anterior y un estándar de la imina y se resolvió en una mezcla amoniaco: metanol: acetato de etilo (1:2:7), revelándola con ninhidrina.

El aislamiento del producto de la reacción se realizó mediante agregado de ácido clorhídrico 10 % gota a gota hasta que la mezcla de reacción se volvió ácida. Se agitó la mezcla por treinta minutos y luego se agregó amoniaco concentrado hasta que la mezcla presentaba pH básico. Se extrajo la mezcla con diclorometano, se secó los extractos orgánicos con sulfato de sodio anhidro y se evaporó en el rotavapor.

### **Síntesis de diaminas.**

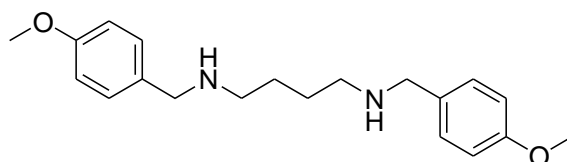
#### **1. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-bis(4-metoxibencil)propano-1,3-diamina.**



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió de 1,3-propilendiamina (40 mg; 0,54 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego p-anisaldehído (197  $\mu\text{L}$ ; 1,62 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borhidruro de sodio (61 mg; 1,62 mmoles). Se obtuvieron 115 mg de producto como un aceite incoloro con un rendimiento del 67 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,21$  (d, 4 H,  $J = 8,7$  Hz,  $\text{C}2'$ -H);  $6,85$  (d, 4 H,  $J = 8,7$  Hz,  $\text{C}3'$ -H);  $3,79$  (s, 6 H, O- $\text{CH}_3$ );  $3,71$  (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2$ );  $2,68$  (t, 4 H,  $J = 6,6$  Hz, N- $\text{CH}_2$ );  $1,71$  (m, 2 H,  $\text{C}2$ -H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 158,6$  (C-OMe, carbono aromático cuaternario);  $132,7$  (C, carbono aromático cuaternario);  $129,3$  y  $113,7$  (CH, carbonos aromáticos);  $55,2$  ( $\text{CH}_3$ , O- $\text{CH}_3$ );  $53,5$  ( $\text{CH}_2$ , Ar- $\text{CH}_2$ );  $47,9$  ( $\text{CH}_2$ , N- $\text{CH}_2$ );  $30,2$  ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}2$ ). **IR:**  $\nu = 3301$  (R-NH-R1);  $3062$  (Ar-H);  $1176$  (C-N-C);  $1243$  y  $1036$  (Ar-O-C);  $818$  (aromático disustituido)  $\text{cm}^{-1}$   
**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ )  $315,2073$ ; encontrada  $315,2087$ .

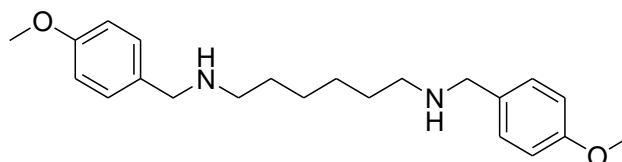
## 2. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^4$ -bis(4-metoxibencil)butano-1,4-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butildiamina (40 mg; 0,45 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego p-anisaldehído (165  $\mu\text{L}$ ; 1,36 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (51 mg; 1,36 mmoles). Se obtuvo 115 mg de producto como sólido blanco con un rendimiento del 77%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,19$  (d, 4 H,  $J = 8,7$  Hz,  $\text{C}2'$ -H);  $6,83$  (d, 4 H,  $J = 8,7$  Hz,  $\text{C}3'$ -H);  $3,75$  (s, 6 H, O- $\text{CH}_3$ );  $3,68$  (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2$ );  $2,58$  (t, 4 H,  $J = 6,6$  Hz, N- $\text{CH}_2$ );  $1,51$  (m, 4 H,  $\text{C}2$ -H y  $\text{C}3$ -H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 158,6$  (C-OMe, carbono aromático cuaternario);  $132,4$  (C, carbono aromático cuaternario);  $129,3$  y  $113,8$  (CH, carbonos aromáticos);  $55,2$  (O- $\text{CH}_3$ );  $53,3$  ( $\text{CH}_2$ , Ar- $\text{CH}_2$ );  $49,1$  ( $\text{CH}_2$ , N- $\text{CH}_2$ );  $27,8$  ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}2$  y  $\text{C}3$ ). **IR:**  $\nu = 3314$  (R-NH-R1);  $2997$  (Ar-H);  $1246$  y  $1036$  (Ar-O-C);  $1174$  (C-N-C);  $818$  (aromático disustituido)  $\text{cm}^{-1}$   
**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ )  $329,229$ ; encontrada  $329,2233$ .

## 3. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^6$ -bis(4-metoxibenzil)hexano-1,6-diamina.

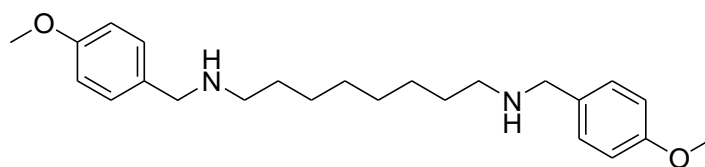


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexildiamina (40 mg; 0,34 mmoles) en una mezcla de diclorometano : metanol (4 mL; 3:1). Luego p-anisaldehído (126  $\mu\text{L}$ ; 1,03 mmoles) fue disuelto en (4 mL) diclorometano: metanol

(3:1).El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (39 mg; 1,03 mmoles). Obteniéndose 106 mg de producto como un sólido cristalino blanco con un rendimiento del 86%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,23 (d, 4 H,  $J$ = 8,7 Hz,  $\text{C}2'$ -H); 6,86 (d, 4 H,  $J$ = 8,7 Hz,  $\text{C}3'$ -H); 3,79 (s, 6 H,  $-\text{CH}_3$ ); 3,71 (s, 4 H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2$ ); 2,59 (t, 4 H,  $J$ = 6,9 Hz,  $\text{N}-\text{CH}_2$ ); 1,48 (m, 4 H,  $\text{C}2$ -H y  $\text{C}5$ -H ); 1,33 (m, 4 H,  $\text{C}3$ -H y  $\text{C}4$ -H) .**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ = 158,6 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 132,5 (C, carbono aromático cuaternario); 129,3 y 113,8 (CH, carbonos aromáticos); 55,2 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{O}-\text{CH}_3$ ); 53,4( $\text{CH}_2$ ,  $\text{Ar}-\text{CH}_2$ ); 49,2 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{N}-\text{CH}_2$ ); 29,9 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}2$  y  $\text{C}5$ ); 27,3 ( $\text{CH}_2$ , $\text{C}3$  y  $\text{C}4$ ).**IR:**  $\nu$  = 3296( $\text{R}-\text{NH}-\text{R}1$ ); 2957 ( $\text{Ar}-\text{H}$ ); 1252 y 1033 ( $\text{Ar}-\text{O}-\text{C}$ ); 1103 (C-N-C); 818(aromático disustituido)  $\text{cm}^{-1}$ .**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 357,2542; encontrada 357,2531.

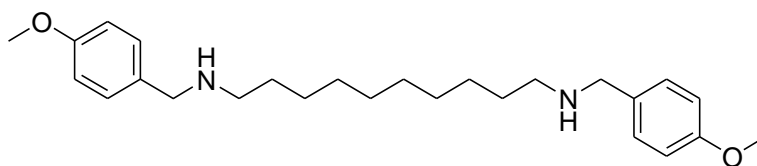
#### 4. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^8$ -bis(4-metoxibencil)octano-1,8-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octilendiamina (40 mg; 0,28 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego p-anisaldehído (101  $\mu\text{L}$ ; 0,83 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1).El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (31 mg; 0,83 mmoles). Obteniéndose 106 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 99%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,23 (d, 4 H,  $J$ = 8,7 Hz,  $\text{C}2'$ -H); 6,85 (d, 4 H,  $J$ = 8,7 Hz,  $\text{C}3'$ -H); 3,78 (s, 6 H,  $\text{O}-\text{CH}_3$ ); 3,71 (s, 4 H,  $\text{Ar}-\text{CH}_2$ ); 2,59 (t, 4 H,  $J$ = 6,9 Hz,  $\text{N}-\text{CH}_2$ ); 1,48 (m, 4 H,  $\text{C}2$ -H y  $\text{C}7$ -H ); 1,28 (s, 8 H,  $\text{C}3$ -H al  $\text{C}6$ -H).**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ = 158,6 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 132,4 (C, carbono aromático cuaternario); 129,3 y 113,8 (CH, carbonos aromáticos); 55,2 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_3$ ); 53,4 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{Ar}-\text{CH}_2$ ); 49,3 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{N}-\text{CH}_2$ ); 29,9 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}2$  y  $\text{C}7$ ); 29,5 ( $\text{CH}_2$ , $\text{C}3$  y  $\text{C}6$ ); 27,3 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}4$  y  $\text{C}5$ ).**IR:**  $\nu$  = 3307 ( $\text{R}-\text{NH}-\text{R}1$ ); 3026 ( $\text{Ar}-\text{H}$ ); 1121 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ .**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 385,2855; encontrada: 385,2857.

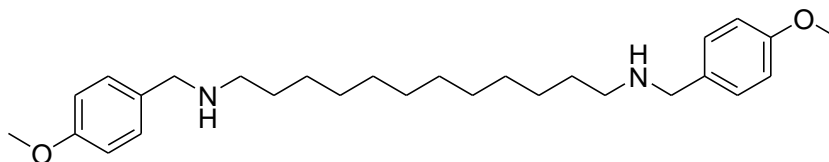
### 5. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(4-metoxibencil)decano-1,10-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decilendiamina (40 mg; 0,23 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego p-anisaldehído (84  $\mu$ L; 0,70 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (26 mg; 0,70 mmoles). Se aislaron 57 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 60%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7,26 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,86 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 3,79 (s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,75 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,62 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, NH-CH<sub>2</sub>); 1,52 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,26 (s, 12 H, C3-H al C8-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ = 158,9 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 130,2 (C, carbono aromático cuaternario); 129,8 y 113,9 (CH, carbonos aromáticos); 55,2 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>); 52,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 48,9 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,4 (CH<sub>2</sub>, C2 y C9); 29,3 (CH<sub>2</sub>, C3 y C8); 28,9 (CH<sub>2</sub>, C4 y C7); 27,2 (CH<sub>2</sub>, C5 y C6). **IR:**  $\nu$  = 3392 (R-NH-R1); 1253 y 1033 (Ar-O-C); 1177 (C-N-C); 818 (aromático disustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 413,3168, encontrada 413,3172.

### 6. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(4-metoxibencil)dodecano-1,12-diamina.



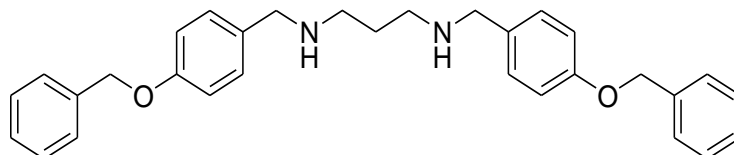
Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-dodecilendiamina (50 mg; 0,49 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego p-anisaldehído (101 mg  $\delta$ =1,19 g/l; 114  $\mu$ L; 0,75 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (26 mg; 0,70 mmoles). Se aislaron 109 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 99%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7,26 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,86 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 3,79 (s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,75 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,62 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,52 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,26 (s, 12 H, C3-H al C8-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ = 158,9 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 130,2 (C, carbono aromático cuaternario); 129,8 y 113,9 (CH, carbonos aromáticos); 55,2 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>); 52,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 48,9 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,4 (CH<sub>2</sub>, C2 y C9); 29,3 (CH<sub>2</sub>, C3 y C8); 28,9 (CH<sub>2</sub>, C4 y C7); 27,2 (CH<sub>2</sub>, C5 y C6).

carbono aromático cuaternario); 130,2 ( C, carbono aromático cuaternario); 129,8 y 113,9 (CH, carbonos aromáticos); 55,2 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>); 52,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 48,9 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,4 (CH<sub>2</sub>, C2 y C9); 29,3 (CH<sub>2</sub>,C3 y C8); 28,9 (CH<sub>2</sub>, C4 y C7); 27,2 (CH<sub>2</sub>,C5 y C6).**IR:**  $\nu$  = 3392(R-NH-R1); 1253 y 1033 (Ar-O-C); 1177 (C-N-C); 818 (aromático disustituido)cm<sup>-1</sup>.

**EMAR:** masa calculada para C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 441,3475, encontrada 441,3462.

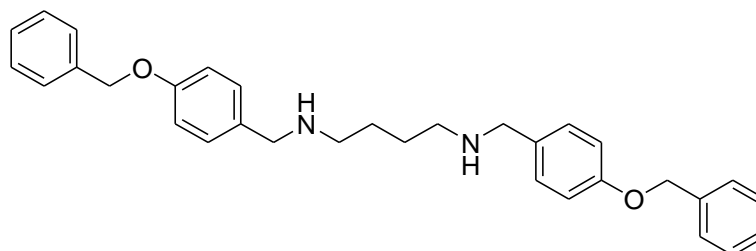
### 7. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-bis(4-(benciloxi)bencil)propano-1,3-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,3-propilendiamina (40 mg; 0,54 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). 4-benciloxi-benzaldehído (344 mg; 1,62 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (61 mg; 1,62 mmoles). Obteniéndose 197 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 78%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  =7,41 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo) 7,21 (d, 4 H, J= 8,7 Hz,C2'-H); 6,93 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 5,05 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N);2,69 ( t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,72 (m, 2 H, C2). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ = 157,9 ( C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,1 (C1''-CH<sub>2</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 132,7 (C1', carbono aromático cuaternario); 129,4 (CH, C3'' y C5''); 128,6 (CH, C2' y C6'); 128,0 (CH, C4''); 127,5 (CH, C2'' y C6''); 114,8 (CH, C3' y C5'); 70,1 (CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>); 53,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 47,9 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>2</sub>, C2). **IR:**  $\nu$  = 3289 (R-NH-R1); 3032 (Ar-H); 1106 (C-N-C); 1239 y 1026 (Ar-O-C) cm<sup>-1</sup>.**EMAR:** masa calculada para C<sub>31</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 467,2699; encontrada 467,2678.

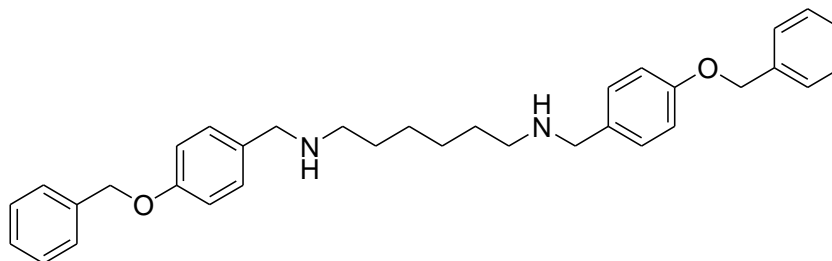
### 8. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(4-(benciloxi)bencil)butano-1,4-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butilendiamina (40 mg; 0,45 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). 4-benciloxi-benzaldehído (289 mg; 1,36 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (51 mg; 1,36 mmoles). Se aislaron 168 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 77%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =7,42 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 7,22 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,93 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 5,05 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 2,62 (t, 4 H, J= 6,6 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,53 (m, 4 H, C2-H y C4-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ = 157,8 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,1 (C1''-CH<sub>2</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 132,9 (C1', carbono aromático cuaternario); 129,3 (CH, C3'' y C5''); 128,6 (CH, C2' y C6'); 127,9 (CH, C4''); 127,5 (CH, C2'' y C6''); 114,8 (CH, C3' y C5'); 70,1 (CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>); 53,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 49,2 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 27,9 (CH<sub>2</sub>, C2 y C4). **IR:**  $\nu$  = 3294 (R-NH-R1); 3035 (Ar-H); 1167 (C-N-C); 1247 y 1015 (Ar-O-C); 814 (aromático disustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 481,2855; encontrada 481,2849.

### 9. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>-bis(4-(benciloxi)bencil)hexano-1,6-diamina.

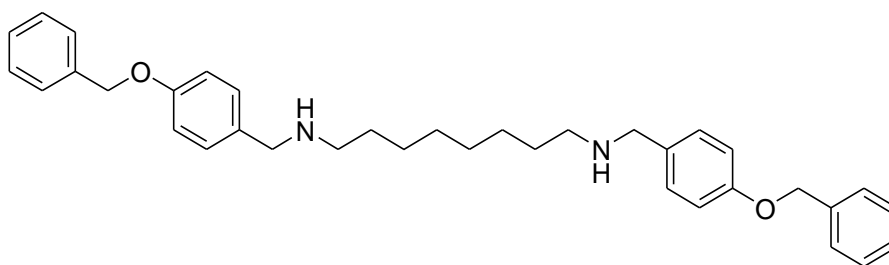


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexilendiamina (40 mg; 0,34 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). 4-benciloxi-benzaldehído (219 mg; 1,03 mmoles) fue disuelto en (4 mL) diclorometano: metanol (3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (39 mg; 1,03 mmoles). Obteniéndose 54 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 30%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =7,38 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 7,23 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,93 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 5,05 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 3,72 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 2,61 (t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,51 (m, 4 H, C2-H y C5-H); 1,32 (m, 4 H, C3-H y C4-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ = 157,9 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,1 (C1''-

CH<sub>2</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 132,3 (C1', carbono aromático cuaternario); 129,5 (CH, C3'' y C5''); 128,6 (CH, C2' y C6'); 127,9 (CH, C4''); 127,5 (CH, C2'' y C6''); 114,8 (CH, C3' y C5'); 70,0 (CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>); 53,2 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 49,1 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,7 (CH<sub>2</sub>, C2 y C5); 27,2 (CH<sub>2</sub>, C3 y C4). **IR:**  $\nu$  = 3293 (R-NH-R1); 3048 (Ar-H); 1104 (C-N-C); 1251 y 1016 (Ar-O-C); 815 (aromático disustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 509,3168; encontrada 501,3146.

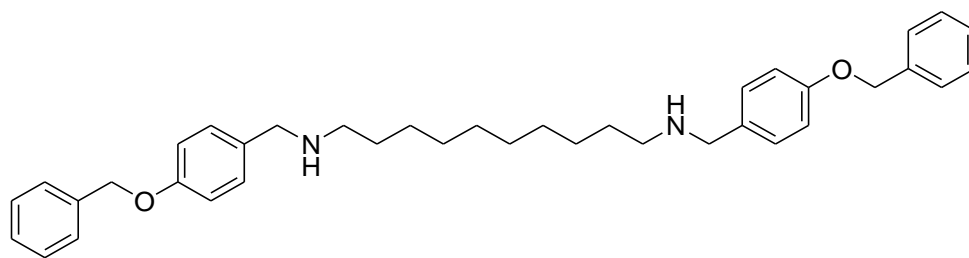
### 10. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(4-(benciloxi)bencil)octano-1,8-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octilendiamina (40 mg; 0,28 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). 4-benciloxi-benzaldehído (176,6 mg; 0,83 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (31 mg; 0,83 mmoles). Se generaron 88 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 59%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7,42 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 7,23 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,93 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 5,05 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 3,72 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 2,60 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,49 (m, 4 H, C2-H y C7-H); 1,29 (s, 8 H, CH<sub>2</sub>, C3-H al C6-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 157,8 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,1 (C1''-CH<sub>2</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 133,0 (C1', carbono aromático cuaternario); 129,3 (CH, C3'' y C5''), 128,6 (CH, C2' y C6'), 127,9 (CH, C4''), 127,5 (CH, C2'' y C6''); 114,8 (CH, C3' y C5'); 70,0 (CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>); 53,5 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 49,4 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 30,1 (CH<sub>2</sub>, C2 y C7); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C3 y C6); 27,3 (CH<sub>2</sub>, C4 y C5). **IR:**  $\nu$  = 3246 (R-NH-R1); 3035 (Ar-H); 1104 (C-N-C); 1249 y 1015 (Ar-O-C); 813 (aromático disustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>36</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 537,3481; encontrada 537,3477.

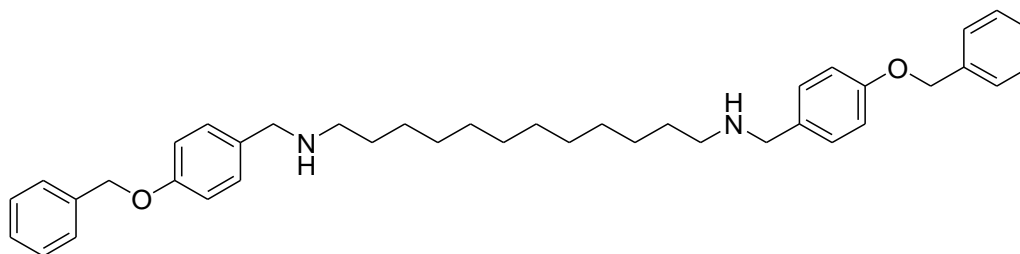
### 11. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(4-(benciloxi)bencil)decano-1,10-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decildiamina (40 mg; 0,54 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). 4-benciloxi-benzaldehído (148 mg; 1,62 mmoles) fue disuelto en (4 mL) diclorometano: metanol (3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (26 mg; 1,62 mmoles). Obteniéndose 87 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 66%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7,42 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 7,24 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,93 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 5,05 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 3,72 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 2,61 (t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,49 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,27 (s, 12 H, C3-H al C8-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ= 157,9 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,1 (C1''-CH<sub>2</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 132,7 (C1', carbono aromático cuaternario); 129,4 (CH, C3'' y C5''), 128,6 (CH, C2' y C6'), 128,0 (CH, C4''), 127,5 (CH, C2'' y C6''); 114,8 (CH, C3' y C5'); 70,0 (CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>); 53,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 49,4 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 30,0 (CH<sub>2</sub>, C2 y C9); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C3 al C7); 27,6 (CH<sub>2</sub>, C5). **IR:** ν = 3311 (R-NH-R1); 3049 (Ar-H); 1105 (C-N-C); 1250 y 1016 (Ar-O-C); 814 (aromático disustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>38</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 565,3794; encontrada 565,3802.

### 12. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(4-(benciloxi)bencil)dodecano-1,12-diamina.

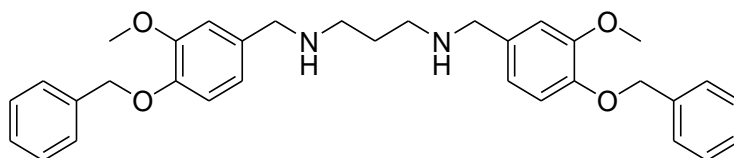


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decildiamina (50 mg; 0,49 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). 4-benciloxi-benzaldehído (148 mg; 1,62 mmoles) fue disuelto en (4 mL) diclorometano: metanol (3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL;

1:1) y se agregó borohidruro de sodio (26 mg; 1,62 mmoles). Obteniéndose 87 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 60%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =7,42 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 7,24 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C2'-H); 6,93 (d, 4 H, J= 8,7 Hz, C3'-H); 5,05 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 3,72 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 2,61 (t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,49 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,27 (s, 12 H, C3-H al C8-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ = 157,9 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,1 (C1''-CH<sub>2</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 132,7 (C1', carbono aromático cuaternario); 129,4 (CH, C3'' y C5''), 128,6 (CH, C2' y C6'), 128,0 (CH, C4''), 127,5 (CH, C2'' y C6''); 114,8 (CH, C3' y C5'); 70,0 (CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>-); 53,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 49,4 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>-); 30,0 (CH<sub>2</sub>, C2 y C9); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C3 al C7); 27,6 (CH<sub>2</sub>, C5). **IR:**  $\nu$  = 3311 (R-NH-R1); 3049 (Ar-H); 1105 (C-N-C); 1250 y 1016 (Ar-O-C); 814 (aromático disustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>38</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 565,3794; encontrada 565,3802.

### 13. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-bis(4-(benciloxi)-3-metoxibencil)propano-1,3-diamina.

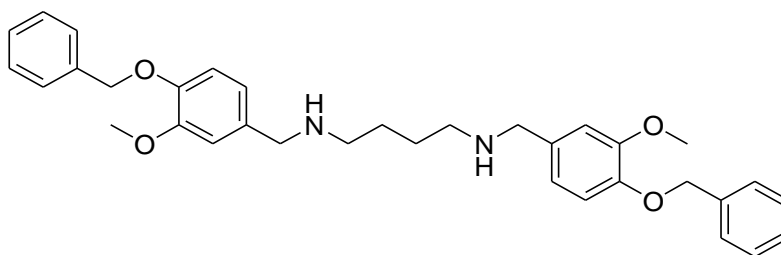


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,3-propilendiamina (40 mg; 0,54 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El 3-metoxi-4-benciloxibenzaldehído fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1).

El crudo de la primer reacción se disolvió en (10 mL; 1:1) diclorometano: metanol y se agregó (61 mg; 1,62 mmoles) borohidruro de sodio. Se aislaron 133 mg de producto como un sólido cristalino blanco con un rendimiento del 50%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =7,37 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 6,82 (m, 6 H, aromáticos); 5,13 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 3,87 (s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,70 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 2,69 (t, 4 H, J= 6,6 Hz, N-CH<sub>2</sub>-); 1,72 (m, 2 H, C2-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ = 149,7 (C5'-OMe, carbono aromático cuaternario); 147,2 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,3 (C1''-CH<sub>2</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 133,8 (C1'-CH<sub>2</sub>-N, carbono aromático cuaternario); 128,5 (CH, C3'' y C5''); 127,8 (CH, C4''); 127,3 (CH, C2'' y C6''); 120,2 (CH, C2'); 114,1 (CH, C3'); 112,0 (CH, C6'); 71,1 (CH<sub>2</sub>, -O-CH<sub>2</sub>-); 56,0 (CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 53,9 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 48,0 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 30,2 (CH<sub>2</sub>, C2). **IR:**  $\nu$  = 3302 (R-NH-R1); 3063 (Ar-H); 1264 y 1026 (Ar-O-C); 1139 (C-N-C)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 527,2910; encontrada 527,2886.

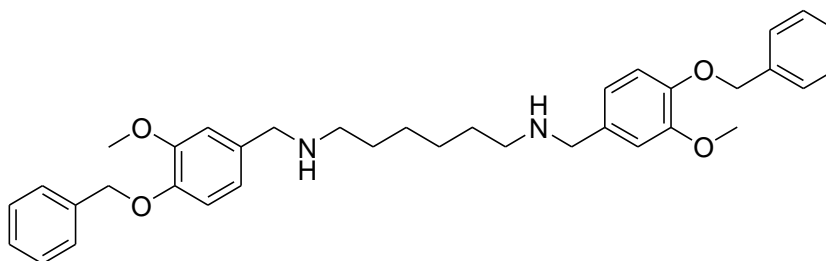
#### 14. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(4-(benciloxi)-3-metoxibencil)butano-1,4-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butilendiamina (40 mg; 0,45 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El 3-metoxi 4-benciloxi-benzaldehído (329 mg; 1,36 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (38 mg; 1,36 mmoles). Se aislaron 205 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 84%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ =7,39 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 6,82 (m, 6 H, aromáticos); 5,13 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 3,89 (s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,70 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 2,64 (t, 4 H, J= 6,6 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,56 (m, 4 H, C2-H y C3-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ= 149,7 (C5'-OMe, carbono aromático cuaternario); 147,2 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,3 (C1''-CH<sub>2</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 133,2 (C1'-CH<sub>2</sub>-N, carbono aromático cuaternario); 128,5 (CH, C3'' y C5''), 127,8 (CH, C4''), 127,3 (CH, C2'' y C6''); 120,3 (CH, C2'), 114,0 (CH, C3'), 112,0 (CH, C6'); 71,1 (CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>-); 56,0 (CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 53,6 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 49,1 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 27,7 (CH<sub>2</sub>, C2 y C3). **IR:** ν = 3299(R-NH-R1); 3066(Ar-H); 1261 y 1032 (Ar-O-C); 1131 (C-N-C) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 541,3066; encontrada 541,3045.

#### 15. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>-bis(4-(benciloxi)-3-Metoxibencil)hexano-1,6-diamina.

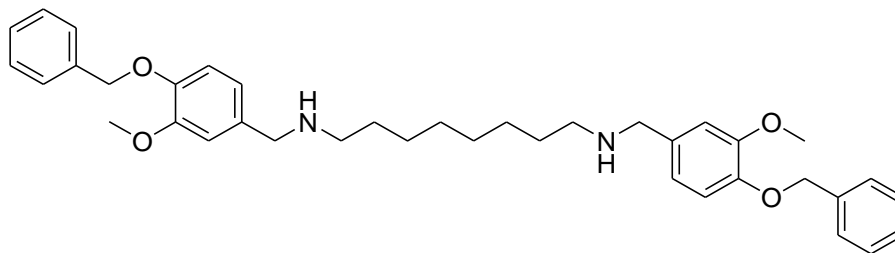


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexilendiamina (40 mg; 0,34 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El 3-metoxi-4-benciloxi-benzaldehído (250 mg; 1,03 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol

(10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (39 mg; 1,03 mmoles). Obteniéndose 159 mg de producto como sólido blanco con un rendimiento del 81%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =7,40 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 6,84 (m, 6 H, aromáticos); 5,13 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$ ); 3,89 (s, 6 H, O- $\text{CH}_3$ ); 3,71 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 2,61 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N- $\text{CH}_2$ ); 1,51 (m, 4 H, C2-H y C5-H); 1,33 (m, 4 H, C3-H y C4-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ = 149,7 (C5'-OMe, carbono aromático cuaternario); 147,6 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,3 (C1''- $\text{CH}_2\text{-O}$ , carbono aromático cuaternario); 133,4 (C1'- $\text{CH}_2\text{-N}$ , carbono aromático cuaternario); 128,5 (CH, C3'' y C5''), 127,8 (CH, C4''), 127,3 (CH, C2'' y C6''); 120,3 (CH, C2'), 114,0 (CH, C3'), 112,0 (CH, C6'); 71,1 (CH<sub>2</sub>, O- $\text{CH}_2$ ); 56,0 (CH<sub>3</sub>, O- $\text{CH}_3$ ); 53,7 (CH<sub>2</sub>, Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 49,3 (CH<sub>2</sub>, N- $\text{CH}_2$ ); 29,8 (CH<sub>2</sub>, C2 y C4); 27,3 (CH<sub>2</sub>, C3 y C5). IR:  $\nu$  = 3409 (R-NH-R1); 1264 y 1004 (Ar-O-C); 1145 (C-N-C)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$  (M+H<sup>+</sup>) 569,3379; encontrada 569,3380.

#### 16. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(4-(benciloxi)-3-metoxibencil)octano-1,8-diamina.

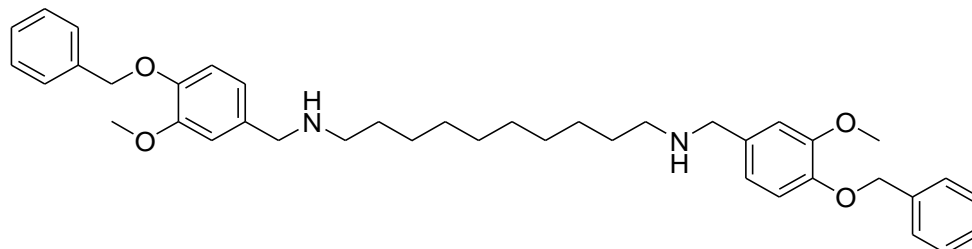


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octilendiamina (40 mg; 0,28 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El 3-metoxi 4-benciloxi-benzaldehído (201 mg; 0,83 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (31 mg; 0,83 mmoles). Obteniéndose 155 mg de producto como sólido cristalino blanco con un rendimiento del 88%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =7,39 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 6,84 (m, 6 H, aromáticos); 5,14 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-O}$ ); 3,89 (s, 6 H, O- $\text{CH}_3$ ); 3,71 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 2,61 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N- $\text{CH}_2$ ); 1,46 (m, 4 H, C2-H y C7-H); 1,29 (s, 8 H, C3-H al C6-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ = 149,7 (C5'- OMe, carbono aromático cuaternario); 147,2 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,3 (C1''- $\text{CH}_2\text{-O}$ , carbono aromático cuaternario); 133,2 (C1'- $\text{CH}_2\text{-N}$ , carbono aromático cuaternario); 128,5 (CH, C3'' y C5''), 127,8 (CH, C4''), 127,3 (CH, C2'' y C6''); 120,3 (CH, C2'), 114,0 (CH, C3'), 112,0 (CH, C6'); 71,1 (CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>); 56,0 (CH<sub>3</sub>, O- $\text{CH}_3$ ); 53,7 (CH<sub>2</sub>, Ar- $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 49,3 (CH<sub>2</sub>, N- $\text{CH}_2$ ); 29,8 (CH<sub>2</sub>, C2 y C7); 29,4 (CH<sub>2</sub>, C3 y C6); 27,2 (CH<sub>2</sub>, C4 y C5). IR:  $\nu$  = 3410 (R-NH-R1); 3006 (Ar-H); 1259 y 1029 (Ar-O-

C); 1162 (C-N-C)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 597,3692; encontrada 597,3717.

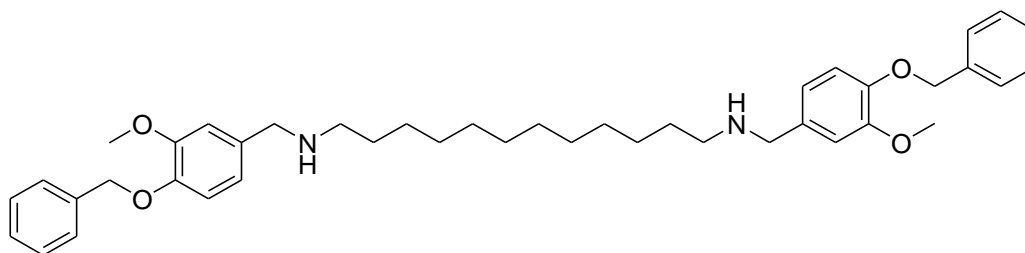
### 17. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^{10}$ -bis(4-(benciloxi)-3-metoxibencil)decano-1,10-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-dodecilendiamina (40 mg; 0,54 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El 3-metoxi-4-benciloxi-benzaldehído (169 mg; 1,62 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (26 mg; 1,62 mmoles). Obteniéndose 130 mg de producto como sólido blanco con un rendimiento del 89%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,40 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 6,81 (m, 6 H, aromáticos); 5,14 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2$ -O); 3,89 (s, 6 H, O- $\text{CH}_3$ ); 3,71 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2$ -N); 2,61 (t, 4 H, N- $\text{CH}_2$ ); 1,51 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,27 (s, 12 H, C3-H al C8-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 149,7 (C5'-OMe, carbono aromático cuaternario); 147,2 (C4'-O, carbono aromático cuaternario); 137,3 (C1''- $\text{CH}_2$ -O, carbono aromático cuaternario); 133,6 (C1'- $\text{CH}_2$ -N, carbono aromático cuaternario); 128,5 (CH, C3'' y C5''); 127,8 (CH, C4''); 127,3 (CH, C2'' y C6''); 120,3 (CH, C2'); 114,0 (CH, C3'); 112,0 (CH, C6'); 71,1 ( $\text{CH}_2$ , O $\text{CH}_2$ ); 56,0 ( $\text{CH}_3$ , O- $\text{CH}_3$ ); 53,8 ( $\text{CH}_2$ , Ar- $\text{CH}_2$ -N); 49,4 ( $\text{CH}_2$ , N- $\text{CH}_2$ ); 30,0 ( $\text{CH}_2$ , C2 y C9); 29,5 ( $\text{CH}_2$ , C3 al C7); 27,4 ( $\text{CH}_2$ , C5). **IR:**  $\nu$  = 3422 (R-NH-R1); 1263 y 1029 (Ar-O-C); 1140 (C-N-C)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 625,4005; encontrada 625,4030.

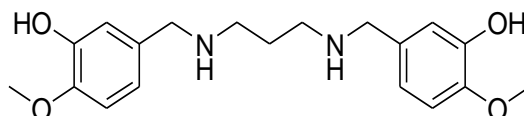
### 18. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^{12}$ -bis(4-(benciloxi)-3-metoxibencil)dodecano-1,12-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-dodecilendiamina (40 mg; 0,54 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL;

3:1). El 3-metoxi-4-benciloxi-benzaldehído (167 mg; 1,62 mmoles) fue disuelto en diclorometano : metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano : metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (26 mg; 1,62 mmoles). Obteniéndose 130 mg de producto como sólido blanco con un rendimiento del 89%. **RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  =7,40 (m, 10 H, aromáticos 4'-benciloxilo); 6,81 (m, 6 H, aromáticos); 5,14 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-O); 3,89 (s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 2,61 (t, 4 H, N-CH<sub>2</sub>); 1,51 (m, 4 H, C<sub>2</sub>-H y C<sub>9</sub>-H ); 1,27 (s, 12 H, C<sub>3</sub>-H al C<sub>8</sub>-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ = 149,7 ( C<sub>5'</sub>-OMe, carbono aromático cuaternario); 147,2 (C<sub>4'</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 137,3 (C<sub>1''</sub>-CH<sub>2</sub>-O, carbono aromático cuaternario); 133,6 (C<sub>1'</sub>-CH<sub>2</sub>-N, carbono aromático cuaternario); 128,5 (CH, C<sub>3''</sub> y C<sub>5''</sub>); 127,8 (CH, C<sub>4''</sub>); 127,3 (CH, C<sub>2''</sub> y C<sub>6''</sub>); 120,3 (CH, C<sub>2'</sub>); 114,0 (CH, C<sub>3'</sub>); 112,0 (CH, C<sub>6'</sub>); 71,1 (CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>); 56,0 (CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 53,8 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-N); 49,4 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 30,0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>9</sub> ); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> al C<sub>7</sub>); 27,4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>). **IR:**  $\nu$  = 3422(R-NH-R<sub>1</sub>); 1263 y 1029 (Ar-O-C); 1140 (C-N-C) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 653,4313; encontrada 653,4313.

### 19. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-bis(3-hidroxi-4-metoxibencil)propano-1,3-diamina .

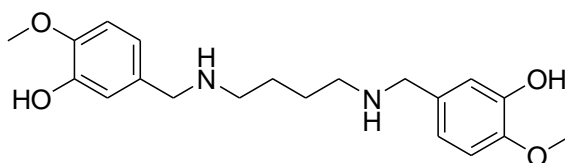


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,3-propilendiamina (40 mg; 0,54 mmoles) en una mezcla de diclorometano : metanol (4 mL; 3:1). Luego isovainillina (246 mg; 1,62 mmoles) fue disuelta en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano : metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (61 mg; 1,62 mmoles). Obteniéndose 180 mg de producto como un sólido anaranjado con un rendimiento del 96%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 6,79 (m, 6 H, aromáticos); 3,87(s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,69 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,73 (t, 4 H, J=6,6 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,74 (m, 2 H, C<sub>2</sub>-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 146,8 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 146,7 (C-OH, carbono aromático cuaternario); 134,1 (C, carbono aromático cuaternario); 118,9, 115,9, 112,4 (CH, carbonos aromáticos); 56,1 (CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 53,1 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 47,5 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>); 30,0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>).

**IR (BrK):**  $\nu$  = 3449 (R-NH-R<sub>1</sub>); 3029 (Ar-H); 2464 (Ar-O-H); 1280 y 1028 (Ar-O-C); 1132 (C-N-C)cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 347,1971; encontrada 347,1969.

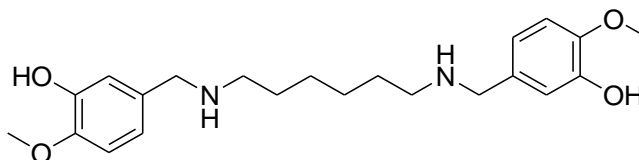
## 20. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(3-hidroxi-4-metoxibencil)butano-1,4-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butilendiamina (40 mg; 0,46 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego isovainillina (207 mg; 1,36 mmoles) fue disuelta en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano : metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (51 mg; 1,36 mmoles). Se aislaron 131 mg de producto como un polvo blanco con un rendimiento del 80%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 6,77 (m, 6 H, aromáticos); 3,87(s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,69 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,62 (t, 4 H, J= 6,6 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,56 (m, 4 H, C2-H y C3-H ). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 146,7 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 146,7 (C-OH, carbono aromático cuaternario); 134,1 (C, carbono aromático cuaternario); 118,9, 115,8, 112,4 (CH, carbonos aromáticos); 56,1 (CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 53,0 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 49,0 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>); 27,8 (CH<sub>2</sub>, C2 y C3). **IR (BrK):**  $\nu$  = 3441(R-NH-R1); 3040 (Ar-H); 2319 (Ar-O-H); 1255 y 1026 (Ar-O-C); 1138(C-N-C); 866 cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 361,2127; encontrada 361,2121.

## 21. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>-bis(3-hidroxi-4-metoxibenzil)hexano-1,6-diamina.

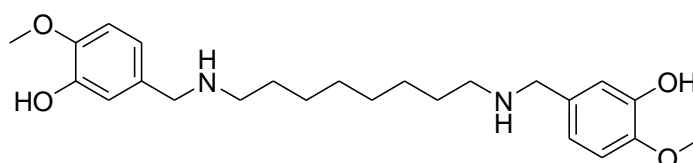


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexilendiamina (40 mg; 0,34 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego isovainillina (157 mg; 1,03 mmoles) fue disuelta en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (39 mg; 1,03 mmoles). Obteniéndose 110 mg de producto como un sólido blanquecino con un rendimiento del 82 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 6,80 (m, 6 H, aromáticos); 3,86 (s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,68 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,59 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,47 (m, 4 H, C2-H y C5-H); 1,30(m, 4 H, C3-H y C4-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 146,7 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 146,7 (C-OH, carbono aromático cuaternario); 134,1 (C, carbono aromático cuaternario); 118,9, 115,8,

112,4 (CH, carbonos aromáticos); 56,1 (CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 53,1 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 49,0 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>2</sub>, C2 y C5); 27,4 (CH<sub>2</sub>, C3 y C4). **IR (BrK):**  $\nu = 3465(\text{R-NH-R1}); 3031(\text{Ar-H}); 2441(\text{Ar-O-H}); 1286 \text{ y } 1035(\text{Ar-O-C}); 1131(\text{C-N-C}) \text{ cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 389,2440; encontrada 389,2442.

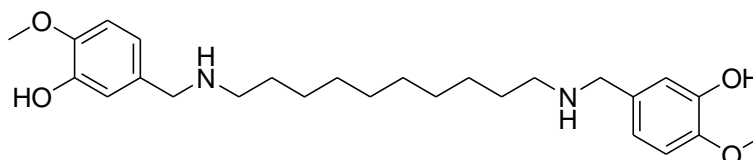
## 22. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(3-hidroxi-4-metoxibencil)octano-1,8-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octilendiamina (40 mg; 0,28 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego isovainillina (126 mg; 0,83 mmoles) fue disuelta en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (31 mg; 0,83 mmoles). Obteniéndose como un sólido blanco.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 6,80$  (m, 6 H, aromáticos); 3,86 (s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,69 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,58 (t, 4 H, J = 7,2 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,47 (m, 4 H, C2-H y C7-H); 1,25 (m, 8 H, C3-H al C6-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 146,8$  (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 146,7 (C-OH, carbono aromático cuaternario); 134,0 (C, carbono aromático cuaternario); 119,0, 115,9, 112,4 (CH, carbonos aromáticos); 56,1 (CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 53,1 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 49,0 (CH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>2</sub>, C2 y C7); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C3 y C6); 27,3 (CH<sub>2</sub>, C4 y C5). **IR (BrK):**  $\nu = 3447(\text{R-NH-R1}); 2991(\text{Ar-H}); 2445(\text{Ar-O-H}); 1282 \text{ y } 1033(\text{Ar-O-C}); 1131(\text{C-N-C}); 855$  (aromático trisustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 417,2753; encontrada 417,2740.

## 23. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(3-hidroxi-4-metoxibencil)decano-1,10-diamina.

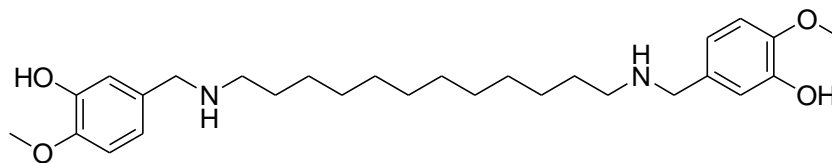


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-hexilendiamina (40 mg; 0,23 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Isovainillina (106 mg; 0,70 mmoles) fue disuelta en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1).

El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (26 mg; 0,70 mmoles). Obteniéndose 74 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 72%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 6,82 (m, 6 H, aromáticos); 3,86 (s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,70 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,60 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,48 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,25 (m, 12 H, CH<sub>2</sub> C3-H al C8-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 146,7 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 146,7 (C-OH, carbono aromático cuaternario); 134,1 (C, carbono aromático cuaternario); 118,9, 115,8, 112,4 (CH, carbonos aromáticos); 56,1 (O-CH<sub>3</sub>); 53,1 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 49,0 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>2</sub>, C2 y C9); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C3 y C8); 27,6 (CH<sub>2</sub>, C5 y C6). **IR (BrK):**  $\nu$  = 3418(R-NH-R1); 3033 (Ar-H); 2444 (Ar-O-H); 1282 y 1033 (Ar-O-C); 1131(C-N-C); 873 (aromático trisustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 445,3066; encontrada 445,3050.

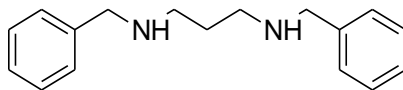
#### 24. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(3-hidroxi-4-metoxibencil)dodecano-1,12-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-hexilendiamina (40 mg; 0,23 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Isovainillina (106 mg; 0,70 mmoles) fue disuelta en diclorometano : metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano : metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio(26,3 mg; 0,70 mmoles). Obteniéndose 74 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 72%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 6,82 (m, 6 H, aromáticos); 3,86 (s, 6 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,70 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,60 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,48 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,25 (m, 12 H, CH<sub>2</sub> C3-H al C8-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 146,7 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 146,7 (C-OH, carbono aromático cuaternario); 134,1 (C, carbono aromático cuaternario); 118,9, 115,8, 112,4 (CH, carbonos aromáticos); 56,1 (O-CH<sub>3</sub>); 53,1 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 49,0 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>2</sub>, C2 y C9); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C3 y C8); 27,6 (CH<sub>2</sub>, C5 y C6). **IR (BrK):**  $\nu$  = 3418(R-NH-R1); 3033 (Ar-H); 2444 (Ar-O-H); 1282 y 1033 (Ar-O-C); 1131(C-N-C); 873 (aromático trisustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 445,3066; encontrada 445,3050.

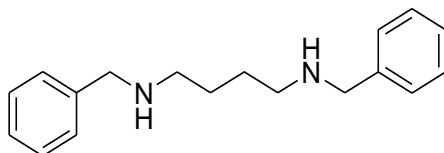
## 25. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-dibencil-propano-1,3-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,3-propilendiamina (40 mg; 0,54 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego benzaldehído (165  $\mu$ L; 1,62 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (61 mg; 1,62 mmoles). Obteniéndose 97 mg de producto como un aceite incoloro con un rendimiento del 79%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7,31 (m, 10 H, aromáticos); 3,78 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,72 (t, 4 H, J = 6,6 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,74 (m, 2 H, C2-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 140,3 (C, carbono aromático cuaternario); 128,4; 128,2 y 126,9 (CH, carbonos aromáticos); 54,1 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 48,0 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 30,0 (CH<sub>2</sub>, C2). **IR:**  $\nu$  = 3296 (R-NH-R1); 3026 (Ar-H); 1119 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 255,1861; encontrada 255,1853.

## 26. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dibencil-butano-1,4-diamina.



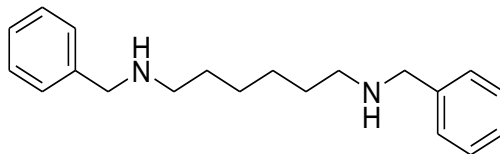
Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butilendiamina (40,0 mg; 0,45 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego benzaldehído (138  $\mu$ L; 1,36 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1).

El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (51 mg; 1,36 mmoles). Obteniéndose 88 mg de producto como un sólido aceitoso blanco con un rendimiento del 73%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7,28 (m, 10 H, aromáticos); 3,78 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,64 (t, 4 H, J=6,6 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,57 (m, 4 H, C2-H y C3-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 139,6 (C, carbono aromático cuaternario); 128,4; 128,2 y 127,1 (CH, carbonos aromáticos); 53,6 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 48,9 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 27,6 (CH<sub>2</sub>, C2). **IR:**  $\nu$  = 3311 (R-NH-R1); 1120 (C-N-C); 697 (aromático

monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 269,2018; encontrada 269,2011.

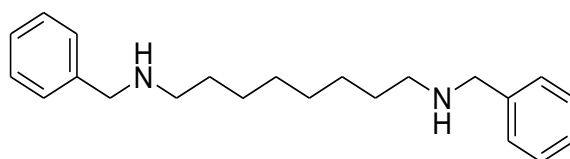
### 27. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^6$ -dibencil-hexano-1,6-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexilendiamina (40 mg; 0,34 mmoles) en una 4 mL de mezcla de diclorometano: metanol (3:1). Luego se agregó el benzaldehído (105  $\mu\text{L}$ ; 1,03 mmoles) disuelto en 4 mL de diclorometano: metanol (3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (39 mg; 1,03 mmoles). Se obtuvieron 47 mg de producto como un sólido aceitoso blanco con un rendimiento del 46%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,28$  (m, 10 H, aromáticos); 3,78 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2$ ); 2,61 (t, 4 H,  $\text{J} = 7,2$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ); 1,49 (m, 4 H, C2-H y C5-H); 1,34 (m, 4 H, C3-H y C4-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 140,3$  (C, carbono aromático cuaternario); 128,4 ; 128,2 y 126,9 (CH, carbonos aromáticos); 54,0 ( $\text{CH}_2$ , Ar- $\text{CH}_2$ ); 49,3 ( $\text{CH}_2$ , N- $\text{CH}_2$ ); 29,9 ( $\text{CH}_2$ , C2 y C5); 27,3 ( $\text{CH}_2$ , C3 y C4). **IR:**  $\nu = 3312$  (R-NH-R1); 3026(Ar-H); 1119 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 297,2331; encontrada 297,2328.

### 28. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^8$ -dibencil-octano-1,8-diamina.



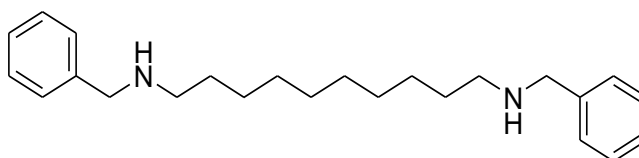
Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octilendiamina (40 mg; 0,28 mmoles) en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego benzaldehído (84  $\mu\text{L}$ ; 0,83 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1).

El crudo de la primer reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (31 mg; 0,83 mmoles). Se aislaron 85 mg de producto como un sólido amarillo pálido con un rendimiento del 94%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,30$  (m, 10 H, aromáticos); 3,82 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2$ ); 2,67 (t, 4 H, N $\text{CH}_2$ ); 1,52 (m, 4 H, C2-H y C7-H); 1,30 (s, 8 H, C3-H al C6-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 140,2$  (C, carbono aromático cuaternario); 128,4; 128,2 y 126,9 (CH, carbonos aromáticos);

53,9 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 49,3 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>2</sub>, C2 y C7); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C3 y C6); 27,5 (CH<sub>2</sub>, C4 y C5). **IR:**  $\nu = 3307$  (R-NH-R1); 3026 (Ar-H); 1121 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 325,2644, encontrada 325,2660.

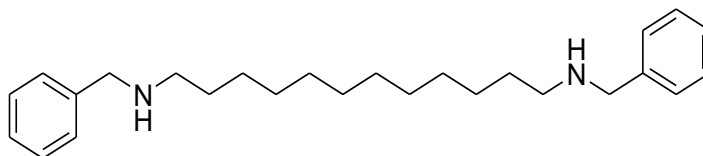
### 29. Síntesis de N<sup>1</sup>, N<sup>10</sup>-dibencil-decano-1,10-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decildiamina (40 mg; 0,23 mmoles) en una mezcla de diclorometano:metanol (4 mL; 3:1). Luego de benzaldehído (71  $\mu$ L; 0,70 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (26 mg; 10,70 mmoles). Fueron aislados 73 mg del producto como sólido rosáceo con un rendimiento del 89%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 7,31$  (m, 10 H, Ar-H); 3,84 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,65 (t, 4 H, J= 7,20 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,55 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,25 (s, 12 H, C3-H al C8-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 136,7$  (C, carbono aromático cuaternario); 128,9; 128,6 y 127,7 (CH, carbonos aromáticos); 52,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 47,9 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,3 (CH<sub>2</sub>, C2 y C9); 29,2 (CH<sub>2</sub>, C3 y C8); 28,2 (CH<sub>2</sub>, C4 y C7); 27,0 (CH<sub>2</sub>, C5 y C6). **IR:**  $\nu = 3307$  (R-NH-R1); 3026 (Ar-H); 1121 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 353,2957; encontrada 353,2966.

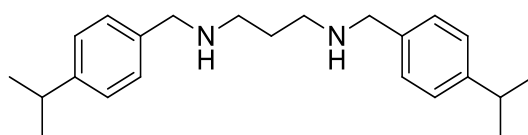
### 30. Síntesis de N<sup>1</sup>, N<sup>12</sup>-dibencil-dodecano-1,12-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decildiamina (50 mg; 0,49 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). Luego de benzaldehído (71  $\mu$ L; 0,70 mmoles) fue disuelto en diclorometano: metanol (4 mL; 3:1). El crudo de la primera reacción se disolvió en diclorometano: metanol (10 mL; 1:1) y se agregó borohidruro de sodio (26 mg; 10,70 mmoles). Fueron aislados 73 mg del producto como sólido rosáceo con un rendimiento del 89%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,31 (m, 10 H, Ar-H); 3,84 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2$ ); 2,65 (t, 4 H,  $J$ = 7,20 Hz, N- $\text{CH}_2$ ); 1,55 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,25 (s, 12 H, C3-H al C8-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 136,7 (C, carbono aromático cuaternario); 128,9; 128,6 y 127,7 (CH, carbonos aromáticos); 52,4 ( $\text{CH}_2$ , Ar- $\text{CH}_2$ ); 47,9 ( $\text{CH}_2$ , N- $\text{CH}_2$ ); 29,3 ( $\text{CH}_2$ , C2 y C9); 29,2 ( $\text{CH}_2$ , C3 y C8); 28,2 ( $\text{CH}_2$ , C4 y C7); 27,0 ( $\text{CH}_2$ , C5 y C6). **IR:**  $\nu$  = 3307 (R-NH-R1); 3026 (Ar-H); 1121 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 353,2957; encontrada 353,2966.

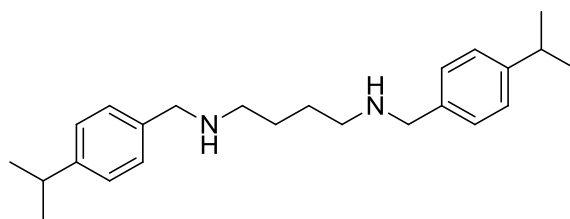
### 31. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^3$ -bis(4-isopropilbencil)propan-1,3-diamina.



Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,3-propanodiamina (50 mg; 0.67 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-isopropil-benzaldehído (299 mg ( $\rho$ = 0,98 g/mL at 25 °C); 2.02 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (121 mg; 2,02 mmoles). Se obtuvo 100 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 44 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,25 (d, 4 H,  $J$ =7,8Hz, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,19 (d, 4 H,  $J$ =7,8Hz, ArC3-H y ArC5-H protones aromáticos); 3,76 (s, 4 H, ipAr- $\text{CH}_2$ -NH-); 2,90 (hept, 2 H,  $J$ =6.9Hz, Ar- $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ); 2,73 (t, 4 H,  $J$ =6,7 Hz, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 1,75 (q, 2 H,  $J$ =6,7Hz, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 1,25 (d, 12 H,  $J$ =6,9Hz, Ar- $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 147.6 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 137.4 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128.2 (CH, C2 y C6 arilo); 126.5 (CH, C3 y C5 arilo); 53.7 (ipAr- $\text{CH}_2$ -NH-); 48.0 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 33.8 (Ar- $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ); 29.8 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 24.1 (Ar- $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ). **IR:**  $\nu$  = 3292 (R-NH-R1); 2956 (Ar-H); 1121 (C-N-C); 1118 (C- $\text{CH}_3$ ) 1016 (C-C) ; 697 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 339,27948; encontrada : 339,27948

### 32. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^4$ -bis(4-isopropilbencil)butan-1,4-diamina.(32)

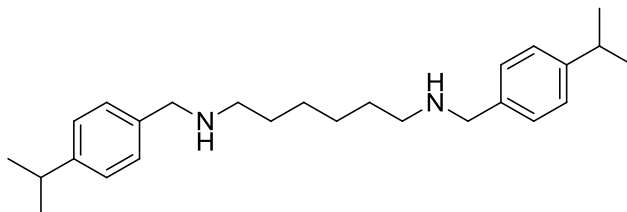


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butanodiamina (60 mg; 0,68 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-isopropil-benzaldehido (300 mg ( $\rho = 0,98 \text{ g/mL}$  at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ); 2.02 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (122 mg; 2,02 mmoles). Se obtuvo 145 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 61 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,25$  (d, 4 H,  $J=7,8\text{Hz}$ , ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,19 (d, 4 H,  $J=7,8\text{Hz}$ , ArC3-H y ArC5-H protones aromáticos); 3,76 (s, 4 H, ipAr-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,90 (hept, 2 H,  $J=6,9\text{Hz}$ , Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,73 (t, 4 H,  $J=6,7 \text{ Hz}$ , -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,75 (q, 2 H,  $J=6,7\text{Hz}$ , -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,25 (d, 12 H,  $J=6,9\text{Hz}$ , Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 147.6$  (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 137.4 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128.2 (CH, C2 y C6 arilo); 126.5 (CH, C3 y C5 arilo); 53.7 (ipAr-CH<sub>2</sub>-NH-); 48.0 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 33.8 (Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 29.8 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 24.1 (Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **IR:**  $\nu = 3292$  (R-NH-R1); 2956 (Ar-H); 1121 (C-N-C); 1118 (C-CH<sub>3</sub>) 1016 (C-C) ; 697 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 353,29513; encontrada : 353,29513

### 33. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>-bis(4-isopropilbencil)hexan-1,6-diamino.



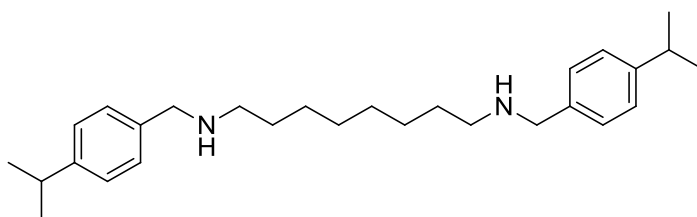
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexanodiamina (54 mg; 0,47 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Isopropil-benzaldehido (208 mg- ( $\rho = 0,98 \text{ g/mL}$  at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ); 1,40 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices

moleculares 4Å. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (84 mg; 1,41 mmoles). Se obtuvo 59 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 33 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,25$  (d, 4 H,  $J=8,0\text{Hz}$ , ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,19 (d, 4 H, ArC3-H y ArC5-H,  $J=8,1\text{Hz}$ , protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, ipAr-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,90 (hept, 2 H,  $J=6,9\text{Hz}$ , Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,63 (t, 4 H,  $J=7,2\text{ Hz}$ , -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,52 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,34 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,25 (d, 12 H,  $J=6,9\text{Hz}$ , Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 147,5$  (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 137,8 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128,1 (CH, C2 y C6 arilo); 126,4 (CH, C3 y C5 arilo); 53,8 (ipAr-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,5 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 33,8 (Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 30,0 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 24,1 (Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**IR:**  $\nu = 3292$  (R-NH-R1); 2956 (Ar-H); 1121 (C-N-C); 1118(C-CH<sub>3</sub>) 1016(C-C) ; 697 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub> (M+Na<sup>+</sup>) 409,3583 ; encontrada : 409,3592

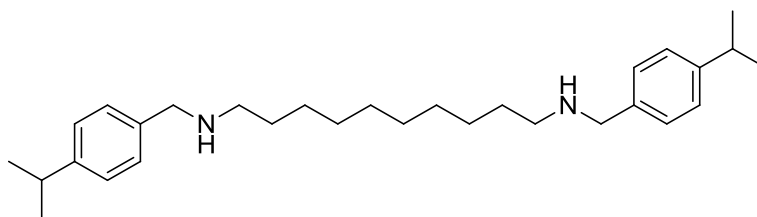
### 34. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(4-isopropilbencil)octano-1,8-diamino.



Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8- octil-diamina (61 mg; 0,42 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Isopropil-benzaldehido (188 mg-( $\rho$ = 0,98 g/mL at 25 °C) ; 1,27 mmoles) preparada en diclorometano : metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (76,1 mg; 1,26 mmoles). Se obtuvo 152 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 88 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7,25 (d, 4 H,  $J$ =7,8Hz, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,19 (d, 4 H, ArC3-H y ArC5-H,  $J$ =7,8Hz, protones aromáticos); 3,76 (s, 4 H, ipAr-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,90 (hept, 2 H,  $J$ =6.9Hz, Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,63 (t, 4 H,  $J$ =7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,51 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,30 (m, 8 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,25 (d, 12 H,  $J$ =6,9Hz, Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 147,6 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 137,7 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128,2 (CH, C2 y C6 arilo); 126,4 (CH, C3 y C5 arilo); 53,8 (ipAr-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,5 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 33,8 (Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 30,0; 29,5 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 24,0 (Ar-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **IR:**  $\nu$  = 3292 (R-NH-R1); 2956 (Ar-H); 1121 (C-N-C); 1118(C-CH<sub>3</sub>) 1016(C-C); 697 (aromático monosustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>)= 409,3577; encontrada 409,3592

### 35. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(4-isopropilbencil)decano-1,10-diamino.

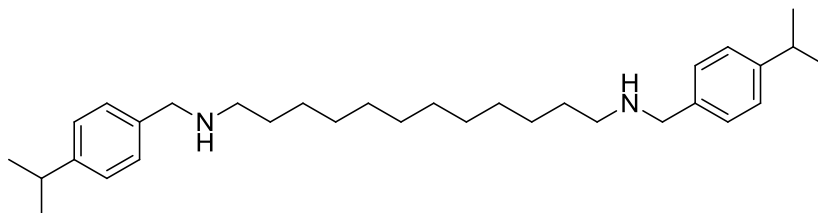


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decanodiamina (62 mg; 0,36 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se

adicionó una solución de 4-Isopropil-benzaldehído (160 mg ( $\rho = 0,98 \text{ g/mL}$  at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ; 1,07 mmoles) preparada en diclorometano : metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano : metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (65 mg; 1,08 mmoles).. Se obtuvo 135 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 86 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,25$  (d, 4 H,  $J=7,7\text{Hz}$ , ArC2–H y ArC6–H protones aromáticos); 7,185 (d, 4 H, ArC3–H y ArC5–H,  $J=8,2\text{Hz}$ , protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, ipAr–CH<sub>2</sub>–NH–); 2,90 (hept, 2 H,  $J=6.9\text{Hz}$ , Ar–CH–(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,63 (t, 4 H,  $J=7,2 \text{ Hz}$ , –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–); 1,50 (m, 4 H, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–); 1,27 (m, 12 H, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–) y 1,25 (d, 12 H,  $J=6,9\text{Hz}$ , Ar–CH–(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 147,5$  (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 137,9 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128,1 (CH, C2 y C6 arilo); 126,4 (CH, C3 y C5 arilo); 53,9 (ipAr–CH<sub>2</sub>–NH–); 49,6 (–NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–); 33,8 (Ar–CH–(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 30,1; 29,6 y 27,4 (–NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–) y 24,1 (Ar–CH–(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **IR:**  $\nu = 3292$  (R–NH–R1); 2956 (Ar–H); 1121 (C–N–C); 1118(C–CH<sub>3</sub>) 1016(C–C) ; 697 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) : 437,38903; encontrada: 437,3879

### 36. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(4-isopropilbencil)dodecano-1,12-diamino.

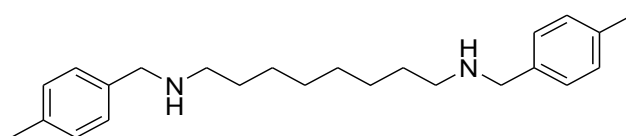


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecanodiamina (62 mg; 0.31 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) adicionó una solución de 4-Isopropil-benzaldehído (138 mg ( $\rho = 0,98 \text{ g/mL}$  at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ); 0,92 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (56 mg; 0,92 mmoles). Se obtuvo 125 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 87 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,25$  (d, 4 H,  $J=8,0\text{Hz}$ , ArC2–H y ArC6–H protones aromáticos); 7,19 (d, 4 H, ArC3–H y ArC5–H,  $J=8,0\text{Hz}$ , protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, ipAr–CH<sub>2</sub>–NH–); 2,90 (hept, 2 H,  $J=6.9\text{Hz}$ , Ar–CH–(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,63 (t, 4 H,  $J=7,2 \text{ Hz}$ , –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–);

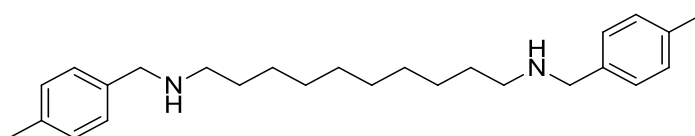
1,51 (m, 4 H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 1,27 (m, 12 H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4$ ) y 1,25 (d, 12 H,  $J=7,0\text{Hz}$ ,  $\text{Ar}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 147,5$  (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 137,7 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128,2 (CH, C2 y C6 arilo); 126,4 (CH, C3 y C5 arilo); 53,8 (ipAr- $\text{CH}_2-\text{NH}-$ ); 49,5 ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 33,8 ( $\text{Ar}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ); 30,0; 29,6 y 27,4 ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5$ ) y 24,1 ( $\text{Ar}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ ). **IR:**  $\nu = 3292$  (R-NH-R1); 2956 (Ar-H); 1121 (C-N-C); 1118(C- $\text{CH}_3$ ) 1016(C-C); 697 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$   
**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 465,4203; encontrada: 465,4203

### 37. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^8$ -bis(4-metilbencil)octan-1,8-diamina.



Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8- octil-diamina (50 mg; 0,34 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Cloro-benzaldehído (125 mg; 1,04 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (57 mg; 0,96 mmoles). Se obtuvo 106 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 87 %.  
**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,20$  (d, 4 H,  $J=8,0\text{Hz}$ , ArC2-**H**y ArC6-**H** protones aromáticos); 7,13 (d, 4 H,  $J=8,0\text{Hz}$ , ArC3-**H**y ArC5-**H**, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2-\text{NH}-$ ); 2,60 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 2,33 (s, 6 H, Ar- $\text{CH}_3$ ); 1,49 (m, 4 H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ) y 1,28 (m, 8 H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 137,1$  (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 136,5 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,1 (CH, C2 y C6 arilo); 128,1(CH, C3 y C5 arilo); 53,6 (Ar- $\text{CH}_2-\text{NH}-$ ); 49,3 ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 29,9; 29,4 y 27,2 ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ) y 21,1 (Ar- $\text{CH}_3$ ). **IR:**  $\nu = 3415$  (R-NH-R1); 2918 (Ar-H); 1119 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido); 1448 (C- $\text{CH}_3-$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  
**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) : 353,2951 encontrada :353,2974

### 38. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^{10}$ -bis(4-metilbencil)decan-1,10-diamina.(38)



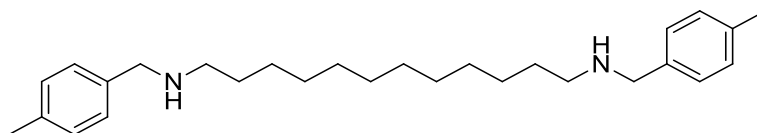
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decildiamina (55 mg; 0,32 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Metil-benzaldehído (115 mg; 0,96 mmoles) preparada en diclorometano : metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (57 mg; 0,96 mmoles). Se obtuvo 113 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 93 %.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,20$  (d, 4 H,  $J=8,0\text{Hz}$ , ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,13 (d, 4 H,  $J=8,0\text{Hz}$ , ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,61 (t, 4 H,  $J=7,2\text{ Hz}$ , -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 2,34 (s, 6 H, Ar-CH<sub>3</sub>); 1,50 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,27 (m, 12 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 137,5$  (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 136,4 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,0 (CH, C2 y C6 arilo); 128,1 (CH, C3 y C5 arilo); 53,8 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,5 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,1; 29,6 y 27,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>) y 21,1 (Ar-CH<sub>3</sub>). **IR:**  $\nu = 3415$  (R-NH-R1); 2918 (Ar-H); 1119 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido); 1448 (C-CH<sub>3</sub>-)  $\text{cm}^{-1}$ .

**EMAR:** masa calculada para C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 381,3270; encontrada 381,3281

### 39. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(4-metilbencil)dodecan-1,12-diamina.



Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecildiamina (53 mg; 0,26 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Metil-benzaldehído (95 mg; 0,79 mmoles) preparada en diclorometano : metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

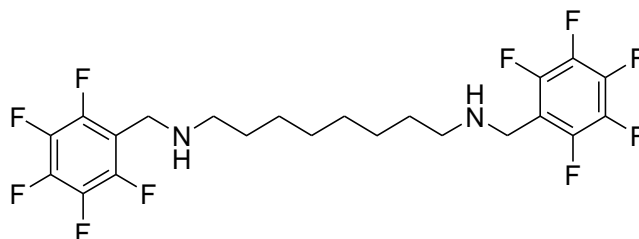
El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (47 mg; 0,79 mmoles). Se obtuvo 98 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 91 %.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,21$  (d, 4 H,  $J=8,0\text{Hz}$ , ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,13 (d, 4 H,  $J=8,0\text{Hz}$ , ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,61 (t, 4 H,  $J=7,2\text{ Hz}$ , -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 2,33 (s, 6 H, Ar-CH<sub>3</sub>); 1,50 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,25 (m, 16 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 137,1$  (C4

arilo, carbono cuaternario aromático); 136,5 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,1 (CH, C2 y C6 arilo); 128,2(CH, C3 y C5 arilo); 53,6 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,9; 29,5 y 27,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 21,1 (Ar-CH<sub>3</sub>). **IR:**  $\nu = 3415$  (R-NH-R1); 2918 (Ar-H); 1119 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido); 1448 (C-CH<sub>3</sub>-) cm<sup>-1</sup>.

**EMAR:** masa calculada para C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) :409,3583 encontrada: 409,3587

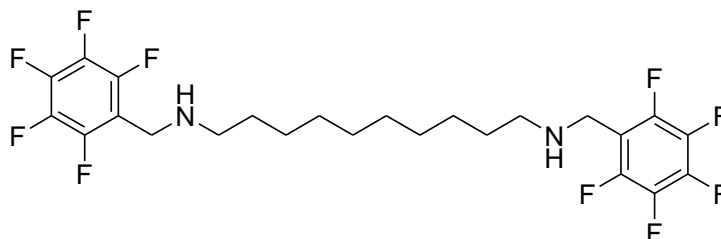
#### 40. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(perfluorobencil)octan-1,8-diamina.



Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octil-diamina (50 mg; 0,34 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de Pentafluor-benzaldehido (204 mg; 1,04 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (62 mg; 1,04 mmoles). Se obtuvo 61 mg de producto como un sólido blanco amarillento con un rendimiento del 35 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 7,27$  (m, 4 H, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,00 (m, 4 H, ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,60 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,49 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,29 (m, 8 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 161,9$  (d,  $J=244,3$ Hz, C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 136,1 (d,  $J=2,8$ Hz, C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,6 (d,  $J=8,0$ Hz, C2 y C6 arilo); 126,4 (d,  $J=20,9$ Hz, C3 y C5 arilo); 53,3 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,5 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu = 3415$  (R-NH-R1); 2918 (Ar-H); 1119 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido); 1448 (C-CH<sub>3</sub>-), 1114 (C-F) cm<sup>-1</sup>.

#### 41. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(perfluorobencil)decano-1,10-diamina.

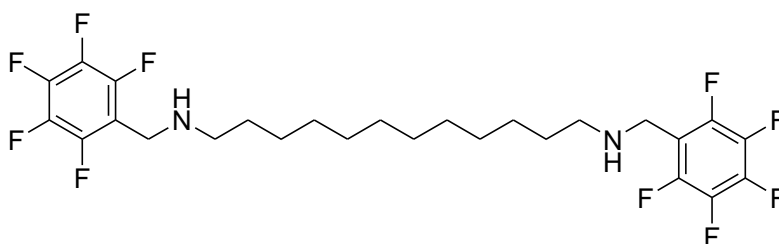


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decil-diamina (55 mg; 0,32 mmoles) en una mezcla de diclorometano : metanol (3:1) y se adicionó una solución de Pentafluor-benzaldehido (187 mg; 0,96 mmoles) preparada en diclorometano : metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano : metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (57 mg; 0,96 mmoles). Se obtuvo 17 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 10 %.

**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,26 (m, 4 H, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 6,99 (m, 4 H, ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,74 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,59 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,49 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,26 (m, 12 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 161,9 (d, J=244,4Hz, C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 136,2 (d, J=2,8Hz, C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,6 (d, J=7,9Hz, C2 y C6 arilo); 115,1 (d, J=20,9Hz, C3 y C5 arilo); 53,3 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,0; 29,5 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). **RMN de <sup>19</sup>F** (CDCl<sub>3</sub>): δ = -116,3 ppm (1 F, F-Ar) **IR**: ν = 3415 (R-NH-R1); 2918 (Ar-H); 1119 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido); 1448 (C-CH<sub>3</sub>-), 1114 (C-F) cm<sup>-1</sup>

#### 42. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(Pentafluor)dodecano-1,12-diamina.

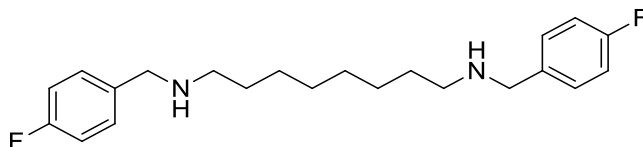


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecil-diamina (53 mg; 0,26 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se

adicionó una solución de Pentafluor-benzaldehído (155 mg; 0,79 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å. El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (47 mg; 0,79 mmoles). Se obtuvo 22 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 15 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,28$  (m, 4 H, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 6,99 (m, 4 H, ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,60 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,50 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,25 (m, 16 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-)<sub>4</sub>). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 161,9$  (d,  $J=244,6$  Hz, C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 135,8 (d,  $J=2,8$  Hz, C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,7 (d,  $J=8,2$  Hz, C2 y C6 arilo); 115,1 (d,  $J=21,2$  Hz, C3 y C5 arilo); 53,1 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,8; 29,5 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-)<sub>5</sub>). **IR:**  $\nu = 3415$  (R-NH-R1); 2918 (Ar-H); 1119 (C-N-C); 697 (aromático monosustituido); 1448 (C-CH<sub>3</sub>-), 1114 (C-F)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>F<sub>10</sub>N<sub>2</sub> (M+Na<sup>+</sup>): 583,2141; encontrada : 583,2322

#### 43. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(4-fluorobencil)octan-1,8-diamina.



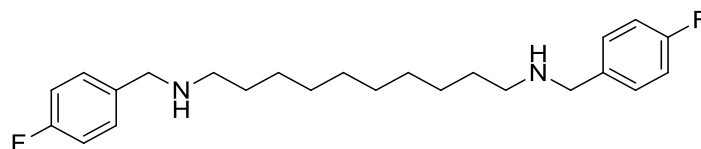
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octil-diamina (50 mg; 0,34 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Fluor-benzaldehído (129 mg; 1,04 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4 Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (62 mg; 1,04 mmoles). Se obtuvo 91 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 73 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,27$  (m, 4 H, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,00 (m, 4 H, ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,60 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,49 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,29 (m, 8 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 161,9$  (d,  $J=244,3$  Hz, C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 136,1 (d,  $J=2,8$  Hz, C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,6 (d,  $J=8,0$  Hz,

C2 y C6 arilo); 126,4(d,  $J=20,9\text{Hz}$ , C3 y C5 arilo); 53,3 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,5 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu = 3417$  (R-NH-R1); 2920 (Ar-H); 1219 (C-N-C); 823 (aromático monosustituido); 1219 (C-F) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 361,2455; encontrada: 361,2466

#### 44. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(4-fluorobencil)decano-1,10-diamina.

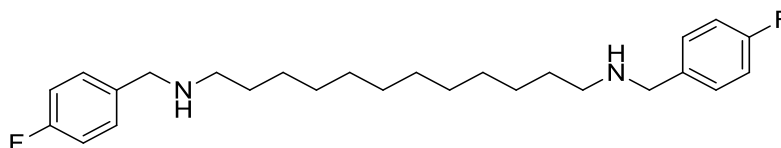


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decil-diamina (55 mg; 0,32 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Fluor-benzaldehído (118 mg; 0,96 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (57 mg; 0,96 mmoles). Se obtuvo 105 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 85 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 7,26$  (m, 4 H, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 6,99 (m, 4 H, ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,74 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,59 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,49 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,26 (m, 12 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 161,9$  (d,  $J=244,4\text{Hz}$ , C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 136,2 (d,  $J=2,8\text{Hz}$ , C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,6 (d,  $J=7,9\text{Hz}$ , C2 y C6 arilo); 115,1 (d,  $J=20,9\text{Hz}$ , C3 y C5 arilo); 53,3 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,0; 29,5 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). **RMN de <sup>19</sup>F (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = -116,3$  ppm (1 F, F-Ar). **IR:**  $\nu = 3417$  (R-NH-R1); 2920 (Ar-H); 1219 (C-N-C); 823 (aromático monosustituido); 1219 (C-F) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 417,3081; encontrada 417,3077

#### 45. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(4-fluorobencil)dodecano-1,12-diamina.

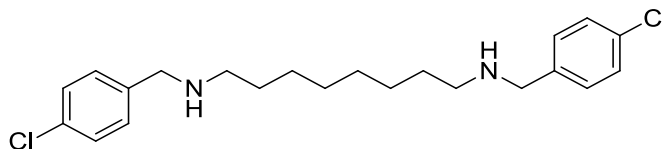


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecil-diamina (53 mg; 0,26 mmoles) en una mezcla de diclorometano : metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Fluor-benzaldehído (98 mg; 0,79 mmoles) preparada en diclorometano : metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano : metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (47 mg; 0,79 mmoles). Se obtuvo 96 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 88 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7,28 (m, 4 H, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 6,99 (m, 4 H, ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,60 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,50 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,25 (m, 16 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 161,9 (d, J=244,6 Hz, C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 135,8 (d, J=2,8 Hz, C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,7 (d, J=8,2 Hz, C2 y C6 arilo); 115,1 (d, J=21,2 Hz, C3 y C5 arilo); 53,1 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,8; 29,5 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>). **IR:** ν = 3417 (R-NH-R1); 2920 (Ar-H); 1219 (C-N-C); 823 (aromático monosustituido); 1219 (C-F) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 417,3076; encontrada: 417,3077

#### 46. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(4-clorobencil)octan-1,8-diamina.

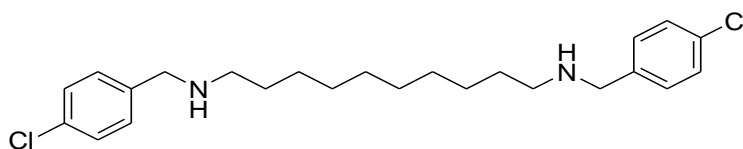


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octil-diamina (50 mg; 0,34 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Cloro-benzaldehído (145 mg; 1,04 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (62 mg; 1,04 mmoles). Se obtuvo 91 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 73 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,26 (m, 8 H, protones aromáticos); 3,75 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2$ -NH-); 2,58 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 1,48 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 1,29 (m, 8 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 139,0 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 132,5 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,4 (CH, C2 y C6 arilo); 128,5 (CH, C3 y C5 arilo); 53,3 (ipAr- $\text{CH}_2$ -NH-); 49,4 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 30,0; 29,5 y 27,3 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -). **IR:**  $\nu$  = 3415 (R-NH-R1); 2918 (Ar-H); 1219 (C-N-C); 823 (aromático monosustituido); 796 (C-Cl)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{Cl}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 393,1864; encontrada: 393,1858

#### 47. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^{10}$ -bis(4-clorobencil)decan-1,10-diamina.

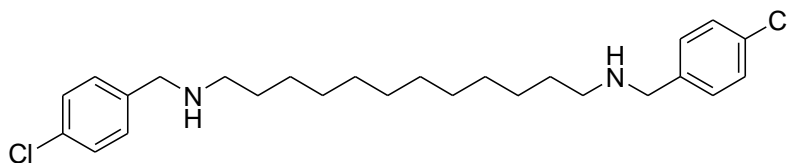


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decil-diamina (55 mg; 0,32 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Cloro-benzaldehído (134 mg; 0,96 mmoles) preparada en diclorometano : metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (57 mg; 0,96 mmoles). Se obtuvo 101 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 75 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,26 (m, 8 H, protones aromáticos); 3,74 (s, 4 H, Ar- $\text{CH}_2$ -NH-); 2,58 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 1,47 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 1,26 (m, 12 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $(\text{CH}_2)_3$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 139,1 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 132,5 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,4 (CH, C2 y C6 arilo); 128,5 (CH, C3 y C5 arilo); 53,3 (ipAr- $\text{CH}_2$ -NH-); 49,5 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 30,1; 29,5 y 27,3 (-NH- $\text{CH}_2$ - $(\text{CH}_2)_4$ ). **IR:**  $\nu$  = 3415 (R-NH-R1); 2918 (Ar-H); 1219 (C-N-C); 823 (aromático monosustituido); 796 (C-Cl)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 421,2171; encontrada: 421,2158

#### 48. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(4-clorobencil)dodecan-1,12-diamina.(48)

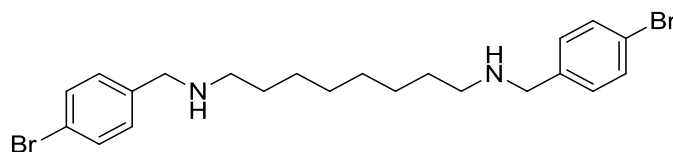


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecil-diamina (53 mg; 0,26 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Cloro-benzaldehído (111 mg; 0,79 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (47 mg; 0,79 mmoles). Se obtuvo 101 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 75 %.

**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,26 (m, 8 H, protones aromáticos); 3,74 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,59 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,49 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,25 (m, 16 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 139,1 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 132,5 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 129,4 (CH, C2 y C6 arilo); 128,5 (CH, C3 y C5 arilo); 53,3 (ipAr-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,5 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,1; 29,6 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>). **IR**: ν = 3415 (R-NH-R1); 2918 (Ar-H); 1219 (C-N-C); 823 (aromático monosustituido); 796 (C-Cl) cm<sup>-1</sup>. **EMAR**: masa calculada para C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 449,2484; encontrada: 449,2466

#### 49. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(4-bromobencil)octano-1,8-diamina.

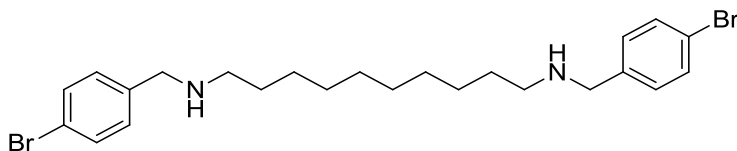


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octil-diamina (50 mg; 0,35 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Bromo benzaldehido (192 mg; 1,04 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (62 mg; 1,04 mmoles). Se obtuvo 122 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 73 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7,44 (m, 4 H, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 7,21 (d, 4 H, ArC3-H y ArC5-H, protones aromáticos); 3,73 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,59 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,48 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,25 (m, 16 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 139,6 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 131,4 (CH, C2 y C6 arilo); 129,8 (CH, C3 y C5 arilo); 120,6 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 53,4 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,1; 29,6 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:** ν = 3415 (R-NH-R1); 2922 (Ar-H); 1396 (C-N-C); 644 (aromático monosustituido); 630 (C-Br) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) : 481,0854; encontrada : 481,0842

#### 50. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(4-bromobencil)decano-1,10-diamina.

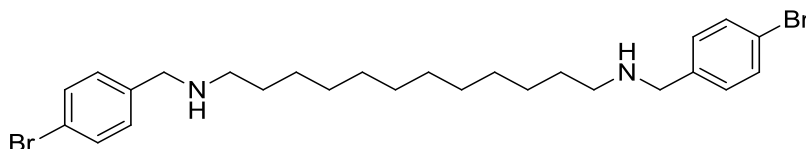


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decil-diamina (55 mg; 0,32 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Bromo benzaldehido (177 mg; 0,96 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml de la mezcla de solventes en condiciones antes mencionada y se adicionan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (57 mg; 0,96 mmoles). Se obtuvo 161 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 99 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,44 (m, 4 H, ArC2–H y ArC6–H protones aromáticos); 7,21 (d, 4 H, ArC3–H y ArC5–H, protones aromáticos); 3,68 (s, 4 H, Ar–CH<sub>2</sub>–NH–); 2,53 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–); 1,45 (m, 4 H, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–) y 1,21 (m, 12 H, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 139,6 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 131,4 (CH, C2 y C6 arilo); 129,8 (CH, C3 y C5 arilo); 120,6 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 53,4 (Ar–CH<sub>2</sub>–NH–); 49,4 (–NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–); 30,1; 29,6 y 27,3 (–NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–). **IR:**  $\nu$  = 3415 (R–NH–R1); 2922 (Ar–H); 1396 (C–N–C); 644 (aromático monosustituido); 630 (C–Br)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{Br}_2\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) : 509,1162; encontrada : 509,1167

### 51. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^{12}$ -bis(4-bromobencil)dodecano-1,12-diamina.



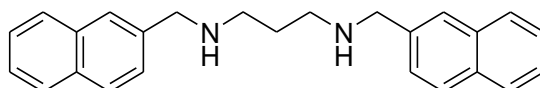
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecanodiamina (53 mg; 0,26 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 4-Bromo Benzaldehído (146 mg; 0,79 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen final de 5 ml con la misma mezcla de solventes y se adicionan los tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (47 mg; 0,79 mmoles). Se obtuvo 136 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 96 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,44 (m, 4 H, ArC2–H y ArC6–H protones aromáticos); 7,21 (d, 4 H, ArC3–H y ArC5–H, protones aromáticos); 3,73 (s, 4 H, Ar–CH<sub>2</sub>–NH–); 2,59 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–); 1,48 (m, 4 H, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–) y 1,25 (m, 16 H, –NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 139,6 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 131,4 (CH, C2 y C6 arilo); 129,8 (CH, C3 y C5 arilo); 120,6 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 53,4 (Ar–CH<sub>2</sub>–NH–); 49,4 (–NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–); 30,1; 29,6 y 27,3 (–NH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–). **IR:**  $\nu$  = 3415 (R–NH–R1); 2922 (Ar–H); 1396 (C–N–

C); 644 (aromático monosustituido); 630 (C-Br)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{Br}_2\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 537,1480; encontrada: 537,1485

### 52. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^3$ -bis(naftalen-2-ilmetil)propan-1,3-diamina.



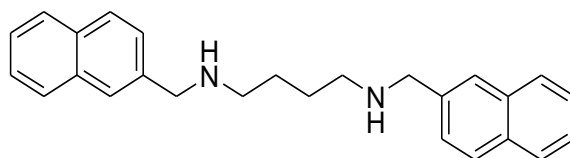
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butanodiamina (50 mg; 0,68 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 2-naftaldehído (325 mg; 2,02 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1).

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (121 mg; 2,02 mmoles). Se obtuvo 29 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 12 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,80 (m, 6 H, H4, H6 y H9 aromáticos naftoles); 7,77 (s, 2 H, H1 aromático naftoles); 7,49 (m, 6 H, H3, H7 y H8 aromáticos naftoles); 3,97 (s, 4 H, Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 2,78 (t, 4 H,  $J=6,7\text{Hz}$ , -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 1,80 (q, 2 H,  $J=6,7\text{Hz}$ , -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 138,0 (C2 naftol, carbono aromático cuaternario); 133,5 y 132,7 (C5 y C10 naftol, carbono aromático cuaternario); 128,1; 127,8; 127,7; 126,7; 126,5; 126,1 y 125,6 (CH, carbonos aromáticos naftoles); 54,2 (Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 48,1 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 30,2 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -). **IR:**  $\nu$  = 3361 (C-NH); 3049 (Ar-H): ( $\beta$ -Naftol) 2927, 1633, 815; (- $\text{CH}_2$ -) 2819, 1284,  $746\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ): 377,1980; encontrada 377,1988

### 53. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^4$ -bis(naftalen-2-ilmetil)butan-1,4-diamina.(53)

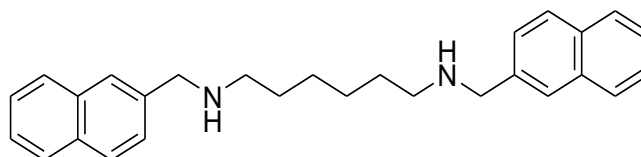


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butildiamina (50 mg; 0,57 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 2-naftaldehído (156 mg; 1,70 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (102 mg; 1,70 mmoles). Se obtuvo 34 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 16 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,78 (m, 6 H, H4, H6 y H9 aromáticos naftoles); 7,71 (s, 2 H, H1 aromático naftoles); 7,43 (m, 6 H, H3, H7 y H8 aromáticos naftoles); 3,94 (s, 4 H, Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 2,68 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 1,62 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 135,7 (C2 naftol, carbono aromático cuaternario); 133,4 y 132,8 (C5 y C10 naftol, carbono aromático cuaternario); 128,3; 127,8; 127,7; 127,2; 126,6; 126,2 y 125,9 (CH, carbonos aromáticos naftoles); 53,1 (Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 48,3 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 27,1 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -). **IR:**  $\nu$  = 3361 (C-NH); 3049 (Ar-H): ( $\beta$ -Naftol) 2927, 1633, 815; (- $\text{CH}_2$ -) 2819, 1284, 746  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ): 391,2145; encontrada : 391,2144

#### 54. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^6$ -bis(naftalen-2-ilmetil)hexan-1,6-diamina.



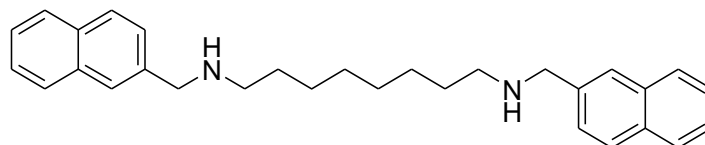
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexildiamina (50 mg; 0,43 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 2-naftaldehído (207 mg; 1,29 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (77 mg; 1,29 mmoles). Se obtuvo 150 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 88 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,80 (m, 6 H, H4, H6 y H9 aromáticos naftoles); 7,75 (s, 2 H, H1 aromático naftoles); 7,44 (m, 6 H, H3, H7 y H8 aromáticos naftoles); 3,95 (s, 4 H, Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 2,65 (t, 4 H,  $J=7,3$  Hz, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 1,53 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 1,29 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 136,3 (C2 naftol, carbono aromático cuaternario); 133,4 y 132,7 (C5 y C10 naftol, carbono aromático cuaternario); 128,2; 127,7; 127,7; 127,0; 126,6; 126,1 y 125,7 (CH, carbonos aromáticos naftoles); 53,4 (Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 48,7 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 29,2 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 27,0 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -). **IR:**  $\nu$  = 3361 (C-NH); 3049 (Ar-H): ( $\beta$ -Naftol) 2927, 1633, 815; (- $\text{CH}_2$ -) 2819, 1284, 746  $\text{cm}^{-1}$ .

**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ): 419,2458; encontrada: 419,2457

### 55. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(naftalen-2-ilmetil)octan-1,8-diamina.

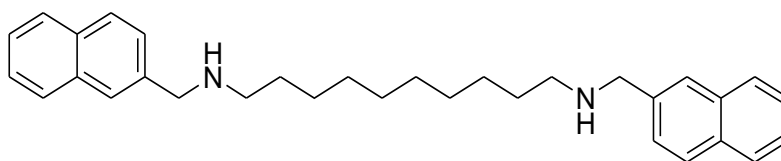


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octildiamina (100 mg; 0,69 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 2-naftaldehido (333 mg; 2,07mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (124 mg; 2,07mmoles). Se obtuvo 267 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 91 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7,80 (m, 6 H, H4, H6 y H9 aromáticos); 7,75 (s, 2 H, H1 aromático naftoles); 7,44 (m, 6 H, H3, H7 y H8 aromáticos); 3,95 (s, 4 H, Naft-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,65 (t, 4 H, J=7,3 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,53 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,29 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 136,3 (C2 naftol, carbono aromático cuaternario); 133,4 y 132,7 (C5 y C10 naftol, carbono aromático cuaternario); 128,2; 127,7; 127,7; 127,0; 126,6; 126,1 y 125,7 (CH, carbonos aromáticos naftoles); 53,4 (Naft-CH<sub>2</sub>-NH-); 48,7 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,0 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:** ν = 3361 (C-NH); 3049 (Ar-H): (β-Naftol) 2927, 1633, 815; (-CH<sub>2</sub>-) 2819, 1284,746cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) : 425,2951; encontrada : 425,2953

### 56. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(naftalen-2-ilmetil)decil-1,10-diamina.

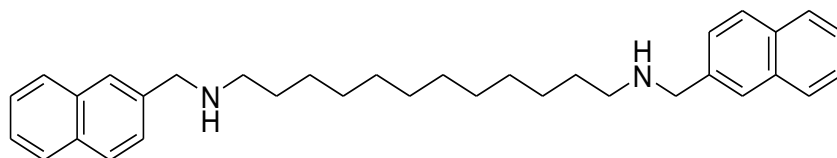


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decildiamina (100 mg; 0,58 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 2-naftaldehido ( 279,3mg; 1,75 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (104 mg; 1,74mmoles). Se obtuvo 228 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 87 %

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,80$  (m, 6 H, H4, H6 y H9 aromáticos naftoles); 7,75 (s, 2 H, H1 aromático naftoles); 7,44 (m, 6 H, H3, H7 y H8 aromáticos naftoles); 3,95 (s, 4 H, Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 2,65 (t, 4 H,  $J=7,3$  Hz, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 1,53 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 1,29 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -  $\text{CH}_2$ -). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 136,3$  (C2 naftol, carbono aromático cuaternario); 133,4 y 132,7 (C5 y C10 naftol, carbono aromático cuaternario); 128,2; 127,7; 127,7; 127,0; 126,6; 126,1 y 125,7 (CH, carbonos aromáticos naftoles); 53,4 (Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 48,7 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 29,2 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 27,0 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -). **IR:**  $\nu = 3361$  (C-NH); 3049 (Ar-H): ( $\beta$ -Naftol) 2927, 1633, 815; (- $\text{CH}_2$ -) 2819, 1284,746 $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) : 453.3264; encontrada : 453,3264

### 57. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^{12}$ -bis(naftalen-2-ilmetil)dodecil-1,12-diamina.

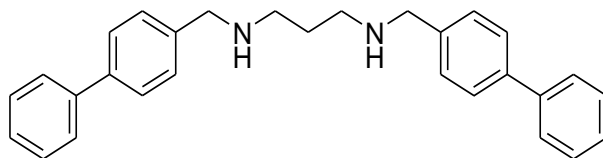


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecildiamina (100 mg; 0,49mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 2-naftaldehído (240 mg; 1,49 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (89 mg; 149 mmoles). Se obtuvo 189 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 79 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,80$  (m, 6 H, H4, H6 y H9 aromáticos naftoles); 7,75 (s, 2 H, H1 aromático naftoles); 7,44 (m, 6 H, H3, H7 y H8 aromáticos naftoles); 3,95 (s, 4 H, Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 2,65 (t, 4 H,  $J=7,3$  Hz, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 1,53 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 1,29 (m, 4 H, -NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -  $\text{CH}_2$ -). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 136,3$  (C2 naftol, carbono aromático cuaternario); 133,4 y 132,7 (C5 y C10 naftol, carbono aromático cuaternario); 128,2; 127,7; 127,7; 127,0; 126,6; 126,1 y 125,7 (CH, carbonos aromáticos naftoles); 53,4 (Naft- $\text{CH}_2$ -NH-); 48,7 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 29,2 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -) y 27,0 (-NH- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -). **IR:**  $\nu = 3361$  (C-NH); 3049 (Ar-H): ( $\beta$ -Naftol) 2927, 1633, 815; (- $\text{CH}_2$ -) 2819, 1284,746 $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 481.3577; encontrada : 481,3577

### 58. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-bis([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)butan -1,3-diamina.

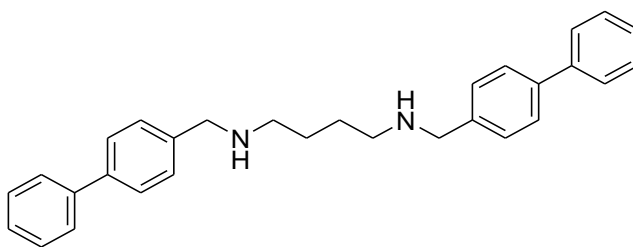


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,3-propildiamina (50 mg; 0,67 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 2-bifenilaldehído (416 mg; 2,02 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (121 mg; 2,02 mmoles). Se obtuvo 162 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 59%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7,40 (m, 18 H, protones aromáticos bifenilos); 3,83 (s, 4 H, BiFen-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,69 (t, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,61 (q, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 141,0 (C1' bifenilo, carbono aromático cuaternario); 139,9 (C4 bifenilo, carbono aromático cuaternario); 139,5 (C1 bifenilo, carbono aromático cuaternario); 128,7; 128,6; 127,2 y 127,1 (CH, carbonos aromáticos bifenilos); 53,7 (BiFen-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,9 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:** ν = 3670 (C-NH); 3055, (Ar-H); 2918, (Bencil monosustituidos); 1259 (C-C); 1274 (-CH<sub>2</sub>-); 823 (Aromáticos); 752 (C-disustituidos en *para*) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 407,2481

### 59. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)butan -1,4-diamina.

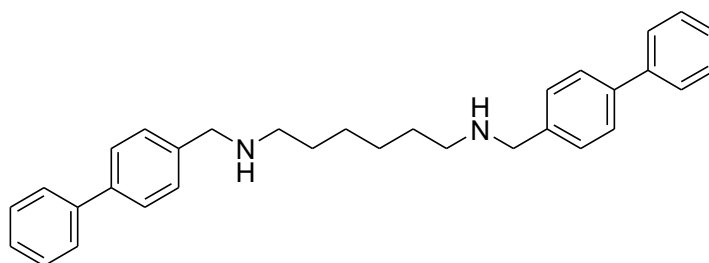


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butildiamina (50 mg; 0,57 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 2-bifenilaldehído (350 mg; 1,70 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (102 mg; 1,70 mmoles). Se obtuvo 181 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 76 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,40$  (m, 18 H, protones aromáticos bifenilos); 3,83 (s, 4 H, Bifen- $\text{CH}_2\text{-NH-}$ ); 2,69 (t, 4 H,  $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ) y 1,61 (q, 4 H,  $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 141,0$  ( $\text{C1}'$  bifenilo, carbono aromático cuaternario); 139,9 ( $\text{C4}$  bifenilo, carbono aromático cuaternario); 139,5 ( $\text{C1}$  bifenilo, carbono aromático cuaternario); 128,7; 128,6; 127,2 y 127,1 (CH, carbonos aromáticos bifenilos); 53,7 (BiFen- $\text{CH}_2\text{-NH-}$ ); 49,3 ( $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ) y 27,9 ( $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ). **IR:**  $\nu = 3670$  (C-NH); 3055,(Ar-H); 2918,(Bencil monosustituidos);1259 (C-C);1274 ( $-\text{CH}_2-$ ); 823(Aromáticos); 752 (C-disustituidos en *para*)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 421,2638; encontrada

### 60. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^6$ -bis([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)hexan-1,6-diamina.

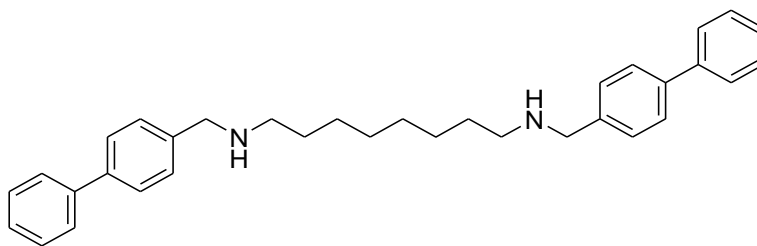


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-Hexildiamina (50 mg; 0,43 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de bifenilaldehido (265 mg; 1,29 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (77 mg; 1,29 mmoles). Se obtuvo 144 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 75 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,40$  (m, 18 H, protones aromáticos bifenilos); 3,93 (s, 4 H, BiFen- $\text{CH}_2\text{-NH-}$ ); 2,76 (t, 4 H,  $J=7,3$  Hz,  $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ); 1,64 (m, 4 H,  $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ) y 1,34 (m, 4 H,  $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 141,1$  ( $\text{C1}'$  bifenilo, carbono aromático cuaternario); 140,5 ( $\text{C4}$  bifenilo, carbono aromático cuaternario); 133,8 ( $\text{C1}$  bifenilo, carbono aromático cuaternario); 129,6; 128,8; 127,4 y 127,0 (CH, carbonos aromáticos bifenilos); 53,4 (BiFen- $\text{CH}_2\text{-NH-}$ ); 47,1 ( $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ); 27,2 ( $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ ) y 26,3 ( $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ ). **IR:**  $\nu = 3670$  (C-NH); 3055,(Ar-H); 2918,(Bencil monosustituidos);1259 (C-C);1274 ( $-\text{CH}_2-$ ); 823(Aromáticos); 752 (C-disustituidos en *para*)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 449,2951; encontrada:

### 61. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)decan-1,8-diamina.



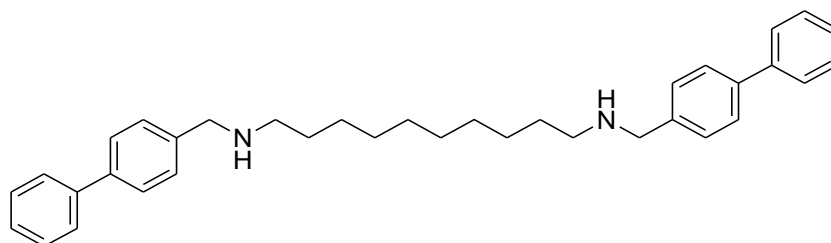
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-Octil-diamina (100 mg; 0,69 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de bifenilaldehido (427 mg; 2,07 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (124 mg; 2,07mmoles). Se obtuvo 168 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 51 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7,45 (m, 18 H, protones aromáticos bifenilos); 3,82 (s, 4 H, BiFen-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,65 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,52 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,31 (m, 8 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 140,9 (C1' bifenilo, carbono aromático cuaternario); 140,0 (C4 bifenilo, carbono aromático cuaternario); 138,7 (C1 bifenilo, carbono aromático cuaternario); 128,7; 127,2 y 127,0 (CH, carbonos aromáticos bifenilos); 53,3 (BiFen-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,7; 29,4 y 27,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:** ν = 3670 (C-NH); 3055,(Ar-H); 2918,(Bencil monosustituidos);1259 (C-C);1274 (-CH<sub>2</sub>-); 823(Aromáticos); 752 (C-disustituidos en *para*) cm<sup>-1</sup>

**EMAR:** masa calculada para C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 477,3264; encontrada:

### 62. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)decan-1,10-diamina.

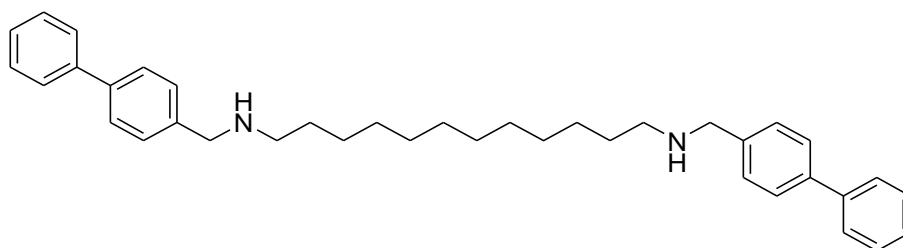


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decildiamina (100 mg; 0,58 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 2-bifenilaldehido (358 mg; 1,74 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (104 mg; 1,74 mmoles). Se obtuvo 103 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 35 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,45 (m, 18 H, protones aromáticos bifenílos); 3,88 (s, 4 H, BiFen- $\text{CH}_2\text{-NH-}$ ); 2,72 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 1,62 (m, 4 H,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ) y 1,27 (m, 12 H,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 140,7 (C1' bifenilo, carbono aromático cuaternario); 140,6 (C4 bifenilo, carbono aromático cuaternario); 135,5 (C1 bifenilo, carbono aromático cuaternario); 129,4; 128,8; 127,3 y 127,0 (CH, carbonos aromáticos bifenílos); 52,1 (BiFen- $\text{CH}_2\text{-NH-}$ ); 48,0 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 28,9; 28,8; 28,2 y 26,8 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ). **IR:**  $\nu$  = 3670 (C-NH); 3055,(Ar-H); 2918,(Bencil monosustituidos);1259 (C-C);1274 ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ); 823(Aromáticos); 752 (C-disustituidos en *para*)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 505,3577; encontrada :505,3555

### 63. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^{12}$ -bis([1,1'-bifenil]-4-ilmetil)decan-1,12-diamina.



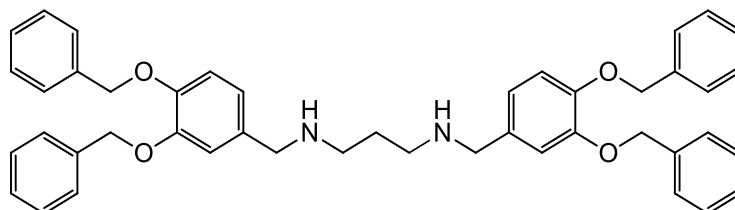
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecil-diamina (100 mg; 0,49 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de bifenilaldehído (308 mg; 1,49 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Completando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (89 mg; 1,49 mmoles). Se obtuvo 96 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 36 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,45 (m, 18 H, protones aromáticos bifenílos); 3,88 (s, 4 H, BiFen- $\text{CH}_2\text{-NH-}$ ); 2,72 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 1,62 (m, 4 H,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ) y 1,27 (m, 12 H,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 140,7 (C1' bifenilo, carbono aromático cuaternario); 140,6 (C4 bifenilo, carbono aromático cuaternario); 135,5 (C1 bifenilo, carbono aromático cuaternario); 129,4; 128,8; 127,3 y 127,0 (CH, carbonos aromáticos bifenílos); 52,1 (BiFen- $\text{CH}_2\text{-NH-}$ ); 48,0 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 28,9; 28,8; 28,2 y 26,8 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ). **IR:**  $\nu$  = 3670 (C-NH); 3055,(Ar-H); 2918,(Bencil

monosustituidos);1259 (C-C);1274 (-CH<sub>2</sub>-); 823(Aromáticos); 752 (C-disustituidos en *para*) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>38</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 533,3890; encontrada :533,3867

#### 64. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-bis(3,4-bis(benciloxi)bencil)propan-1,3-diamina.(64)



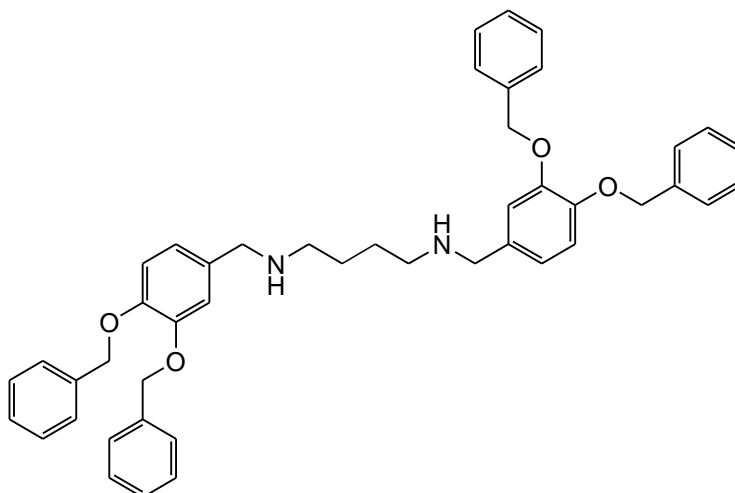
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butanodiamina (50 mg; 0,68 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución del 3,4 dibenciloxi benzaldehido (551 mg; 1,68 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1).

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (121 mg; 2,02 mmoles). Se obtuvo 46 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 10 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7,38 (m, 20 H, -O-CH<sub>2</sub>-Ar` protones aromáticos); 7,00 (s, 2 H, C2-H aromático); 6,88 (m, 4 H, C5-H y C6-H aromáticos); 5,18 (s, 4 H, ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 5,15 (s, 4 H, ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,67 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,71 (q, 2 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 149,1 (ArC3, carbono aromático cuaternario); 148,0 (ArC4, carbono aromático cuaternario); 137,5 (Ar´C1, carbono aromático cuaternario); 134,0 (ArC1, carbono aromático cuaternario); 128,5; 127,8; 127,4; 127,4; 121,1 y 115,2 (CH, carbonos aromáticos); 71,5 (ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 71,3 (ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 53,7 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 47,9 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 30,1 (-NH,-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).

**IR:** ν = 3498 (R-NH-R1); 2924 (Ar-H); 1454(-CH<sub>2</sub>-) 1168(C-N-C); 1265 y 1006 (Ar-O-C) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>45</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(M+H<sup>+</sup>) : 679,3531; encontrada: 679,3530

### 65. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(3,4-bis(benciloxi)bencil)butan -1,4-diamina.



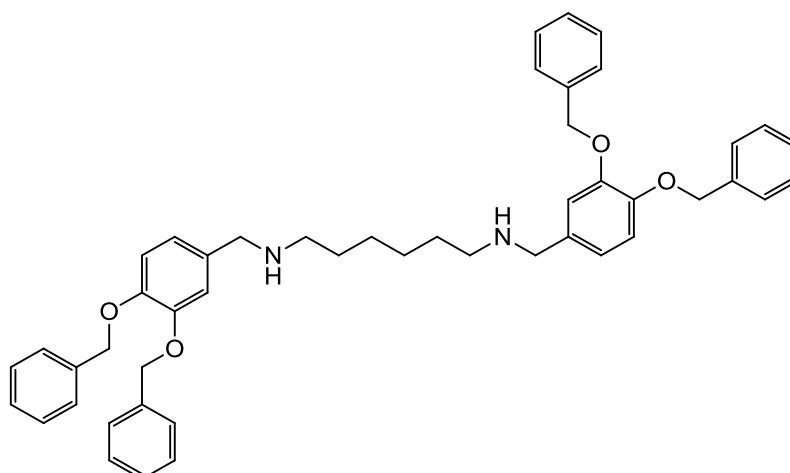
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butildiamina (50 mg; 0,57 mmoles) fue disuelta en una mezcla de diclorometano : metanol (3:1) y se adicionó una solución de 3,4 dibenciloxi benzaldehído (556 mg; 1,70 mmoles) preparada en diclorometano : metanol (3:1). Llevando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano : metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (102 mg; 1,70 mmoles). Se obtuvo 43 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 11 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7,38 (m, 20 H, -O-CH<sub>2</sub>-Ar` protones aromáticos); 7,00 (s, 2 H, C2-H aromático); 6,88 (m, 4 H, C5-H y C6-H aromáticos); 5,18 (s, 4 H, ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 5,15 (s, 4 H, ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,67 (t, 4 H, *J*=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,71 (q, 2 H, *J*=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 149,1 (ArC3, carbono aromático cuaternario); 148,0 (ArC4, carbono aromático cuaternario); 137,5 (Ar`C1, carbono aromático cuaternario); 134,0 (ArC1, carbono aromático cuaternario); 128,5; 127,8; 127,4; 127,4; 121,1 y 115,2 (CH, carbonos aromáticos); 71,5 (ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 71,3 (ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 53,7 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 47,9 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 30,1 (-NH,-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu$  = 3498 (R-NH-R1); 2924 (Ar-H); 1454(-CH<sub>2</sub>-) 1168(C-N-C); 1265 y 1006 (Ar-O-C) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>46</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) : 693,3687; encontrada 693,3686

## 66. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>-bis(3,4-bis(benciloxi)bencil)hexan-1,6-diamina.



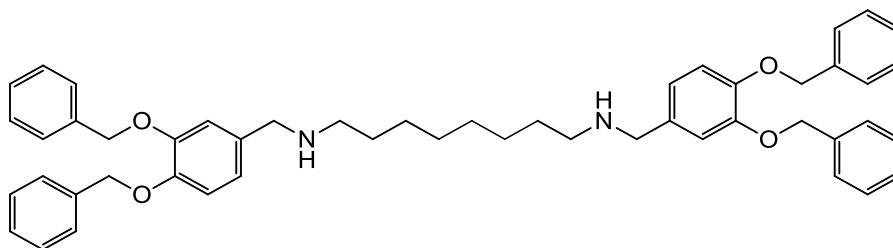
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexanodiamina (50 mg; 0,43 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 3,4 dibenciloxi benzaldehido (422 mg; 1,29 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Llevando a volumen final de 5 ml.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (77 mg; 1,29 mmoles). Se obtuvo 34 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 11 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7,37 (m, 20 H, -O-CH<sub>2</sub>-Ar` protones aromáticos); 7,06 (s, 2 H, C2-H aromático); 6,82 (m, 4 H, C5-H y C6-H aromáticos); 5,14 (s, 4 H, ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 5,04 (s, 4 H, ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 3,73 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,61 (t, 4 H, *J*=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,55 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,28 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 149.0 (ArC3, carbono aromático cuaternario); 148.9 (ArC4, carbono aromático cuaternario); 137.1 (Ar`C1, carbono aromático cuaternario); 128.5; 127.8; 127.4; 127.2; 122,6; 116.1 y 114.7(CH, carbonos aromáticos); 71.1 (ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 71.0 (ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 51.4 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 46.7 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 26.9; 26.3 y 23.7 (-NH.-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu$  = 3498 (R-NH-R1); 2924 (Ar-H); 1454(-CH<sub>2</sub>-) 1168(C-N-C); 1265 y 1006 (Ar-O-C) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>48</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) : 721,3999; encontrada : 721,3999

### 67. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(3,4-bis(benciloxi)bencil)octan-1,8-diamina.



Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octil-diamina (61 mg; 0,42 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 3,4 dibenciloxi benzaldehído (404 mg; 1,26 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Llevando a volumen final de 5 ml.

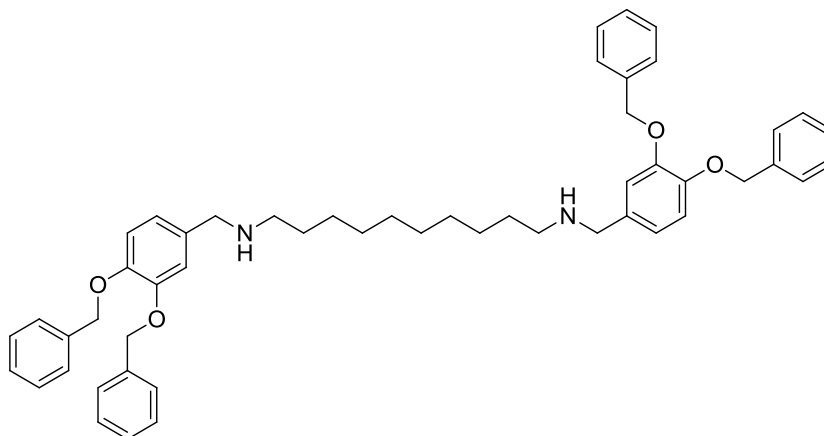
El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (76 mg ; 1,26 mmoles). Se obtuvo 180 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 57 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7,37 (m, 20 H, -O-CH<sub>2</sub>-Ar`protones aromáticos); 7,00 (s, 2 H, C2-H aromático); 6,86 (m, 4 H, C5-H y C6-H aromáticos); 5,19 (s, 4 H, ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 5,16 (s, 4 H, ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 3,71 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,60 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,51 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,33 (m, 8 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 149,1 (ArC3, carbono aromático cuaternario); 148,0 (ArC4, carbono aromático cuaternario); 137,5 y 137,4 (Ar`C1, carbono aromático cuaternario); 134,0 (ArC1, carbono aromático cuaternario); 128,5; 127,8; 127,4; 127,4; 121,2 y 115,2 (CH, carbonos aromáticos); 71,5 (ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 71,3 (ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 53,7 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,1; 29,6 y 27,4 (-NH,-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu$  = 3498 (R-NH-R1); 2924 (Ar-H); 1454(-CH<sub>2</sub>-) 1168(C-N-C); 1265 y 1006 (Ar-O-C) cm<sup>-1</sup>

**EMAR:** masa calculada para C<sub>50</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) : 749,43128; encontrada: 749,43129

## 68. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(3,4-bis(benciloxi)bencil)decano-1,10-diamina.

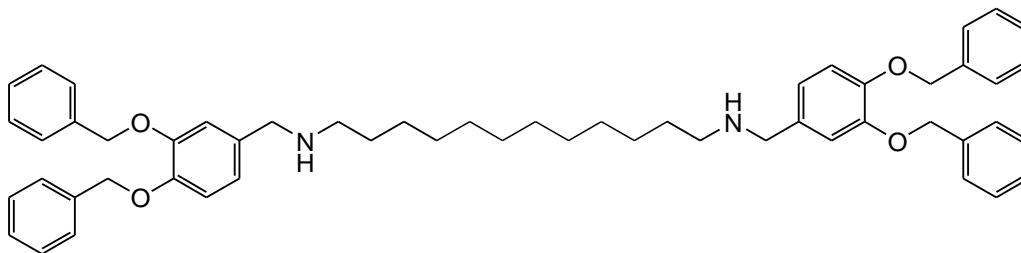


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decil-diamina (61 mg; 0,35) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 3,4-bis(benciloxi)benzaldehído (338 mg; 1,06 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen de 5 ml., se agregaron 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (64 mg; 1,06 mmoles). Se obtuvo 156 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 57%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7,35 (m, 20 H, -O-CH<sub>2</sub>-Ar` protones aromáticos); 6,99 (d, 2 H, J=1,65Hz, C2-H aromático); 6,86 (m, 4 H, C5-H y C6-H aromáticos); 5,17 (s, 4 H, ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 5,13 (s, 4 H, ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 3,69 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,57 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,50 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,27 (m, 12 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 149.0 (ArC3, carbono aromático cuaternario); 148.1 (ArC4, carbono aromático cuaternario); 137.4 (Ar`C1, carbono aromático cuaternario); 133.2 (ArC1, carbono aromático cuaternario); 128.5; 127.8; 127.4; 127.3; 121.3; 115.2 y 115.1 (CH, carbonos aromáticos); 71.5 (ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 71.3 (ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 53.4 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49.1 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29.7; 29.5 y 27.3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR: ν** = 3498 (R-NH-R1); 2924 (Ar-H); 1454(-CH<sub>2</sub>-) 1168(C-N-C); 1265 y 1006 (Ar-O-C) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>52</sub>H<sub>60</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(M+H<sup>+</sup>): 777,4625; encontrada : 777,4604

### 69. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(3,4-bis(benciloxi)bencil)dodecano-1,12-diamina.(69)

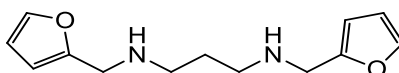


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecil-diamina (61 mg; 0.30 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una solución de 3,4-bis-benciloxi benzaldehido (290 mg; 0,91 mmoles) preparada en diclorometano: metanol (3:1). Se lleva a volumen de 5 ml con la misma mezcla de solvente., se agregaron 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (121 mg; 2,02 mmoles). Se obtuvo 164 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 67 %.

**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,35 (m, 20 H, -O-CH<sub>2</sub>-Ar` protones aromáticos); 6,99 (d, 2 H, J=1,65Hz, C2-H aromático); 6,85(m, 4 H, C5-H y C6-H aromáticos); 5,17 (s, 4 H, ArC3-O--CH<sub>2</sub>-); 5,12 (s, 4 H, ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 3,69 (s, 4 H, Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,57 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-); 1,50 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,26 (m, 16 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 149.0 (ArC3, carbono aromático cuaternario); 148.1 (ArC4, carbono aromático cuaternario); 137.4 (Ar`C1, carbono aromático cuaternario); 132.8 (ArC1, carbono aromático cuaternario); 128.4; 127.7; 127.4; 127.3; 121.4; 115.3 y 115.1 (CH, carbonos aromáticos); 71.4(ArC3-O-CH<sub>2</sub>-); 71.2 (ArC4-O-CH<sub>2</sub>-); 53.3 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49.0 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29.7; 29.5; 29,4 y 27.3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:** ν = 3498 (R-NH-R1); 2924 (Ar-H); 1454(-CH<sub>2</sub>-) 1168(C-N-C); 1265 y 1006 (Ar-O-C) cm<sup>-1</sup> **EMAR:** masa calculada para C<sub>54</sub>H<sub>64</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) : 805,4938; encontrada : 805,4938

### 70. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-bis(furan-2-ilmetil)propan-1,3-diamina.



Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,3-propanodiamina (50 mg; 0,67 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Furfuraldehido (196 mg (ρ= 1.16g/mL a 25°C); 2,02 mmoles) y se lleva a volumen

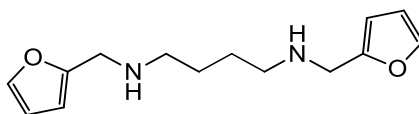
de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (121 mg; 2,02 mmoles). Se obtuvo 85 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 54 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,34 (m, 2H, C5-H furanilo); 6,29 (m, 2H, C4-H furanilo); 6,15 (m, 2H, C3-H furanilo); 3,76 (s, 4 H, Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,67 (t, 4 H,  $J=6,9$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,68 (q, 2 H,  $J=6,9$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 153,9 (C2 furanilo, carbono cuaternario); 141,7 (CH, C5 furanilo); 110,1 (CH, C4 furanilo); 106,9 (CH, C3 furanilo); 47,5 (Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 46,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 29,9 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).

**IR:**  $\nu$  = 3304 (R-NH-R1); 1107 (C-N-C); 1454(-CH<sub>2</sub>-); 1278(C-O-C); 810 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 235,1441 encontrada : 235,1441

### 71. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(furan-2-ilmetil)butan-1,4-diamina.



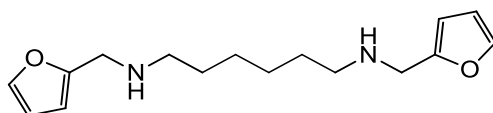
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4 propano diamina (55 mg; 0,62 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Furfuraldehído (181,2 mg ( $\rho$ = 1.16 g/mL a 25 °C); 1,87 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (112 mg; 1,87 mmoles). Se obtuvo 100 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 65 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7,33 (m, 2H, C5-H furanilo); 6,28 (m, 2H, C4-H furanilo); 6,14 (m, 2H, C3-H furanilo); 3,76 (s, 4 H, Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,60 (t, 4 H,  $J=6,9$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,51 (q, 4 H,  $J=6,9$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 153,9 (C2 furanilo, carbono cuaternario); 141,7 (CH, C5 furanilo); 110,1 (CH, C4 furanilo); 106,8 (CH, C3 furanilo); 48,9 (Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 46,1 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,7 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).

**IR:**  $\nu = 3304$  (R-NH-R1); 1107 (C-N-C); 1454(-CH<sub>2</sub>-); 1278(C-O-C); 810 (aromático monosustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 249,1593, encontrada: 249,1597

### 72. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>-bis(furan-2-ilmetil)hexan-1,6-diamina.

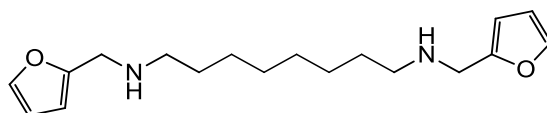


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexanodiamina (50 mg; 0,43 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una Furfuraldehido (124 mg ( $\rho = 1,16$  g/mL a 25°C); 1,29 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (77 mg; 1,29 mmoles). Se obtuvo 75 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 63

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 7,34$  (m, 2H, C5-H furanilo); 6,30 (m, 2H, C4-H furanilo); 6,15 (m, 2H, C3-H furanilo); 3,76 (s, 4 H, Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,59 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,48 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,31 (m, 4H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 154,0$  (C2 furanilo, carbono cuaternario); 141,7 (CH, C5 furanilo); 110,1 (CH, C4 furanilo); 106,8 (CH, C3 furanilo); 49,1 (Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 46,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,9 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu = 3304$  (R-NH-R1); 1107 (C-N-C); 1454(-CH<sub>2</sub>-); 1278(C-O-C); 810 (aromático monosustituido) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): 277,1910 encontrada : 277,1910

### 73. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(furan-2-ilmetil)octan-1,8-diamina.

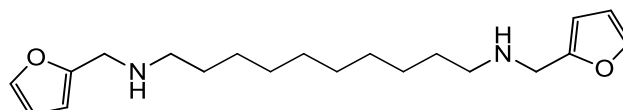


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octanodiamina (50 mg; 0,35 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Furfuraldehido (100 mg ( $\rho = 1,16$  g/mL a 25 C); 1,04 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano:metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (62 mg; 1,04 mmoles). Se obtuvo 35 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 33 %.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,34$  (m, 2H, C5-**H** furanilo); 6,30 (m, 2H, C4-**H** furanilo); 6,16 (m, 2H, C3-**H** furanilo); 3,76 (s, 4 H, Fur-**CH<sub>2</sub>**-NH-); 2,59 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-); 1,47 (m, 4 H, -NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-) y 1,28 (m, 8H, -NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 154,1$  (C2 furanilo, carbono cuaternario); 141,7 (CH, C5 furanilo); 110,1 (CH, C4 furanilo); 106,7 (CH, C3 furanilo); 49,2 (Fur-**CH<sub>2</sub>**-NH-); 46,2 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-); 29,9 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-); 29,4 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-) y 27,2 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-). **IR:**  $\nu = 3304$  (R-NH-R1); 1107 (C-N-C); 1454(-**CH<sub>2</sub>**-); 1278(C-O-C); 810 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 305,2223 encontrada :305,2221

#### 74 . Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^{10}$ -bis(furan-2-ilmetil)decan-1,10-diamina.

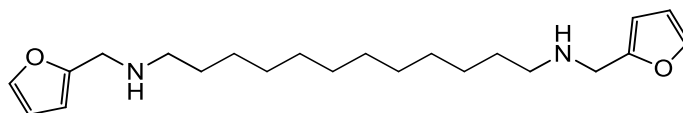


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butanodiamina (55 mg; 0,31 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Furfuraldehido (92,6 mg ( $\rho = 1,16$  g/mL); 0,96 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (57 mg; 0,96 mmoles). Se obtuvo 83 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 78 %.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,34$  (m, 2H, C5-**H** furanilo); 6,30 (m, 2H, C4-**H** furanilo); 6,16 (m, 2H, C3-**H** furanilo); 3,77 (s, 4 H, Fur-**CH<sub>2</sub>**-NH-); 2,59 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-); 1,47 (m, 4 H, -NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-) y 1,26 (m, 12 H, -NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 154,1$  (C2 furanilo, carbono cuaternario); 141,7 (CH, C5 furanilo); 110,1 (CH, C4 furanilo); 106,7 (CH, C3 furanilo); 49,2 (Fur-**CH<sub>2</sub>**-NH-); 46,2 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-); 29,9 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-); 29,5 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-) y 27,3 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-). **IR:**  $\nu = 3304$  (R-NH-R1); 1107 (C-N-C); 1454(-**CH<sub>2</sub>**-); 1278(C-O-C); 810 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) : 333,2536 encontrada : 333,2536

### 75. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(furan-2-ilmetil)dodecan-1,12-diamina.

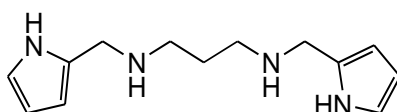


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecanodiamina (53 mgr; 0,26 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Furfuraldehido (76 mg ( $\delta = 1,16$  g/mL); 0,79 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (47 mg; 0,79 mmoles). Se obtuvo 58 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 61 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 7,34$  (m, 2H, C5-H furanilo); 6,30 (m, 2H, C4-H furanilo); 6,16 (m, 2H, C3-H furanilo); 3,77(s, 4 H, Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,59 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,45 (M, 2 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,24 (m, 16 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 154,1$  (C2 furanilo, carbono cuaternario); 141,7 (CH, C5 furanilo); 110,1 (CH, C4 furanilo); 106,7 (CH, C3 furanilo); 49,2 (Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 46,2 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,0 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,6 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu = 3194$  (R-NH-R1); 1666 (C-NH-C); 1469(-CH<sub>2</sub>-); 1396 y 1134(=CH-NH-CH=) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+Na<sup>+</sup>) 383,2671 encontrada: 383,2669

### 76. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-bis((1H-pirrol-2-il)metil)propan-1,3-diamina.

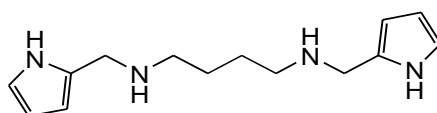


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,3-propanodiamina (50 mg; 0,67 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Pirraldehido (192 mg; 2,02 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó borohidruro de sodio (121 mg; 2,02 mmoles). Se obtuvo 17 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 11 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 6,72$  (m, 2H, C2-**H** Pirroilo); 6,12 (m, 2H, C3-**H** Pirroilo); 6,02 (m, 2H, C4-**H** Pirroilo); 3,78 (s, 4 H, Pirr-**CH<sub>2</sub>**-NH-); 2,61 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-); 1,50 (m, 4 H, -NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-) y 1,26 (m, 16 H, -NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 126,6$  (C5 Pirroilo, carbono cuaternario); 117,5 (CH, C2 Pirroilo); 107,9 (CH, C3 Pirroilo); 106,6 (CH, C4 Pirroilo); 49,1 (Fur-**CH<sub>2</sub>**-NH-); 46,4 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-); 30,0 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,5 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,1 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu = 3194$  (R-NH-R1); 1666 (C-NH-C); 1469(-CH<sub>2</sub>-); 1396 y 1134(=CH-NH-CH=)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_4$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) : 233,1760; encontrada :233,1758

### 77. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^4$ -bis((1H-pirrolo-2-il) metil )butan-1,4-diamina.

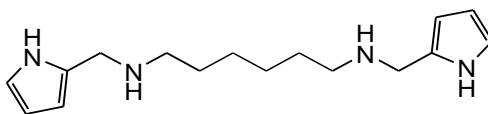


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4 propano diamina (55 mg; 0,62 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Pirraldehído (178 mg; 1,87 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (112 mg; 1,87 mmoles). Se obtuvo 23 mg de producto como un sólido marrón oscuro con un rendimiento del 15 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 6,72$  (m, 2H, C2-**H** Pirroilo); 6,12 (m, 2H, C3-**H** Pirroilo); 6,02 (m, 2H, C4-**H** Pirroilo); 3,78 (s, 4 H, Pirr-**CH<sub>2</sub>**-NH-); 2,61 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-); 1,50 (m, 4 H, -NH-**CH<sub>2</sub>**-**CH<sub>2</sub>**-) y 1,26 (m, 16 H, -NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 126,6$  (C5 Pirroilo, carbono cuaternario); 117,5 (CH, C2 Pirroilo); 107,9 (CH, C3 Pirroilo); 106,6 (CH, C4 Pirroilo); 49,1 (Fur-**CH<sub>2</sub>**-NH-); 46,4 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-); 30,0 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,5 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,1 (-NH-**CH<sub>2</sub>**-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu = 3194$  (R-NH-R1); 1666 (C-NH-C); 1469(-CH<sub>2</sub>-); 1396 y 1134(=CH-NH-CH=)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_4$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 247,1917; encontrada :247,1907

### 78. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>-bis((1H-pirrol-2-il) metil)hexan-1,6-diamina.

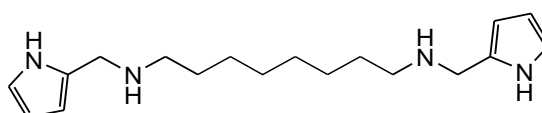


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexanodiamina (50 mg; 0,43 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó una Pirraldehido (122 mg; 1,29 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (77 mg; 1,29 mmoles). Se obtuvo 20 mg de producto como un sólido marrón oscuro con un rendimiento del 17 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 6,72 (m, 2H, C2-H Pirroilo); 6,12 (m, 2H, C3-H Pirroilo); 6,02 (m, 2H, C4-H Pirroilo); 3,77 (s, 4 H, Pirr-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,60 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,49 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,31 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 130,8 (C5 Pirroilo, carbono cuaternario); 117,3 (CH, C2 Pirroilo); 108,0 (CH, C3 Pirroilo); 106,4 (CH, C4 Pirroilo); 49,1(Pirr-CH<sub>2</sub>-NH-); 46,5(-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,5 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 27,9 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 26,7 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:** ν = 3194 (R-NH-R1); 1666 (C-NH-C); 1469(-CH<sub>2</sub>-); 1396 y 1134(=CH-NH-CH=) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>): 275,2230; encontrada : 275,2213

### 79. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis((1H-pirrol-2-il) metil)octan-1,8-diamina.



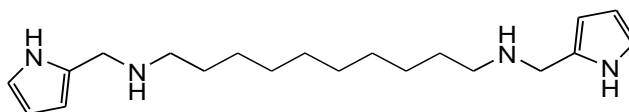
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octanodiamina (50 mg; 0,35 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Pirralaldehido (98 mg; 1,04 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (62 mg; 1,04 mmoles). Se obtuvo 17 mg de producto como un sólido marrón oscuro con un rendimiento del 16 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 6,73 (m, 2H, C2-H Pirroilo); 6,12 (m, 2H, C3-H Pirroilo); 6,03 (m, 2H, C4-H Pirroilo); 3,79 (s, 4 H, Pirr-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,61 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,49 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,26 (m, 16 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 126,6 (C5 Pirroilo, carbono cuaternario); 117,5 (CH, C2 Pirroilo); 107,9 (CH, C3 Pirroilo); 106,6 (CH, C4 Pirroilo); 49,1 (Pirr-CH<sub>2</sub>-NH-); 46,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,0 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,5 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,1 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:** ν = 3194 (R-NH-R1); 1666 (C-NH-C); 1469(-CH<sub>2</sub>-); 1396 y 1134(=CH-NH-CH=) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub> (M+Na<sup>+</sup>): 325,2362; encontrada : 325,2341

### 80. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis((1H-pirrolo-2-il)metil)decano-1,10-diamina.

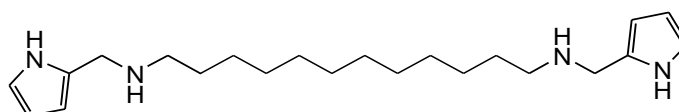


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decanodiamina (55 mg; 0,32 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Pirraldehido (91 mg; 0,96 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (57 mg; 0,96 mmoles). Se obtuvo 15 mg de producto como un sólido marrón - amarillento con un rendimiento del 14 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7,34 (d, J= 0.9 2H, C2-H Pirroilo); 6,29 (c, 2H, J=1.66 , C3-H Pirroilo); 6,15 (d, 2H, J=3,09 Hz, C4-H Pirroilo); 3,76 (s, 4 H, Pirr-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,59 (t, 4 H, J=7,2 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,50 (m, 4 H,-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,26 (m, 16 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 126,6 (C5 Pirroilo, carbono cuaternario); 117,5 (CH, C2 Pirroilo); 107,9 (CH, C3 Pirroilo); 106,6 (CH, C4 Pirroilo); 49,1 (Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 46,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,0 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,5 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,1 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:** ν = 3194 (R-NH-R1); 1666 (C-NH-C); 1469(-CH<sub>2</sub>-); 1396 y 1134(=CH-NH-CH=) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>): 331,2783

### 81. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis((1H-pirrolo-2-il)metil)dodecano-1,12-diamina.



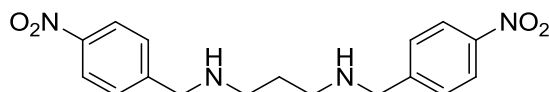
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecil-diamina (53 mg; 0,26 mmoles) en una mezcla de diclorometano: metanol (3:1) y se adicionó Pirraldehído (76 mg; 0,79 mmoles) y se lleva a volumen de 5 ml con la misma solución de diclorometano: metanol (3:1). Se agregan 10 mg de tamices moleculares 4Å.

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (47 mg; 0,79 mmoles). Se obtuvo 6 mg de producto como un sólido marrón-amarillento con un rendimiento del 6 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 6,72 (m, 2H, C2-HPirroilo); 6,12 (m, 2H, C3-HPirroilo); 6,02 (m, 2H, C4-HPirroilo); 3,78(s, 4 H, Pirr-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,61 (t, 4 H,  $J=7,2$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,50 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,26 (m, 20 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 126,6 (C5 Pirroilo, carbono cuaternario); 117,5 (CH, C2Pirroilo); 107,9 (CH, C3Pirroilo); 106,6 (CH, C4 Pirroilo); 49,1 (Fur-CH<sub>2</sub>-NH-); 46,4 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,0 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 29,5(-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27,1 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu$  = 3194 (R-NH-R1); 1666 (C-NH-C); 1469(-CH<sub>2</sub>-); 1396 y 1134(=CH-NH-CH=)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>): 359,3169; encontrada : 359,3169

## 82. Síntesis de N<sup>1</sup>, N<sup>3</sup>-bis(4-nitrobencil)propano-1,3-diamina.



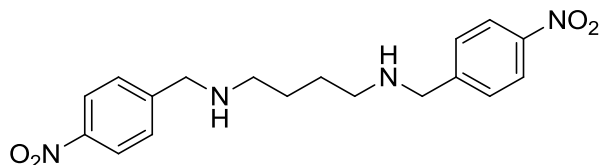
Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,3-propanodiamina (50 mg; 0,67 mmoles) en una solución de diclorometano: metanol (3:1) conteniendo 4-Nitro-Benzaldehído 98% (305 mg; 2,02 mmoles), llevándose a volumen con la misma mezcla de solventes (diclorometano: metanol (3:1)).

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (121 mg; 2,02 mmoles). Se obtuvo 28 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 12 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 8,17 (d, 4 H,  $J=8,6$ Hz, ArC3-H y ArC5-H protones aromáticos); 7,49 (d, 4 H,  $J=8,6$ Hz, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 3,89 (s, 4 H, NO<sub>2</sub>-Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,64 (t, 4 H,  $J=6,7$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,57 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 148.2 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 147.0 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128.6 (CH, C2 y C6 arilo); 123.6 (CH, C3 y C5 arilo); 53.2 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49.3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27.8 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:**  $\nu$  = 3336 (R-NH-R1); 2927,

1600(*para*-Aromático); 1519 y 1346 (R-NO<sub>2</sub>); 1454(-CH<sub>2</sub>-) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>):367,1362; encontrada 367,1376

### 83. -Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(4-nitroencil)butan-1,4-diamina.(83)

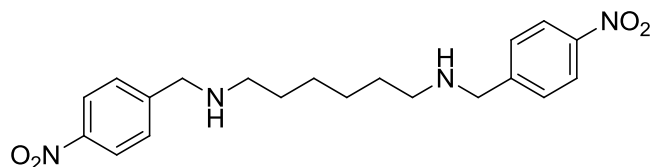


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,4-butanodiamina (54 mg; 0,60 mmoles) en una solución de diclorometano: metanol (3:1) conteniendo 4-Nitro-Benzaldehido 98% (275,6 mg; 1,82 mmoles), llevándose a volumen con la misma mezcla de solventes (diclorometano: metanol (3:1)).

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (109 mg; 1,82 mmoles). Se obtuvo 139 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 64 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 8,17 (d, 4 H, J=8,6Hz, ArC3-H y ArC5-H protones aromáticos); 7,49 (d, 4 H, J=8,6Hz, ArC2-H y ArC6-H protones aromáticos); 3,89 (s, 4 H, NO<sub>2</sub>-Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,64 (t, 4 H, J=6,7 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,57 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ = 148.2 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 147.0 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128.6(CH, C2 y C6 arilo); 123.6 (CH, C3 y C5 arilo); 53.2 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49.3 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 27.8 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). **IR:** ν = 3336 (R-NH-R1); 2927, 1600(*para*-Aromático); 1519 y 1346 (R-NO<sub>2</sub>); 1454(-CH<sub>2</sub>-) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M+Na<sup>+</sup>):359,1717; encontrada 359,1713

### 84. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>-bis(4-nitroencil)hexano-1,6-diamina.

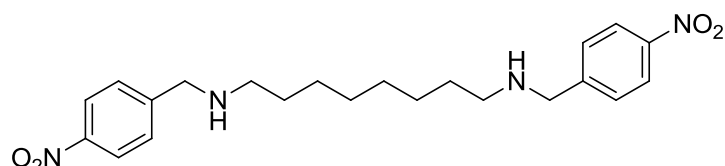


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,6-hexanodiamina (44 mg; 0,38 mmoles) en una solución de diclorometano: metanol (3:1) conteniendo 4-Nitro-Benzaldehido 98% (172 mg; 1,14 mmoles), llevándose a volumen con la misma mezcla de solventes (diclorometano: metanol (3:1)).

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (68 mg; 1,14 mmoles). Se obtuvo 113 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 77 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 8,17 (d, 4 H,  $J=8,6\text{Hz}$ ,  $\text{ArC3-H}$  y  $\text{ArC5-H}$  protones aromáticos); 7,49 (d, 4 H,  $J=8,6\text{Hz}$ ,  $\text{ArC2-H}$  y  $\text{ArC6-H}$  protones aromáticos); 3,89 (s, 4 H,  $\text{NO}_2\text{-Ar-CH}_2\text{-NH-}$ ); 2,64 (t, 4 H,  $J=6,7\text{ Hz}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ) y 1,57 (m, 4 H,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 148.2 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 147.0 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128.6 (CH, C2 y C6 arilo); 123.6 (CH, C3 y C5 arilo); 53.2 ( $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$ ); 49.3 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ) y 27.8 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ). **IR:**  $\nu$  = 3336 (R-NH-R1); 2927, 1600 (*para*-Aromático); 1519 y 1346 (R- $\text{NO}_2$ ); 1454( $\text{-CH}_2\text{-}$ )  $\text{cm}^{-1}$   
**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) :387,2032; encontrada 387,2026

### 85. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^8$ -bis(4-nitroencil)octano-1,8-diamina.

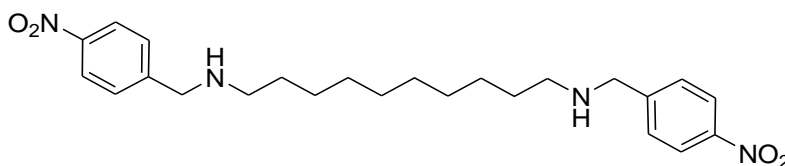


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,8-octanodiamina (61 mg; 0,42 mmoles) en una solución de diclorometano: metanol (3:1) conteniendo 4-Nitro-Benzaldehido 98% (192 mg; 1,26 mmoles), llevándose a volumen con la misma mezcla de solventes (diclorometano: metanol (3:1)).

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (76 mg; 1,26 mmoles). Se obtuvo 158 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 90 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 8,16 (d, 4 H,  $J=8,7\text{Hz}$ ,  $\text{ArC3-H}$  y  $\text{ArC5-H}$  protones aromáticos); 7,49 (d, 4 H,  $J=8,7\text{Hz}$ ,  $\text{ArC2-H}$  y  $\text{ArC6-H}$  protones aromáticos); 3,88 (s, 4 H,  $\text{NO}_2\text{-Ar-CH}_2\text{-NH-}$ ); 2,60 (t, 4 H,  $J=7,1\text{ Hz}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 1,49 (m, 4 H,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ) y 1,28 (m, 8 H,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{-)}_n$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 148,3 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 147,0 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128,6(CH, C2 y C6 arilo); 123,6 (CH, C3 y C5 arilo); 53,2 ( $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$ ); 49,5 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 30,1; 29,4 y 27,2 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{-)}_3$ ). **IR:**  $\nu$  = 3336 (R-NH-R1); 2927, 1600 (*para*-Aromático); 1519 y 1346 (R- $\text{NO}_2$ ); 1454( $\text{-CH}_2\text{-}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_4$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) : 415,2339; encontrada : 415,2338

### 86. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>-bis(4-nitrobenzil)decano-1,10-diamina.

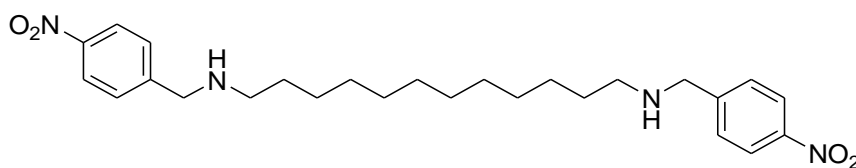


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,10-decanodiamina (62 mg; 0,36 mmoles) en una solución de diclorometano: metanol (3:1) conteniendo 4-Nitro-Benzaldehido 98% (163 mg; 1,07 mmoles), llevándose a volumen con la misma mezcla de solventes (diclorometano: metanol (3:1)).

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (65 mg; 1,07 mmoles). Se obtuvo 157 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 97 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 8,16 (d, 4 H,  $J=8,7$ Hz, ArC3–H y ArC5–H protones aromáticos); 7,49 (d, 4 H,  $J=8,7$ Hz, ArC2–H y ArC6–H protones aromáticos); 3,88 (s, 4 H, NO<sub>2</sub>-Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 2,60 (t, 4 H,  $J=7,1$  Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1,49 (m, 4 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) y 1,26 (m, 12 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 148,4 (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 147,0 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128,6 (CH, C2 y C6 arilo); 123,6 (CH, C3 y C5 arilo); 53,2 (Ar-CH<sub>2</sub>-NH-); 49,5 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 30,1; 29,5 y 27,3 (-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). **IR:**  $\nu$  = 3336 (R-NH-R1); 2927, 1600 (*para*-Aromático); 1519 y 1346 (R-NO<sub>2</sub>); 1454 (-CH<sub>2</sub>-) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) : 443,2652: encontrada : 443,2652

### 87. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-bis(4-nitrobenzil)dodecano-1,12-diamina.

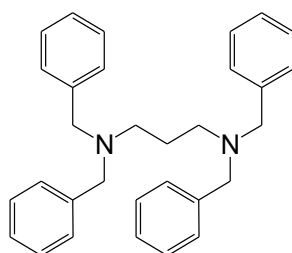


Se siguió el protocolo general de preparación de diaminas disustituidas. Se disolvió 1,12-dodecil-diamina (62 mg; 0,31 mmoles) en una solución de diclorometano: metanol (3:1) conteniendo 4-Nitro-Benzaldehido 98% (140 mg; 0,93 mmoles), llevándose a volumen con la misma mezcla de solventes (diclorometano: metanol (3:1)).

El crudo de la reacción se disolvió en diclorometano: metanol (1:1) y se agregó Borohidruro de sodio (56 mg; 0,93 mmoles). Se obtuvo 87 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 60 %.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 8,16$  (d, 4 H,  $J=8,7\text{Hz}$ ,  $\text{ArC3-H}$  y  $\text{ArC5-H}$  protones aromáticos); 7,49 (d, 4 H,  $J=8,7\text{Hz}$ ,  $\text{ArC2-H}$  y  $\text{ArC6-H}$  protones aromáticos); 3,88 (s, 4 H,  $\text{NO}_2\text{-Ar-CH}_2\text{-NH-}$ ); 2,60 (t, 4 H,  $J=7,1\text{ Hz}$ ,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 1,49 (m, 4 H,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ) y 1,28 (m, 8 H,  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{-)}_2$ ) . **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 148,3$  (C4 arilo, carbono cuaternario aromático); 147,0 (C1 arilo, carbono cuaternario aromático); 128,6 (CH, C2 y C6 arilo); 123,6 (CH, C3 y C5 arilo); 53,2 ( $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$ ); 49,5 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ); 30,1; 29,4 y 27,2 ( $\text{-NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{-)}_6$ ). **IR:**  $\nu = 3336$  ( $\text{R-NH-R1}$ ); 2927, 1600(*para*-Aromático); 1519 y 1346 ( $\text{R-NO}_2$ ); 1454( $\text{-CH}_2\text{-}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4$  ( $\text{M+H}^+$ ) : 471,2965.

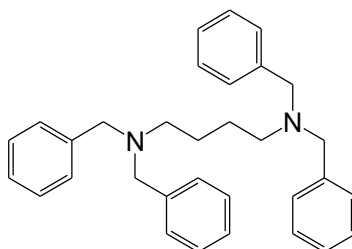
### 88. -Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^3, \text{N}^3$ -tetrabencil-propano-1,3-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. Se disolvió 1,3-propilendiamina (30 mg; 0,40 mmoles) en trimetilortoformiato (TMOF) (3 mL) y luego se agregaron benzaldehído (185  $\mu\text{L}$ ; 1,83 mmoles) y triacetoxiborhidruro de sodio (618 mg; 2,92 mmoles) y ácido acético (155  $\mu\text{L}$ ; 2,59 mmoles). Obteniéndose 29 mg de producto como un sólido aceitoso blanco con un rendimiento del 17%.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7,28$  ( m, 20 H, aromáticos); 3,51 (s, 8 H,  $\text{Ar-CH}_2$ ); 2,42 ( t, 4 H,  $J=6,9\text{ Hz}$ ,  $\text{N-CH}_2$  ); 1,73 (m, 2 H,  $\text{C2-H}$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 139,7$  (carbono aromático cuaternario); 128,9, 128,2, 126,8 (CH, carbonos aromáticos); 58,4 (  $\text{N-CH}_2\text{-Ar}$ ); 51,6 (  $\text{N-CH}_2$  ); 24,5 ( $\text{CH}_2$ , C2). **IR:**  $\nu = 3026$  ( $\text{Ar-H}$ ); 1127 ( $\text{C-N}$ ); 697 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_2$  ( $\text{M+H}^+$ ):435,2800, encontrada 435,2781.

### 89. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^4, \text{N}^4$ -tetrabencilbutano-1,4-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. Se disolvió 1,4-butilendiamina (30 mg; 0,34 mmoles) en trimetilortoformiato (3 mL), luego fue agregado

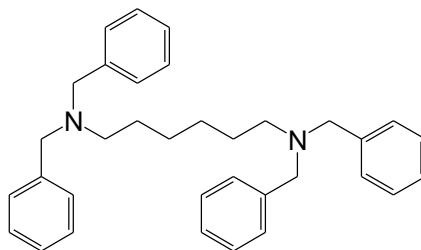
benzaldehído (155  $\mu\text{L}$ ; 1,53 mmoles) y finalmente el triacetoxiborhidruro de sodio (618 mg; 2,45 mmoles) y ácido acético (155  $\mu\text{L}$ ; 2,18 mmoles). Se aislaron 42 mg de producto como un sólido blanco cristalino con un rendimiento del 26%.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,31$  (m, 20 H, aromáticos); 3,50 (s, 8 H, Ar- $\text{CH}_2$ ); 2,35 (t, 4 H,  $J = 4,8$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ); 1,49 (m, 4 H, C2-H y C3-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 140,0$  (Carbono aromático cuaternario); 128,8, 128,2, 126,7 (CH, carbonos aromáticos); 58,3 (N- $\text{CH}_2$ -Ar); 53,4 (N- $\text{CH}_2$ ); 24,8 ( $\text{CH}_2$ , C2 y C3)

**IR:**  $\nu = 3028$  (Ar-H); 1123 (C-N); 693 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ .

**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 449,2957; encontrada 449,2964.

### 90. Síntesis de $\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^6, \text{N}^6$ -tetrabencilhexano-1,6-diamina

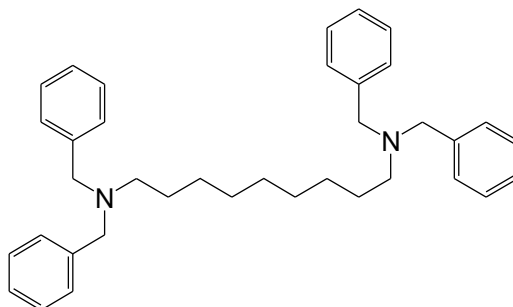


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. Se disolvió 1,6-hexilendiamina (30 mg; 0,26 mmoles) en TMOF (3 mL), luego fueron agregados benzaldehído (118  $\mu\text{L}$ ; 1,16 mmoles), triacetoxiborhidruro de sodio (393 mg; 1,86 mmoles) y ácido acético (99  $\mu\text{L}$ ; 1,65 mmoles). Obteniéndose 27, mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 17%.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,31$  (m, 20 H, aromáticos); 3,53 (s, 8 H, Ar- $\text{CH}_2$ ); 2,36 (t, 4 H,  $J = 6,9$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ); 1,45 (m, 4 H, C2-H y C5-H); 1,17 (m, 4 H, C3-H y C4-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 140,1$  (Carbono aromático cuaternario); 128,8, 128,1, 126,7 (CH, carbonos aromáticos); 58,3 (N- $\text{CH}_2$ -Ar); 53,4 (N- $\text{CH}_2$ ); 27,1 ( $\text{CH}_2$ , C2 y C5); 27,0 ( $\text{CH}_2$ , C3 y C4).

**IR:**  $\nu = 3026$  (Ar-H); 1120 (C-N); 698 (aromático monosustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 477,3270; encontrada 477,3273.

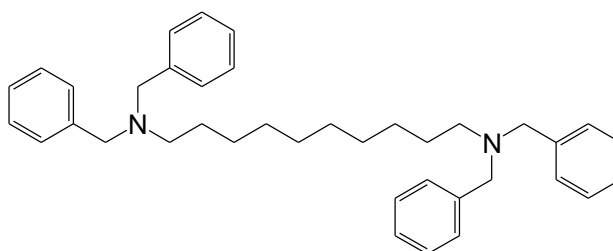
### 91. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>,N<sup>8</sup>-tetrabenciloctano-1,8-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. Se disolvió 1,8-octilendiamina (30 mg; 0,21 mmoles) en TMOF (3 mL), luego fueron agregados benzaldehído (95  $\mu$ L; 0,94 mmoles), triacetoxiborhidruro de sodio (317 mg; 1,49 mmoles) y ácido acético (79  $\mu$ L; 1,33 mmoles). Se obtuvieron 28,3 mg de producto como un sólido blanco cristalino con un rendimiento del 27%.

**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,32 (m, 20 H, aromáticos); 3,54 (s, 8 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,39 (t, 4 H, J= 6,9, N-CH<sub>2</sub>); 1,47 (m, 4 H, C2-H y C7-H); 1,22 (m, 8 H, C3-H al C6-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 140,1 (carbono aromático cuaternario); 128,8, 128,1, 126,7 (CH, carbonos aromáticos); 58,3 (N-CH<sub>2</sub>-Ar); 53,4 (N-CH<sub>2</sub>); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C2 y C7); 27,3 (CH<sub>2</sub>, C3 y C6); 27,0 (CH<sub>2</sub>, C4 y C6). **IR:**  $\nu$  = 3026 (Ar-H); 1126 (C-N); 697 (aromático monosustituido) cm<sup>-1</sup>.

### 92. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>,N<sup>10</sup>-tetrabencildecano-1,10-diamina.(92)

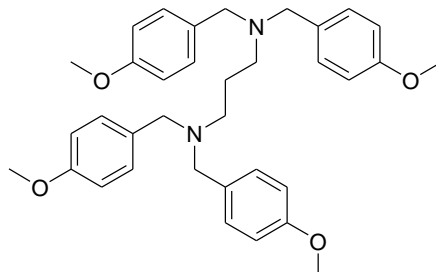


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. Se disolvió 1,10-decilendiamina (30 mg; 0,17 mmoles) en TMOF (3 mL), luego fue agregado benzaldehído (79  $\mu$ L; 0,78 mmoles), triacetoxiborhidruro de sodio (265 mg; 1,25 mmoles) y ácido acético (67  $\mu$ L; 1,11 mmoles). Se aislaron 26 mg de producto como un sólido blanco cristalino con un rendimiento del 28%.

**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,32 (m, 20 H, aromáticos); 3,54 (s, 8 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,39 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,48 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,17 (s, 12 H, del C3-H al C8-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 140,1 (Carbono aromático cuaternario); 128,8, 128,1 y 126,7 (CH, carbonos aromáticos), 58,3 (Ar-CH<sub>2</sub>); 53,4 (N-CH<sub>2</sub>); 29,6 (CH<sub>2</sub>, C2 y C-9); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C3 y C8); 27,3

(CH<sub>2</sub>,C4 y C7); 27,0 (CH<sub>2</sub>,C5 y C6) **EMAR:** masa calculada para C<sub>38</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>):533,3892; encontrada 533,3896.

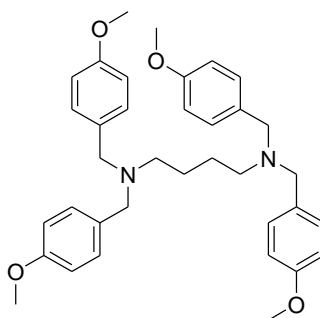
### 93. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>3</sup>--tetrakis(4-metoxibencil)propano-1,3-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. 1,3-propilendiamina (100 mg; 1,35 mmoles) fue disuelta en TMOF (3 mL), a esta solución se le agregó *p*-anisaldehído (780 µL; 6,48mmoles), triacetoxiborhidruro de sodio (2,28 mg, 10,80 mmoles) y ácido acético (583 µL; 9,7 mmoles). Se obtuvieron 19 mg de producto como un aceite amarillo pálido con un rendimiento del 30 %.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ= 7,16 (d, 8 H, J=8,7 Hz, aromáticos); 6,81(d, 8 H, J = 8,7 Hz, aromáticos); 3,79 (s, 12 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,40 (s, 8 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,36 (t, 4 H, J= 6,9 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,67 (m, 2 H, C2). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):** δ=158,5 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 132,0 (C, carbono aromático cuaternario); 130,0 y 113,5 (CH, carbonos aromáticos); 57,5 (Ar-CH<sub>2</sub>); 55,2 (OCH<sub>3</sub>); 51,3 (N-CH<sub>2</sub>); 24,5 (CH<sub>2</sub>, C2). **IR:** ν = 2997 (Ar-H); 1247 y 1034 (Ar-O-C); 1179 (C-N) cm<sup>-1</sup>. **EMAR:** masa calculada para C<sub>35</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 555,3223; encontrada 555,3235.

### 94. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-tetrakis(4-metoxibencil)butano-1,4-diamina.

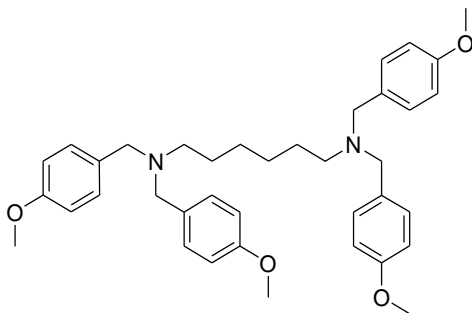


Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. 1,4-butilendiamina (30 mg; 0,34 mmoles) fue disuelta en diclorometano (5 mL), a esta solución se le agregó *p*-anisaldehído (185 µL; 1,5 mmoles), triacetoxiborhidruro de sodio (518 mg; 2,4

mmoles) y ácido acético (130  $\mu$ L; 2,2 mmoles). Se generaron 45 de producto como un sólido blanco cristalino, con un rendimiento del 25 %.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ = 7,22 (d, 8 H,  $J$ = 8,7 Hz, aromáticos); 6,83(d, 8 H,  $J$  = 8,7 Hz aromáticos); 3,79 (s, 12 H, -O-CH<sub>3</sub>); 3,42 (s, 8 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,31 (t, 4 H, N-CH<sub>2</sub>); 1,44 (m, 4 H, C2-H y C3-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ =158,5 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 132,1 (C, aromático cuaternario); 129,9 y 113,5 (CH, carbonos aromáticos); 57,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 55,3(CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 51,3 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 24,8 (CH<sub>2</sub>, C2 y C4 ). **IR:**  $\nu$  = 2998 (Ar-H); 1247 y 1037 (Ar-O-C); 1178 (C-N)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>36</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 569,3379; encontrada 569,3385.

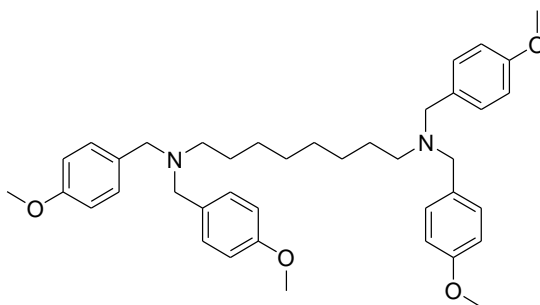
### 95. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-tetrakis(4-metoxibencil)hexano-1,6-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. 1,6-hexilendiamina (40 mg; 0,34 mmoles) fue disuelta en TMOF (3 mL), a esta solución se le agregó p-anisaldehído (223  $\mu$ L; 1,7 mmoles), triacetoxiborhidruro de sodio (583 mg; 2,8 mmoles) y ácido acético (148  $\mu$ L; 2,5 mmoles). Se generaron 20 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 10%.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ = 7,24 (d, 8 H,  $J$ =8,7 Hz, aromáticos); 6,83(d, 8 H,  $J$ = 8,7 Hz, aromáticos); 3,79 (s, 12 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,45 (s, 8 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,33 (t, 4 H,  $J$ = 7,2 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,46 (m, 4 H, C2-H y C5-H); 1,16 (m, 4 H, C3-H y C4-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ =158,4 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 132,0 (C, aromático cuaternario); 129,8 y 113,5 (CH, carbonos aromáticos); 57,3 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>-); 55,2(CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 51,1 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 27,2 (CH<sub>2</sub>, C2 y C5); 27,0 (CH<sub>2</sub>, C3 y C4). **IR:**  $\nu$  = 3032 (Ar-H); 1247 y 1036 (Ar-O-C); 1170 (C-N)  $\text{cm}^{-1}$ . **EMAR:** masa calculada para C<sub>38</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 597,3692; encontrada 597,3718.

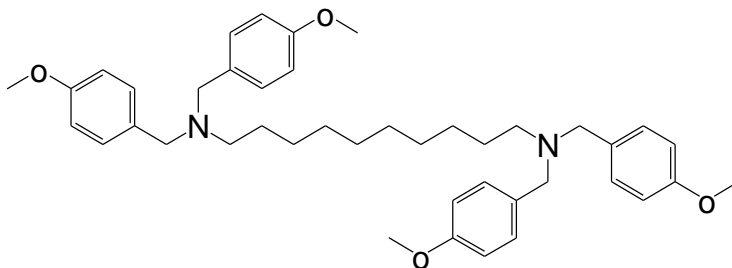
### 96. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>,N<sup>8</sup>-tetrakis(4-metoxibencil)octano-1,8-diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. 1,8-octilendiamina (30 mg; 0,21 mmoles) fue disuelta en TMOF (3 mL), a esta solución se le agregó p-anisaldehído (113  $\mu$ L; 0,9 mmoles), triacetoxiborhidruro de sodio (317 mg; 1,5 mmoles) y ácido acético (79  $\mu$ L; 1,3 mmoles). Se obtuvieron 20 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 16%.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ = 7,25 (d, 8 H, J= 8,7 Hz, aromáticos); 6,84 (d, 8 H, J = 8,7 Hz, aromáticos); 3,79 (s, 12 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,46 (s, 8 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,37 (t, 4 H, J= 7,2 Hz, N-CH<sub>2</sub>); 1,46 (m, 4 H, C2-H y C7-H); 1,16 (s, 8 H, C3-H al C6-H). **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ =158,4 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 132,1 (C aromático cuaternario); 129,9 y 113,5 (CH, carbonos aromáticos); 57,4 (Ar-CH<sub>2</sub>); 55,2 (CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 53,1 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,6 (CH<sub>2</sub>, C2 y C7); 27,3 (CH<sub>2</sub>, C3 y C6); 27,3 (CH<sub>2</sub>, C4 y C5). **EMAR:** masa calculada para C<sub>40</sub>H<sub>53</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 625,4005; encontrada 625,4036.

### 97. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>10</sup>,N<sup>10</sup>-tetrakis(4-metoxibencil)decano-1,10 diamina.



Se siguió el procedimiento general de preparación de diaminas tetrasustituidas. 1,10-decilendiamina (30 mg; 0,2 mmoles) fue disuelta en TMOF (3 mL), a esta solución se le agregó p-anisaldehído (95  $\mu$ L; 0,78 mmoles), triacetoxiborhidruro de sodio (266 mg; 1,3 mmoles) y ácido acético (67  $\mu$ L; 1,1 mmoles). Obteniéndose 20 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 28%.

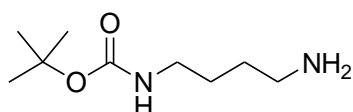
**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ = 7,25 (d, 8 H, J= 8,7 Hz, aromáticos); 6,84 (d, 8 H, J = 8,7 Hz, aromáticos); 3,79 (s, 12 H, O-CH<sub>3</sub>); 3,46 (s, 8 H, Ar-CH<sub>2</sub>); 2,36 (t, 4 H, J= 7,5 Hz, N-CH<sub>2</sub>

);1,47 (m, 4 H, C2-H y C9-H); 1,18 (s, 12 H, CH<sub>2</sub> C3-H al C8-H).**RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ=158,4 (C-OMe, carbono aromático cuaternario); 132,0 (C aromático cuaternario); 129,9 y 113,5 (CH, carbonos aromáticos); 57,4 (CH<sub>2</sub>, Ar-CH<sub>2</sub>); 55,24(CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>); 53,0 (CH<sub>2</sub>, N-CH<sub>2</sub>); 29,8 (CH<sub>2</sub>, C2 y C9); 29,5 (CH<sub>2</sub>, C3 y C8); 27,3 (CH<sub>2</sub>, C4y C6); 26,9 (CH<sub>2</sub>, C5).

**EMAR:** masa calculada para C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M+H<sup>+</sup>) 653,4318; encontrada 653,4340.

### Síntesis de análogos de NBD.

#### 98. Síntesis de tert-butil 4-aminobutilcarbamato.



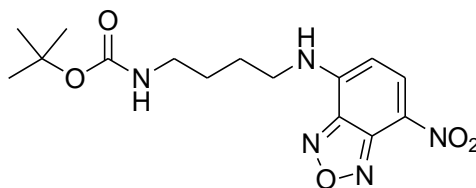
A una solución de diamina, 1,4 butilendiamina (500mg; 5,67 mmoles) en etanol anhidro se le adiciona TEA hasta llegar al 5%, se le agregan (618,9 mg; 2,84mmoles) de Di-Tert-Butil dicarbamato en relación (2:1). Se mantiene la reacción a reflujo con condensador durante 18hrs. Luego la reacción se enfría a temperatura ambiente. Se concentra utilizando el rotavapor. Se agrega agua y se ajusta el pH a 3, mediante la adición de HCl 2M, se realiza la extracción con diclorometano al menos 3 veces. Luego se ajusta nuevamente la fase acuosa con NaOH 2M, hasta pH=12, y se realizan nuevamente tres extracciones con diclorometano. Se combinan las dos fases orgánicas y se las seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se lo filtra y se concentran con el rotavapor, obteniéndose un polvo blanco.

Obteniéndose 518,9 mg de producto como un sólido blanco con un rendimiento del 97%.

**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ= 3,09(m, 2H); 2,67(t,2H, J=6,9); 1,44(m, 13H)

**EMAR:** masa calculada para C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) 189,1597; encontrada: 189,1593

#### 99. Síntesis de tert-butil 4-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-ilamino)butilcarbamato.



### Protocolo 1.

Al producto de la reacción 99, se pesan 59 mg (0,31 mmoles) y se disuelve en THF anhidro al cual se le adicionan TEA 50  $\mu$ L para 2 ml de mezcla de reacción, se le agregan (63 mg; 0.32 mmoles) de 4-Cloro-7-nitrobenzofurazan. La mezcla se deja reaccionando durante 18 hrs.

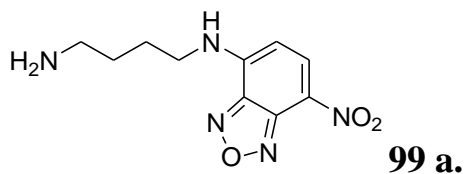
### Protocolo 2.

Al producto de reacción 99 se pesa 200 mg (1,06 mmoles) se disuelve en una mezcla Acetonitrilo: Agua (1: 1) al cual se agrega  $K_2CO_3$  y luego se adiciona 4-Cloro-7-nitrobenzofurazan (318 mg; 1,60 mmoles).

Procedimiento común de extracción y purificación.

Se agregan HCl 4N y agua se neutraliza la reacción con  $NaHCO_3$ , y se lleva a un pH de aproximadamente 9.0. Se extrae cuatro veces con DCM y se seca la fase orgánica con  $SO_4Na_2$  anhidro. Se evapora el solvente para obtener un sólido marrón amarillento. Se realiza una columna empacada en DCM y se utilizan dos lavados de elución con DCM y luego sucesivos agregados de DCM:MeOH 9:1. Para finalizar con 2 eluciones con la mezcla DCM:MeOH: $NH_4OH$  (8:1.8:0.2). Se corren TLC con la misma fase móvil. Se realizan espectros de  $^1H$ RMN y  $^{13}C$ RMN.

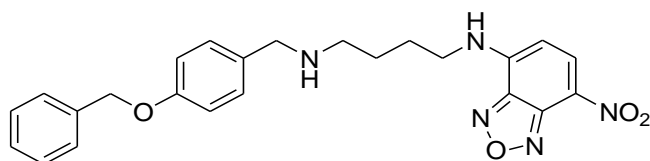
Se obtuvo un sólido marrón que para el caso del protocolo 1 el peso obtenido resulto de 50,9 mg (46% de rendimiento) y para el protocolo 2 se obtuvieron unos 85,3 mg (26% de rendimiento). En ambos procedimientos el producto por estos procedimientos resulta el compuesto (**99 a**)



**RMN de  $^1H$**  ( $D_2O$ ):  $\delta$ = 8,50 (d, 1 H, J= Hz, **CH-C-NO<sub>2</sub>**); 6,36 (d, 1 H, J = 8,7 Hz, **CH-C-NH**); 3,65 (s, 2H, **CH<sub>2</sub>-NH-NBD**); 3,35 (t, 2H, **CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**); 2,98 (t, 2 H, J= 7,5 Hz, **-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-NBD**); 1,22 (t, 2 H, **-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**)

**EMAR:** calculada 351.1542

### 100. Síntesis de N-(4-(4-(benciloxi) bencilamino)butil)-7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-amina.(100)



Se disuelven 47 mg (0,14 mmoles) del compuesto 100, en TMOF (5 ml) se le agrega en primer término TEA anhidra 56  $\mu$ L(0,39mmoles), luego se incorpora a la mezcla de reacción 4-Benciloxi-Benzaldehído (90 mg; 0,40 mmoles). Se deja la reacción a reflujo a 80°C durante 18 hrs. Se lleva la reacción a temperatura ambiente y sobre la mezcla de reacción se adicionaron 112,0 mg (0,53mmoles) de Tri-acetoxi Borohidruro de Sodio. Se deja reaccionar otras 12 hrs a temp ambiente.

Luego se agrega a la mezcla una solución saturada de ClNa, y se realizan varios lavados con DCM.

A la fase orgánica se la seca con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro y se evapora el solvente con el rotavapor. Se obtiene un material amarillento marrón. Se realiza una columna para obtener el producto puro, se realiza una elución con Hexano al 100% y luego se pasa gradualmente a Acetato de Etilo al 100%, las eluciones finales en donde aparece el compuesto, se realizan en una mezcla de Acetato de etilo: MeOH:  $\text{NH}_4\text{OH}$  (70:25:5). Se obtiene un 12,2 mg (20%de rendimiento), como un sólido marrón amarillento.

**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ = 8,50 (d, 1 H, J= Hz,  $\text{CH-C-NO}_2$ ); 6,36 (d, 1 H, J = 8,7 Hz,  $\text{CH-C-NH}$ ); 3,65 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH-NBD}$ ); 3,35 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ); 2,98 (t, 2 H, J= 7,5 Hz,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-NBD}$ ); 1,22 (t, 2 H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ )

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ = 190,8 (C19-O); 172,3(C6-NH); 132,0 (C26- $\text{CH}_2$ ); 128,7; 128,3; 128,9; 127,9; 127,5; 115,1; 114,9; 114,5 (CH-aromáticos); 70,3(C- $\text{CH}_2\text{-O}$ ); 65,1(C- $\text{CH}_2\text{-NH}$ ); 46,4(NH- $\text{CH}_2$ ); 29,7; (CH2-CH2-CH2); 29,4(CH2-CH2-NH)

**EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_4$  (M+H<sup>+</sup>): 447,1906 ; encontrada:

## **Ensayos de determinación de Actividad antitripanocida.**

### **Determinación de IC<sub>50</sub> para cepas de *T. brucei*.**

Se utilizó para los análisis los tripomastigotes de la cepa de *T. brucei* (MITat 427; clona 221a) su forma sanguínea (BSF) que creció a 37°C bajo atmósfera a 5% CO<sub>2</sub> en medio Iscove modificado como se describe previamente<sup>168</sup>

Los tripomastigotes *T. brucei* BSF fueron sembrados en 200 µl de medio de cultivo con un recuento de  $1 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ , este medio contiene diferentes concentraciones de diaminas. Luego de la incubación a 37°C por 3 días, se agrega 20 µl Alamar blue (Biosource UK Ltd) en cada celda y las cubetas son incubadas por 16 hrs. La fluorescencia de cada pocillo es determinada como se describe abajo y luego se establece el valor de IC<sub>50</sub>.

### **Determinación de IC<sub>50</sub> para cepas de *T. cruzi* (cepa CI-Brener).**

Los epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CI-Brener) fueron crecidos en medio RPMI-1640 conteniendo suplemento como se describe en<sup>169</sup>

Los epimastigotes de *T. cruzi* fueron sembrados con un recuento de  $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  en 200 µl de medio de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de diaminas. Se incubó durante 72 hrs a 27°C. Luego se agregan 20 µl Alamar blue (Biosource UK Ltd) en cada celda. Se monitorea la fluorescencia utilizando un lector de placas Gemini Fluorescent Plate reader (Molecular Devices) a una longitud de onda de excitación a 530 nm, y una longitud de emisión de 585 nm y un filtro de cut off a 550 nm., estableciendo el IC<sub>50</sub>. El resultado del cambio de color debido a la reducción del Alamar blue es proporcional al número de células vivas.

## **Ensayos in vitro antimalaricos y antileishmania.**

Las mediciones de actividades fueron realizadas en el National Center for Natural Products Research de la Universidad de Mississippi, en Estados Unidos de América.

La actividad leishmanicida fue determinada in vitro en un cultivo de promastigotes de *Leishmania donovani*. Los compuestos, apropiadamente diluidos, fueron agregados a microplacas de 96 pocillos que contenían los cultivos de promastigotes de *Leishmania* ( $2 \times 10^6$  células/mL). Las placas fueron incubadas a 26°C durante 72 horas, y se determinó el crecimiento de promastigotes de *Leishmania donovani* por el ensayo Alamar Azul. Se

utilizaron pentamidina y anfotericina B como drogas estandar antileishmania. Para cada compuesto se computo un valor de IC<sub>50</sub> a partir de la curva de inhibición de crecimiento.

La actividad antimalárica de los compuestos fue determinada in vitro en dos cepas de *Plasmodium falciparum*, una sensible a cloroquina (D6, Sierra Leona) y otra resistente (W2, IndoChina). El ensayo de microplacas de 96 pocillos se basa en evaluar los efectos de los extractos en el crecimiento de cultivos asincrónicos de *P. falciparum*, determinado por el ensayo de actividad de la lactato deshidrogenasa (pLDH).

Se prepararon las diluciones apropiadas en DMSO y se agregaron a los cultivos de *P. falciparum* (2% hematocritos, 2% parasitemia) montados en microplacas de 96 pocillos de fondo plano. Los platos fueron colocados en una cámara humidificada y venteada con una mezcla de gases 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>. Los cultivos fueron incubados a 37 °C por 48 horas. El crecimiento de los parásitos en cada pocillo se determinó por el ensayo pLDH usando el reactivo de Malstat®. Las placas poseen además, en pocillos separados, el medio de cultivo y glóbulos rojos como controles adicionales. Los agentes antimaláricos estándar, cloroquina y artemisina, se usaron como controles positivos mientras que se usa DMSO como control negativo.

#### **Ensayo de determinación de porcentaje de crecimiento de *Toxoplasma gondii*.**

Los ensayos fueron realizados por el Dr. Gustavo Gustavo Arrizabalaga. En la Universidad de Indiana, Estados Unidos de América.

Procedimiento.

Se infectaron fibroblastos con 100 parásitos en placas de 96 pocillos. Los parásitos expresan GFP y β-gal para monitorear el crecimiento. El medio utilizado es RPMI.

Se los deja crecer por 24 horas. Se añaden los compuestos a dos concentraciones y por duplicado a 1 μM. y a 10 μM.

Se realiza el recuento previo y posterior al agregado, de los compuestos se incuban por otras 24 hrs más.

El ensayo se realiza por duplicado y en experimentos independientes se realizar el recuento de formas parasitarias intracelulares. Para lo candidatos con mejor desempeño en el ensayo exploratorio, se determinó si IC<sub>50</sub>. Siguiendo el mismo procedimiento usando diluciones de los compuestos en DMSO, para obtener una curva dosis-respuesta en concentración decreciente. Se utiliza como control de crecimiento, por placa se realiza el mismo procedimiento pero solo agregando DMSO. No se realizan controles positivos por no ser

específicos contra *Tg* y ser este un ensayo evaluativo del porcentaje de inhibición contra el número de parásitos en crecimiento libre.

Resultados se observan en el microscopio de fluorescencia y se realiza un recuento utilizando GFP para observar los parásitos intracelulares.

En las tablas se interpretan los siguientes valores.

C: Citotóxico a nivel del fibroblasto.

-: No crece parásito. Compuesto antitoxoplasma a una dada concentración.

+: pequeña cantidad de parásitos.

++ Crecimiento del parásito menor que el control.

+++ crecimiento normal.

### **Ensayo de concentración de Tripanocida Mínima.**

Ensayos realizados durante mi estadía en la Universidad de San Francisco California (UCSF) en el Instituto . A cargo de la Dra. Patricia Doyle, el Dr Juan Engel y el Dr. Jut Giri.

### **Procedimiento general.**

1- Se cultivan macrófagos J774 (en nuestro caso se utilizaron células derivadas de músculo esquelético embrionario bovino (Bovine embryo skeletal muscle (BESM))) en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de Suero Fetal bovino calentado.

2- Para este ensayo los macrófagos son previamente irradiados (15 min a aproximadamente 1000 rad) para arrestar el crecimiento celular. O se utiliza la línea de células de miocitos de manera tal que se obtiene un recuento celular de ( $10^5$ /ml) que son cultivados toda la noche en placas de 12, 24, o 48 pocillos según la necesidad del ensayo. En nuestro caso se utilizaron placas de 24 con el objetivo de tener por duplicado el ensayo. El cultivo se realiza a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

3- Se preparan las soluciones stocks de inhibidores a 10 mM in DMSO y son diluidas en el medio de cultivo RPMI+5% SFB antes de realizar la prueba de manera que se realiza la siguiente dilución (10 ml RPMI+10µl de solución 10 mM stock). Tanto la solución Stocks como las diluciones son almacenadas a 4°C durante el experimento. Por otro lado la solución en DMSO stocks es almacenada a -20°C.

4- Todos los ensayos incluyen como controles al posaconazol (100 nM), Células infectadas no tratadas y no infectadas (n=3 por placa) por tratamiento. En nuestro caso además agregamos un control con Benznidazol (1mM)

5- Los Tripomastigotes de *T.cruzi* cepa Y son mantenidos mediante pasajes semanales en cultivos de células de músculo esquelético embrionario bovino. Los cultivos son mantenidos en RPMI+5% con suero de caballo inactivado por calor, a 37°C en incubador con 5 % CO<sub>2</sub>. El ciclo de vida de esta cepa es de 6 a 7 días bajo estas condiciones. Al ser liberados los tripomastigotes son recolectados del sobrenadante y usados para infectar los macrófagos o los miocardiocitos.

6- Una vez obtenidos los tripomastigotes y el cultivo celular por separado se realizan las diluciones correspondientes de manera de obtener una tasa de infección 1 a 1 respecto a la cantidad de células en el cultivo en cada pocillo. Aproximadamente este número no debe exceder (10<sup>5</sup> tripomastigotes/ml). Una vez colocados en cada pocillo, se incuban durante 2 h a 37°C, luego el medio es reemplazado y se realizan al menos tres lavados con medio sin inhibidor. Ocurrido esto, se agrega el medio RPMI con la solución de inhibidor a 10 µM.

7- Se realiza cada 48 hrs un cambio por medio fresco con el inhibidor y los controles. Este tratamiento se realiza durante dos semanas. Esto puede extenderse por un periodo de 27 días. En nuestro caso se realizaron los cambios de medio durante 12 días y luego solo se cambia cada 48 hrs el medio RPMI suplementado sin inhibidor hasta llegar a los 27 días.

8- la eficacia de los compuestos es evaluada de acuerdo a la sobrevivencia de los macrófagos infectados con *T.cruzi*, siendo 40 días el tiempo total del experimento.

9- Lectura: cada 48 hrs se debe observar el cultivo en microscopio de fase. La aparición de tripomastigotes en el medio indica que se completó el ciclo intracelular por lo que queda descartado el pocillo

10- Evaluación de la Eficacia.

**Baja eficacia:** el compuesto no es efectivo, si se observan tripomastigotes en el sobrenadante antes del día 6 post infección, de igual manera de lo que ocurre con los controles sin tratar.

**Compuestos tripanostáticos.:** Algunos de los compuestos solo pueden causar un retraso en el desarrollo intracelular del ciclo de *T.cruzi* (o *Leishmania spp*) esto, puede incluso mantenerse luego de la quita de la presión del inhibidor, al cambiar por medio fresco para el mantenimiento del cultivo.

**Compuestos tripanocidas:** De forma similar a lo que ocurre con el pozaconazol se debe observar que el compuesto cura a los macrófagos infectados y no se observan tripomastigotes en el sobrenadante y tampoco se observan amastigote dentro de las células.

11- Los medios de cultivos sobrantes y las policubetas son desinfectadas, y luego descartadas.

## **Ensayo de concentración inhibitoria máxima media de amastigotes (IC<sub>50</sub>) de *T.cruzi* y *Leishmania donovani* y ensayo de tamizaje de inhibición a una concentración.**

Ensayos realizados en la Universidad de San Francisco California (UCSF) en el Instituto .. A cargo de la Dra. Patricia Doyle, Dr Juan Engel, Dr. Jut Giri. Dr Jair Lage, Dra Geraldine De Muylder .

### **Procedimiento general.**

1- Se cultivan macrófagos *J774* (para IC<sub>50</sub> de amastigotes de *Leishmania donovani*) o miocardiocitos (caso *T.cruzi*) en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de Suero Fetal bovino calentado.

2- Para este ensayo los macrófagos son previamente irradiados (15 min a aproximadamente 1000 rad) para arrestar el crecimiento celular. O se utiliza la línea de células de miocitos de manera tal que se obtiene un recuento celular de (10<sup>5</sup>/ml) que son cultivados toda la noche en placas de 394 del ensayo, estas placas son selladas e introducidas en la incubadora. El cultivo se realiza a 37 °C en atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

4- Los Tripomastigotes de *T.cruzi* cepa Y son mantenidos mediante pasajes semanales en cultivos de células de musculo esquelético embrionario bovino. Los cultivos son mantenidos en RPMI+5% con suero de caballo inactivado por calor, a 37°C en incubador con 5 % CO<sub>2</sub>. El ciclo de vida de esta cepa es de 6 a 7 días bajo estas condiciones. Al ser liberados los tripomastigotes son recolectados del sobrenadante y usados para infectar los macrófagos o los miocardiocitos.

5- Se infectan las células de cada pocillo y luego se sellan las placas. De manera de obtener una tasa de infección 1 a 1 respecto a la cantidad de células en el cultivo en cada pocillo Aproximadamente este número no debe exceder (10<sup>5</sup> tripomastigotes/ml).

6- Se preparan las soluciones stocks de inhibidores a 10 mM in DMSO y son diluidas en el medio de cultivo RPMI+5% SFB antes de realizar la prueba de manera que se realiza la siguiente dilución (10 ml RPMI+10µl de solución 10 mM stock). Tanto la solución Stocks como las diluciones son almacenadas a 4°C durante el experimento. Por otro lado la solución en DMSO stocks es almacenada a -20°C.

7- Todos los ensayos incluyen como controles al posaconazol (100 nM), células infectadas no tratadas y no infectadas (n=3 por placa) por tratamiento. En nuestro caso además agregamos un control con Benznidazol (1mM)

8- Una vez obtenidos los tripomastigotes y el cultivo celular se procede mediante inyección a la incorporación por cada pocillo del medio más el inhibidor preparado en el paso 6. En el caso de ser un ensayo a una concentración fija, se programa al robot realizar solo una dilución

a una concentración preestablecida. En el caso de querer obtener un valor de IC<sub>50</sub> se realizan las diluciones correspondientes. Una vez colocados en cada pocillo, se incuban durante 48 h a 37°C, luego el medio es reemplazado y se realizan al menos tres lavados con medio sin inhibidor.

Luego de la incubación, se lavan las células con PBS y son fijados durante 30 min con formaldehído al 4%. Nuevamente son lavados y teñidos durante 2 hrs con diamidino-2-fenilindol (DAPI 300nM) y finalmente son lavados nuevamente con PBS.

Las imágenes son obtenidas a partir del microscopio automatizado con epifluorescencia INCell Analyzer que detecta utilizando para la excitación y emisión los filtros de (350+/-50nm y 460+/-40nm) para poder detectar al DAPI. Utilizando un objetivo 20X. El microscopio provee de un programa el Developer Toolbox 1.7 para análisis de imágenes a través del cual se programa el recuento de manera que identifica el núcleo celular (mayor a 250µm<sup>2</sup>) y excluyendo los kinetoplastidos que poseen un área de emisión de fluorescencia de 1 µm<sup>2</sup>.

Se realiza el recuento en un área de entre 700 y 2000 µm<sup>2</sup> de manera que queda delimitado el borde celular. Se excluyen parásitos extracelulares y falsas tinciones como falsos positivos. El porcentaje de inhibición del crecimiento es calculado mediante la siguiente fórmula

$$[1-(P/hc_x - P/hc^+) / (P/hc_2 - P/hc^+)] * 100$$

Donde P/hc<sub>x</sub>: recuento de parásitos

P/hc<sup>+</sup>: recuento células en cada celda (control positivo (Benznidazol, pozaconazol.)

P/hc<sub>2</sub> : Recuento sobre el control negativo.

### **Ensayo de determinación de la concentración inhibitoria máxima media de amastigotes de *Leishmania donovani*. (Adaptado para obtener tamizaje a una concentración fija)**

Se cultivan, en placas de 96 pocillos de paredes negras y fondo claro (Grenier Bio-One), las células de macrófagos-monocitos THP-1, (5500 cel/ml) estas deben encontrarse en fase exponencial de crecimiento, dejándose a 37C por 48 hrs de maduración y formación de monocapa adherente, luego de la activación con 0.1 mM de Acetato forbol/Miristato (PMA, del inglés phorbol myristate Acetate). Una vez lograda la monocapa adherente las células son lavadas y luego se le agrega RPMI conteniendo promastigotes de *Leishmania donovani* en fase I, en una relación 1:15 respecto de las células. Luego se incuban por 4 hrs a 37C y en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Los promastigotes no internalizados son removidos por lavados conteniendo RPMI +5% FBS+5% suero de caballo calentado

Luego son agregados, mediante el uso del robot Biomek FXp liquid handler (Beckman Coulter), los compuestos previamente diluidos en DMSO, en nuestro experimento se realizaron dos esquemas el primero utilizando para todas la biblioteca una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  (en la dilución final en el pocillo la concentración final de DMSO debe ser menor o igual a 10%). En otro esquema para determinados compuestos fueron evaluados a distintas concentraciones por diluciones sucesivas. Del mismo modo se agregan los controles positivos (Anfotericina B 2mM) o negativos (1% DMSO).

Para el caso de la obtención del  $\text{IC}_{50}$  se requiere de la dilución sucesiva desde una concentración de 50 mM a 0.02 mM (conservando la proporción de 1 % de DMSO) por triplicado. En nuestro caso se utilizó para una misma concentración los experimentos fueron realizados por duplicado.

Son incubados durante 72 hrs a 37 C.

Luego de la incubación, se lavan las células con PBS y son fijados durante 30 min con formaldehído al 4%. Nuevamente son lavados y teñidos durante 2 hrs con diamidino-2-fenilindol (DAPI 300nM) y finalmente son lavados nuevamente con PBS.

Las imágenes son obtenidas a partir del microscopio automatizado con epifluorescencia INCell Analyzer que detecta utilizando para la excitación y emisión los filtros de (350+/-50nm y 460+/-40nm) para poder detectar al DAPI. Utilizando un objetivo 20X. El microscopio provee de un programa el Developer Toolbox 1.7 para análisis de imágenes a través del cual se programa el recuento de manera que identifica el núcleo celular (mayor a 250 $\mu\text{m}^2$ ) y excluyendo los kinetoplastidos que poseen un área de emisión de fluorescencia de 1  $\mu\text{m}^2$ .

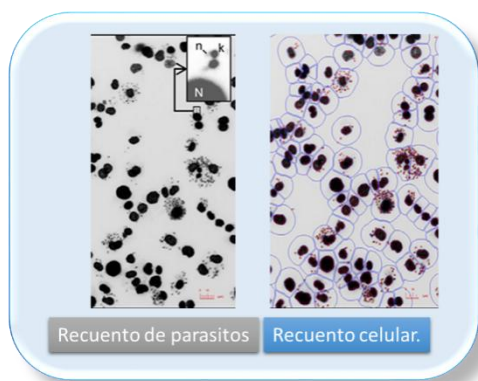
Se realiza el recuento en un área de entre 700 y 2000  $\mu\text{m}^2$  de manera que queda delimitado el borde celular. Se excluyen parásitos extracelulares y falsas tinciones como falsos positivos. El porcentaje de inhibición del crecimiento es calculado mediante la siguiente formula

$$[1-(P/hc_x - P/hc^+) / (P/hc_2 - P/hc^+)] * 100$$

Donde  $P/hc_x$ : recuento de parásitos

$P/hc^+$ : recuento células en cada celda (control positivo (anfotericina B))

$P/hc_2$  : Recuento sobre el control negativo.–



### **Determinación de la citotoxicidad en células VERO.**

La citotoxicidad es determinada en el mismo momento en el laboratorio de la Universidad de Misisipi. El procedimiento se realiza a una única concentración 4,76  $\mu\text{g/ml}$ . Para lo cual se incuban previamente las células VERO, en los pocillos de las placas hasta lograr monocapa, luego se le agregan los 4,76  $\mu\text{g/ml}$  y se los incuban por 24 hrs. La actividad se realiza mediante la determinación de LDH (método descrito previamente).

### **Evaluación enzimática de la enzima Tripanotión Sintetasa (TryS).**

Se realizaron los ensayos por dos metodologías diferentes con el objetivo de ensayar las enzimas inicialmente y realizar la confirmación por técnicas distintas.

#### **Ensayo de actividad por punto Final para las TryS.(verde de malaquita)**

El ensayo de punto final se basa en la determinación de fosfato inorgánico, liberado durante la catálisis del ATP por parte de la TryS. Este fosfato se acompleja con el colorante catiónico trifenilmetanol (verde de malaquita)/fosfomolibdato (BIOMOL GREEN<sup>TM</sup> reactivo) lectura a 650nm. El ensayo fue realizado a temperatura ambiente y la lectura de las placas de 96 celdas fue realizada en un lector MultiScan EX. El buffer de reacción (MM) consiste en 100mM HEPES-K pH 7.4, EDTA, MgSO<sub>4</sub> DTT. Se fijó a Espermidina (SP) a 2 mM para todas las enzimas y una concentración de glutatión (GSH) ajustada a 570 $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , y 50 $\mu\text{M}$  para TcTryS, LiTryS y TbTryS, respectivamente. Siendo ajustada la concentración de ATP a 150 $\mu\text{M}$ , para evitar interferencias. Cada compuesto fue disuelto previamente en DMSO (J.T. Baker) y se utilizó el siguiente esquema de dilución en pocillo: Vol. Total del reacción: 50  $\mu\text{L}$ : 40  $\mu\text{L}$  de MM, 5  $\mu\text{L}$  del compuesto disuelto en DMSO y 5 $\mu\text{L}$  de la solución de las enzimas. Los controles fueron preparados por agregado de 5  $\mu\text{L}$  DMSO y el de inhibición positivo por el agregado de 5 $\mu\text{L}$  la sol (30  $\mu\text{M}$  compuesto Mol2008, 350nM compuesto

FS554 y 2.82mM GSH para *TbTryS*, *LiTryS* y *TcTryS*, respectivamente). Los blancos de enzimas, controles y compuestos fueron testeados por cuadruplicado. Los resultados fueron expresados en porcentajes de actividad (PA)  $\pm 2s^{n-1}$ . Los valores de IC<sub>50</sub> fueron obtenidos a partir de curvas dosis respuesta, ajustada a la ecuación Boltzmann sigmoideal (errores calculados usando errores de propagación) o extrapolados desde una curva de ajuste no lineal.

#### **Ensayo Cinético de actividad de las TryS.**

El ensayo consiste en acoplar la hidrolisis del ATP de la actividad de la TryS a la oxidación del NADH a través la Piruvato Kinasa (PK) y la lactato deshidrogenasa (LDH). Midiéndose la absorbancia del NADH a 340nm de forma continúa usando un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio UV-Visible. La reacción fue llevada a cabo a temp. ambiente. Utilizando el buffer de reacción MM conteniendo 0.2 mM de NADH, 1 mM fosfoenolpiruvato 5 mM DTT, 10 unidades/ mL PK, 10 unidades/ mL LDH, 0.25 mM GSH, 2.5 mM ATP y 2 o 26 mM SP en un volumen total de 150  $\mu$ l. la reacción comienza con el agregado de la enzima. Usando una cubeta de cuarzo para realizar estas reacciones. Las reacciones control fueron preparadas a partir del agregado de 15  $\mu$ L DMSO. El control de inhibición fue realizado a partir del agregado de *LiTryS* y de 15  $\mu$ L de un inhibidor conocido (compuesto FS554), determinándose los valores de IC<sub>50</sub> a concentraciones de (350 nM). Las velocidades iniciales (IV) fueron calculadas para el control y los compuestos testeados en ambos casos por duplicado. Los PA fueron calculados, por duplicado, siendo PA calculada como: (valor IV compuesto/ valor IV control) x 100.

#### **Determinación de la concentración Inhibitoria de la biblioteca en presencia de cantidades saturantes de Putrescina o Espermidina, sobre promastigotes de *Leishmania donovani*.**

Se realizaron diluciones sucesivas a partir de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l de cada compuesto correspondiendo a 1% en las gráficas de los compuestos, hasta llegar a 0.025%, en el medio RPMI suplementado.

Se agregó a cada pocillo una concentración fija saturante de Putrescina o Espermidina, de 200 $\mu$ M la concentración elegida.

Luego se agregaron promastigotes de *Leishmania donovani* a 3x10<sup>4</sup> parasites/100 $\mu$ L los parásitos cultivados previamente y en fase log. Se deja en cultivo por 5 días hrs a 37°C.

El crecimiento de los parásitos o la evaluación metabólica es evaluada por la conversión del colorante resazurina a resorufina, mediante la medida de absorbancia a 570-600nm usando el lector de placas Biotek-Sinergy2.

Se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> mediante los procedimientos antes descriptos.

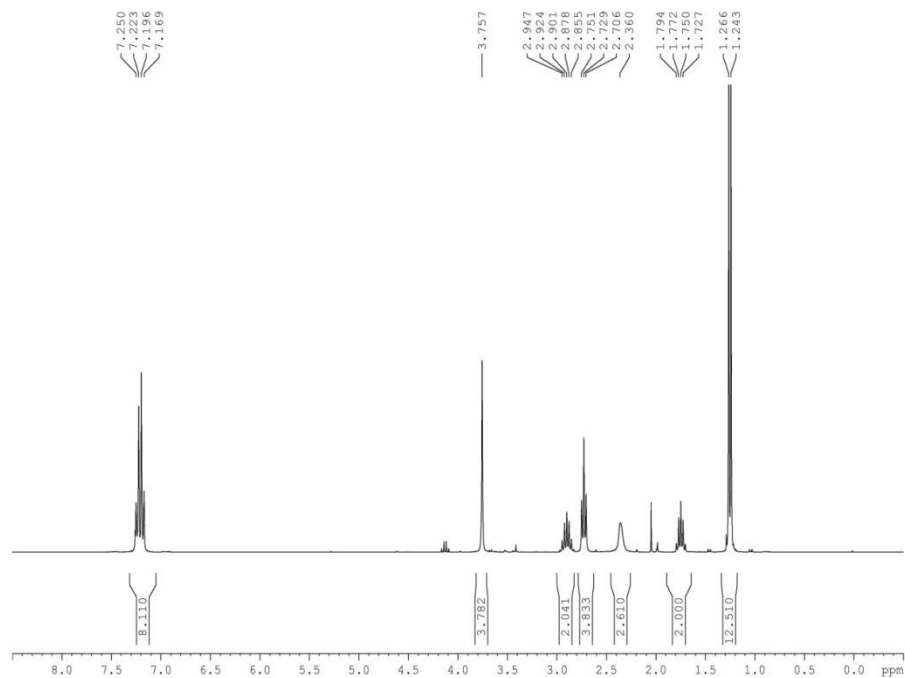
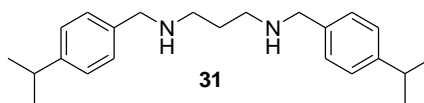
**Interpretación de resultados.**

Si los compuestos inhiben alguna de las enzimas como Arginasa o ODC, la toxicidad reducida apoyaría esta noción, mientras que la toxicidad inalterada implicaría que otros objetivos o adicionales celulares están presentes.

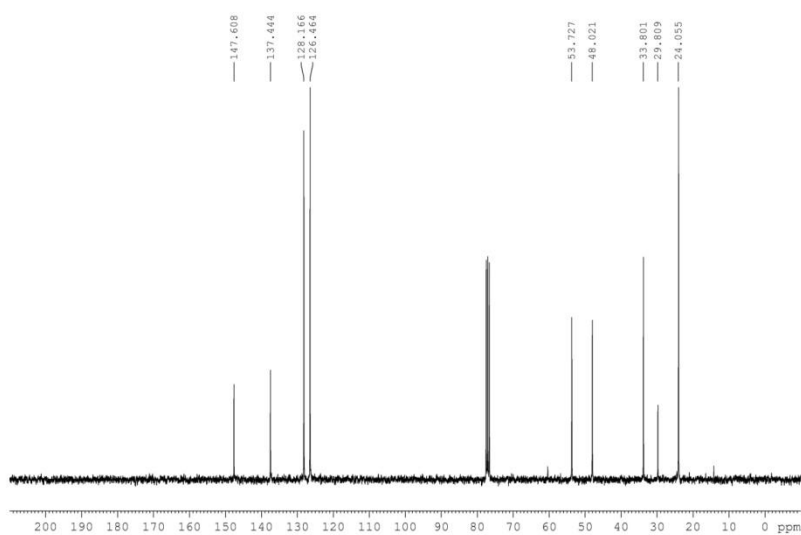
## ***12. ESPECTROS SELECCIONADOS.***

## 12 Espectros seleccionados.

### Espectros compuesto 31.

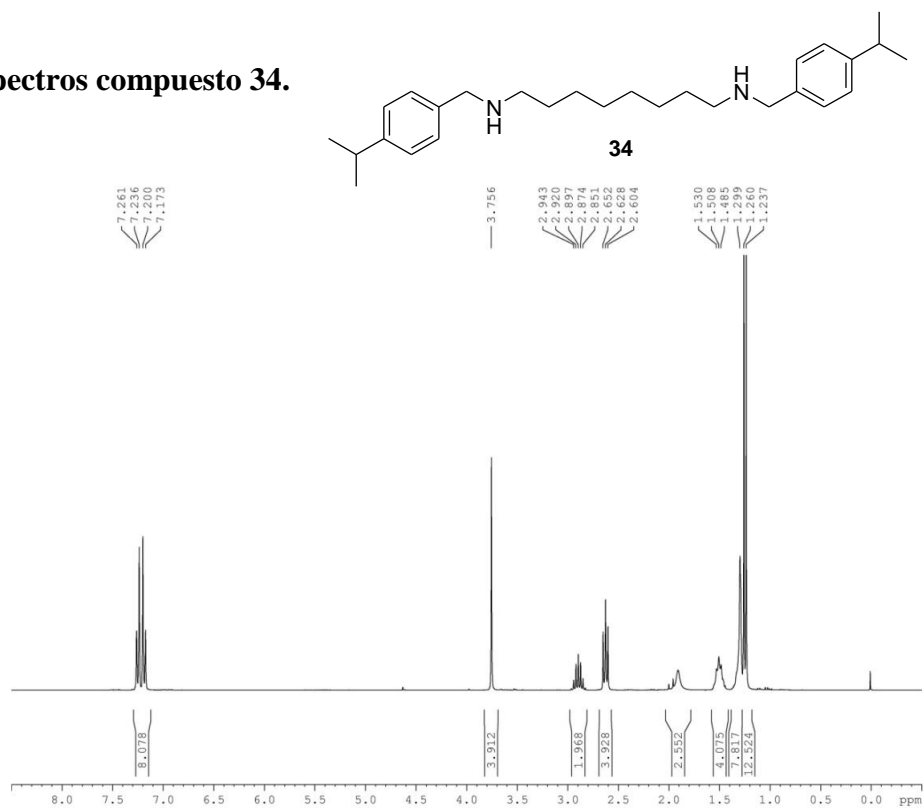


### Espectro de <sup>1</sup>HRMN

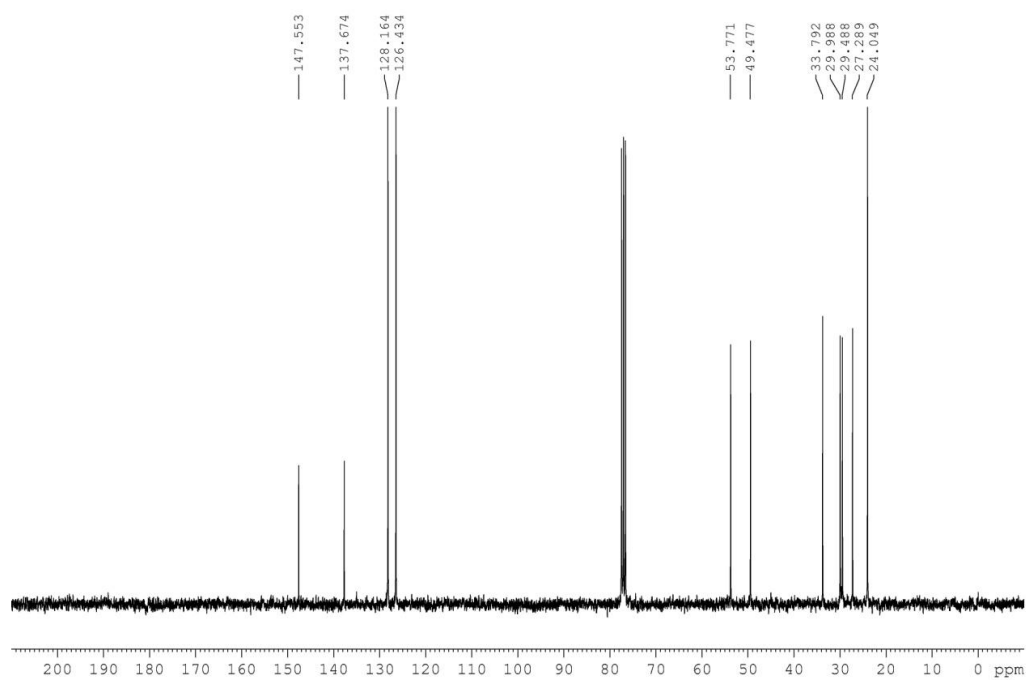


### Espectro de <sup>13</sup>CRMN

**Espectros compuesto 34.**

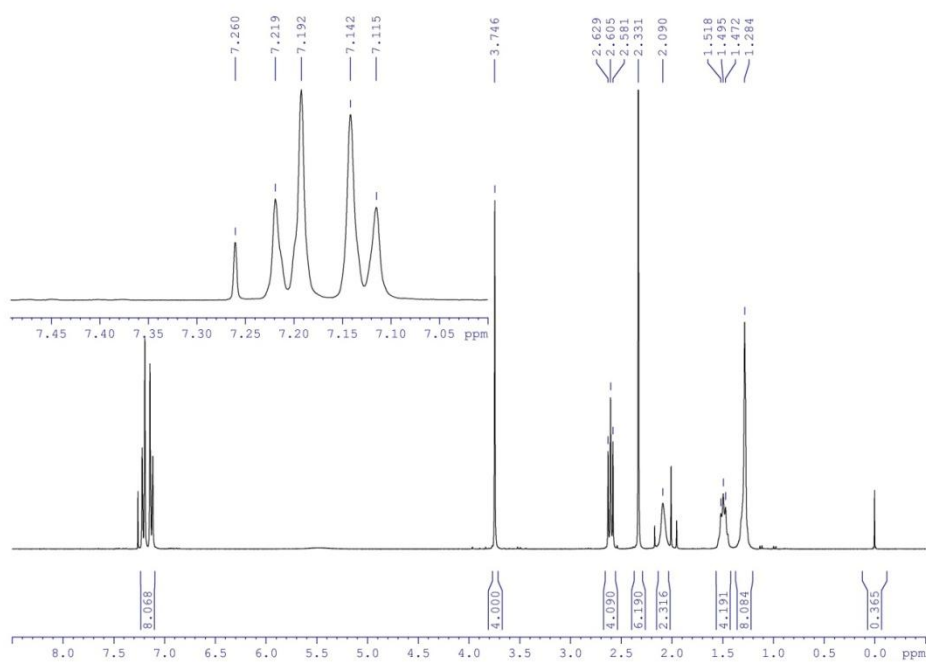
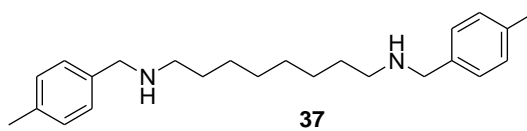


**Espectro de <sup>1</sup>HRMN**

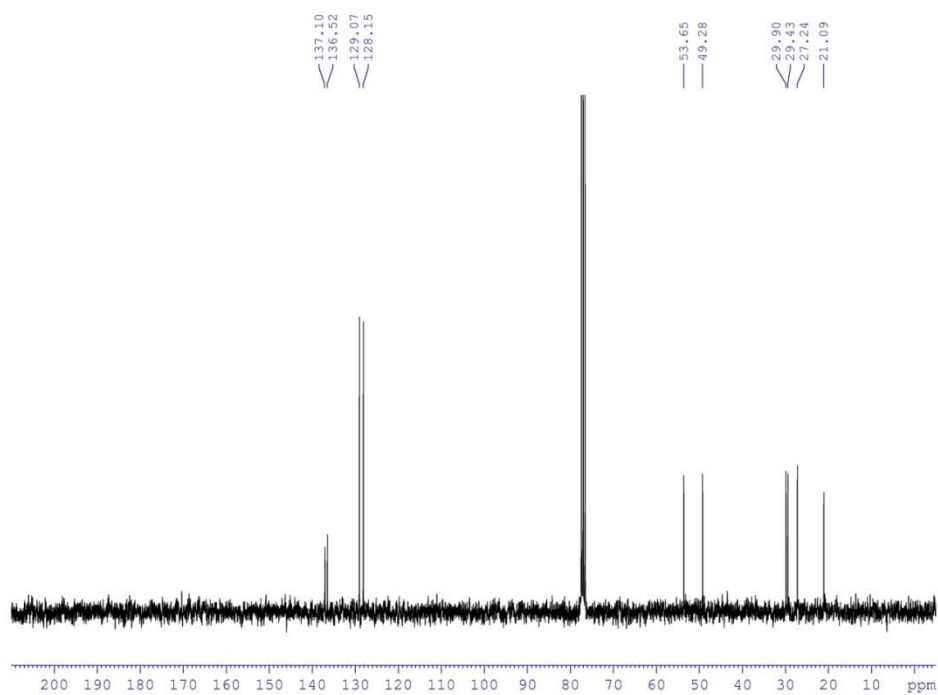


**Espectro de <sup>13</sup>CRMN**

**Espectro compuesto 37.**

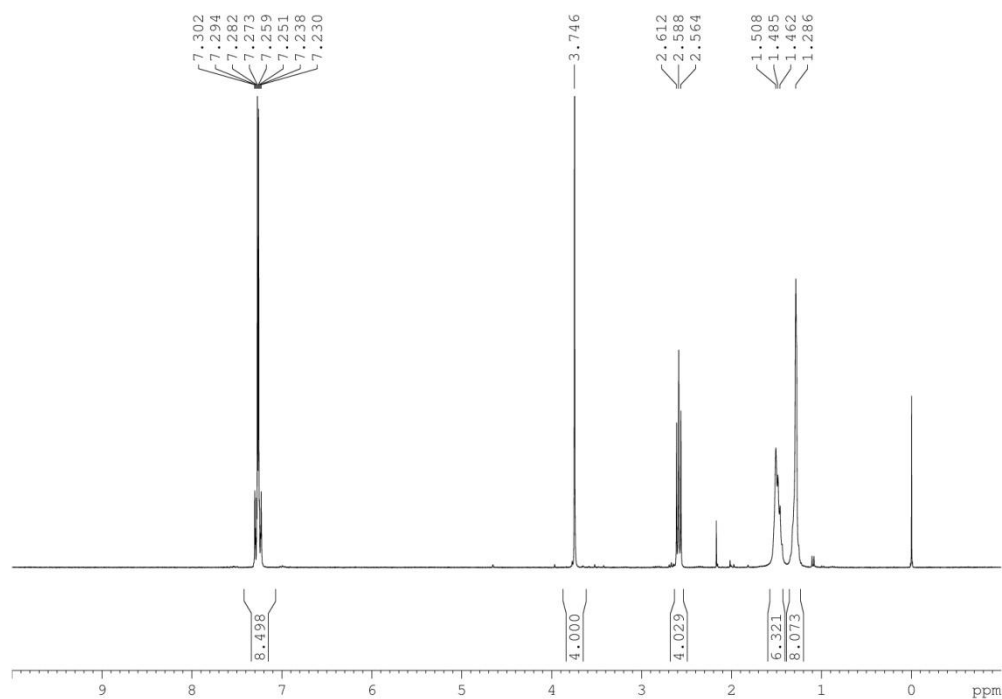
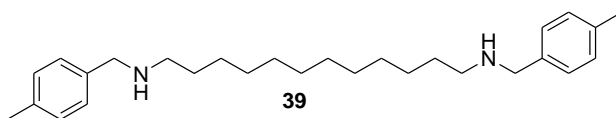


**Espectro de <sup>1</sup>HRMN**

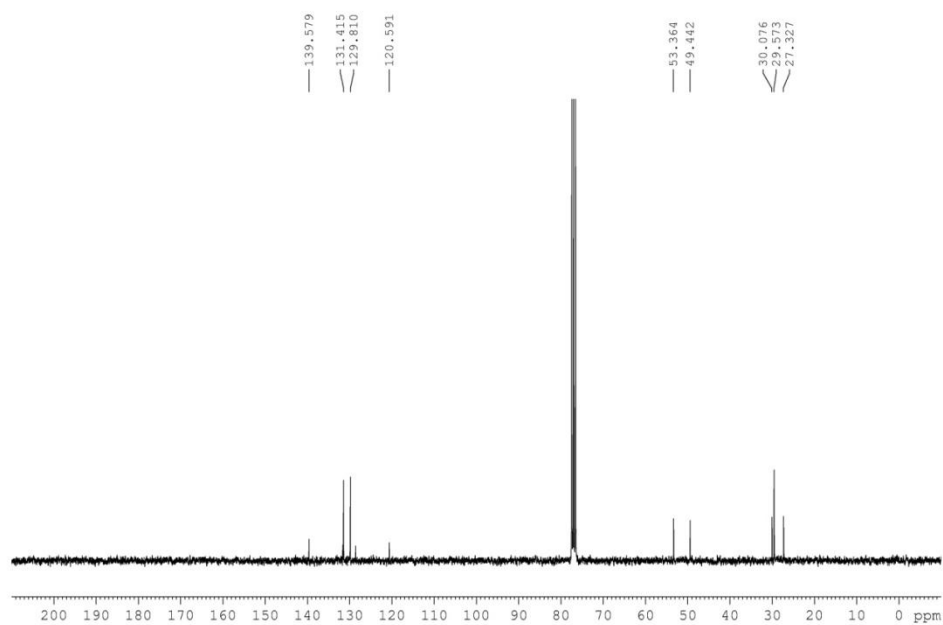


**Espectro de <sup>13</sup>CRMN**

### Espectro compuesto 39

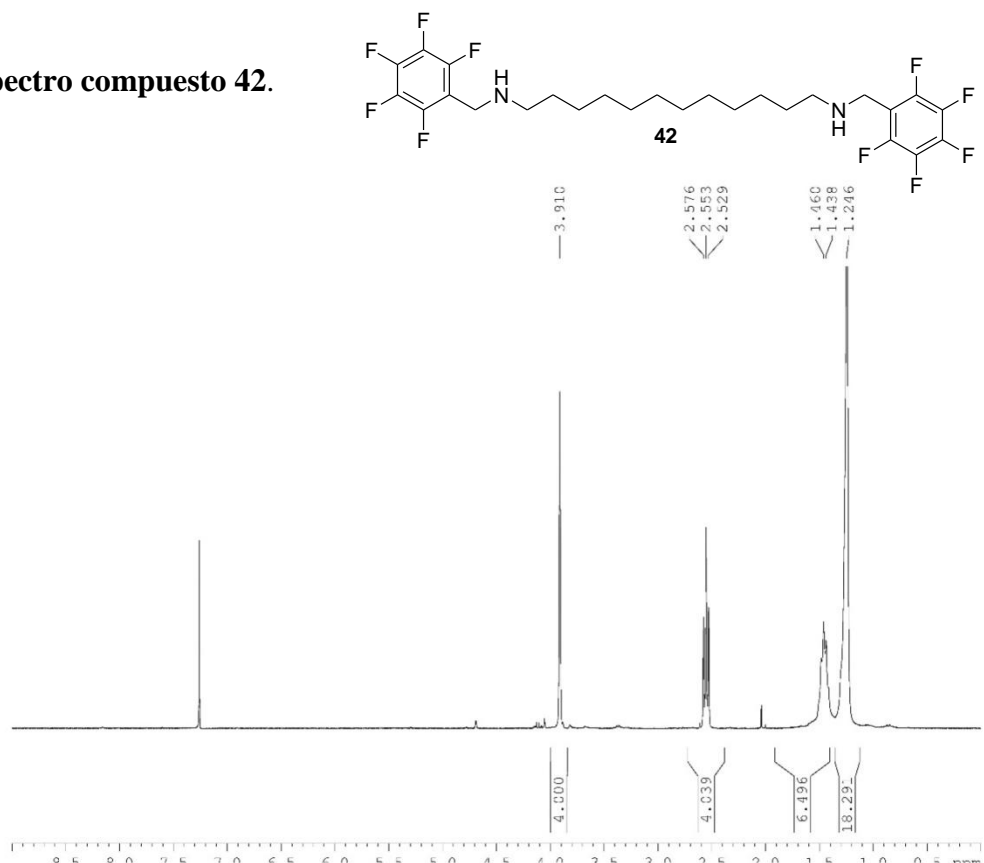


### Espectro de <sup>13</sup>HRMN

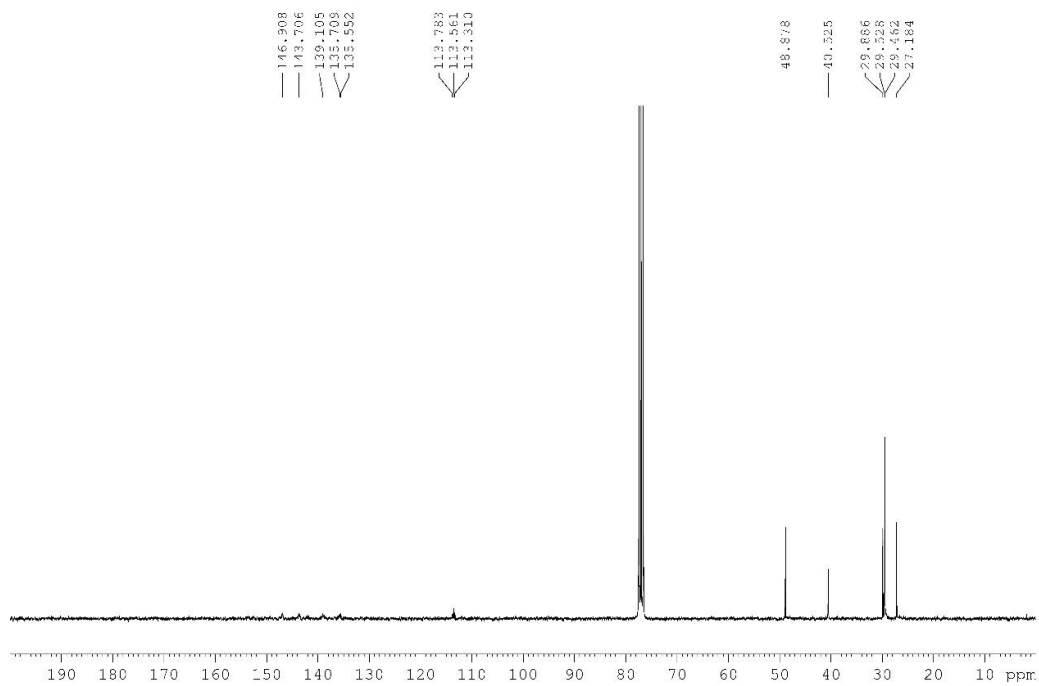


### Espectro de <sup>13</sup>CRMN

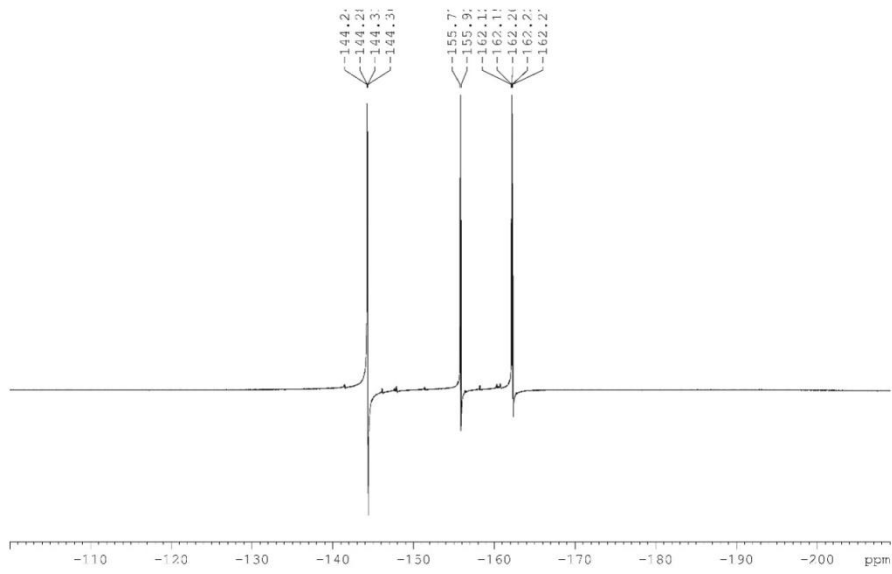
Espectro compuesto 42.



Espectro de <sup>13</sup>HRMN

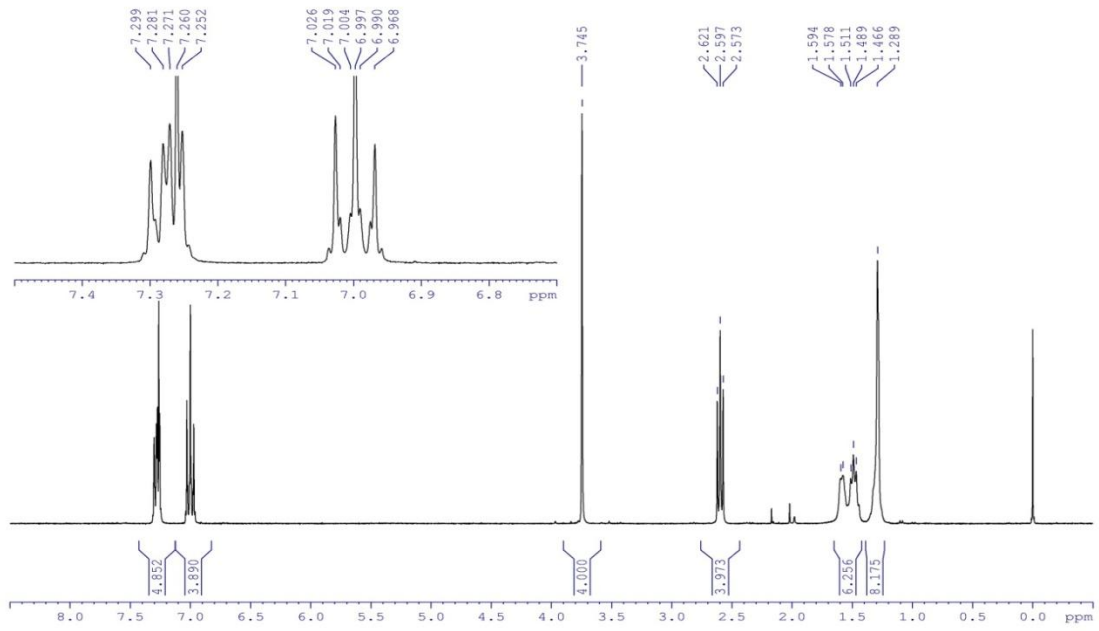
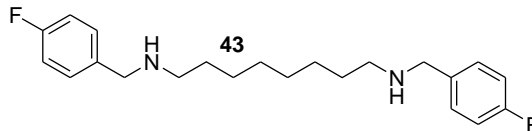


Espectro de <sup>13</sup>CRMN

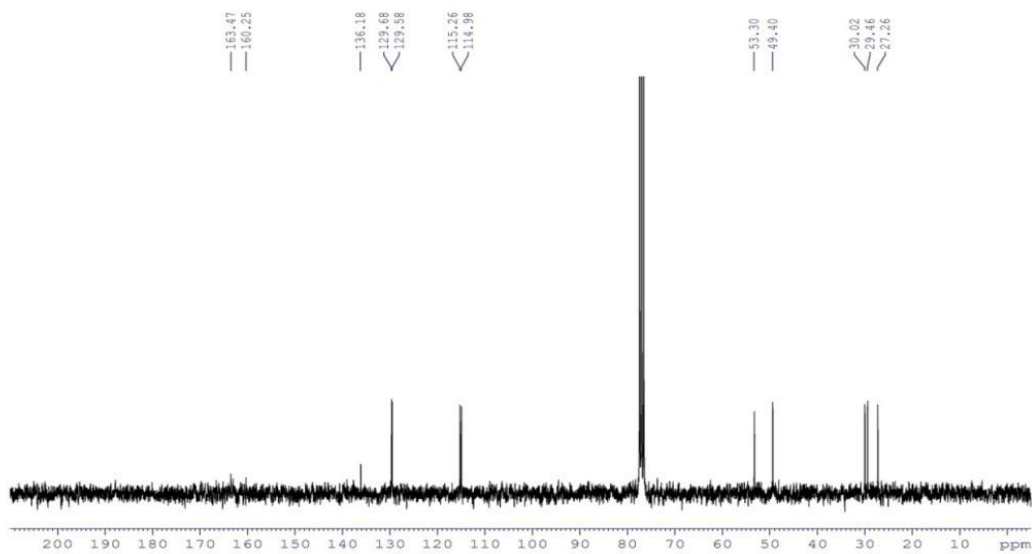


Espectro de F-RMN

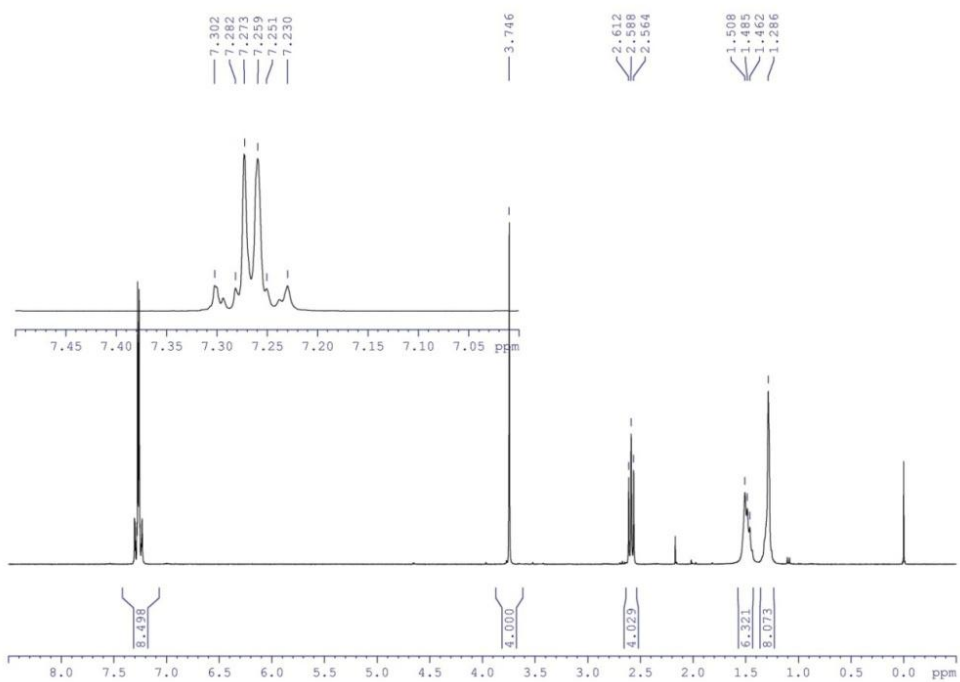
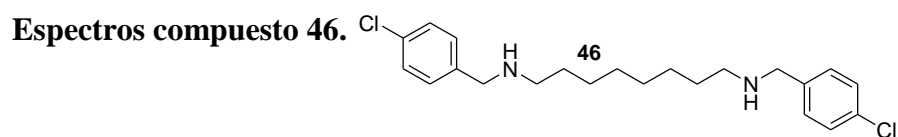
Espectros compuesto 43.



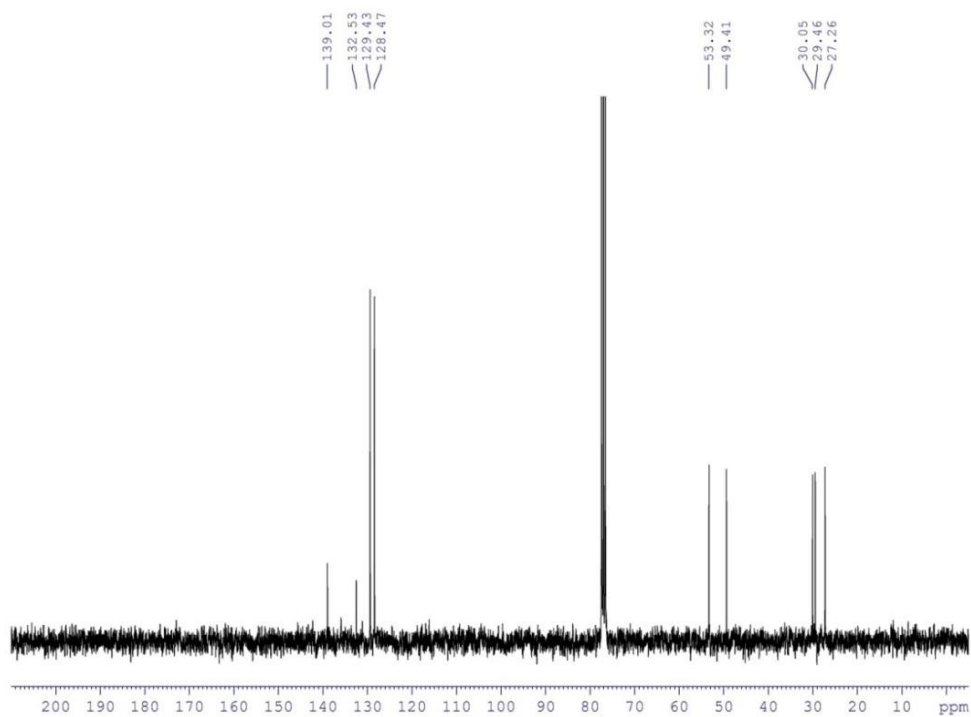
Espectro de <sup>1</sup>HRMN



Espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN

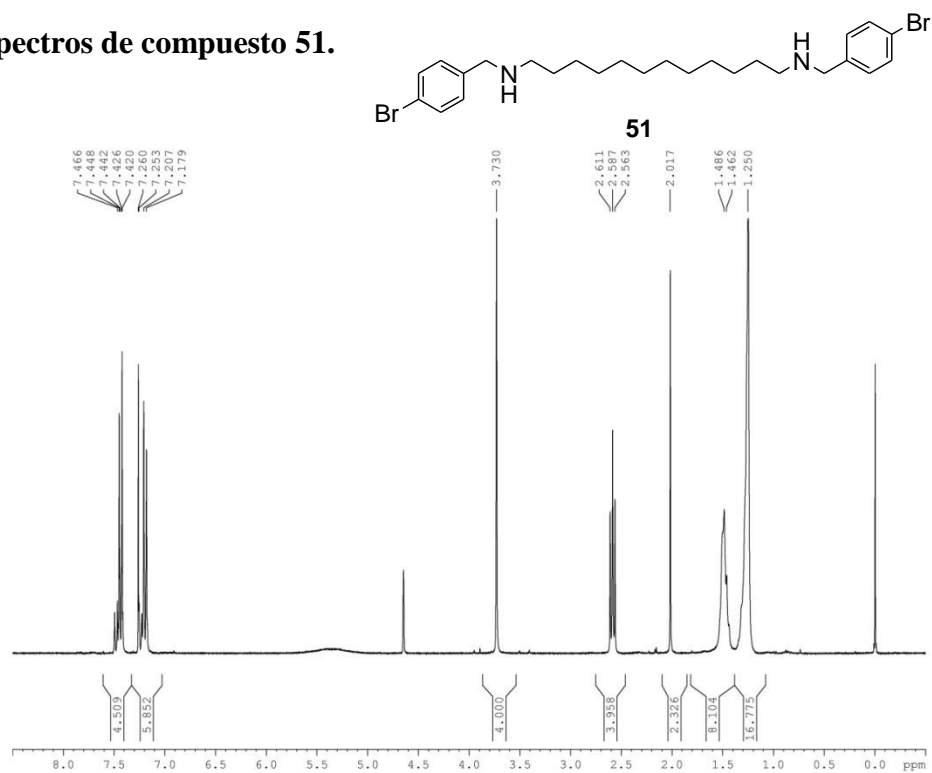


Espectro de  $^1\text{H}$ RMN

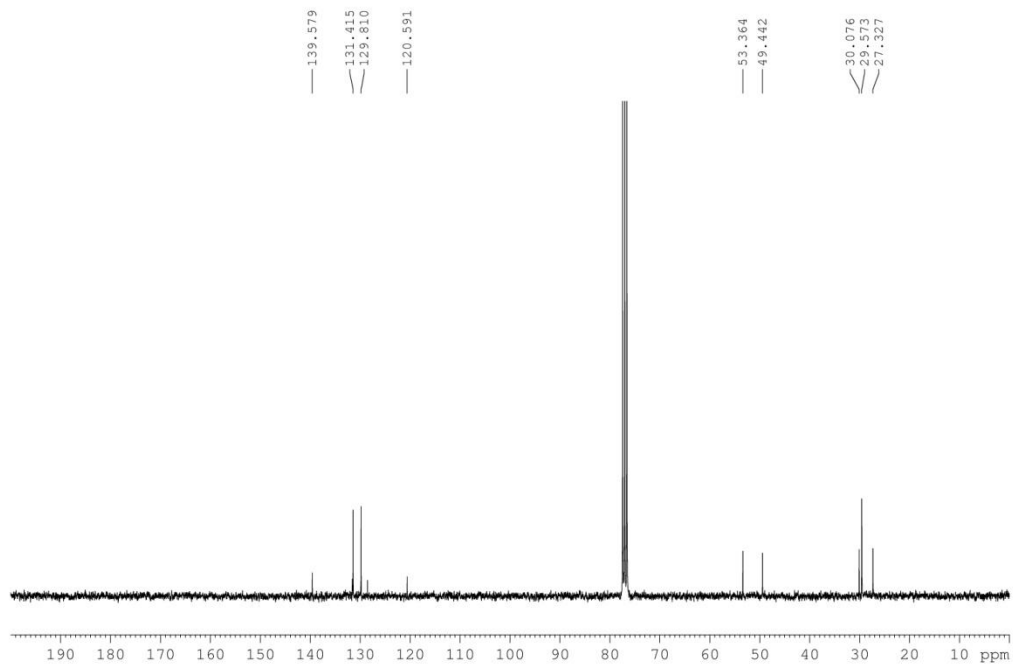


Espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN

Espectros de compuesto 51.

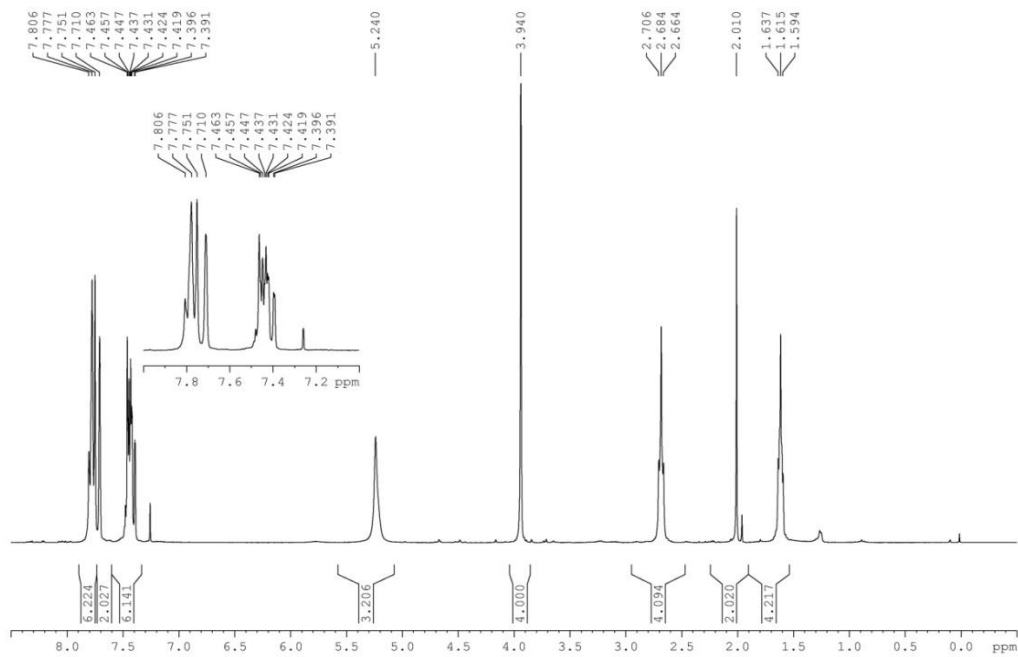
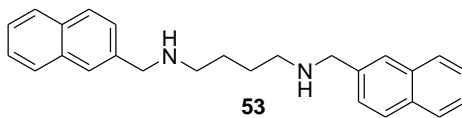


Espectro de  $^1\text{H}$ RMN

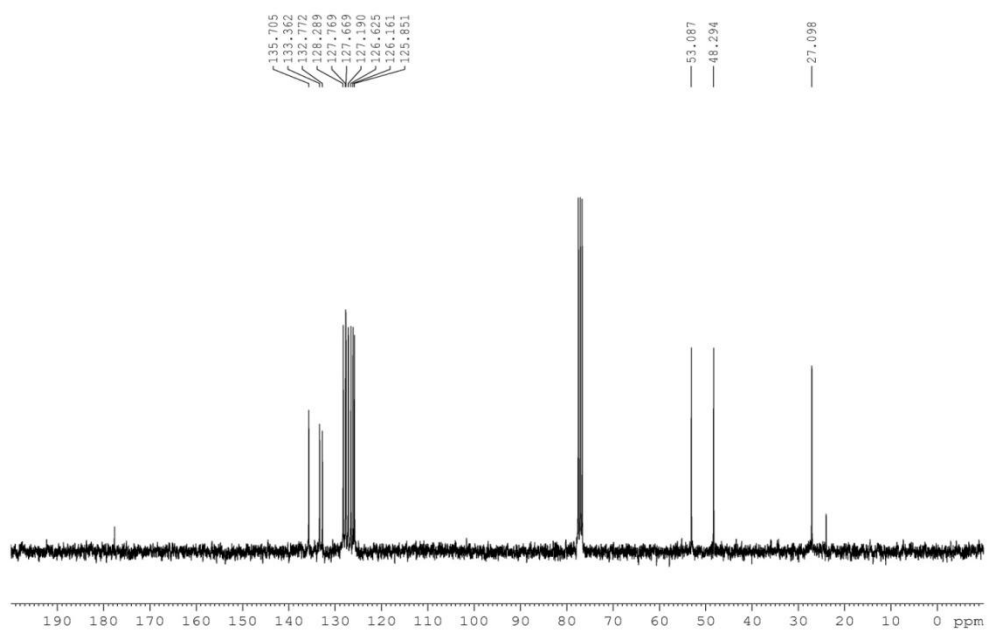


Espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN

Espectros de compuesto **53**

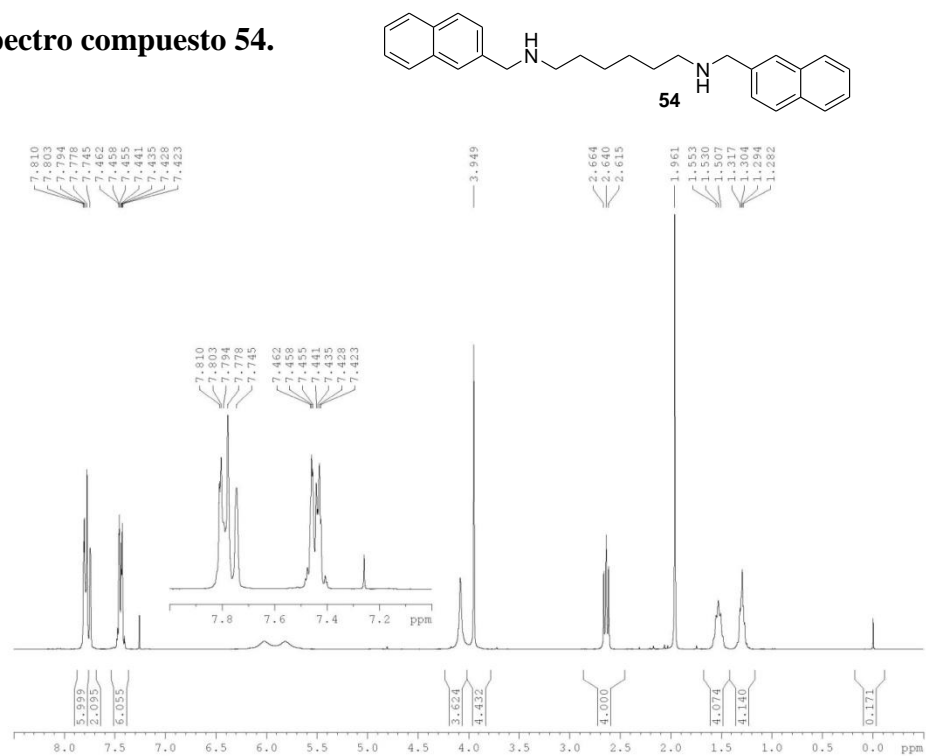


Espectro de  $^1\text{H}$ RMN

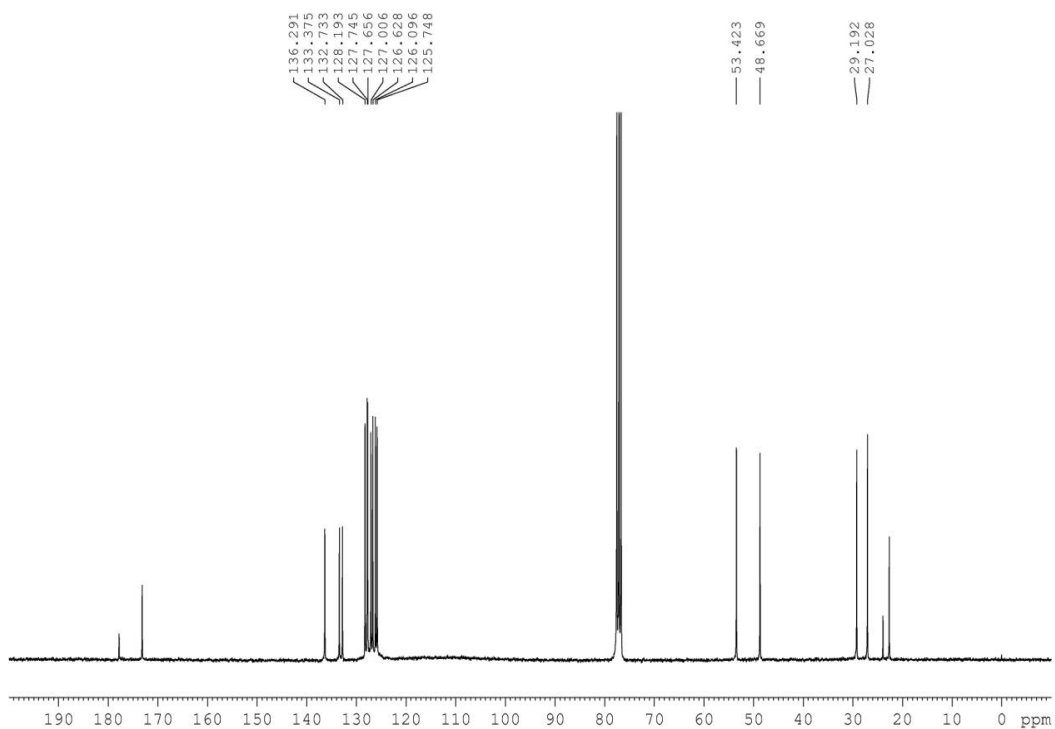


Espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN

Espectro compuesto 54.

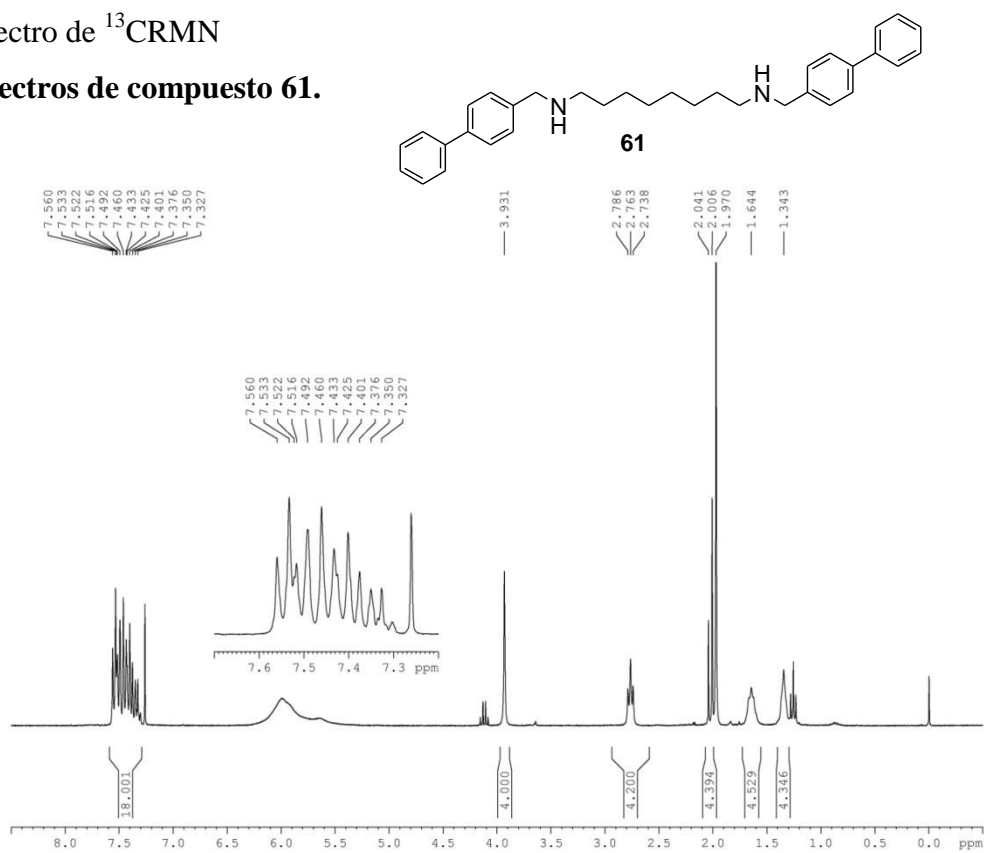


Espectro de  $^1\text{H}$ RMN

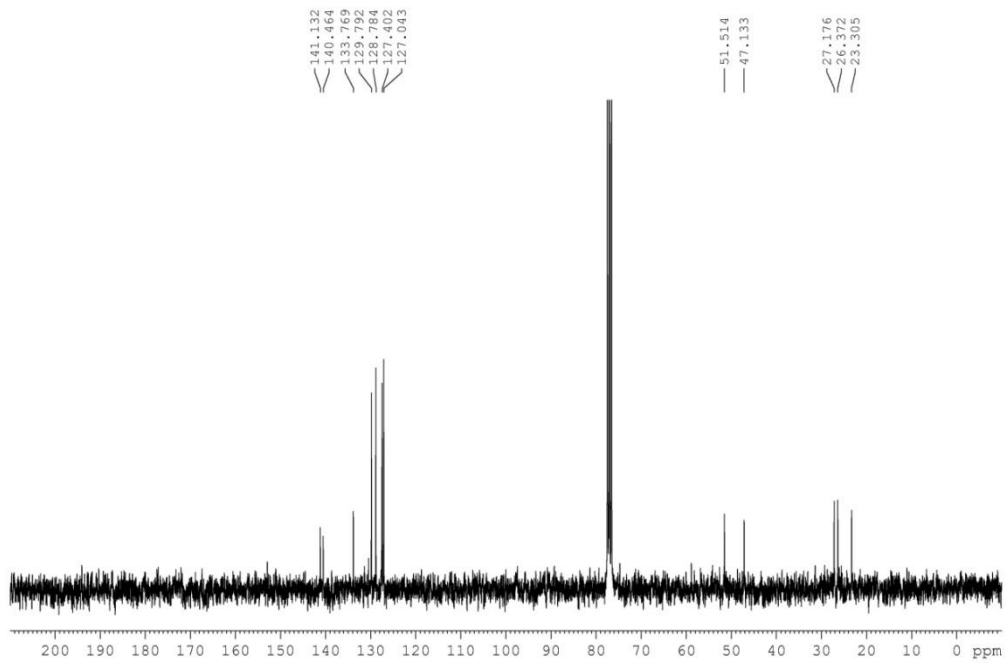


Espectro de  $^{13}\text{CRMN}$

Espectros de compuesto 61.

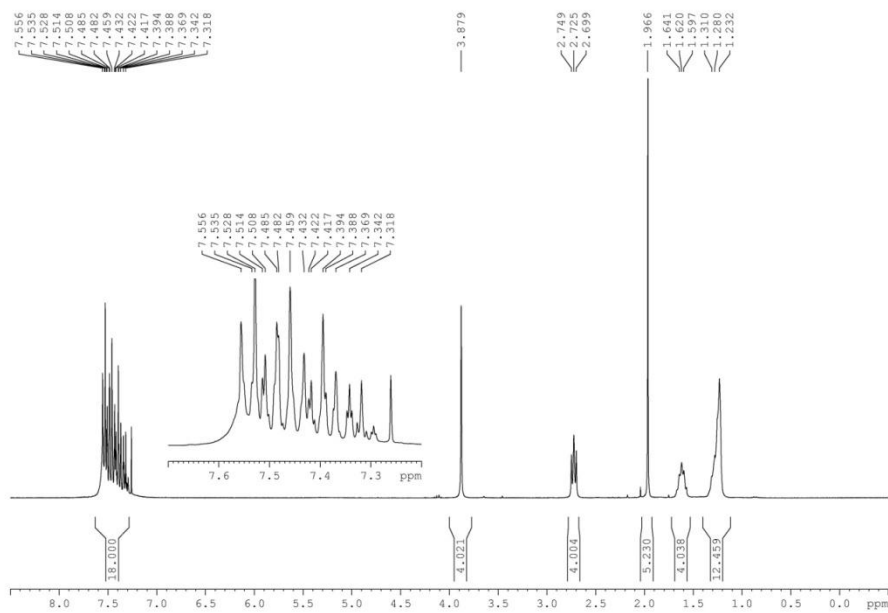
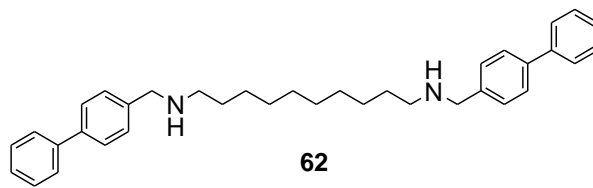


Espectro de  $^1\text{HRMN}$

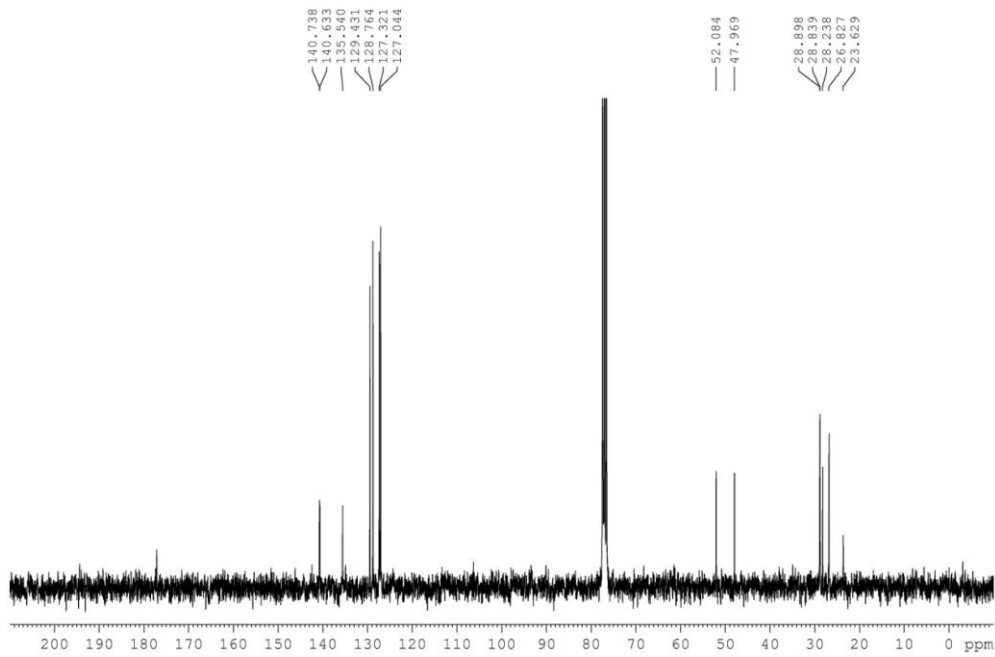


Espectro de  $^{13}\text{CRMN}$

Espectros compuesto 62.

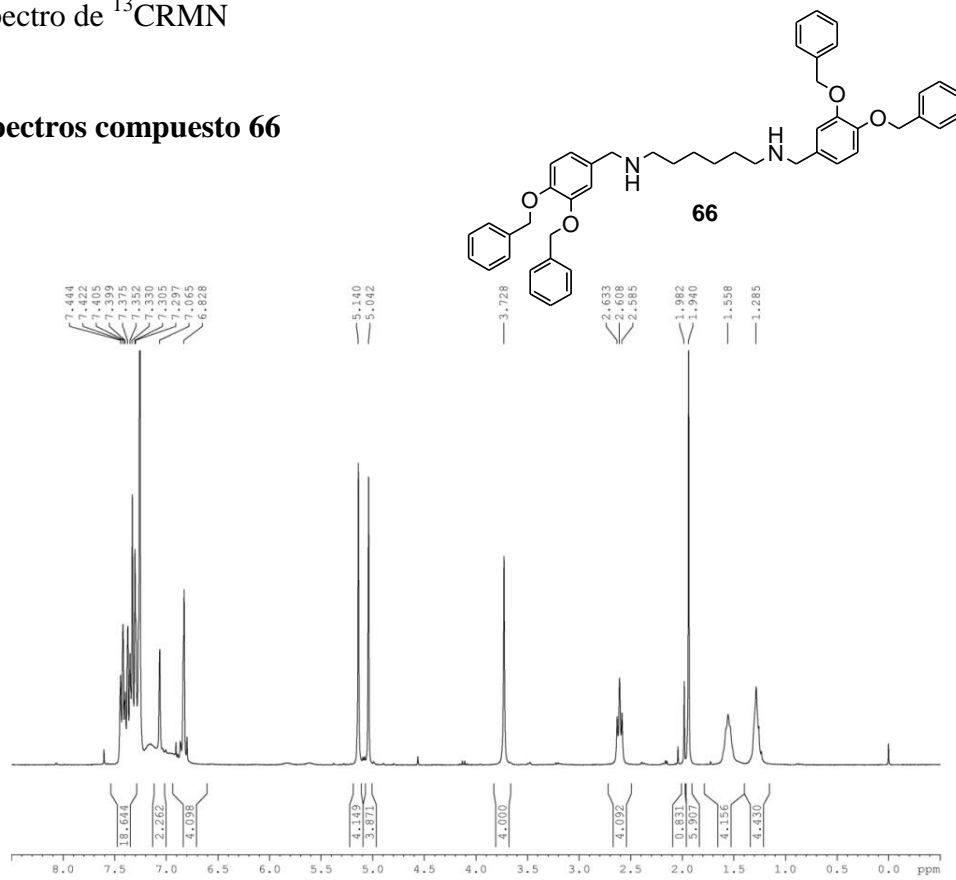


Espectro de  $^1\text{HRMN}$

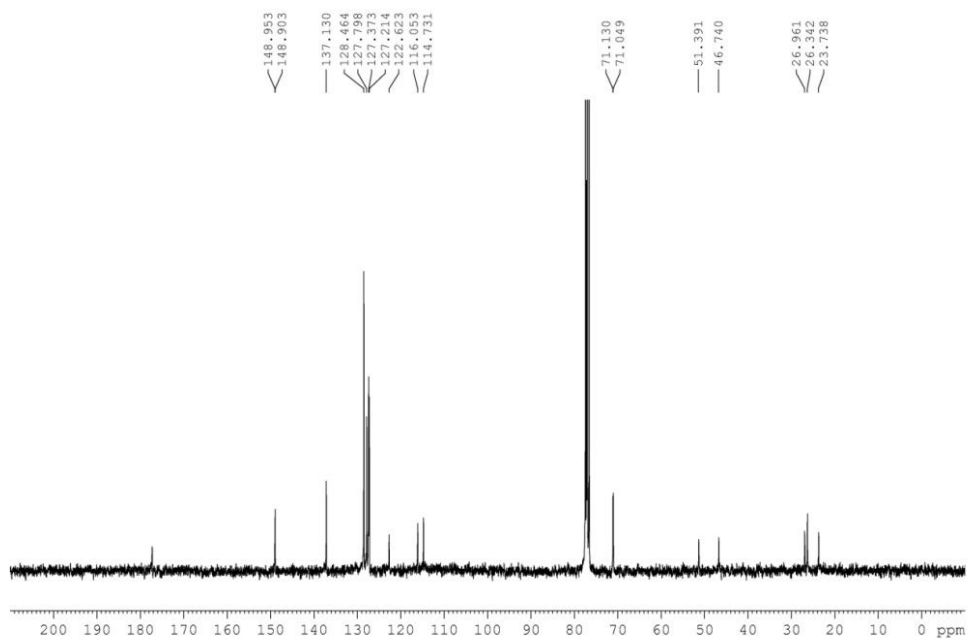


Espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN

Espectros compuesto 66

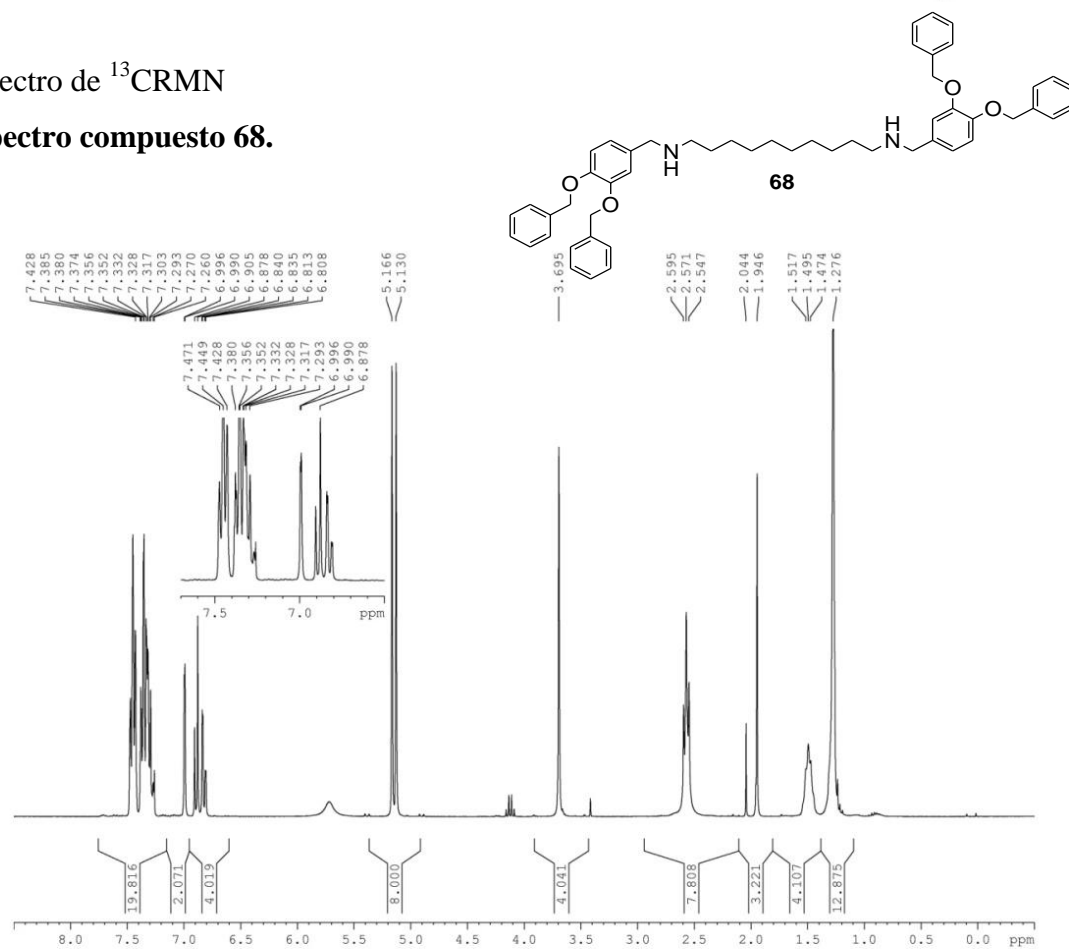


Espectro de  $^1\text{H}$ RMN

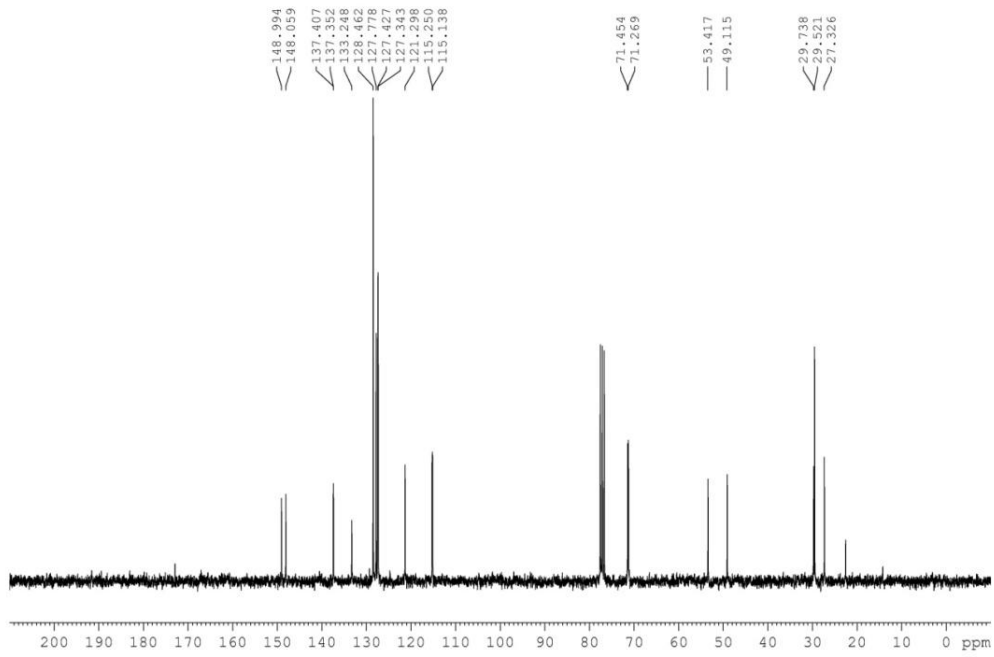


Espectro de  $^{13}\text{CRMN}$

Espectro compuesto 68.

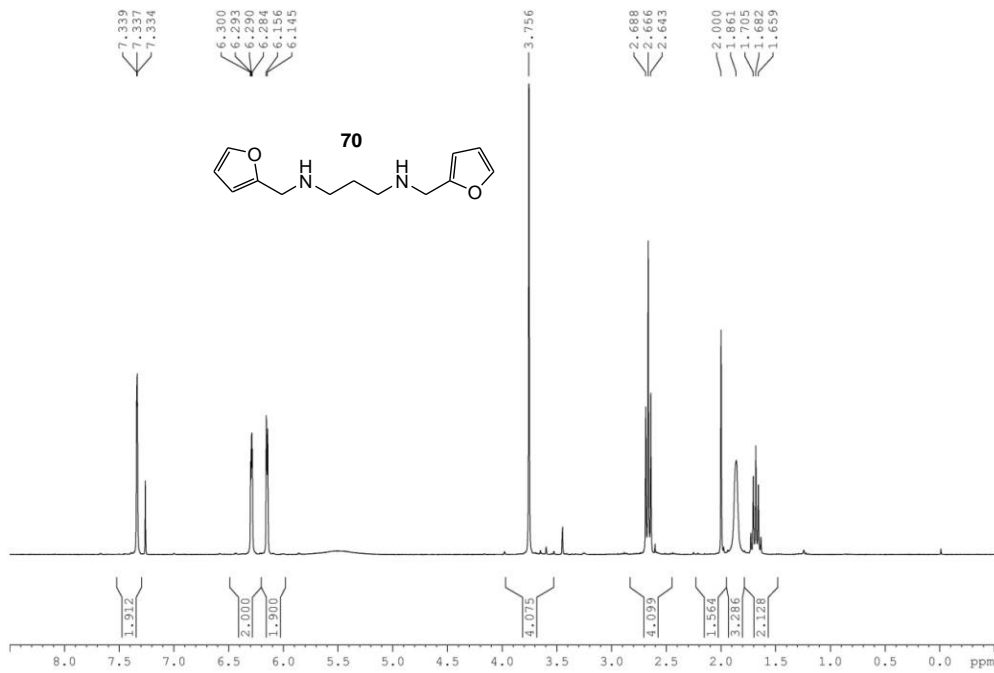


Espectro de  $^1\text{HRMN}$

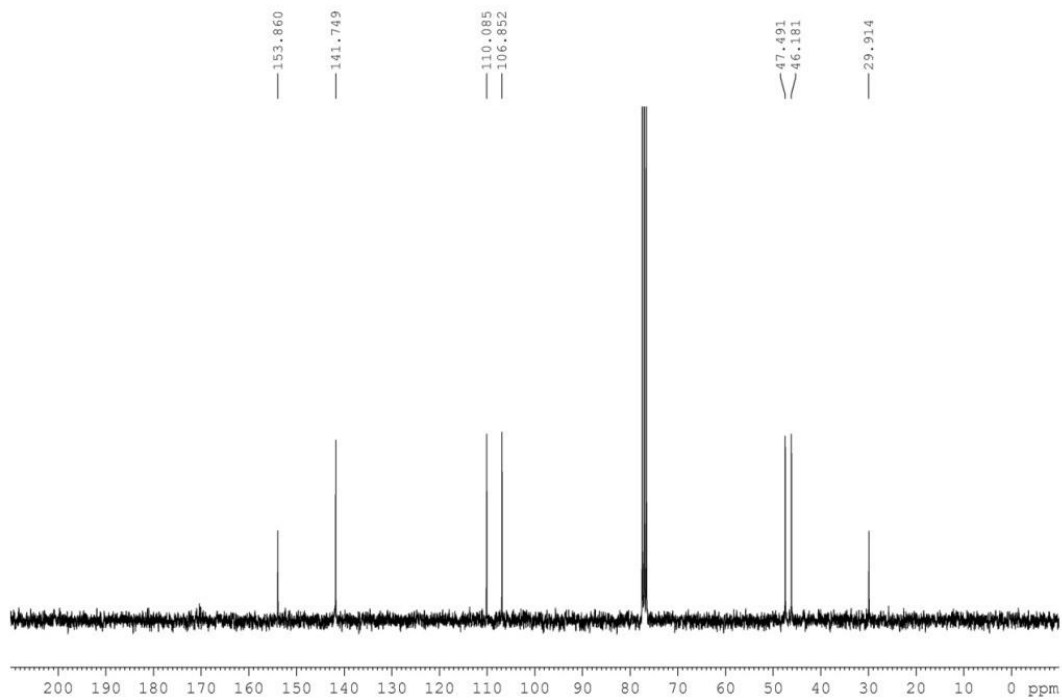


Espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN

Espectro compuesto 70.

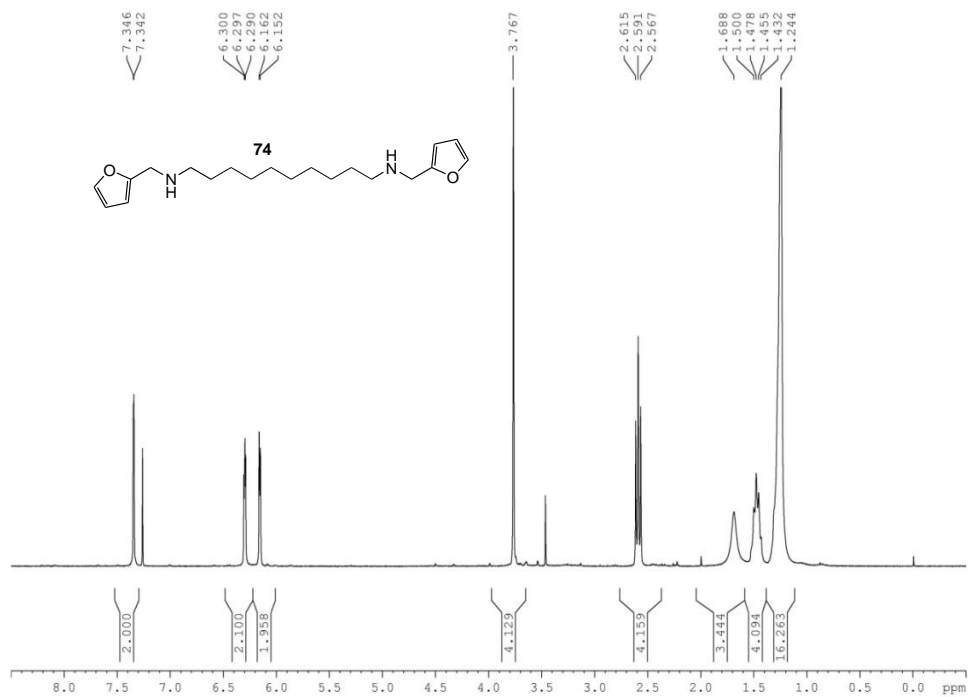


Espectro de  $^1\text{H}$ RMN

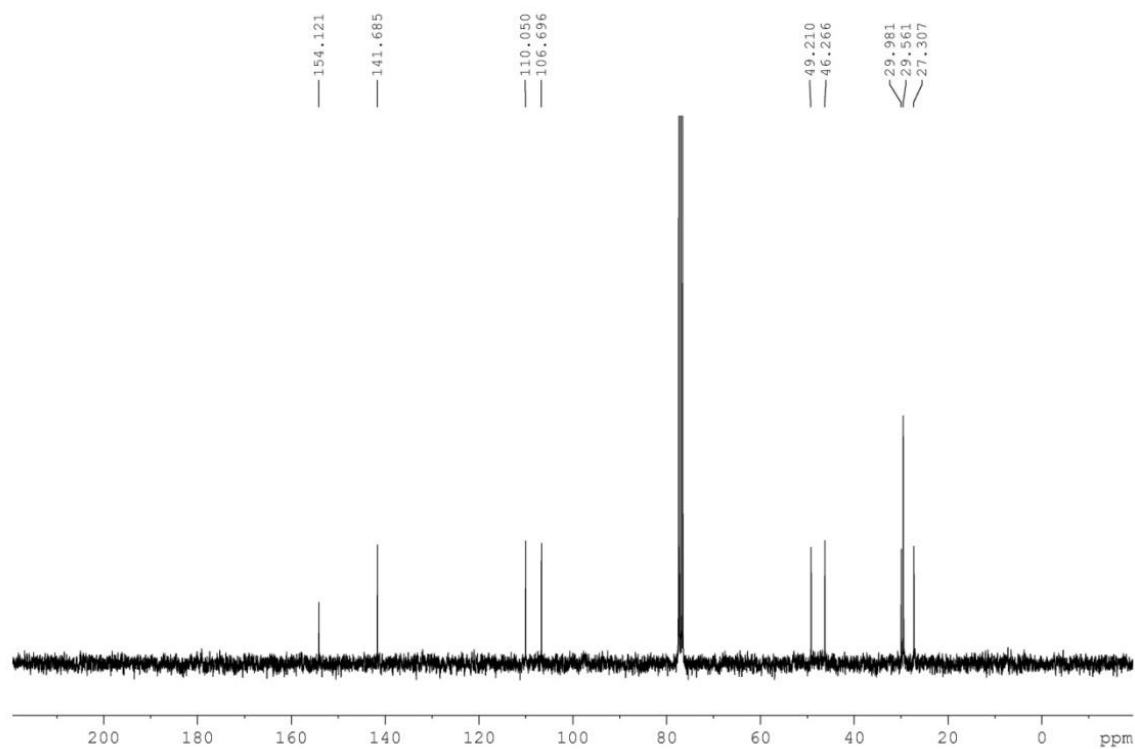


Espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN

Espectro de compuesto **74**.

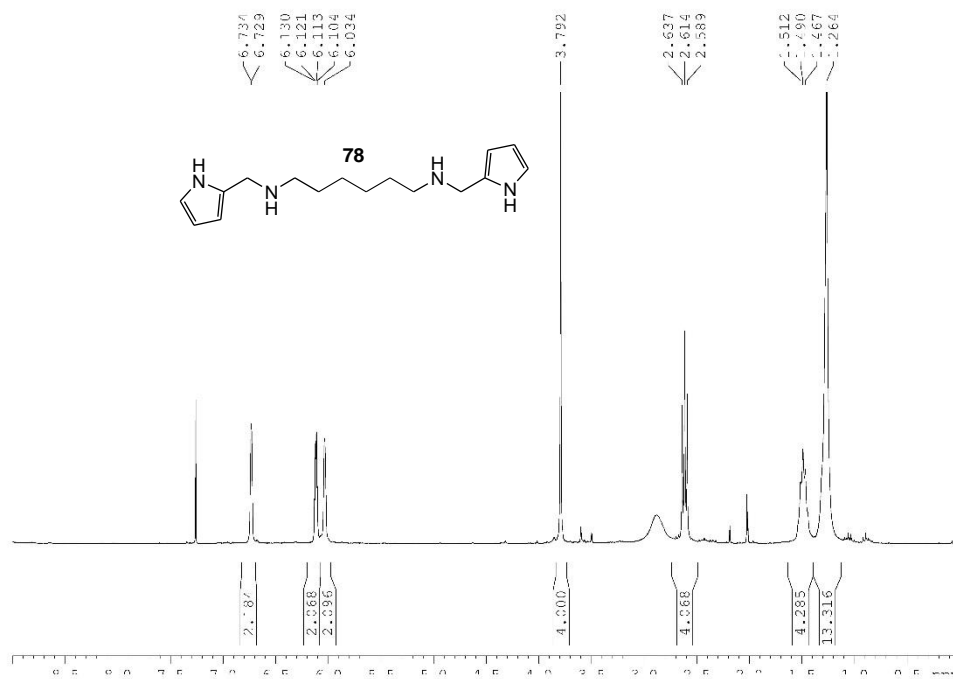


Espectro de  $^1\text{HMRN}$

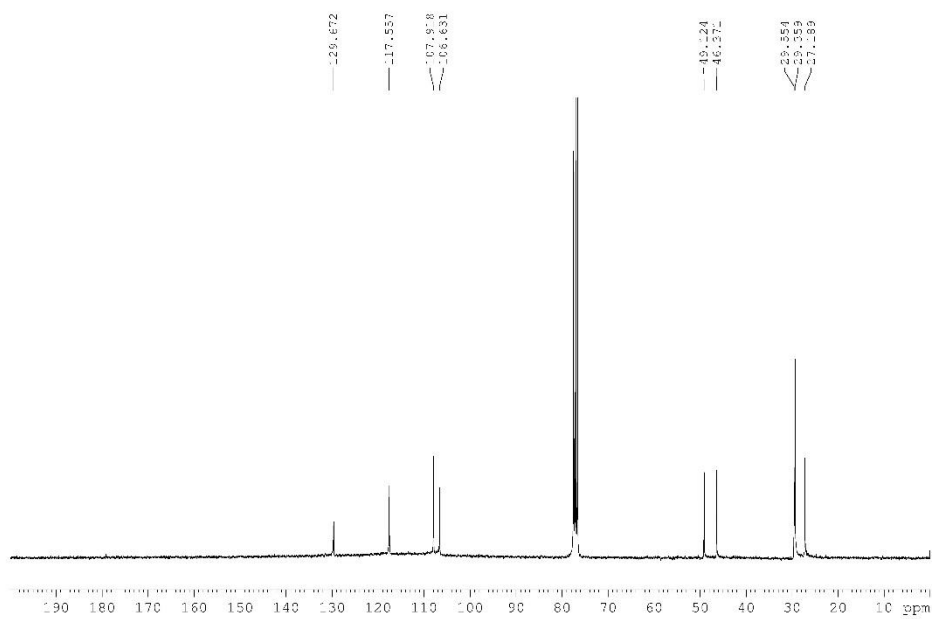


Espectro de  $^{13}\text{CRMN}$

Espectro de compuesto **78**



## Espectro de $^1\text{HRMN}$

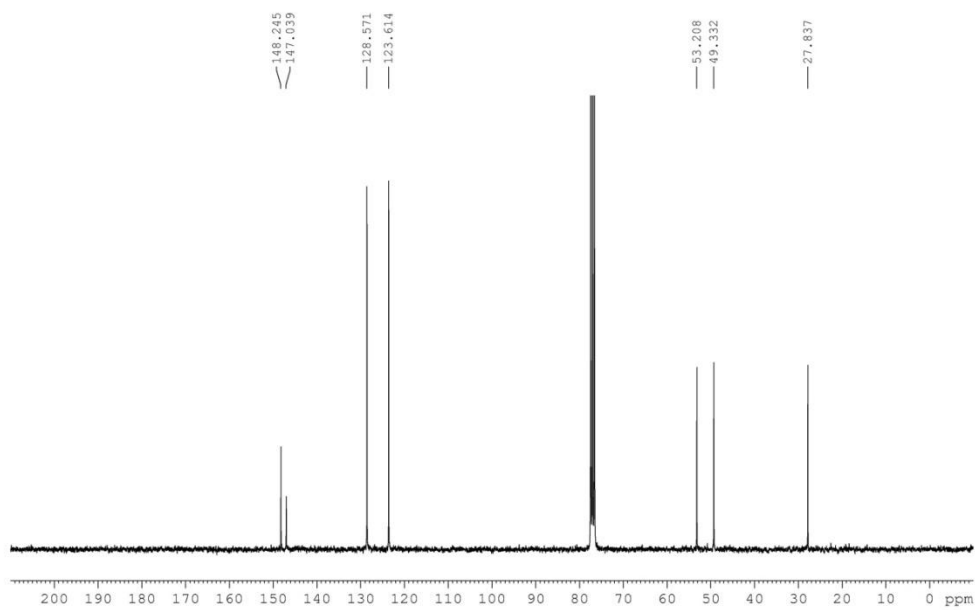


## Espectro de $^{13}\text{CRMN}$

### Espectro compuesto 82

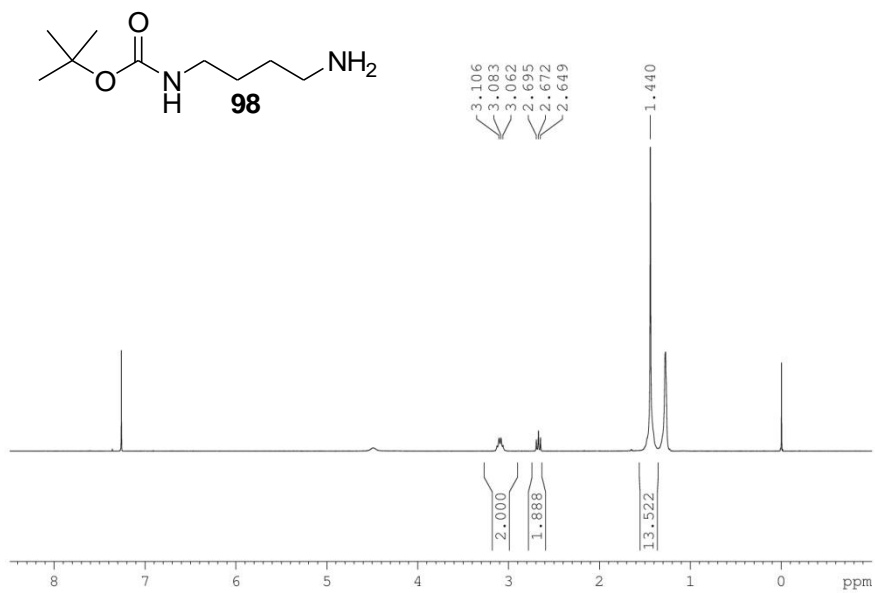


## Espectro de $^1\text{HRMN}$



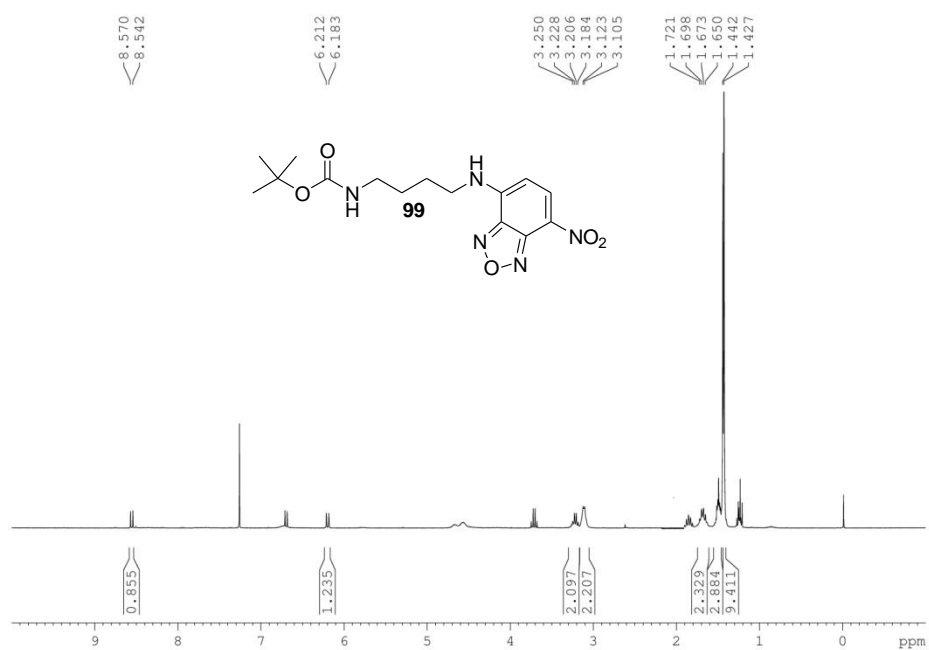
Espectro de  $^{13}\text{C}$ RMN

**Compuesto 98.**



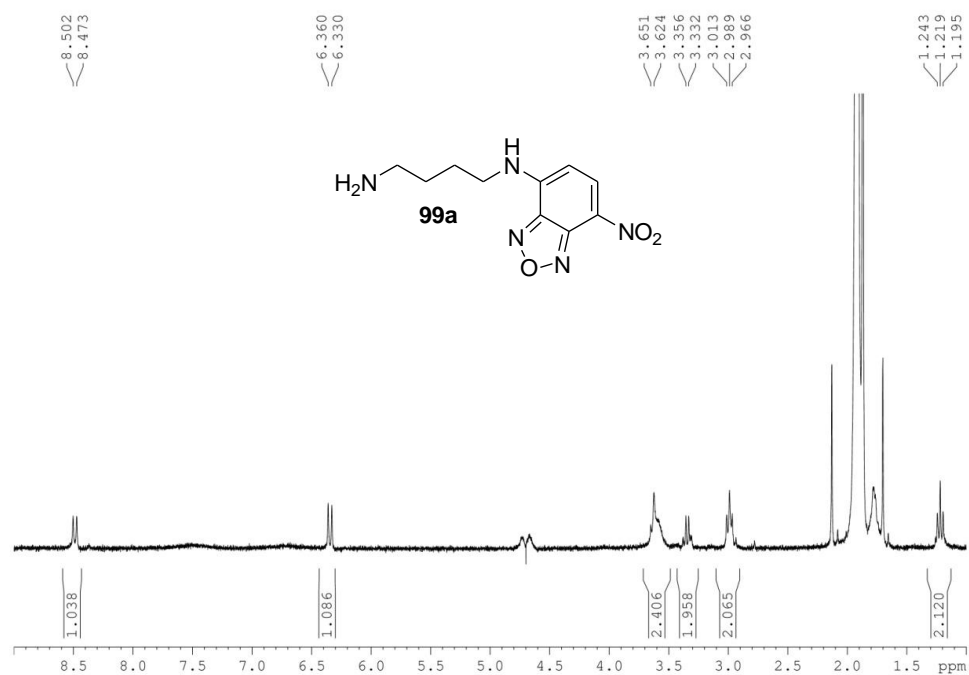
Espectro de  $^1\text{H}$ RMN

## Compuesto 99



## Espectro de <sup>1</sup>HRMN

### Compuesto 99.a



## Espectro de <sup>1</sup>HRMN (D<sub>2</sub>O suprimida la señal de H<sub>2</sub>O)



## ***13.BIBLIOGRAFÍA.***

## 13 Bibliografía.

1. Hay SI, *et al.* (2010) Estimating the Global Clinical Burden of *Plasmodium falciparum* Malaria in 2007. *PLoS Med.* 7(6):e1000290.
2. World Health Organization (2007) Global plan to combat neglected tropical diseases 2008–2015 in *World Health Organization 2007* (WHO).
3. World Health Organization (2012) World Malaria report 2012
4. WHO-TDR (2012) Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. in *Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis* (WHO-TDR), pp 1-116.
5. Paul R Torgerson PM (2013) La carga global de la toxoplasmosis congénita: una revisión sistemática. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud* 91(7):465-544.
6. World Health Organization (2007) Report of the global partners' meeting on neglected tropical diseases. ed WHO.
7. Breman JG, Alilio MS, & Mills A (2004) Conquering the Intolerable Burden of Malaria: What's New, What's Needed: A Summary. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71(2):1-15.
8. Rakotonirina H, *et al.* (2008) Accuracy and reliability of malaria diagnostic techniques for guiding febrile outpatient treatment in malaria-endemic countries. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78:217 - 221.
9. Guerra C, *et al.* (2007) Assembling a global database of malaria parasite prevalence for the Malaria Atlas Project. *Malar. J.* 6:17.
10. Schrader FC, Barho M, Steiner I, Ortmann R, & Schlitzer M (2012) The antimalarial pipeline--an update. *Int. J. Med. Microbiol.* 302(4-5):165-171.
11. Coura JR & Vinas PA (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465(7301):S6-7.
12. Vallejo GA, Guhl F, & Schaub GA (2009) Triatominae-Trypanosoma cruzi/T. rangeli: Vector-parasite interactions. *Acta Trop.* 110(2-3):137-147.
13. McKerrow JH, *et al.* (2009) Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1:263-269.
14. World Health Organization (2013) Informe mundial 2012 sobre el Paludismo . Resumen; World Health Organization (2005) Global strategic plan. Roll Back Malaria. 2005-2015.
15. Snow R, *et al.* (1997) Relation between severe malaria morbidity in children and level of Plasmodium falciparum transmission in Africa. *The Lancet* 349:1650 - 1654.
16. Smith D, Guerra C, Snow R, & Hay S (2007) Standardizing estimates of the Plasmodium falciparum parasite rate. *Malar. J.* 6:131.
17. Yeung S, Van Damme W, Socheat D, White N, & Mills A (2008) Access to artemisinin combination therapy for malaria in remote areas of Cambodia. *Malar. J.* 7:96.
18. Littrell M, *et al.* (2011) Case management of malaria fever in Cambodia: results from national anti-malarial outlet and household surveys. *Malar. J.* 10:328.
19. Smith T, *et al.* (2006) Mathematical modeling of the impact of malaria vaccines on the clinical epidemiology and natural history of Plasmodium falciparum malaria: Overview. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(2 Suppl):1 - 10; Albert Schweitzer Hospital L, Gabon, and Institute of Tropical Medicine, *et al* app (2012) A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants. *New Engl. J. Med.* 367(24):2284-2295.
20. Webster JP (2007) The effect of Toxoplasma gondii on animal behavior: playing cat and mouse. *Schizophrenia bulletin* 33(3):752-756.
21. Cook T, *et al.* (2007) Divergent polyamine metabolism in the Apicomplexa. *Microbiology* 153(4):1123-1130.
22. Berdoy M, Webster JP, & Macdonald DW (2000) Fatal attraction in rats infected with Toxoplasma gondii. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 267(1452):1591-1594.

23. Flores SMHyRM (2009) TOXOPLASMA GONDII, UN PATÓGENO ASESINO RE-EMERGENTE. *REB* 28(2):52-58.
24. Tenter AM, Heckerth AR, & Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30(12-13):1217-1258.
25. Jones JL, *et al.* (2001) *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am. J. Epidemiol.* 154(4):357-365.
26. Pappas G, Roussos N, & Falagas ME (2009) Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39(12):1385-1394.
27. Delespau V & de Koning HP (2007) Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resistance Updates* 10(1-2):30-50.
28. WHO (2013) [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). *World Health Organization*.
29. Burudi EME, Karanja SM, Njue AI, Githiori JB, & Ndung'u JM (1995) Establishment of a partly DFMO-sensitive primate model of *Trypanosoma rhodesiense* sleeping sickness. *Acta Trop.* 59(1):71-73.
30. Berger BJ, Carter NS, & Fairlamb AH (1995) Characterisation of pentamidine-resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69(2):289-298.
31. Barrett MP, Boykin DW, Brun R, & Tidwell RR (2007) Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *British journal of pharmacology* 152(8):1155-1171.
32. Bitonti AJ, *et al.* (1990) Cure of *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections in mice with an irreversible inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34(8):1485-1490.
33. Brun R, Schumacher R, Schmid C, Kunz C, & Burri C (2001) The phenomenon of treatment failures in Human African Trypanosomiasis. *Tropical Medicine & International Health* 6(11):906-914.
34. Balmer O & Caccone A (2008) Multiple-strain infections of *Trypanosoma brucei* across Africa. *Acta Trop.* 107(3):275-279.
35. Buckner FS & Navabi N (2010) Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Current opinion in infectious diseases* 23(6):609-616.
36. Chatelain E (2014) Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. *Journal of biomolecular screening*.
37. Moreira DR, Leite AC, dos Santos RR, & Soares MB (2009) Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Current drug targets* 10(3):212-231.
38. Coura JR & Borges-Pereira J (2012) Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(3):286-296.
39. Schmunis GA & Yadon ZE (2010) Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115(1-2):14-21.
40. Salomon OD, *et al.* (2011) [Distribution of *Lutzomyia longipalpis* in the Argentine Mesopotamia, 2010]. *Medicina* 71(1):22-26.
41. Fernandez MS, *et al.* (2013) Spatial and temporal changes in *Lutzomyia longipalpis* abundance, a *Leishmania infantum* vector in an urban area in northeastern Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108(7):817-824.
42. Salomon CJ (2012) First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences* 101(3):888-894.
43. Apt W (2010) Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug design, development and therapy* 4:243-253.
44. Spencer RC (2000) Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease 5th Edn (two volumes). *J. Antimicrob. Chemother.* 46(2):343.

45. Duschak VG & Couto AS (2009) Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. *Curr. Med. Chem.* 16(24):3174-3202.
46. Gascon J, Bern C, & Pinazo MJ (2010) Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 115(1-2):22-27.
47. Apt W (2010) Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug design, development and therapy*:243.
48. De Rissio AM, *et al.* (2010) Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non-endemic area of Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82(5):838-845.
49. Guedes PM, Silva GK, Gutierrez FR, & Silva JS (2011) Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert review of anti-infective therapy* 9(5):609-620.
50. A. Riarte EV, N. Prado, AG. Schijman, JC. Ramírez, A M. De Rissio, Y. Hernández, M. Esteva, C. Luna, A. Sinagra, AM. Ruiz (2012) "TRAENA" TRATamiento EN pacientes Adultos. Una evaluación preliminar de un ensayo clínico aleatorizado con Benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica. *VIII Taller sobre la enfermedad de Chagas importada. Avances en el tratamiento antiparasitario* 1.
51. Bern C (2011) Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *New Engl. J. Med.* 364(26):2527-2534.
52. Cerecetto H & Gonzalez M (2008) Anti-T. cruzi agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. *Mini reviews in medicinal chemistry* 8(13):1355-1383.
53. Coura JR & Borges-Pereira J (2010) Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115(1-2):5-13.
54. de Andrade AL, *et al.* (1996) Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348(9039):1407-1413.
55. Ullmann AJ, *et al.* (2006) Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(2):658-666.
56. Salomon OD, *et al.* (2009) [Distribution of vectors of visceral leishmaniasis in the Province of Corrientes, 2008]. *Medicina* 69(6):625-630.
57. Salomon O, *et al.* (2008) First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103:109-111.
58. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, & Michael A. Pfaller (2013) *Medical Microbiology, 7th Edition* (ELSEVIERHEALTH) p 880.
59. Zumla A (2010) Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *The Lancet Infectious Diseases* 10(5):303-304.
60. Handman E, Kedzierski L, Uboldi AD, & Goding JW (2008) Fishing for anti-leishmania drugs: principles and problems. *Advances in experimental medicine and biology* 625:48-60.
61. Olle H (1986) Putrescine, Spermidine, and Spermine. *Physiology* 1(1):12-15.
62. Kusano T, Berberich T, Tateda C, & Takahashi Y (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228(3):367-381.
63. T. Thomas TJT (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:244-258.
64. Birkholtz LM, *et al.* (2011) Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. *Biochem. J.* 438(2):229-244.
65. Comini MA, *et al.* (2004) Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radical Biol. Med.* 36(10):1289-1302.
66. Spinks D, *et al.* (2012) Design, synthesis and biological evaluation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase inhibitors. *ChemMedChem* 7(1):95-106.
67. Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, & Cerami A (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science (New York, N.Y.)* 227(4693):1485-1487.

68. Oza SL, Wyllie S, & Fairlamb AH (2006) Mapping the functional synthetase domain of trypanothione synthetase from *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 149(1):117-120.
69. Oza SL, Chen S, Wyllie S, Coward JK, & Fairlamb AH (2008) ATP-dependent ligases in trypanothione biosynthesis – kinetics of catalysis and inhibition by phosphinic acid pseudopeptides. *FEBS J.* 275(21):5408-5421.
70. Irigoien F, *et al.* (2008) Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free radical biology & medicine* 45(6):733-742.
71. Oza SL, Shaw MP, Wyllie S, & Fairlamb AH (2005) Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139(1):107-116.
72. Fyfe PK, Oza SL, Fairlamb AH, & Hunter WN (2008) *Leishmania* Trypanothione Synthetase-Amidase Structure Reveals a Basis for Regulation of Conflicting Synthetic and Hydrolytic Activities. *J. Biol. Chem.* 283(25):17672-17680.
73. Abdulhussein AA & Wallace HM (2014) Polyamines and membrane transporters. *Amino acids* 46(3):655-660.
74. Aziz SM, *et al.* (1996) The potential of a novel polyamine transport inhibitor in cancer chemotherapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278(1):185-192.
75. Hasne MP, Coppens I, Soysa R, & Ullman B (2010) A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Microbiol.* 76(1):78-91.
76. Carrillo C, Canepa GE, Algranati ID, & Pereira CA (2006) Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344(3):936-940.
77. Hasne MP & Ullman B (2005) Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 280(15):15188-15194.
78. Le Quesne SA & Fairlamb AH (1996) Regulation of a high-affinity diamine transport system in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem. J.* 316 ( Pt 2):481-486.
79. Burns MR, Graminski GF, Weeks RS, Chen Y, & O'Brien TG (2009) Lipophilic lysine-spermine conjugates are potent polyamine transport inhibitors for use in combination with a polyamine biosynthesis inhibitor. *J. Med. Chem.* 52(7):1983-1993.
80. Chen Y, *et al.* (2006) Combination therapy with 2-difluoromethylornithine and a polyamine transport inhibitor against murine squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 118(9):2344-2349.
81. Sugiyama S, *et al.* (1996) The 1.8-Å X-ray structure of the *Escherichia coli* PotD protein complexed with spermidine and the mechanism of polyamine binding. *Protein Sci.* 5(10):1984-1990.
82. Koch M & Waldmann H (2005) Protein structure similarity clustering and natural product structure as guiding principles in drug discovery☆. *Drug Discovery Today* 10(7):471-483.
83. Thomas GL & Johannes CW (2011) Natural product-like synthetic libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15(4):516-522.
84. Thomas G (2003) Fundamentals of Medicinal Chemistry. *Book 1.*
85. Nogrady DFWT (2005) Medicinal Chemistry. A Molecular and Biochemical Approach. . 3rd, Ed., (Oxford University Press, Inc, Oxford University 2005), vol. 1. 1.
86. Lu J-J, Pan W, Hu Y-J, & Wang Y-T (2012) Multi-Target Drugs: The Trend of Drug Research and Development. *PLoS one* 7(6):e40262.
87. Breinbauer R, Vetter IR, & Waldmann H (2002) From Protein Domains to Drug Candidates—Natural Products as Guiding Principles in the Design and Synthesis of Compound Libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41(16):2878-2890.
88. Fergus S, Bender A, & Spring DR (2005) Assessment of structural diversity in combinatorial synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9(3):304-309.
89. Evans BE, *et al.* (1988) Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystikinin antagonists. *J. Med. Chem.* 31(12):2235-2246.
90. Schreiber SL (2000) Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science (New York, N.Y.)* 287(5460):1964-1969.

91. Biggs-Houck JE, Younai A, & Shaw JT (2010) Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14(3):371-382.
92. Leslie BJ & Hergenrother PJ (2008) Identification of the cellular targets of bioactive small organic molecules using affinity reagents. *Chem. Soc. Rev.* 37(7):1347-1360.
93. Leslie M (2011) Infectious diseases. Drug developers finally take aim at a neglected disease. *Science (New York, N.Y.)* 333(6045):933-935.
94. Beghyn TB, *et al.* (2011) Drug to Genome to Drug: Discovery of New Antiplasmodial Compounds. *J. Med. Chem.* 54(9):3222-3240.
95. Njoroge M, *et al.* (2014) Recent Approaches to Chemical Discovery and Development Against Malaria and the Neglected Tropical Diseases Human African Trypanosomiasis and Schistosomiasis. *Chem. Rev.*
96. Patel G, *et al.* (2013) Kinase Scaffold Repurposing for Neglected Disease Drug Discovery: Discovery of an Efficacious, Lapatanib-Derived Lead Compound for Trypanosomiasis. *J. Med. Chem.* 56(10):3820-3832.
97. Majumder S & Kierszenbaum F (1993) Inhibition of host cell invasion and intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* by N,N'-bis(benzyl)-substituted polyamine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(10):2235-2238.
98. Bitonti AJ, McCann PP, & Sjoerdsma A (1988) The effects of polyamine analogues on malaria parasites in vitro and in vivo. *Advances in experimental medicine and biology* 250:717-726.
99. Leal SM, Amado DF, Kouznetsov VV, & Escobar P (2013) In vitro antileishmanial, trypanocidal, and Mammalian cell activities of diverse n,n' -dihetaryl substituted diamines and related compounds. *Scientia pharmaceutica* 81(1):43-55.
100. Persson K, Aslund L, Grahn B, Hanke J, & Heby O (1998) *Trypanosoma cruzi* has not lost its S-adenosylmethionine decarboxylase: characterization of the gene and the encoded enzyme. *Biochem. J.* 333 ( Pt 3):527-537.
101. Kaur K, Emmett K, McCann PP, Sjoerdsma A, & Ullman B (1986) Effects of DL-alpha-difluoromethylornithine on *Leishmania donovani* promastigotes. *The Journal of protozoology* 33(4):518-521.
102. Krause T, *et al.* (2000) The ornithine decarboxylase domain of the bifunctional ornithine decarboxylase/S-adenosylmethionine decarboxylase of *Plasmodium falciparum*: recombinant expression and catalytic properties of two different constructs. *Biochem. J.* 352 Pt 2:287-292.
103. Bitonti AJ, *et al.* (1989) Bis(benzyl)polyamine analogs inhibit the growth of chloroquine-resistant human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*) in vitro and in combination with alpha-difluoromethylornithine cure murine malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(2):651-655.
104. Labadie GR, Choi SR, & Avery MA (2004) Diamine derivatives with antiparasitic activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14(3):615-619.
105. Yamanaka CN, *et al.* (2013) Assessment of Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Aliphatic Diamine Derivatives. *Chemical biology & drug design*:n/a-n/a.
106. Caminos AP, Panozzo-Zenere EA, Wilkinson SR, Tekwani BL, & Labadie GR (2012) Synthesis and antikinoplastid activity of a series of N,N'-substituted diamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22(4):1712-1715.
107. Abdel-Magid AF & Mehrman SJ (2006) A Review on the Use of Sodium Triacetoxyborohydride in the Reductive Amination of Ketones and Aldehydes. *Organic Process Research & Development* 10(5):971-1031.
108. Gardner RA, *et al.* (2004) N1-Substituent Effects in the Selective Delivery of Polyamine Conjugates into Cells Containing Active Polyamine Transporters. *J. Med. Chem.* 47(24):6055-6069.
109. Abdel-Magid AF, Carson KG, Harris BD, Maryanoff CA, & Shah RD (1996) Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures1. *The Journal of Organic Chemistry* 61(11):3849-3862.
110. Caminos AP (2008) Síntesis de poliaminas sustituidas como agentes antiparasitarios. D (Universidad Nacional de Rosario, Rosario).

111. Salvatore RN, Yoon CH, & Jung KW (2001) Synthesis of secondary amines. *Tetrahedron* 57(37):7785-7811; da Silva CM, *et al.* (2011) Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research* 2(1):1-8.
112. Moroy G, Martiny VY, Vayer P, Villoutreix BO, & Miteva MA (2012) Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. *Drug Discovery Today* 17(1–2):44-55.
113. Hansch C & Fujita T (1964)  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *J. Am. Chem. Soc.* 86(8):1616-1626.
114. Spjuth O, Willighagen EL, Guha R, Eklund M, & Wikberg JE (2010) Towards interoperable and reproducible QSAR analyses: Exchange of datasets. *Journal of cheminformatics* 2(1):5.
115. Durairaj C, Shah JC, Senapati S, & Kompella UB (2009) Prediction of vitreal half-life based on drug physicochemical properties: quantitative structure-pharmacokinetic relationships (QSPKR). *Pharm. Res.* 26(5):1236-1260.
116. Hardy B, *et al.* (2010) Collaborative development of predictive toxicology applications. *Journal of cheminformatics* 2(1):7.
117. Joel Griffith Hardman LELaAGG (2001) Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.1835.
118. Liu F, Cao C, & Cheng B (2011) A Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) Study of aliphatic alcohols by the method of dividing the molecular structure into substructure. *International journal of molecular sciences* 12(4):2448-2462.
119. Rohwer A, Marhöfer RJ, Caffrey CR, & Selzer PM (2011) Drug Discovery Approaches toward Anti-Parasitic Agents. *Apicomplexan Parasites*, (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp 1-20.
120. <http://en.wikipedia.org/wiki/Chemometrics> (
121. Faller B & Ertl P (2007) Computational approaches to determine drug solubility. *Advanced drug delivery reviews* 59(7):533-545.
122. Wichmann K, Diedenhofen M, & Klamt A (2006) Prediction of Blood-Brain Partitioning and Human Serum Albumin Binding Based on COSMO-RS  $\sigma$ -Moments. *Journal of chemical information and modeling* 47(1):228-233.
123. Hornig M & Klamt A (2005) COSMOfrag: A Novel Tool for High-Throughput ADME Property Prediction and Similarity Screening Based on Quantum Chemistry. *Journal of chemical information and modeling* 45(5):1169-1177.
124. Goodwin JT & Clark DE (2005) In silico predictions of blood-brain barrier penetration: considerations to "keep in mind". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315(2):477-483.
125. Vilar S, Chakrabarti M, & Costanzi S (2010) Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *Journal of molecular graphics & modelling* 28(8):899-903.
126. Service MPC (2012) Molinspiration Property Calculation Service in *Molinspiration*, ed Molinspiration (Molinspiration).
127. Shanmugasundram A, Gonzalez-Galarza FF, Wastling JM, Vasieva O, & Jones AR (2013) Library of Apicomplexan Metabolic Pathways: a manually curated database for metabolic pathways of apicomplexan parasites. *Nucleic acids research* 41(Database issue):D706-713.
128. Terkawi MA & Igarashi I (2011) Drug Discovery against Babesia and Toxoplasma. *Apicomplexan Parasites*, (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp 453-467; Jortzik E & Becker K (2011) Energy Metabolism as an Antimalarial Drug Target. *Apicomplexan Parasites*, (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp 75-95.
129. Renslo AR & McKerrow JH (2006) Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nat. Chem. Biol.* 2(12):701-710.
130. Ramya TNC, Surolia N, & Surolia A (2006) Polyamine synthesis and salvage pathways in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348(2):579-584.

131. Haider N, *et al.* (2005) The spermidine synthase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: molecular and biochemical characterisation of the polyamine synthesis enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.* 142(2):224-236.
132. Baumann RJ, McCann PP, & Bitonti AJ (1991) Suppression of *Leishmania donovani* by oral administration of a bis(benzyl)polyamine analog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(7):1403-1407.
133. Bitonti AJ, *et al.* (1989) Bis(benzyl)polyamine analogs inhibit the growth of chloroquine-resistant human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*) in vitro and in combination with  $\alpha$ -difluoromethylornithine cure murine malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(2):651-655.
134. Bitonti AJ, McCann PP, & Sjoerdsma A (1988) The effects of polyamine analogs on malaria parasites in vitro and in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol.* 250(Prog. Polyamine Res.):717-726.
135. Bitonti AJ, *et al.* (1989) Bis(benzyl)polyamine analogs inhibit the growth of chloroquine-resistant human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*) in vitro and in combination with  $\alpha$ -difluoromethylornithine cure murine malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(2):651-655.
136. Kirk K & Lehane AM (2014) Membrane transport in the malaria parasite and its host erythrocyte. *Biochem. J.* 457(1):1-18; Niemand J, Louw AI, Birkholtz L, & Kirk K (2012) Polyamine uptake by the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 42(10):921-929.
137. Singh S (1997) Characterization of Simian Malarial Parasite (*Plasmodium knowlesi*)-induced Putrescine Transport in Rhesus Monkey Erythrocytes. A NOVEL PUTRESCINE CONJUGATE ARRESTS IN VITRO GROWTH OF SIMIAN MALARIAL PARASITE (*PLASMODIUM KNOWLESI*) AND CURES MULTIDRUG RESISTANT MURINE MALARIA (*PLASMODIUM YOELII*) INFECTION IN VIVO. *J. Biol. Chem.* 272(21):13506-13511.
138. Hall BS & Wilkinson SR (2012) Activation of Benzimidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(1):115-123.
139. Hall BS, Wu X, Hu L, & Wilkinson SR (2010) Exploiting the drug-activating properties of a novel trypanosomal nitroreductase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(3):1193-1199.
140. Barclay JJ, *et al.* (2011) *Trypanosoma cruzi* Coexpressing Ornithine Decarboxylase and Green Fluorescence Proteins as a Tool to Study the Role of Polyamines in Chagas Disease Pathology. *Enzyme research* 2011:657460.
141. González NS, Huber A, & Algranati ID (2001) Spermidine is essential for normal proliferation of trypanosomatid protozoa. *FEBS Lett.* 508(3):323-326.
142. Reguera RM, Tekwani BL, & Balana-Fouce R (2005) Polyamine transport in parasites: a potential target for new antiparasitic drug development. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 140(2):151-164.
143. Roberts SC, *et al.* (2007) *Leishmania donovani* Polyamine Biosynthetic Enzyme Overproducers as Tools To Investigate the Mode of Action of Cytotoxic Polyamine Analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(2):438-445.
144. Pegg AE & Michael AJ (2010) Spermine synthase. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(1):113-121.
145. Muth A, *et al.* (2014) Polyamine Transport Inhibitors: Design, Synthesis, and Combination Therapies with Difluoromethylornithine. *J. Med. Chem.* 57(2):348-363.
146. Melchiorre C, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, & Tumiatti V (2010) Polyamines in Drug Discovery: From the Universal Template Approach to the Multitarget-Directed Ligand Design Strategy. *J. Med. Chem.* 53(16):5906-5914.
147. Hall BS, Bot C, & Wilkinson SR (2011) Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J. Biol. Chem.* 286(15):13088-13095.
148. Sharma SK, *et al.* (2010) (Bis)urea and (bis)thiourea inhibitors of lysine-specific demethylase 1 as epigenetic modulators. *J. Med. Chem.* 53(14):5197-5212.

149. Huang Y, *et al.* (2007) Inhibition of lysine-specific demethylase 1 by polyamine analogues results in reexpression of aberrantly silenced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(19):8023-8028.
150. Huang Y, Marton LJ, Woster PM, & Casero RA (2009) Polyamine analogues targeting epigenetic gene regulation. *Essays in biochemistry* 46:95-110.
151. Roberts SC (2013) Genetic manipulation of Leishmania parasites facilitates the exploration of the polyamine biosynthetic pathway as a potential therapeutic target. *Advances in Genetics Research* 10:29-54.
152. Casero RA & Pegg AE (1993) Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism. *The FASEB Journal* 7(8):653-661.
153. Poulin R, Casero RA, & Soulet D (2012) Recent advances in the molecular biology of metazoan polyamine transport. *Amino acids* 42(2-3):711-723.
154. Igarashi K & Kashiwagi K (2010) Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42(1):39-51.
155. Masuko T, *et al.* (2003) Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *J. Neurochem.* 84(3):610-617.
156. Igarashi K & Kashiwagi K (2010) Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol. Biochem.* 48(7):506-512.
157. Lu Wang HLP, Jane Juusola, Martin Kline, and Otto Phanstiel IV (2001) Influence of Polyamine Architecture on the Transport and Topoisomerase II Inhibitory Properties of Polyamine DNA-Intercalator Conjugates. *J. Med. Chem.* 44( 3682-3691): 3682-3691.
158. Engel JC, *et al.* (2010) Image-based high-throughput drug screening targeting the intracellular stage of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas' disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(8):3326-3334.
159. Casero RA, Jr. & Woster PM (2009) Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *J. Med. Chem.* 52(15):4551-4573.
160. Zhu Q, *et al.* (2012) Polyamine analogs modulate gene expression by inhibiting lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and altering chromatin structure in human breast cancer cells. *Amino acids* 42(2-3):887-898.
161. Hunter WN, *et al.* (1992) Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design. *Journal of molecular biology* 227(1):322-333.
162. Brinck T, Murray JS, & Politzer P (1992) Surface electrostatic potentials of halogenated methanes as indicators of directional intermolecular interactions. *Int. J. Quantum Chem* 44(S19):57-64.
163. Doyle PS, *et al.* (2010) A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(6):2480-2488.
164. Oza SL, Ariyanayagam MR, Aitcheson N, & Fairlamb AH (2003) Properties of trypanothione synthetase from Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* 131(1):25-33.
165. Pegg AE, Poulin R, & Coward JK (1995) Use of aminopropyltransferase inhibitors and of non-metabolizable analogs to study polyamine regulation and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 27(5):425-442.
166. Wu F & Gehring H (2009) Structural requirements for novel coenzyme-substrate derivatives to inhibit intracellular ornithine decarboxylase and cell proliferation. *The FASEB Journal* 23(2):565-574.
167. Marioara Bem FB, Constantin Draghici, Miron T. Caproiu, Marilena Vasilescu, Mariana Voicescu, Adrian Beteringhe, Agneta Caragheorghopol, Maria Maganu, Titus Constantinescu and Alexandru T. Balaban (2007) Synthesis and fluorescent properties of new derivatives of 4-amino-7-nitrobenzofurazan. *ARKIVOC* 2007(13):87-104.
168. Hirumi H & Hirumi K (1989) Continuous cultivation of Trypanosoma brucei blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *The Journal of parasitology* 75(6):985-989.

169. Bakalara N, Kendall G, Michels PA, & Opperdoes FR (1992) Trypanosoma brucei glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes are stage-regulated at the transcription level. *EMBO J.* 11(10):3808.