

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y  
FARMACÉUTICAS



| UNR |



**ESTUDIO DE REACCIONES DE PRENILACIÓN  
COMO HERRAMIENTA PARA EL ABORDAJE DE  
PROBLEMÁTICAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS**

Autor: Exequiel Oscar Jesús Porta

Director: Dr. Guillermo Roberto Labadie

Lugar de trabajo:

Instituto de Química Rosario

IQUIR-CONICET

**2015**

# **ESTUDIO DE REACCIONES DE PRENILACIÓN COMO HERRAMIENTA PARA EL ABORDAJE DE PROBLEMÁTICAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS**

Exequiel Oscar Jesús Porta

Licenciado en Biotecnología, 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 Nacional 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 la Unidad Orgánica del Instituto de Química de Rosario (IQUIR-CONICET), dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril del 2010 y el 10 de febrero de 2015, bajo la dirección de la Dr. Guillermo Roberto Labadie.

Exequiel Porta  
DNI 30.710.966

*“La utopía está en el horizonte. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos.  
Camino diez pasos, y el horizonte se desplaza diez pasos más allá.  
Por mucho que camine, nunca la alcanzaré.  
Entonces, ¿Para qué sirve la utopía?  
Para eso: sirve para caminar.”*

Eduardo Galeano.

El presente trabajo de Tesis está dedicado a mi familia: Mis padres Carlos y Estella y mis hermanos: Elián, Hernán, Andrés y Sofía.

Ellos son mi sostén, alegría y compañía. Sin ellos no hubiera podido completar muchas de mis metas y mis sueños.

Dedico el trabajo a mi compañera de vida: Julieta. Por su amor incondicional y caminar siempre a mi lado.

El presente trabajo de Tesis va dedicado a mi director: Guillermo Labadie.

Por todos los años que compartimos juntos y por la amistad forjada.

Referente como investigador científico y como persona.

A mis amigos y amigas (que más que amigos son hermanos). Realmente tengo suerte de tenerlos en cantidad y calidad. Por las vivencias compartidas y por las que vendrán. En especial a mi núcleo conocido como “Los vikingos”.

A mis abuelos que me guían desde otro lugar.

A las personas con las que comparto o en algún momento compartí amistad en el laboratorio: Dra. Raquel Cravero, Dra. Liliana Luna, Dra. Andrea Bracca, Dr. Esteban Panozzo Zénere, Lic. Sebastián Jäger, Lic. Diego Ghiano, Lic. Lucía Fagnoli, Lic. Maira Caravajal. Por su excelencia académica y calor humano. Por crear una atmósfera de trabajo sobresaliente.

A los CPA: Ing. Sergio Tindiglia y Ms. Pablo Duché, técnicos del RMN. Por las ayudas brindadas, junto con el Dr. Manuel González Sierra. Al Lic. Guillermo Marcuzzi, técnico del CG-MS. A Gustavo Millan, técnico del LC-qTOF.

A los colaboradores externos: Dr. Babu Tekwani, Dra. Isabel Nocito, Dr. José M. Padrón, Dr. Alejandro Katzin, por las pruebas de actividades biológicas de las colecciones sintetizadas. En especial a Alejandro y su grupo de trabajo por recibirme con las puertas abiertas y hacer que mi pasantía en el extranjero sea inolvidable.

A todos los integrantes del IQUIR-CONICET.

A todo el personal docente del área de Química Inorgánica, donde desempeño funciones docentes.

Al jurado que evaluará esta Tesis Doctoral: Dr. Luis Bruno-Blanch, Dra. Rosana Misico y Dr. Eduardo Rodríguez, así como a mi tutora Dra. Carina Delpiccolo.

A todos aquellos que fueron influencias positivas en el recorrido de mi vida porque me hicieron avanzar y me seguirán haciendo avanzar rumbo a nuevas experiencias y desafíos.

Y por supuesto muy especialmente a Dios y a nuestro país. Sin olvidar a los avances de las políticas en Ciencia y Tecnología que se vinieron realizando desde esta última década. Por más y mejor educación pública y excelencia académica.

Eternamente agradecido.

Exequiel.

## INDICE

0	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	i
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA CIENCIA NATURAL Y LA GÉNESIS DE NUEVAS DISCIPLINAS	2
1.2	LA QUÍMICA MEDICINAL Y SU OBJETO DE ESTUDIO	3
1.3	DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS	5
1.3.1	FASE 0: ORIGEN DE LOS NUEVOS MEDICAMENTOS	5
1.3.2	FASES PRECLÍNICAS Y CLÍNICAS	7
1.3.3	INDUSTRIA FARMACÉUTICA: UNA MIRADA SINTÉTICA GLOBAL Y REGIONAL	10
1.4	LA QUÍMICA MEDICINAL COMO HERRAMIENTA ESTRATÉGICA EN LAS FASES TEMPRANAS DEL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS.	12
1.4.1	HERRAMIENTAS PROVENIENTES DE LA TECNOLOGÍA DE LA INFORMÁTICA (TI)	13
1.4.2	HERRAMIENTAS PROVENIENTES DE LA QUÍMICA	16
1.4.3	HERRAMIENTAS PROVENIENTES DE LOS PRODUCTOS NATURALES	19
1.4.4	HERRAMIENTAS PROVENIENTES DE LA BIOLOGÍA	20
1.5	METABOLÓMICA Y LA EXPLORACIÓN DEL ESPACIO QUÍMICO COMO RESPUESTA A LA NECESIDAD DE GENERAR NUEVOS COMPUESTOS	21
1.6	EL MUNDO DE LOS TERPENOS	23
1.6.1	DEFINICIÓN Y ABUNDANCIA NATURAL	23
1.6.2	CLASIFICACIÓN	24
1.6.3	BIOSÍNTESIS	26
1.7	REACCIONES DE ISOPRENILACIÓN EN LA NATURALEZA Y LAS IMPLICANCIAS FARMACOLÓGICAS.	30
1.7.1	ISOPRENILACIONES EN PROTEÍNAS	30
1.7.2	ISOPRENILACIÓN DE METABOLITOS	33
1.8	BIBLIOGRAFÍA	39
2	ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS	44
2.1	BIBLIOGRAFÍA	53
3.	BIOINFORMÁTICA Y QUIMIOINFORMÁTICA	54
3.1.	SOBRE LA BIOINFORMÁTICA Y LA GENÓMICA COMPARATIVA	55
3.2.	SOBRE LA QUIMIOINFORMÁTICA	58
3.3.	SOBRE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	60

3.4.	BIBLIOGRAFÍA	63
4.	OBJETIVOS	64
5.	ISOPRENILAZIDAS COMO HERRAMIENTAS PARA LA GENERACIÓN DE DIVERSIDAD QUÍMICA	66
5.1	USO DE AZIDAS ORGÁNICAS EN LA PREPARACION DE FÁRMACOS	67
5.1.1	AZIDAS ALÍLICAS Y EL REARDENAMIENTO SIGMATRÓPICO: HISTORIA Y ESTADO DEL ARTE.	68
5.2	SÍNTESIS QUÍMICA DE AZIDAS ORGÁNICAS	70
5.3	ESTUDIOS EXPERIMENTALES Y TEÓRICOS DE LA COMPOSICIÓN EN EL EQUILIBRIO DE AZIDAS ALÍLICAS.	71
5.3.1	EXPANSIÓN DEL SISTEMA EN ESTUDIO A SUSTRATOS AROMÁTICOS	78
5.4	REACTIVIDAD DE ISOPRENIL AZIDAS	83
5.4.1	CICLOADICIONES 1,3-DIPOLARES AZIDO-ALQUINO CATALIZADA POR Cu(I)	84
5.4.2	CICLOADICIÓN TÉRMICA INTRAMOLECULAR DE ISOPRENILAZIDAS	90
5.5	USO DE ISOPRENILAZIDAS PARA LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS CONTRA ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS	104
5.6	ACTIVIDAD IN VITRO EN <i>T. CRUZI</i> Y <i>L. DONOVANI</i>	108
5.7	ESTUDIOS DE LA QUIMIOTECA EN LA ENZIMA CYP51	112
5.7.1	CYP51: ESTEROL 14 $\alpha$ -DEMETILASA	112
5.8	BIBLIOGRAFÍA	118
6.	REACCIONES DE ISOPRENILACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS COMO VÍA DE GENERACIÓN DE PRODUCTOS SINTÉTICOS CON ALTO VALOR BIOLÓGICO	120
6.1	RELEVANCIA BIOLÓGICA DE FENOLES ISOPRENILADOS	122
6.2	SÍNTESIS DE FENOLES ORTO-ISOPRENILADOS (FOI)	125
6.2.1	REACCIÓN DE FRIEDEL-CRAFTS COMO HERRAMIENTA PARA GENERAR FOIs.	125
6.2.2	SINTESIS DE FENOLES ISOPRENILADOS A PARTIR DE METOXIFENOLES	128
6.2.3	EXPANSIÓN DE LA METODOLOGÍA A OTROS SUSTRATOS: ANILLOS AROMÁTICOS MONOHIDROXILADOS	135
6.2.4	EXPANSIÓN DE LA METODOLOGÍA A OTROS SUSTRATOS: ANILLOS AROMÁTICOS POLIHIDROXILADOS.	139
6.3	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA QUIMIOTECA PREPARADA	144
6.4	SÍNTESIS DE METABOLITOS DE ALTA RELEVANCIA	148
6.4.1	VITAMINA K2	149
6.4.2	VITAMINA K1	152
6.5	BIBLIOGRAFÍA	155

7.	REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS ISOPRENILADOS	157
7.1	DIAGRAMA DE TRABAJO	158
7.2	ESTRATEGIA “DRUG TO GENOME TO DRUG”.	159
7.3	ISOPRENILACIÓN DE PROTEINAS COMO BLANCO TERAPÉUTICO.	160
7.4	VALIDACIÓN INFORMÁTICA DEL BLANCO	162
7.5	DISEÑO RACIONAL Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS.	165
7.5.1	FAMILIA DE COMPUESTOS TIO-ALQUILADOS (FTA)	167
7.5.2	FAMILIA DE COMPUESTOS TRIAZOLIL-TIOSALICILATOS (FTT)	170
7.5.3	ESTUDIOS QUIMIOINFORMÁTICOS	171
7.6	ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD IN VITRO DE LAS QUIMIOTECAS	176
7.6.1	RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y ANTIPLASMÓDICA	176
7.6.2	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA	182
7.7	BIBLIOGRAFÍA	186
8.	RESUMEN Y CONCLUSIONES	187
9.	MATERIALES Y MÉTODOS	192
10.	ESPECTROS SELECCIONADOS	265

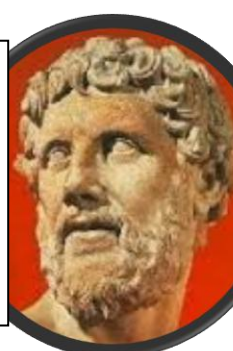
# ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

## 2015



El ser humano siempre se cuestionó sobre la conformación de la materia hasta que Demócrito propone su modelo atómico, aproximadamente en el año 400 antes de Cristo.

Demócrito, que era discípulo de Leucipo, enuncia que la materia se encuentra formada por diminutas partículas, las cuales no pueden ser divididas. Estas partículas indivisibles se las llamó átomos (palabra griega que significa indivisible).



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Å:	Angstrom
AA	Aminoácidos
Ac:	Grupo acetilo
AcOEt:	Acetato de etilo
ADMET	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad
AdoMet:	S-adenosil-L-metionina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AFTS	Ácido farnesil tiosalicilato
Anh:	Anhidro
ANMAT	Agencia Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ASP	Área superficial polar
ATP	Adenosin Trifosfato
BB:	Del inglés, Broad Band
BLAST	Del inglés, Basic Local Alignment Search Tool
Bn:	Bencilo
c:	Cuadruplete
C:	Carbono
CCD:	Cromatografía en capa delgada
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CG-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a masa
CYP	Citocromo P450
d:	Doblete
Da:	Dalton
DBU:	Diazabicicoundec-7-eno
DCM:	Diclorometano
dd:	Doble doblete
DEPT:	Del inglés, Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DFT	Del Inglés, Teoría de densidad funcional
DMAPP	Dimetilalil difosfato

DMF:	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPPA:	Difenilfosforazidato
Ea*	Energía de activación en fase gas
EBI	Del inglés, European Bioinformatics Institute
EE. UU.:	Estados Unidos
EMBL	Del inglés, Laboratorio Europeo de Biología Molecular
EMA	Del Inglés, Agencia de Medicina Europea
enO:	Efecto Nuclear Overhauser
eq:	Equivalentes
ETD	Enfermedades tropicales desatendidas
FDA	Del inglés, Food and Drug Administration
FOI	Fenoles <i>orto</i> -isoprenilados
FPP	Farnesil Pirofosfato
FT	Farnesil transferasa
FTA	Familia Tiosalicilato tio-Alquilados
FTI	Inhibidores de la farnesil transferasa
FTT	Familia Triazolil Tiosalicilatos
g:	Gramos
Glu:	Glutamato
GPP	Geranil Pirofosfato
GGPP	Geranil geranil pirofosfato
GGT1	Geranil geranil transferasa del tipo I
GGT2	Geranil geranil transferasa del tipo II
hept:	Heptuplete
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HSQC <small>editado</small> :	Del inglés, Heteronuclear Single Quantum Coherence Edited
HTS	Por las siglas en inglés de High Throughput Screening.
Hz:	Hertz
IA	Isoprenil azidas
IBE:	Inhibidor de la biosíntesis de ergosterol

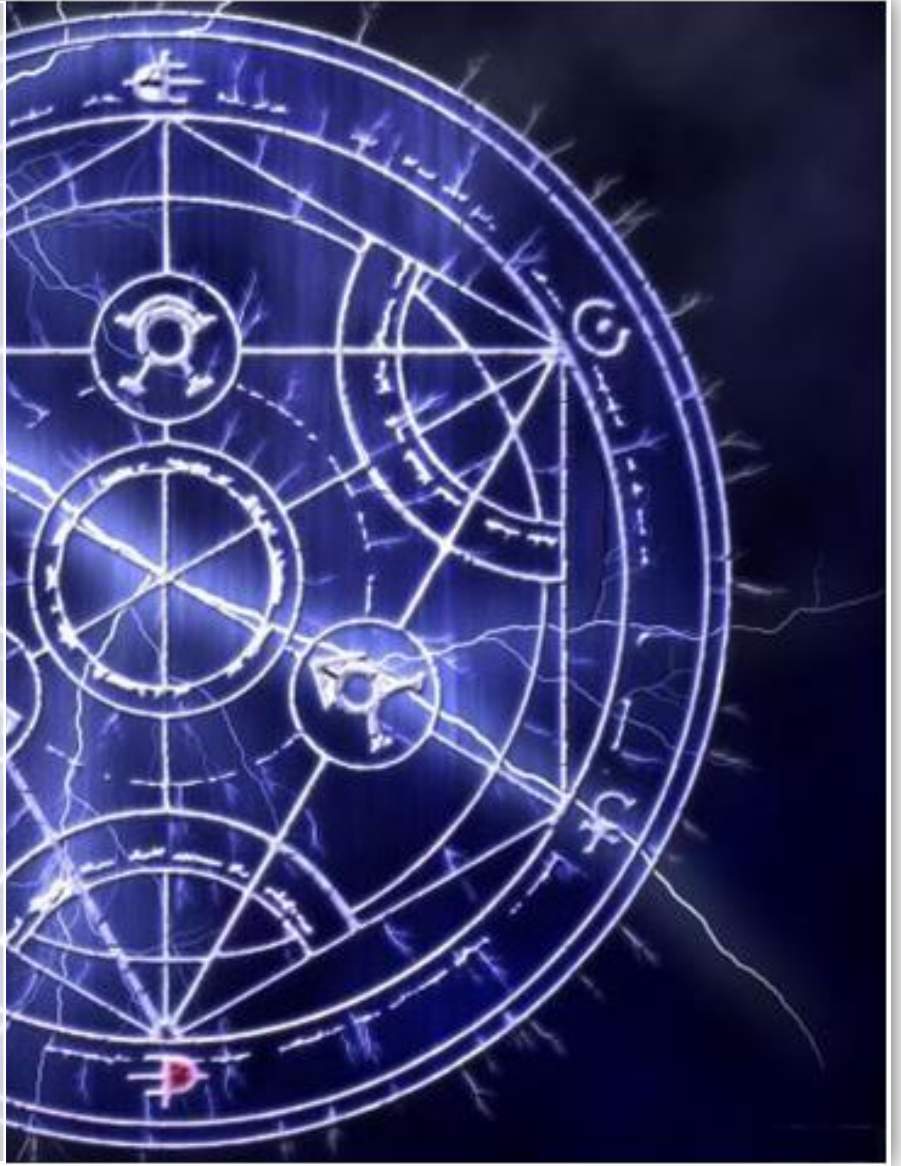
IBR	Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario
IC <sub>50</sub> :	Concentración inhibitoria del 50% de actividad
ICMT	Isoprenilcisteín carboximetil transferasa
IPP	Isopentenil difosfato
IQUIR	Instituto de Química de Rosario
IR:	Infrarrojo
IRC	Del inglés, coordenadas de reacción intrínsecas
IT	Isopreniltriazoles
IUPAC	En inglés, International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i> :	Constante de acoplamiento escalar
<i>k</i> :	Constante cinética
kCal	Kilocalorías
KDa:	Kilodalton
LD <sub>50</sub>	del inglés, dosis letal media
LogP	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua
<i>m</i> :	Multiplete
<i>M</i> :	Molar
MeOD:	Metanol deuterado
MeOH:	Metanol
mg:	Miligramo
mL:	Mililitro
mmoles:	Milimoles
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	Del inglés, Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NCS	N-cloro succinimida
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
PBI:	Producto Bruto Interno
ppm:	Partes por millón
<i>q</i> :	Quinteto
QSAR	Del inglés, Quantitative Structure Activity Relationship

REP	Proteínas Rab específicas
RMN de <sup>13</sup> C:	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H:	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
s:	Singlete
s:	Segundos
SAM:	Véase AdoMet
SAR	En inglés, Structure Activity Relationship
S <sub>E</sub> Ar:	Sustitución electrofílica aromática
SOB	Síntesis orientada a la biología
SOD	Síntesis orientada a la diversidad
t:	Triplete
t <sub>1/2</sub>	Tiempo de vida medio
<sup>t</sup> BuOH:	Tert-Butanol
T-Coffee	Del inglés, Tree-based Consistency Objective Function For alignment Evaluation
TDR:	Del inglés, Programa especial para la investigación y el entrenamiento en enfermedades tropicales desatendidas
THF:	Tetrahidrofurano
TI	Tecnología de la informática
UMA	Unidad de masa atómica
USP	Universidad de São Paulo
UV:	Ultravioleta
ZPE	Del inglés, Energía del punto cero
δ:	Desplazamiento Químico
ΔG*	Diferencia de energía libre de Gibbs en fase gas
μL:	Microlitro
μM:	Micromolar
ν <sub>max</sub> :	Frecuencia máxima (IR)
°C:	Grados centígrados

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

# 2015



En la historia de la ciencia, la **alquimia** (del árabe **الخيمياء** [al-khīmiyā]) es una antigua práctica protocientífica y una disciplina filosófica que combina elementos de la química, la metalurgia, la física, la medicina, la astrología, la semiótica, el misticismo, el espiritualismo y el arte. La alquimia fue practicada en Mesopotamia, el Antiguo Egipto, Persia, la India y China, en la Antigua Grecia y el Imperio romano, en el Imperio islámico y después en Europa hasta el siglo XVIII, en una compleja red de escuelas y sistemas filosóficos que abarca al menos 2 500 años.



## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA CIENCIA NATURAL Y LA GÉNESIS DE NUEVAS DISCIPLINAS

**H**asta los albores del siglo XVII sólo existía una Ciencia Natural. Con la adquisición de nuevos conocimientos, esta se dividió en diversas ramas, dando lugar a las denominadas cuatro ciencias naturales clásicas: Química, Física, Biología y Geología. La continua evolución de los conocimientos provocó la génesis de nuevas especialidades (Bioquímica, Biofísica, Geoquímica, Geofísica, Físicoquímica, Paleontología, etc.) como híbridos de las anteriores. El desarrollo constante e intrínseco de la ciencia es la fuerza vital que genera nuevas direcciones y focos de atención para nuestras investigaciones. En años recientes la especialización se ha ido acentuando llegando a lo que se consideran las terceras y cuartas generaciones de las Ciencias Naturales.

Las investigaciones recientes en química orgánica, una de las principales ramas de la química, abarcan un espectro increíblemente diverso de alta relevancia en el mundo actual (**Figura 1.1**). La química orgánica posee áreas de investigaciones dentro de la medicina,<sup>[1.1]</sup> el medio ambiente,<sup>[1.2]</sup> la química biológica,<sup>[1.3]</sup> las ciencias de los materiales<sup>[1.4]</sup> y la energía,<sup>[1.5]</sup> entre otras.

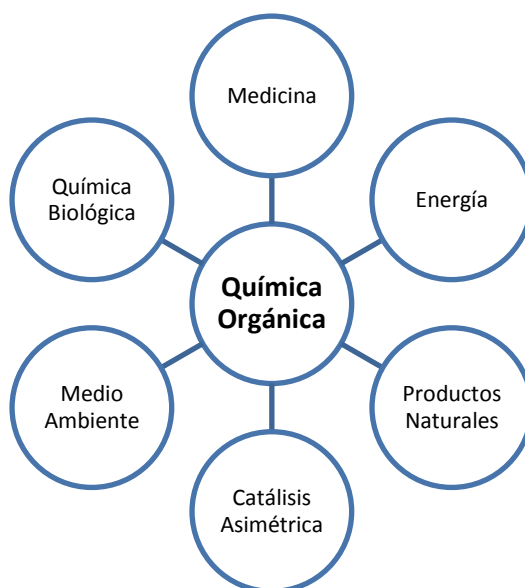


Figura 1.1. Múltiples áreas de investigación en química orgánica.

Desde hace más de 50 años, los científicos han utilizado los conceptos y técnicas de la química para estudiar los sistemas vivos. Para poder medir la trascendencia de la conexión entre el mundo químico y el biológico, basta como ejemplo mencionar que el éxito de la secuenciación del genoma humano<sup>[1.6]</sup> se cimienta en el empleo de un secuenciador de ADN desarrollado en 1986, basado en métodos de secuenciación químicos.<sup>[1.7]</sup>

Prosiguiendo con la tesis, las pequeñas moléculas orgánicas son una poderosa herramienta para estudios biológicos y medicinales. Estas moléculas pueden actuar como principios activos farmacológicos o como sondas para ayudar a elucidar la regulación de los procesos biológicos. Desde una visión reduccionista, comprender estos procesos permite entender el comportamiento de un sistema biológico.

El fin último de responder las preguntas fundamentales del hombre sobre qué es y cómo funciona la vida, ha hecho (y sigue haciendo en la actualidad) que gran parte de los trabajos en química sean de naturaleza bioquímica.

## 1.2 LA QUÍMICA MEDICINAL Y SU OBJETO DE ESTUDIO

Con profundas raíces en la química y en frontera difusa con la farmacología, se erige la Química Medicinal. Según una definición de la IUPAC (1972) la química medicinal abarca: “El descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del modo de acción de compuestos biológicamente activos en general, al nivel molecular. El estudio, identificación y síntesis de los productos del metabolismo de las drogas y compuestos relacionados”.<sup>[1.8]</sup> La química medicinal se nutre de diversas disciplinas y herramientas convergentes, por lo tanto requiere esfuerzos mancomunados en un ambiente interdisciplinario para desarrollar sus objetivos en forma sinérgica y cooperativa (**Figura 1.2**).

Etimológicamente, la palabra fármaco proviene del griego “*Phármakon*” cuyo significado es tan vasto que incluye a palabras como remedio, cura, droga o pintura. La aplicación de los fármacos es tan antigua como la humanidad. Esto se ilustra con las evidencias de que los primeros indicios de su uso se remontan al período paleolítico, el más extenso del hombre.

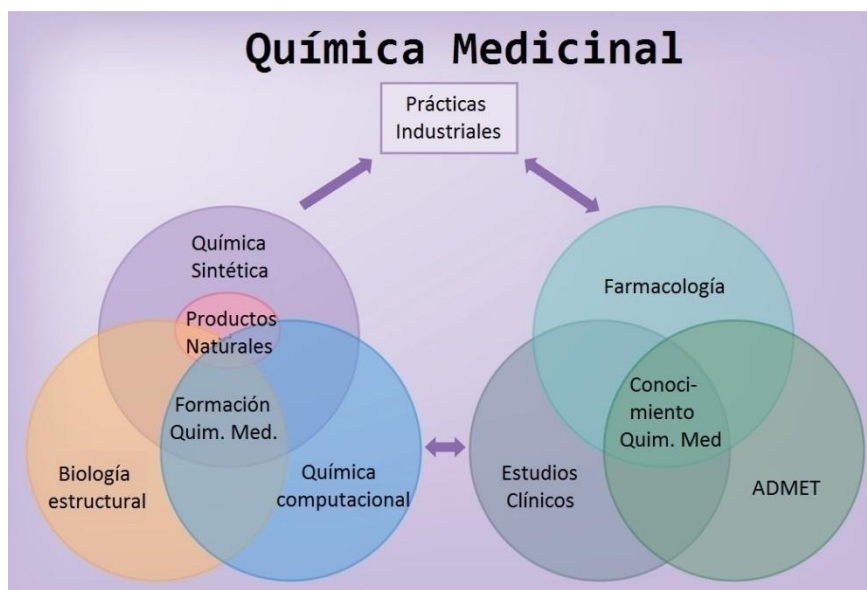


Figura 1.2. Desarrollo interdisciplinario de la química medicinal.

La naturaleza y en particular las plantas, han contribuido enormemente desde la antigüedad a la medicina. En China, el uso del alcaloide efedrina (principio activo aislado originalmente de *Ephedra distachya*, conocida en extremo oriente como “*Ma huang*”) se remonta al año 3000 antes de Cristo. Paralelamente, en las civilizaciones de la Mesopotamia se utilizaban hacia el año 2600 a.C. unas 1000 sustancias derivadas de plantas. En el antiguo Egipto se mencionan alrededor de 700 fórmulas magistrales y remedios en el papiro de Ebers, escrito en el año 1500 a.C.<sup>[1.9]</sup> Espacial y temporalmente más próximos, en las culturas americanas precolombinas era muy extendido el uso de la quina, la corteza del árbol *Cinchona officinalis*, que fue por siglos el mejor febrífugo, antiséptico y antimalárico.

La racionalización occidental del uso de medicamentos ocurrió en los imperios de Grecia y Roma, entre los que se destacan los trabajos de Dioscórides y Galeno (considerado el padre de la farmacología). Estos conocimientos se preservaron y ampliaron por los árabes en los siglos posteriores y han continuado, aún en la actualidad, jugando un importante papel en la salud humana, sobre todo en el tratamiento del cáncer.<sup>[1.10]</sup>

El inicio formal de la quimioterapia moderna se da por la enunciación de la Teoría de los receptores, formulada por el médico y bacteriólogo alemán Paul Ehrlich. El término “bala mágica” con el que se suele denominar a los agentes quimioterapéuticos se comienza a acuñar desde la síntesis del Salvarsan 606 en el año 1901 para el tratamiento de la sífilis.

En la década del '50 se introdujo en el mercado el fármaco Talidomina desarrollado por la farmacéutica alemana Grünenthal GmbH, que actuaba como sedante y calmante de náuseas durante los primeros meses de embarazo. Tuvo un gran éxito debido a su aparente inocuidad. Sin embargo, en 1961 se comprobaron los efectos teratogénicos del fármaco, siendo responsable de severas malformaciones irreversibles de miles de bebés que nacieron durante esos años. Investigaciones posteriores demostraron que los efectos teratogénicos se debían al enantiómero S de la molécula, mientras que el efecto sedante al R. Desde ese momento se modificaron todos los protocolos en el mundo para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. A pesar que en los últimos años se han realizado avances considerables en las diferentes etapas del proceso, actualmente el descubrimiento de nuevas drogas requiere un enorme esfuerzo en términos de investigación, tiempo y costo, particularmente en enfermedades que no poseen drogas, o que son ineficaces.

### 1.3 DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS.

#### 1.3.1 FASE 0: ORIGEN DE LOS NUEVOS MEDICAMENTOS.

La búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos está fundamentalmente orientada a moléculas pequeñas (con un tamaño menor a 500 Daltons), cuyas propiedades les permiten interactuar, modular y perturbar la función de determinados procesos biológicos relacionados con la enfermedad que se está tratando. La llegada de la robótica, la bioinformática, la biotecnología, el modelado molecular (química *in silico*), el cribado de alto rendimiento (en inglés, *High Throughput Screening* o *HTS*), y los métodos de síntesis modernos, fueron consideradas la panacea del descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos desde comienzo de este nuevo siglo.

Como se discutió en el apartado anterior, se requiere de un enorme esfuerzo en tiempo y dinero para desarrollar nuevos fármacos. Para ilustrar la magnitud de un proyecto farmacéutico, se deben investigar entre 5.000 y 10.000 compuestos diferentes, en un proceso que puede durar entre 8 y 12 años para que únicamente un medicamento culmine todo el proceso desde su descubrimiento hasta su utilización clínica. Monetariamente, la inversión gira en torno a los 500 a 1.000 millones de dólares por cada nueva entidad molecular comercial (**Figura 1.3**). En años recientes, la urgencia de encontrar fármacos útiles para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el brote de

influenza H1N1 o la epidemia de ébola del año 2014, ha hecho que la FDA adoptara modificaciones especiales en su reglamentación que permitieron el rápido desarrollo e introducción a la clínica de nuevos tratamientos luego de sólo unos pocos años de desarrollo e investigación.

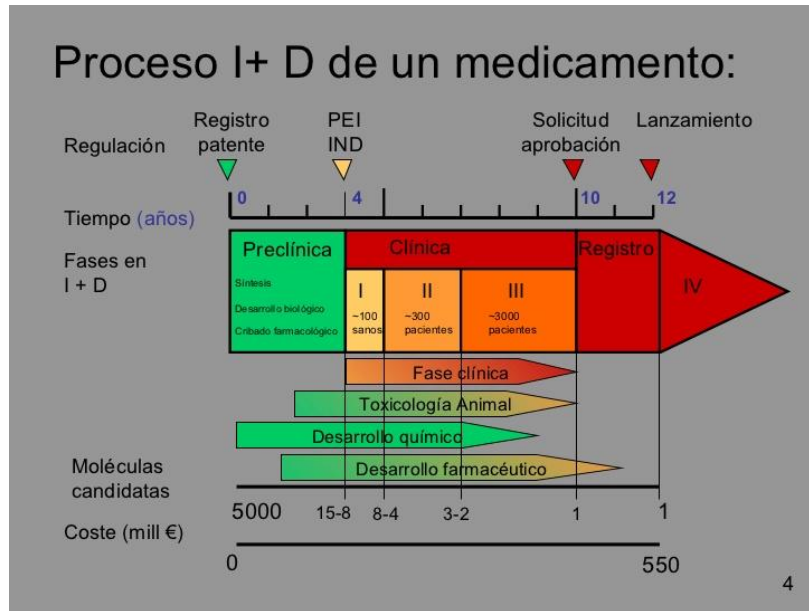


Figura 1.3. Desarrollo de un medicamento. Imagen adaptada de farmaindustria.es

La fase 0 del proceso involucra la obtención de las nuevas entidades químicas y la búsqueda de actividades biológicas novedosas. La primera parte, de carácter mayormente químico, se enfoca en el desarrollo de estructuras moleculares. El consenso científico actual clasifica cinco fuentes primarias de origen de los nuevos compuestos (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Clasificación de los fármacos de acuerdo a la fuente donde se originan.

Fuente	Descripción
<b>Extracción y purificación de un principio activo presente en un producto natural</b>	Aproximadamente el 50% de las nuevas drogas derivan de productos naturales o son productos naturales, de los cuales la mitad corresponde a productos derivados de plantas ( <b>Figura 1.4</b> ).
<b>Modificación química de una molécula ya conocida</b>	Existen dos metodologías de trabajo en la utilización de este diseño: <ul style="list-style-type: none"> <li>• La búsqueda de la optimización de los parámetros farmacológicos y eficiencia de drogas conocidas.</li> <li>• La búsqueda de nuevos fármacos con nuevas actividades, partiendo de drogas ya conocidas.</li> </ul>

<b>Síntesis química de una nueva molécula</b>	Basado en el estudio de moléculas creada “al azar”. Utiliza herramientas de la química combinatoria y de la síntesis orientada a la diversidad.
<b>Diseño racional de fármacos basados en la relación estructura–actividad</b>	Utiliza la comprensión del mecanismo patogénico de la enfermedad a nivel molecular para generar nuevas estructuras. Si bien es la fuente “ideal” de nuevos fármacos, es de las menos eficientes debido al incompleto conocimiento de las bases moleculares de las enfermedades humanas.
<b>Utilización de la Biotecnología</b>	Mediante técnicas de biología molecular y de la genética se obtienen péptidos o mediante la sobreexpresión de fármacos. en organismos unicelulares

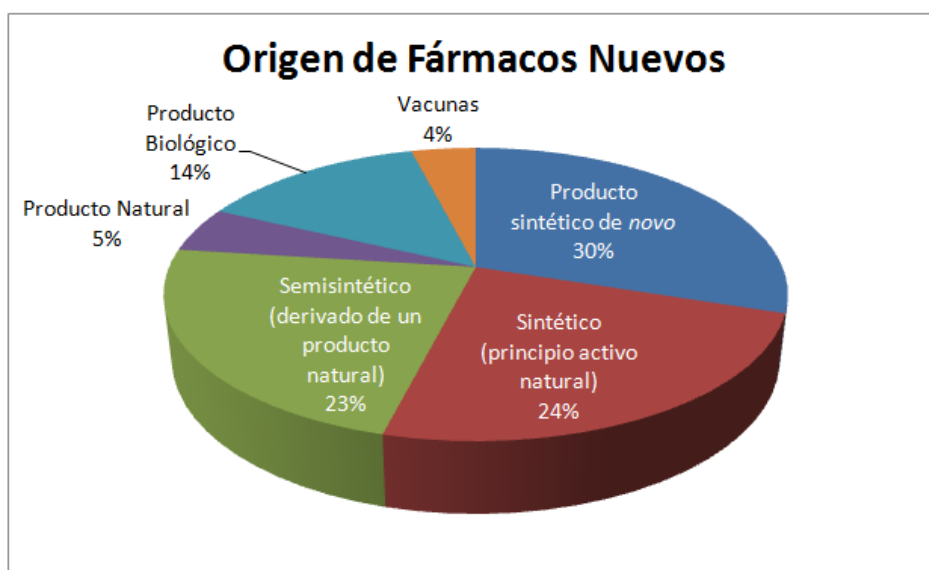


Figura 1.4. Origen de los fármacos nuevos, según su procedencia. Imagen adaptada de FDA.gov

La evaluación de nuevos fármacos en la industria farmacéutica se guía generalmente en nuestro hemisferio por las normativas impuestas por la *Food and Drug Administration* (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América. En Argentina el ente responsable de aprobar y realizar la evaluación de los nuevos agentes quimioterapéuticos es la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), bajo la esfera del Ministerio de Salud.

### 1.3.2 FASES PRECLÍNICAS Y CLÍNICAS.

Caracterizada en forma completa todas las propiedades fisicoquímicas de las nuevas moléculas, los candidatos que sorteen los filtros químicos, prosiguen con los estudios

preclínicos. En esta fase, de perfil meramente biomédico y farmacológico, se determinan las actividades biológicas, la eficiencia y la seguridad del nuevo candidato. Dependiendo la naturaleza del blanco farmacológico, los ensayos se realizan a escala molecular (pruebas directas en la diana molecular), celular (en el organismo patógeno o en cultivos celulares), en órganos aislados y finalmente en animales. Los resultados de los estudios deben generar un perfil detallado de las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los candidatos, incluyendo su potencial toxicológico (agudo, subagudo y crónico) a corto y largo plazo, potencial teratogénico y carcinogénico, dosis letal mínima y media (LD<sub>50</sub>, por sus siglas en inglés). Constituye el filtro biológico clave para aquellos compuestos que continuarán en las fases clínicas del estudio de drogas.

La fase preclínica es una etapa crítica en la evolución de un candidato, sin embargo posee una serie de limitaciones. En primera instancia se requiere un alto número de animales para validar los resultados, por lo que comenzaron a sumar importancia los estudios en cultivos celulares o tejidos, o el uso de nuevos modelos animales, como *Caenorhabditis elegans*. Luego, la diferencia genética y bioquímica entre los modelos animales y el humano no permiten extrapolar en forma directa los resultados. Por último, la falta de detección de efectos adversos poco frecuentes también constituye una limitación.

A pesar de la fuerte coordinación interdisciplinaria, menos del 0,1 % de los compuestos logran avanzar a la fase clínica necesaria para desarrollar un fármaco que sea idóneo en términos de eficiencia y seguridad para el tratamiento de una enfermedad. En estas condiciones se presenta un expediente con todos los ensayos preclínicos del fármaco a los organismos regulatorios como la ANMAT en Argentina, la FDA en Estados Unidos o la Agencia de Medicina Europea (EMA, por sus siglas en inglés) en la Unión Europea. Si resulta aprobado se comienzan con los ensayos clínicos en humanos, a través de 4 fases de investigación. Todas las fases están reguladas por los principios generales éticos enumerados en el Código de Núremberg, la declaración de Helsinki y la Conferencia Internacional de Armonización.<sup>[1.11]</sup>

- 1. Ensayo clínico en Fase I:** Los estudios se realizan en un número pequeño de individuos sanos (en general menos de 100). Los objetivos de esta fase son establecer la tolerabilidad y dosis clínicas seguras; valorar efectos dañinos y realizar estudios exhaustivos en farmacocinética, principalmente en la metabolización y excreción.

Esta prueba no es ciega, tanto los pacientes, como los médicos conocen el fármaco administrando.

- 2. Ensayo clínico en Fase II:** Superada la primera fase, el fármaco será indicado a pacientes con la enfermedad que se quiere tratar. El número en esta fase no suele superar las 200 personas. Son estudios aleatorizados y tienen como objeto valorar la eficiencia del candidato frente a la patología. Los estudios se diseñan con el método de ciego, frente a un fármaco de referencia (control positivo).
- 3. Ensayo clínico en Fase III (Ensayo Clínico Controlado):** Los resultados de las dos primeras fases resultan primordiales para continuar o discontinuar con el desarrollo de un nuevo fármaco. Los estudios en esta etapa involucran a más de 1000 personas, con ensayos de doble ciego y cruzados que son estrictamente vigilados por clínicos. Estos ensayos buscan verificar la eficacia del medicamento y determinar manifestaciones de toxicidad previamente no detectadas. En esta fase se obtiene una mejor perspectiva de la relación entre seguridad y eficacia, parámetros que han de cuantificarse en el contexto del desorden que se pretenda tratar. Superada en forma positiva esta etapa, se presentan los resultados ante un ente regulatorio (por ejemplo, la FDA) y se debe realizar una solicitud de aprobación para el nuevo fármaco; el ente estudia y analiza toda la documentación presentada y si lo considera pertinente, autoriza la comercialización del nuevo fármaco.
- 4. Ensayo clínico en Fase IV:** En esta última fase, se realizan los estudios de farmacovigilancia. Esto consiste en el seguimiento del fármaco después de que ha sido comercializado. Como objetivos bases, se busca detectar toxicidades que no han sido reportadas, así como de la evaluación de la eficacia a largo plazo. Dada la duración y cantidad de individuos estudiados, en esta fase pueden aparecer reacciones adversas raras.

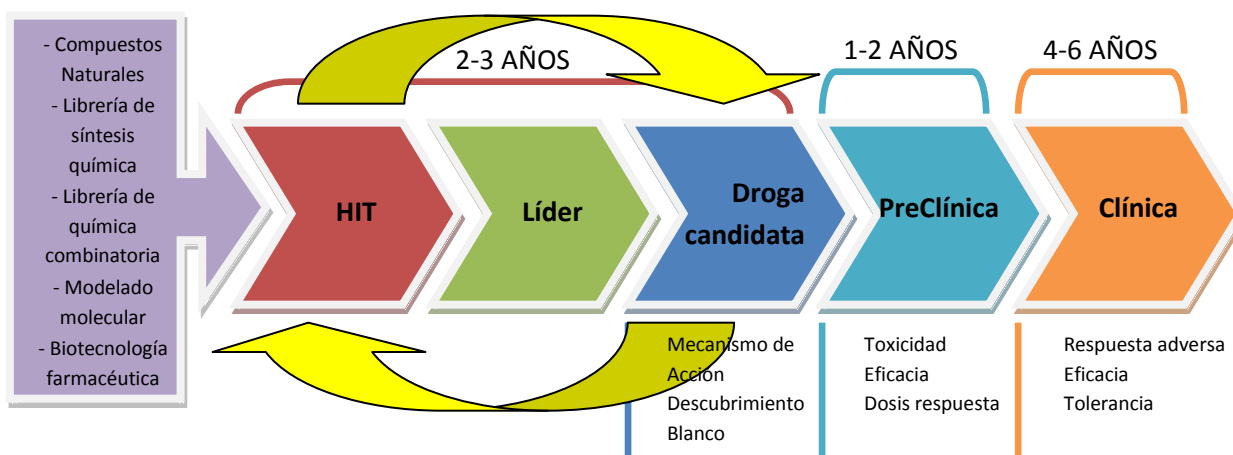


Figura 1.5. Fases en el desarrollo de nuevos fármacos.

### 1.3.3 INDUSTRIA FARMACÉUTICA: UNA MIRADA SINTÉTICA GLOBAL Y REGIONAL.

Se calcula que a nivel mundial el sector farmacéutico puede tener un valor comercial superior a los 700.000 millones de dólares, siendo la tercera industria legal que genera más ingreso en el mundo (luego del petróleo y los bancos).<sup>[1,12]</sup> La tendencia global muestra que los laboratorios de investigación y la industria farmacéutica suelen agruparse geográficamente próximas, en lo que se conocen como clústeres de ciencias de la vida (Figura 1.6).

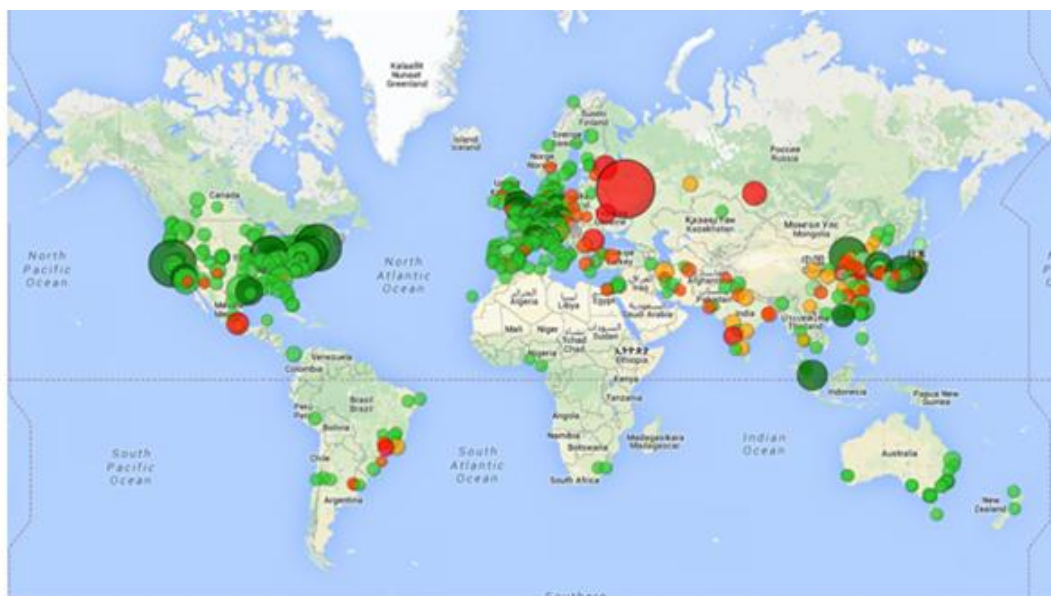
Estos mercados están evolucionando continuamente, por lo que el éxito futuro de esta industria no se define por una única estrategia. En lugar de ello, las compañías tendrán que acercarse a cada lugar de manera diferente, lo que representa una oportunidad única de cada región en la formación de los recursos humanos, la infraestructura académica, la dinámica de la comunidad de negocios, la capacidad de invertir y por último, las aspiraciones de cada comunidad en el sector de las ciencias de la vida. Este dinamismo es una oportunidad sin parangón para nuestro país, por lo tanto debe ser prioritario crear políticas de estado y condiciones jurídico-comerciales para albergar en nuestro país clúster de ciencias de la vida.



Figura 1.6. Agrupaciones mundiales de Ciencias de la Vida. Imagen adaptada del sitio *Site Selection Magazine*.

Argentina tiene una sólida formación de recursos humanos en disciplinas de ciencias de la vida y un potencial enorme para albergar la industria farmacéutica. Sin embargo, el abordaje de un proyecto de química medicinal orientado al desarrollo de fármacos en el ámbito científico académico en Argentina no es una tarea sencilla. La infraestructura de los laboratorios de química orgánica y farmacéutica cuenta en general con equipamiento básico para química *batch*, y no se han adaptado plenamente a los cambios que se han introducido en la disciplina lo largo de las últimas décadas. Si bien es de resaltar que en esta última década se hicieron grandes avances en los organismos gubernamentales de investigación en ciencia y tecnología, aún se requieren más y mejores políticas a mediano y largo plazo para fortalecer el sector de la química medicinal, con el propósito de posicionarse como un

referente en la región y el mundo. En la **Figura 1.7** se ilustra el origen de artículos científicos sobre química medicinal en revistas internacionales con referato en todo el mundo. En esa imagen se observa la correlación directa entre el desarrollo científico de cada región y el desarrollo en el sector farmacéutico.



**Figura 1.7.** Orígenes de las publicaciones en química medicinal en revistas científicas internacionales indexadas. En escala de rojo a verde la relación entre la cantidad de publicaciones por inversión monetaria.

#### 1.4 LA QUÍMICA MEDICINAL COMO HERRAMIENTA ESTRATÉGICA EN LAS FASES TEMPRANAS DEL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS.

La química medicinal juega un rol protagónico en la conducción de un proyecto de búsqueda de nuevos fármacos, basado en todo el conocimiento y experticia de la química orgánica moderna, la biología de las enfermedades, los cribados farmacológicos *in vitro* e *in vivo* y la farmacocinética. El *súmmum* que persigue es el incremento de la eficiencia de los tratamientos, al mismo tiempo que se minimicen los efectos colaterales. Complementariamente, los conocimientos del ADMET (abreviatura de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad), los mecanismos de regulación de medicamentos similares, la búsqueda en literatura científica y los avances tecnológicos, contribuyen a la formación integral de un equipo de químicos medicinales.

Actualmente esta disciplina dispone de un arsenal de herramientas químicas y biológicas para afrontar la etapa 0 de búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos (**Tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Herramientas de la química medicinal.

HERRAMIENTAS DE LA QUÍMICA MEDICINAL	
Provenientes de la Tecnología de la Informática y de la Robótica	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modelado Molecular</li> <li>Cribado virtual y acoplamiento molecular</li> <li>Búsqueda de dianas moleculares por fuerzas de enlaces</li> <li>Relación Cuantitativa Estructura – Actividad (QSAR, por sus siglas en inglés)</li> <li>Bioinformática</li> <li>Quimioinformática</li> <li>Diseño de droga basados en la estructura</li> <li>Cribado de alto rendimiento (<i>High Throughput Screening</i>, HTS)</li> </ul>
Provenientes de la Química	<ul style="list-style-type: none"> <li>Librería de diseño combinatorial</li> <li>Diseño de análogos</li> <li>Diseño racional de drogas</li> <li>Bibliotecas enfocadas</li> <li>Síntesis Orientada a la Diversidad</li> </ul>
Provenientes de los Productos Naturales	<ul style="list-style-type: none"> <li>Uso de productos naturales para drogas líderes</li> </ul>
Provenientes de las Espectroscopías y las Espectrometrías	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cristalografía de Rayos X</li> <li>Resonancia Magnética Nuclear</li> <li>Espectrometría de Masa</li> </ul>
Provenientes de la Microscopías	<ul style="list-style-type: none"> <li>Criomicroscopía electrónica de macromoléculas biológicas</li> </ul>
Provenientes de la Biología	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peptidomiméticos</li> <li>Biotecnología</li> <li>Estudio de bases estructurales de toxicidad</li> </ul>

#### 1.4.1 HERRAMIENTAS PROVENIENTES DE LA TECNOLOGÍA DE LA INFORMÁTICA (TI)

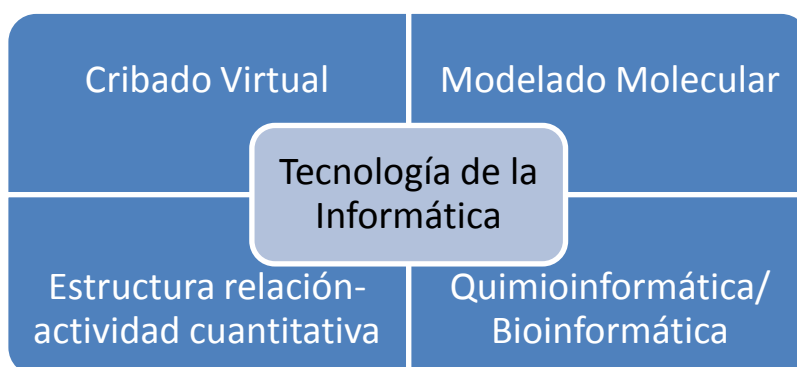


Figura 1.8. Herramientas derivadas de la TI.

Los avances en el campo de la tecnología de la informática y de la información, quizá más que cualquier otro factor, han cambiado extraordinariamente la manera de trabajar de las personas y en particular, de la ciencia. La aparición de la computadora (1941) y de internet (1969) han ampliado sustancialmente el acceso a la información, permitiendo el transporte de un enorme número de datos a cualquier parte del mundo en corto tiempo. En los últimos 30 años se produjo una revolución vertiginosa en la TI, aumentando exponencialmente el poder de cálculo de las computadoras, con la concomitante reducción en el tiempo de trabajo. Bajo estos axiomas, se generaron poderosas herramientas que se utilizan en la química medicinal.

El modelado molecular es un término general que engloba métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar, imitar y predecir el comportamiento de moléculas. Esta técnica tiene amplio uso en el desarrollo de fármacos, así como plegamiento proteico, catálisis de enzimas, estabilidad de proteínas, cambios conformacionales asociados con la función biomolecular y reconocimiento molecular de proteínas, ADN y complejos de membranas. Esta metodología fue clave, por ejemplo, en el diseño y síntesis de inhibidores de la uroquinasa,<sup>[1.13]</sup> metaloproteasas de matriz<sup>[1.14]</sup> o de esterasa de colesterol.<sup>[1.15]</sup>

Otra metodología *in silico* es el cribado virtual (en inglés, *Virtual Screening*), que permiten explorar en forma simultánea un enorme número de colecciones de pequeñas moléculas (en el orden de  $10^6$  moléculas) con el objeto de identificar estructuras que se unan fuertemente a blancos moleculares como enzimas, proteínas, ARN o ADN. Esta herramienta posibilita, en forma teórica, realizar un gran ahorro en términos de tiempo y dinero al momento de diseñar inhibidores.<sup>[1.16]</sup> El cribado virtual en sí mismo está conformado por varias herramientas, entre ellas la que más se destaca es el acoplamiento molecular (en inglés, *Docking*).

La relación cuantitativa estructura-actividad (en inglés, *Quantitative structure-activity relationship* o QSAR), es el proceso por el cual la estructura química se correlaciona cuantitativamente con un proceso bien definido, como la actividad biológica (unión de un fármaco con un receptor) o la reactividad química (afinidad de una sustancia por otra para que produzcan una reacción). El enfoque basado en la clasificación por QSAR es una de las herramientas quimiométricas más importante en el proceso de descubrimiento de fármacos para la categorización de los inhibidores de una proteína diana en más activos y menos

activos. Se han reportado numerosas estrategias de diseños de fármacos empleando este enfoque, se puede citar por ejemplo el primer reporte de doble calificación de inhibidores de la anhidrasa carbónica de *Plasmodium falciparum* usando QSAR como método de modelización<sup>[1.17]</sup> o los estudios de 3D-QSAR de derivados del resveratrol con potentes actividades inhibitorias del virus H1N1, productor de la gripe aviar.<sup>[1.18]</sup>

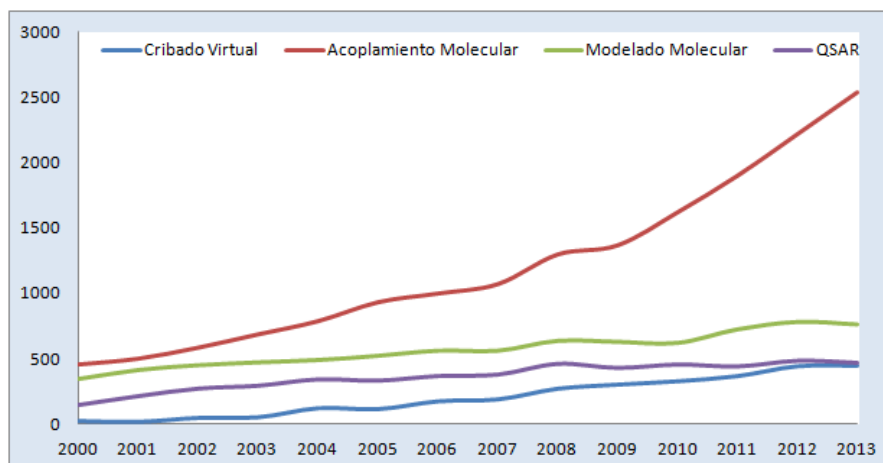


Figura 1.9. Número de publicaciones por año en revistas científicas internacionales de compuestos diseñados por TI. Datos obtenidos de *Scopus*.

Según la definición del Centro Nacional para la Información Biotecnológica<sup>[1.19]</sup> (NCBI por sus siglas en inglés, 2001) la bioinformática es un campo de la ciencia en el cual confluyen varias disciplinas tales como: biología, computación y tecnología de la información. El fin último de este campo es facilitar el descubrimiento de nuevas ideas biológicas así como crear perspectivas globales a partir de las cuales se puedan discernir principios unificadores en biología. Al comienzo de la "revolución genómica", el concepto de bioinformática se refería sólo a la creación y mantenimiento de base de datos donde se almacena información biológica, tales como secuencias de nucleótidos y aminoácidos. El desarrollo de este tipo de base de datos no solamente significaba el diseño de la misma sino que requería además de la implementación de interfaces complejas donde los investigadores pudieran acceder los datos existentes, incorporarlos o revisarlos.<sup>[1.20]</sup>

Por último, la quimioinformática, término acuñado por F. K. Brown en el año 1998, es la mezcla de aquellos recursos informáticos para transformar datos en información e información en conocimiento, con el propósito hacer más rápidas mejores decisiones en el

ámbito de la identificación de los fármacos cabeza de serie (o de molécula inicial) y la optimización de fármacos.<sup>[1,21]</sup>

El uso individual o colectivo de estas herramientas permitió validar un gran número de fármacos disponibles en el mercado contra diversas afecciones humanas. (**Figura 1.10**).

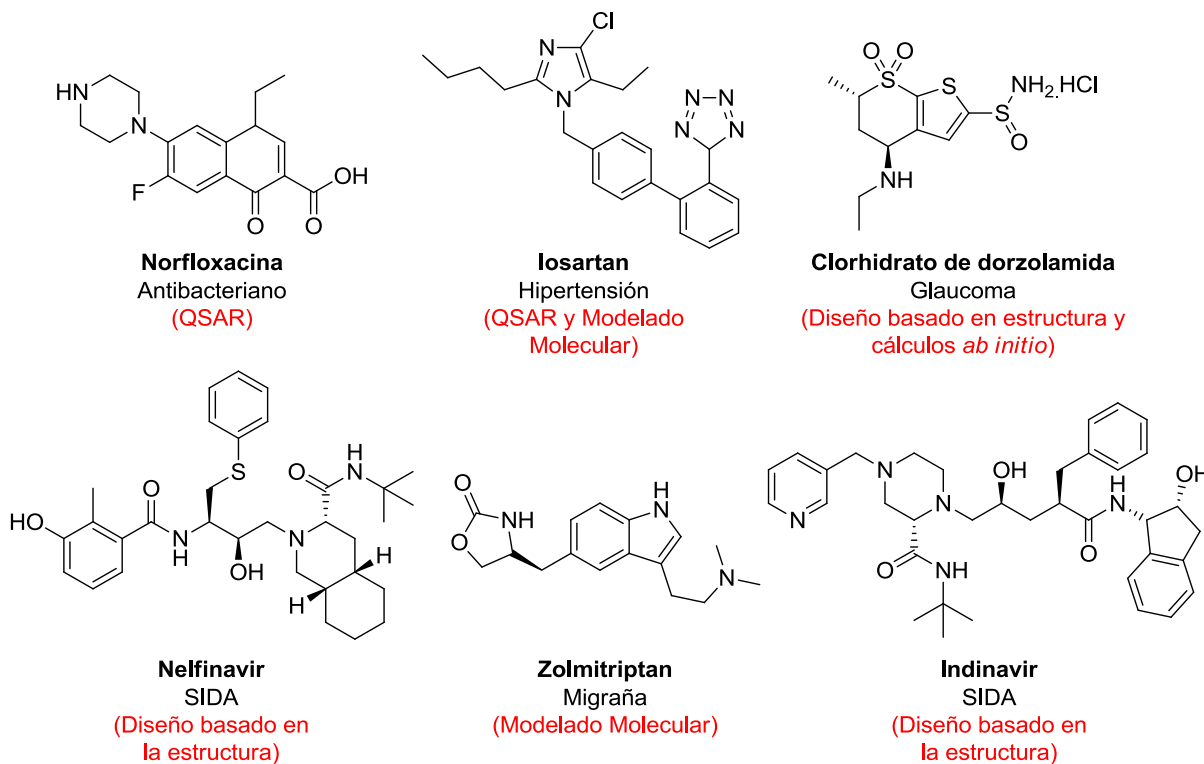


Figura 1.10. Medicamentos con origen en la Tecnología de la Informática.

#### 1.4.2 HERRAMIENTAS PROVENIENTES DE LA QUÍMICA



Figura 1.11. Herramientas derivadas de la química sintética

Los enormes avances en el campo de la biología molecular y la automatización de los ensayos para la detección de compuestos con propiedades terapéuticas (Cribado de alta resolución o *High Throughput Screening*) a mediados de 1980 tuvieron como consecuencia un aumento en la demanda de la industria farmacéutica de nuevos compuestos. En ese contexto fértil, surgió la química combinatoria, que puede definirse como un conjunto de metodologías dirigidas a la obtención del mayor número de compuestos posibles a partir del mínimo número de reacciones.<sup>[1.22]</sup> Los métodos combinatorios se consideraron una panacea, ya que permitían la obtención rápida de una gran cantidad de compuestos entre los que pueden encontrarse nuevos líderes. En un primer momento el enfoque resultaba muy atractivo, por las ventajas en sencillez, economía y eficacia. Estas ventajas, junto con los avances en robótica han permitido a las compañías producir en forma rutinaria más del 100.000 nuevos compuestos por año. Sin embargo, hasta el momento la FDA ha autorizado para uso clínico un solo fármaco sintetizado *de novo* por esta metodología, el Sorafenib® (**Figura 1.12**). Probablemente esta baja tasa de éxito se deba, en cierta medida, a las técnicas utilizadas en este enfoque como la deconvolución de mezclas complejas o los efectos sinérgicos o antagonistas de mezclas. El paso lógico superador 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 la molécula que se estaba preparando.<sup>[1.23]</sup> Sin embargo el principal déficit de estas metodologías radica en la poca diversidad molecular de los compuestos preparados, concepto clave para la búsqueda de nuevos fármacos.

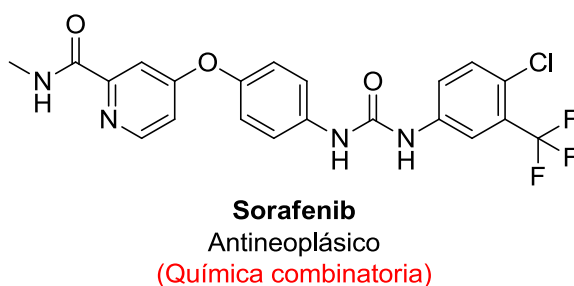
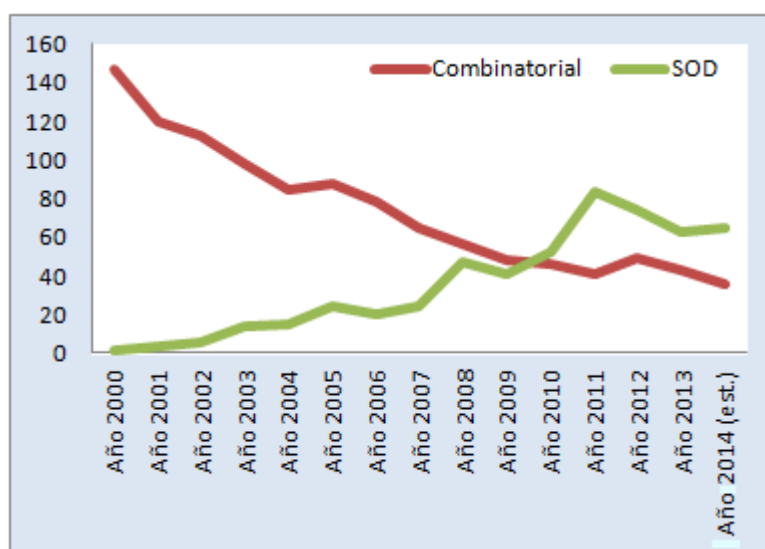


Figura 1.12. Estructura del Sorafenib.

Stuart Schreiber de la Universidad de Harvard, concibe en el año 2000 la síntesis orientada a la diversidad (SOD).<sup>[1.24]</sup> La visión de esta metodología está inspirada en la

variabilidad estructural de la naturaleza. Su objetivo es procurar generar bibliotecas de compuestos estructuralmente diversos y complejos, en un intento de abarcar un mayor sector del universo químico total, sin la necesidad de sintetizar un enorme número de compuestos.

Desde su aparición, en el último decenio se ha observado un aumento en el número de publicaciones en la búsqueda de nuevos compuestos utilizando SOD, frente a las publicaciones en química combinatoria (**Figura 1.13**).



**Figura 1.13.** Publicaciones en el campo de química combinatoria y síntesis orientada a la diversidad en el desarrollo de compuestos con actividades biológicas contra diversas enfermedades. Datos obtenidos de *PubMed*.

Por otro lado, las estrategias basadas en quimiotecas enfocadas o en el diseño racional de inhibidores, requieren un proceso de identificación de los ligandos o inhibidores del blanco deseado. También son necesarios el análisis estructural y fisicoquímico en conjunto con una exhaustiva exploración bibliográfica. El diseño de las colecciones recurre a un arsenal de estrategias para satisfacer los requisitos. Por ejemplo la sustitución bioisostérica<sup>[1.25]</sup> para reemplazar un ligando péptido conocido por un pequeño arreglo mimético no peptídico. De la misma manera el uso de estructuras "privilegiadas" como bloques de construcción es sumamente ventajoso en la síntesis de entidades moleculares con posibles principios bioactivos, sobre todo en los casos en que no exista información sobre moléculas pequeñas que actúen como ligandos para el blanco, o en donde no se disponga de suficiente pesquisa estructural. Evans y colaboradores definen en 1988 a las

estructuras privilegiadas como: “Estructuras químicas presentes en ligandos biológicamente activos y que determinan la especificidad de la molécula hacia un blanco”.<sup>[1.26]</sup> Estas estructuras son fuente de inspiración para la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos y se convirtieron en una importante guía de la química medicinal.<sup>[1.27-29]</sup>

### 1.4.3 HERRAMIENTAS PROVENIENTES DE LOS PRODUCTOS NATURALES

Como se enunció anteriormente, hasta hoy la naturaleza ha sido la principal fuente de nuevos compuestos estructuralmente diversos. Existen datos que corroboran la importancia de los productos naturales en el desarrollo de nuevos fármacos, según la FDA más del 50% de los medicamentos incorporados con éxito en el mercado entre 1981 y 2010 forman parte de esta familia de productos.<sup>[1.30]</sup> Este hecho no es llamativo, si se tiene en cuenta que los productos naturales se encuentran biológicamente validados ya que han evolucionado junto a los seres vivos para unirse a las proteínas implicadas en los procesos biológicos. Hoy se conocen 200.000 productos naturales y en años venideros, gracias a los avances en metodologías de aislamiento y elucidación estructural de los productos, este número se multiplicará.

Desde una perspectiva histórica, las primeras exploraciones de compuestos de interés biológicos se realizaron en animales y plantas. Se conocen más 400.000 especies de plantas superiores distintas, sin embargo, sólo se han estudiado entre el 5-15 % con la meta de encontrar productos naturales bioactivos. El 60% de la biodiversidad de plantas se encuentran en América Latina, posicionando a nuestra región como un área privilegiada para la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos provenientes o derivados de la biósfera.

Con el correr de los años, los grupos de investigación en productos naturales se movilaron a compuestos de origen microbiano y en el presente el gran esfuerzo se dirige a productos naturales de origen marino, en parte motorizado por la diversidad y la riqueza biológica de los ecosistemas marinos. Es de suponer entonces que los productos naturales marinos son una notable fuente de descubrimientos de nuevos fármacos.

El principal inconveniente de los productos naturales es la baja cantidad en la que muchos de ellos son aislados. En ese contexto, las herramientas biotecnológicas permiten mediante la manipulación genética de rutas metabólicas modificar los rendimientos en la obtención de productos naturales de interés. En la **Figura 1.14** se muestran algunos productos de origen natural que están en el mercado.

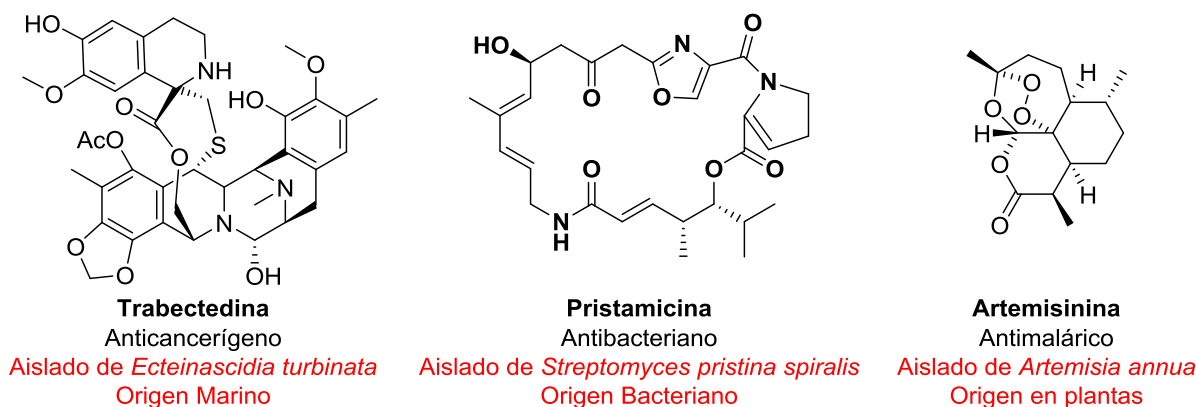


Figura 1.14. Estructuras bioactivas provenientes de la naturaleza.

#### 1.4.4 HERRAMIENTAS PROVENIENTES DE LA BIOLOGÍA

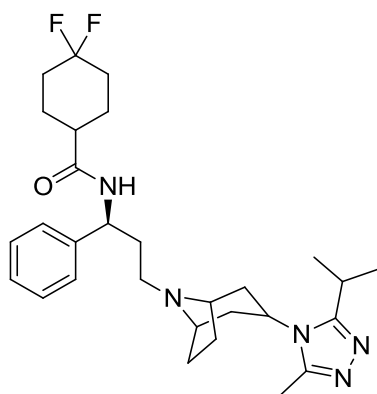
Los agentes quimioterapéuticos procedentes de la biotecnología y de la ingeniería genética se denominan biofármacos. Desde el surgimiento de esta poderosa herramienta, cada año se registran nuevas entidades biomoleculares con interesantes actividades biológicas. Entre sus bases y ventajas se pueden enumerar la producción de moléculas complejas que son muy difíciles de conseguir mediante síntesis química convencional; la vectorización de fármacos, la terapia génica o la creación de nuevos fármacos mediante la tecnología de recombinación genética.

Desde 1980 aparecen nuevas formas de fármacos, entre ellos anticuerpos monoclonales, proteínas reguladoras, ARN de interferencia, hormonas, citoquinas o factores de crecimientos. Los biofármacos suelen tener menos problemas de toxicidad comparados con los fármacos de origen químico.

Herbert Waldmann del Instituto Max Planck-Gesellschaft, sienta en el año 2002 las bases de lo que se conocería 4 años más tarde como síntesis orientada a la biología (SOB en español o BIOS en inglés).<sup>[1.31, 1.32]</sup> El argumento de esta estrategia está fundamentado en la visión reduccionista de los sistemas vivos a meras interacciones fisicoquímicas entre diversas entidades. El corazón de la química biológica es comprender como unas pequeñas moléculas moduladoras son capaces de interactuar con proteínas y perturbarlas. Particularmente SOB se basa en el análisis estructural de la proteína diana y los compuestos que interactúan con ella, así como de la combinación de los dominios conservados de las estructuras con todas las posibles combinaciones de los dominios variables.<sup>[1.33, 1.34]</sup>

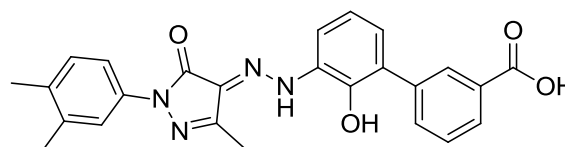
### 1.4.5 HERRAMIENTA PROVENIENTE DE LA ROBÓTICA, LA QUÍMICA Y LA BIOLOGÍA

El cribado de alto rendimiento (HTS) es un método poderoso en la experimentación científica, especialmente utilizado en el descubrimiento de fármacos y relevante para los campos de la biología y la química. El HTS combina el uso de la robótica junto con el procesamiento de datos y software de control, los dispositivos de manejo de líquidos y los detectores sensibles. Entre sus características más sobresalientes se encuentra la rapidez de los análisis (en experimentos de cribado ultrarrápido se han podido testear más de 100.000 en un solo día) y el bajo costo. Los resultados de estos experimentos proporcionan puntos de partida para el diseño de fármacos y para la comprensión de la interacción o el rol de un proceso bioquímico particular. Sin embargo, como contrapartida entre sus desventajas se pueden nombrar la necesidad de adquirir o contar con grandes colecciones de compuestos y la baja tasa de éxito de entidades biológicas promisorias. En la **Figura 1.15** se pueden observar algunos ejemplos de medicamentos comerciales que tuvieron origen en HTS.<sup>[1.35]</sup>



**Maraviroc**

Antagonista del receptor de quimioquina (HIV)  
>500.000 compuestos analizados



**Eltrombopag**

Agonista del receptor de trombopoyetina  
>260.000 compuestos analizados

Figura 1.15. Entidades moleculares obtenidas por cribado de alto rendimiento.

## 1.5 METABOLÓMICA Y LA EXPLORACIÓN DEL ESPACIO QUÍMICO COMO RESPUESTA A LA NECESIDAD DE GENERAR NUEVOS COMPUESTOS.

La metabolómica es un término acuñado por Oliver y otros en el año 1998<sup>[1.36]</sup> en consonancia con los términos genómica, proteómica y transcriptómica. Como sus predecesores, se trata también de un sistema dinámico que cambia con el tiempo. La

metabolómica es el estudio y comparación de los metabolomas, es decir, la colección de todos los metabolitos (moléculas de bajo peso molecular) presentes en una célula, tejido u organismo en un momento dado. Estos metabolitos incluyen a intermediarios del metabolismo, hormonas y otras moléculas de señalización y a los metabolitos secundarios. En 2007, mediante el esfuerzo de la comunidad científica se logró completar el primer borrador del metaboloma humano.<sup>[1.37]</sup> Este trabajo permitió catalogar y caracterizar a unos 2.500 metabolitos, unas 1.200 drogas y unos 3.500 componentes alimenticios que pueden encontrarse en el cuerpo humano. El metaboloma es muy dinámico, cambia ante la menor señal física o química y debido a que son muchos los tipos de metabolitos que puede haber en una célula, también son varios los métodos que se emplean en su análisis.

Por otro lado, la secuencia del genoma humano ha sido prácticamente resuelta,<sup>[1.38]</sup> adelanto que ha permitido establecer que sólo 10% de los genes que lo constituyen codifican para proteínas que pueden unirse a fármacos. De las aproximadamente 25.000 proteínas sólo se han encontrado compuestos para modular a 1.000. Se estima que el número total de moléculas pequeñas formadas por carbono podría superar las  $10^{60}$ . Puesto en contexto, si el metaboloma humano tuviera el tamaño del planeta Tierra, el espacio químico total ocuparía todo el universo conocido. La pregunta que surge inmediatamente entonces es ¿Cómo se resuelve esta necesidad de encontrar nuevos compuestos?

Como se mencionó con anterioridad, 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. El paso siguiente fue la síntesis en paralelo, que tenía la ventaja de generar colecciones de compuestos sintetizados en forma individual.<sup>[1.23]</sup> 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. 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 (**Figura 11.6**).

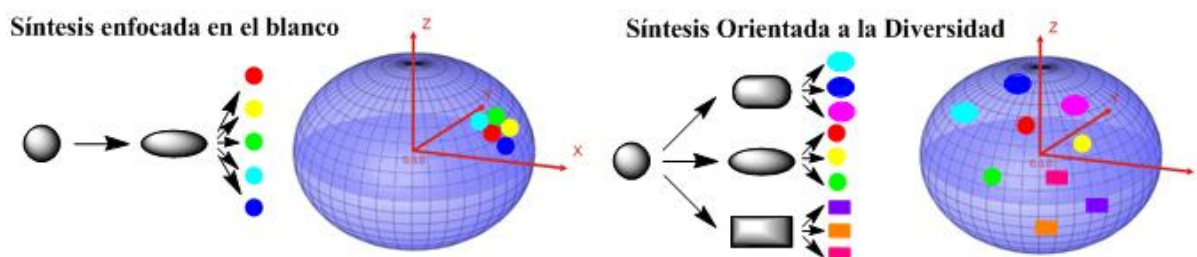






Figura 1.16. La síntesis orientada a la diversidad permite explorar el espacio químico, mientras que la síntesis enfocada explora los requerimientos estéricos y electrónicos de un blanco en particular

En tiempos recientes la síntesis orgánica ha hecho un giro hacia el descubrimiento de metodologías que permitan la generación de colecciones de compuestos con estructuras diversas en la menor cantidad de operaciones.

Puesto en ese contexto, entonces es necesario enfocarse en el uso de alguna estructura promisoría, que nos permitan generar herramientas útiles para ser aplicadas a resolver problemáticas de la química medicinal y de otras disciplinas. Esa estructura “ideal” debe cumplir varios requisitos:

-  Ser un metabolito natural que participe en diversas vías metabólicas.
-  Estar presente en la naturaleza en cantidades considerables y en un número grande de organismos filogenéticamente distintos.
-  Presentar variabilidad estructural y grupos funcionales adecuados capaces de ser funcionalizados con el uso de herramientas sintéticas.
-  Costo comercial y abundancia razonables.

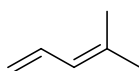
## 1.6 EL MUNDO DE LOS TERPENOS

### 1.6.1 DEFINICIÓN Y ABUNDANCIA NATURAL

Dentro del universo de moléculas orgánicas pequeñas con estructuras atractivas para generar diversidad molecular encontramos a la familia de los terpenos. Los terpenos o isoprenoides son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno (o 2-metil-1,3-butadieno, **Figura 1.17**), un hidrocarburo de cinco átomos de carbono. Los

primeros miembros de esta superfamilia de compuestos fueron obtenidos por destilación de la resina de coníferas (principalmente de los pinos), comúnmente conocida como aguarrás o trementina en español, “*turpentine*” en inglés y “*terpentin*” en alemán.

Según su naturaleza química, se los suelen agrupar dentro de los lípidos, en tanto si son modificados químicamente, pasan a denominarse terpenoides. La enorme diversidad de estos compuestos son producidos por la reorganización de su esqueleto, la oxidación, la polimerización enzimática de unidades de isoprenos ensambladas cabeza-cola, cabeza-cabeza o cabeza-medio, o la ciclación total o parcial de las estructuras terpénicas.



**2-metil-1,3-butadieno**

Figura 1.17. Estructura molecular del 2-metil-1,3-butadieno.


En la naturaleza, los terpenos constituyen una familia universal de compuestos. Esto se debe a que los derivados de isoprenos están presentes en *Eukarya*, *Bacteria* y *Archea*, e incluyen a moléculas tan diversas como esteroides, carotenoides o retinoides.


A fin de ejemplificar la importancia de estas estructuras, cabe mencionar que en las plantas existen aproximadamente 200.000 metabolitos<sup>[1.39]</sup> de los cuales cerca de 50.000 son miembros de la familia de los isoprenoides, constituyendo la familia más importante y numerosa de metabolitos.<sup>[1.40]</sup> En estos organismos los terpenoides cumplen diversas funciones primarias; por ejemplo pigmentos como los carotenoides y la clorofila o las hormonas glibéricas y ácido abscísico. Entre otras funciones, los terpenoides cumplen la función de aumentar la fijación de proteínas a las membranas celulares, lo que es conocido como isoprenilación proteica.


Los terpenoides de las plantas tienen amplia aplicación en la industria ya que son extensamente usados por sus cualidades aromáticas y en usos farmacéuticos. Juegan además un rol importante en la medicina tradicional y en los remedios herbolarios, habiendo sido investigados durante años por la química medicinal.


### 1.6.2 CLASIFICACIÓN


La clasificación de los terpenos según su estructura química se basa en el número de unidades isoprenicas presentes. Se los cataloga en:


 **Hemiterpenos:** Los terpenos más pequeños, con una sola unidad de isopreno de 5 átomos de carbono. El hemiterpeno más conocido es el isopreno, un producto volátil que se desprende de los tejidos fotosintéticamente activos.


 **Monoterpenos:** Terpenos de 10 átomos de carbono conocidos como componentes de las esencias volátiles de las flores y como parte de los aceites esenciales de hierbas y especias, llegando a constituir hasta el 5 % en peso de la planta seca.


 **Sesquiterpenos:** Terpenos de 15 átomos de carbono, estando también presentes en los aceites esenciales. Pueden actuar como fitoalexinas y como inhibidores de la alimentación de los herbívoros oportunistas.

 **Diterpenos:** Terpenos de 20 átomos de carbono, incluyen el fitol, que es la porción hidrofóbica de la clorofila, las hormonas giberelinas, los ácidos de las resinas de las coníferas y las especies de legumbres, las fitoalexinas y una serie de metabolitos farmacológicamente importantes, incluyendo el taxol.


 **Triterpenos:** Terpenos de 30 átomos de carbono. Son por lo general generados por la unión cabeza-cabeza de dos cadenas de 15 carbonos, cada una de ellas formada por unidades de isopreno unidas cabeza-cola. Uno de sus miembros salientes son los brassinoesteroides, algunas fitoalexinas, toxinas y componentes de las ceras de la superficie de las plantas, como el ácido oleanólico de las uvas.

 **Tetraterpenos:** Terpenos de 40 átomos de carbono (8 unidades de isopreno). Los tetraterpenos más prevalentes son los pigmentos carotenoides accesorios que cumplen funciones esenciales en la fotosíntesis.

 **Politerpenos:** Los politerpenos, contienen más de 8 unidades de isopreno, incluyen a los transportadores de electrones que son quinonas preniladas como la plastoquinona y la ubiquinona, también poliprenoles de cadena larga relacionados con las reacciones de transferencia de azúcares (por ejemplo el dolicol) y también a largos polímeros como el caucho o goma natural, usualmente encontrado en el látex.

 **Meroterpenos:** Así se llama a los metabolitos secundarios de las plantas que tienen orígenes sólo parcialmente en derivados de terpenos. Resultan de híbridos

entre una estructura isoprenoide y un metabolito. Las proteínas isopreniladas se consideran miembros dentro de este grupo.

 **Esteroides:** Triterpenos basados en el sistema de anillos ciclopentano perhidrofenantreno

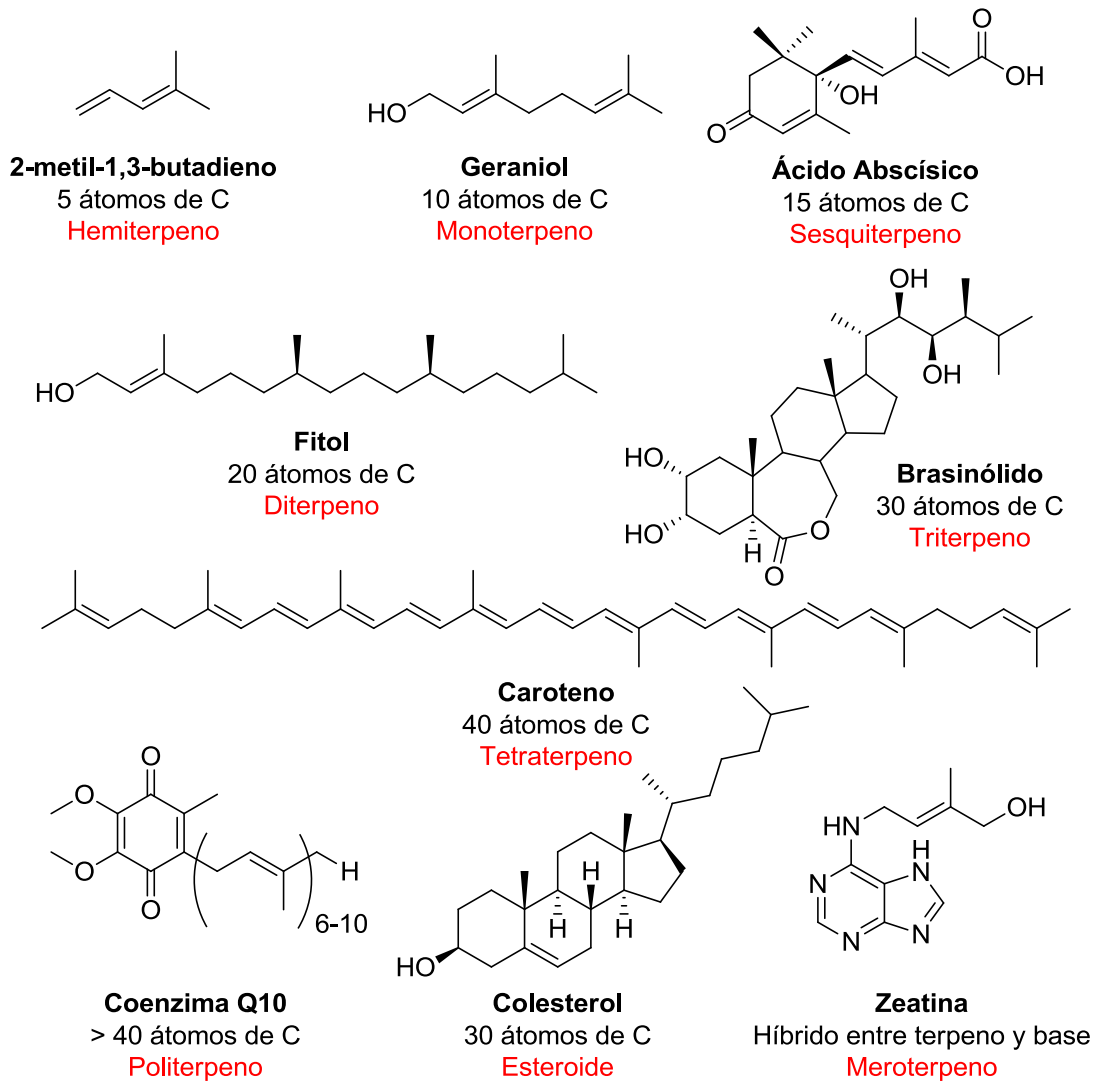

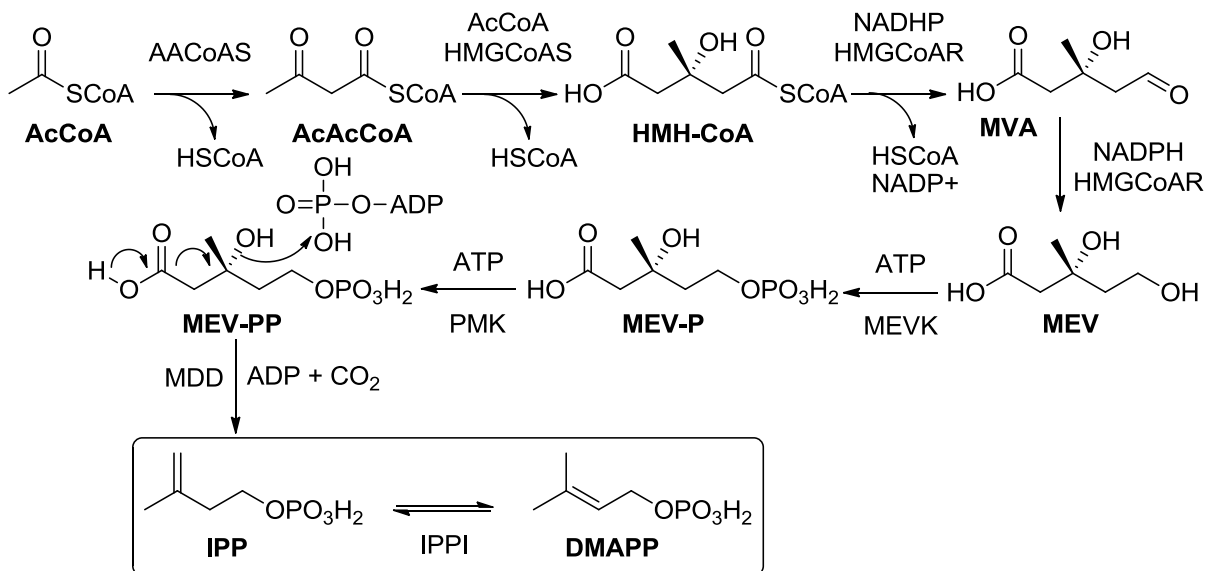


Figura 1.18. Ejemplos de estructuras terpénicas y su clasificación.


### 1.6.3 BIOSÍNTESIS.

Aunque el terpenoma presenta una amplia diversidad estructural y estereoquímica, la ruta biosintética de sus precursores es simple. Las unidades estructurales mínimas, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), son precursoras de todos los terpenos y son biosintetizadas mediante dos vías:

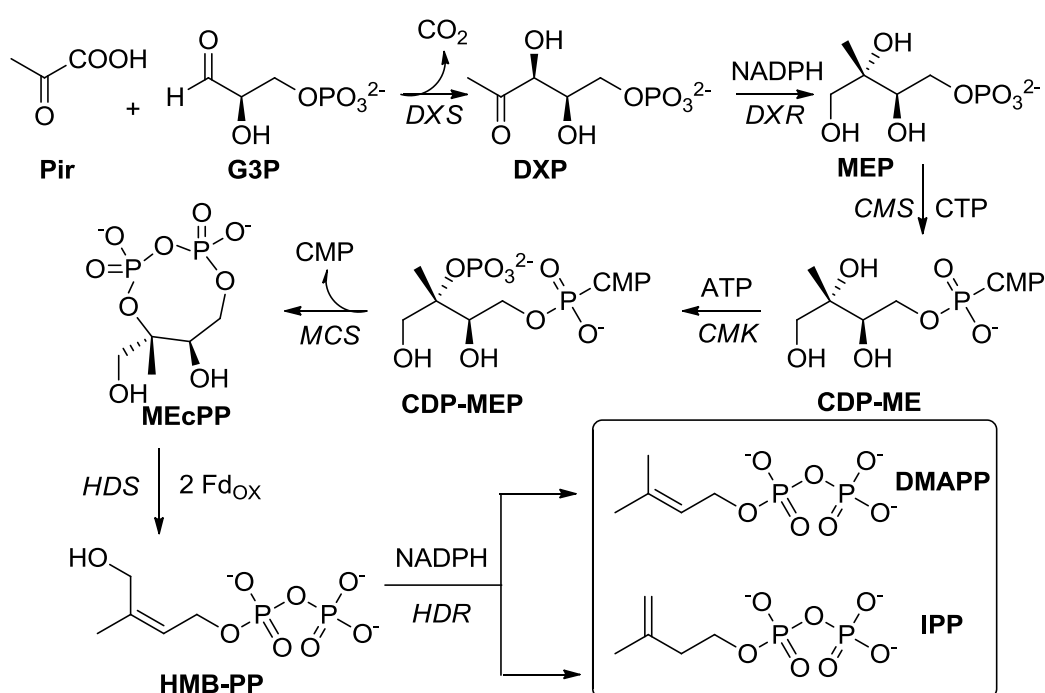

**Ruta del ácido mevalónico:** Esta ruta parte de dos unidades de acetil coenzima A (AcCoA), que se condensan por medio de una reacción tipo Claisen para dar acetoacetil-CoA (AcAcCoA). Esta molécula se vuelve a condensar con una tercera unidad de AcCoA para dar como producto 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) como intermediario. El tioéster de la coenzima A se reduce para formar el aldehído correspondiente, el mevaldehído (MVA), el cual se reduce a ácido mevalónico (MEV). Por acción de dos moléculas de adenosin trifosfato (ATP) el mevalonato se fosforila (MEV-P y MEV-PP) y descarboxila para dar como productos los precursores de los terpenos, el IPP y su isómero DMAPP. La ruta del mevalonato es prácticamente universal y se lleva a cabo en el citosol. A partir de estos intermediarios se sintetizan principalmente sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos.



Esquema 1.1. Ruta del Mevalonato

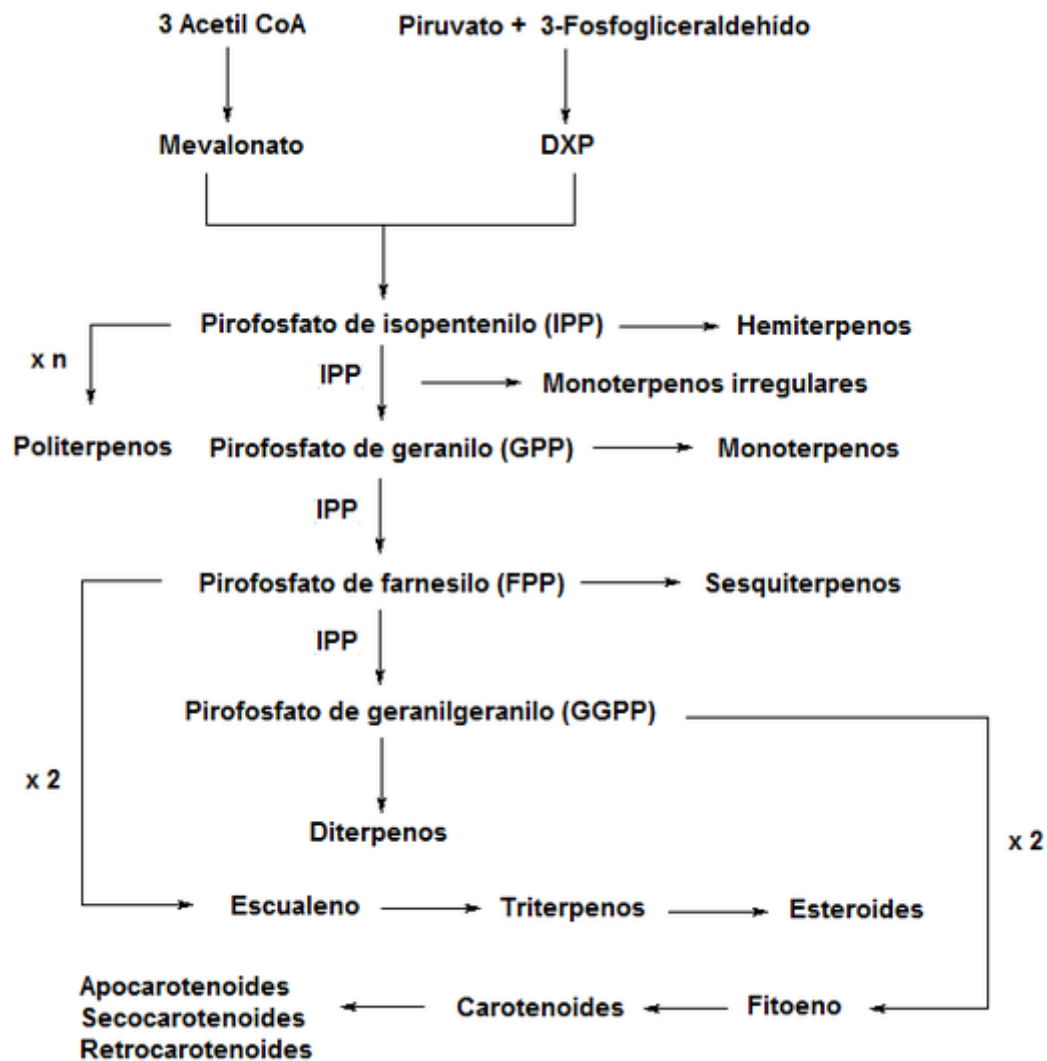

**Ruta de la 5-Fosfono-1-Desoxi-D-Xilulosa (DXP, por sus siglas en inglés) o ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP, por sus siglas en inglés):** En esta ruta, una unidad de ácido pirúvico (Pyr), proveniente de la degradación de carbohidratos, condensa su grupo carbonilo en una reacción de Umpolung con el grupo carbonílico del D-gliceraldehído (G3P), generando la 5-Fosfono-1-desoxi-D-xilulosa (DXP). Por medio de una condensación aldólica inversa, el carbono 1 transpone hacia la posición 2, generando así el 4-fosfono-2-C-metil-D-eritritol (MEP). Éste intermediario se conjuga por medio de una sustitución nucleofílica con una unidad de citidilribósido, por acción del CTP, para formar 4-(CDP)-2-C-metil-D-eritritol

(CDP-ME). Este compuesto se fosforila en el carbono 2, donde se forma el intermediario fosforilado CDP-EMP y desplaza el citidilribósido para obtenerse el 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclofosfato (MEcPP). Por ruptura reductiva del ciclo se da una reacción de eliminación para formar el pirofosfato de 4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo (HMB-PP). El paso final consiste en la eliminación del grupo hidroxilo para obtenerse el catión alílico correspondiente, el cual puede transponerse de tal forma que se isomerizan de manera reversible el IPP y el DMAPP. Esta ruta se lleva a cabo sobre todo en los plástidos de las plantas y en muchas células procariontes.<sup>[1.41]</sup> Por esta ruta se sintetizan sobre todo monoterpenos, diterpenos y carotenoides.



**Esquema 1.2.** Ruta del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato

La elongación de la cadena carbonada comienza con el acoplamiento de dos moléculas de cinco carbonos, el isopentenil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP), para dar como producto el pirofosfato de geranilo (**Esquema 1.3**).<sup>[1.42]</sup>



**Esquema 1.3.** Biosíntesis de isoprenil difosfatos.

Existen dos grandes tipos de mecanismos de construcción de esqueletos isoprenilados.<sup>[1.43]</sup> Por un lado, las reacciones que dan lugar a los isoprenos lineales que están catalizadas por isopreniltransferasas, pudiendo condensarse cabeza-cabeza o cabeza-cola para formar el farnesil difosfatos o el geranilgeranil difosfatos. El segundo tipo de esqueletos isoprenilados que se biosintetizan son producidos por reacciones de ciclación catalizadas por ciclasas. Después que los esqueletos isoprenoides son construidos y ciclados se producen subsecuentes modificaciones y reordenamientos que otorgan complejidad estructural a los productos finales como el limoneno, crisantemol, etc (**Figura 1.19**).

Las isoprenilciclasas tienen la función crítica de producir un plegamiento específico en los isoprenoides para que, una vez que adopten la conformación requerida, den lugar a

un intermediario carbocatiónico y transcurre una reacción concertada, para dar un producto cuyos anillos y estereoquímica está dirigido por la estructura de la enzima. Curiosamente, la selectividad de estas enzimas puede variar dramáticamente de un organismo a otro.

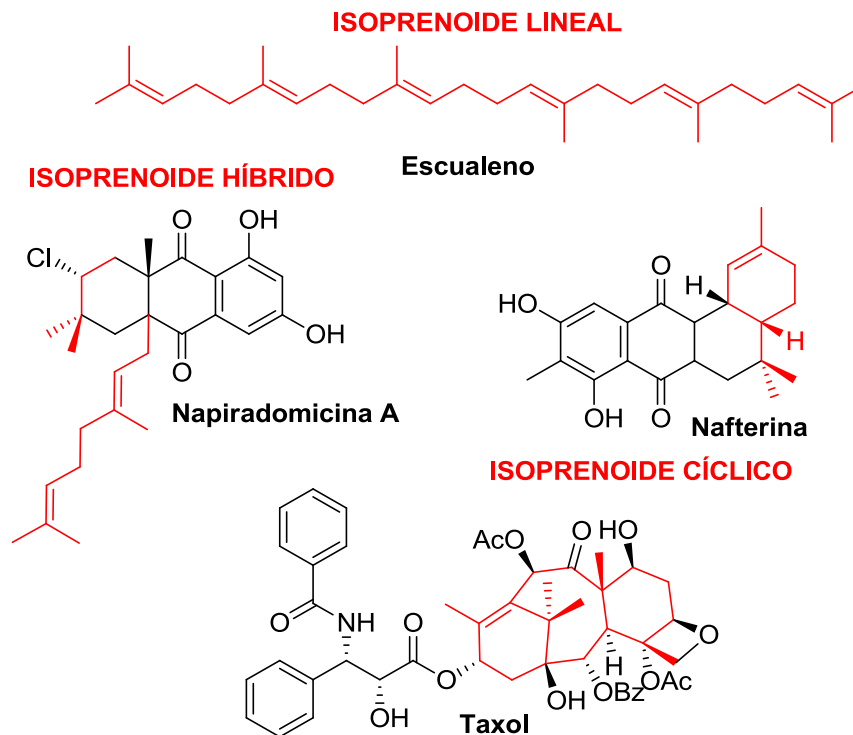


Figura 1.19. Productos naturales que contienen isoprenoides en sus estructuras.

## 1.7 REACCIONES DE ISOPRENILACIÓN EN LA NATURALEZA Y LAS IMPLICANCIAS FARMACOLÓGICAS.

En términos generales, las reacciones de isoprenilación consisten en una adición, química o enzimática, de una cadena hidrofóbica a una molécula aceptora (otro terpenoide, una molécula aromática, una proteína, etc.). En particular, las reacciones de isoprenilación más importantes son las que ocurren en proteínas o en metabolitos secundarios.

### 1.7.1 ISOPRENILACIONES EN PROTEÍNAS

La isoprenilación es un proceso de modificación postraduccional de proteínas. Durante la prenilación, los isoprenos se anclan covalentemente a los polipéptidos que fueron sintetizados *de novo*. Cuando las proteínas se isoprenilan, adquieren propiedades hidrofóbicas que les permite anclarse adecuadamente a membranas, organelas o inclusive a

interactuar con otras proteínas. Aproximadamente el 2% de las proteínas codificadas por el genoma de mamíferos son isopreniladas.<sup>[1.44]</sup> En particular, en humanos la disrupción de la isoprenilación provoca el desarrollo de patologías, entre las que se incluyen desordenes malignos, ceguera genética, osteoporosis y envejecimiento precoz.<sup>[1.45]</sup>

Kamiya y colaboradores reportaron en 1978 la primer proteína isopreniladas, la rhodotorucina A proveniente del hongo *Rhodospiridium toruloides*.<sup>[1.46]</sup> Actualmente, se conoce en eucariotas tres enzimas que catalizan la transferencia de estos lípidos, la farnesiltransferasa (FT), la geranilgeranil transferasa tipo I (GGT1) y la geranilgeranil transferasa tipo II (GGT2). Las FT y GGT1 reconocen un motivo CAAX, ubicado en el extremo C-terminal de las proteínas sustrato.<sup>[1.47]</sup> Este motivo está conformado por una cisteína (C), seguido de dos aminoácidos alifáticos cualesquiera (AA) y finaliza con un aminoácido cualquiera. (X) La función de este motivo es etiquetar la proteína para que sea blanco de farnesilación o de geranilgeranilación. Se observó que si el residuo en la posición X es serina, metionina o alanina, se conduce hacia la farnesilación, mientras que un residuo de leucina define una geranilgeranilación.<sup>[1.48, 1.49]</sup> El motivo CAAX es una condición necesaria, pero no suficiente para la isoprenilación.

La ruta de isoprenilación incluye tres reacciones (**Figura 1.20**). En el primer paso, una FT o GGT1 coloca un farnesilo o un geranilgeranilo, en la cisteína del motivo de la proteína sustrato. En un segundo paso, se produce la proteólisis de los aminoácidos AAX, catalizada por la enzima CAAX prenil proteasa, ubicada en el retículo endoplasmático. Finalmente, en el tercer paso, que tiene lugar nuevamente en el retículo endoplasmático, la cisteína terminal es metilada por la isoprenilcisteín carboximetil transferasa (ICMT).

La geranil geranil transferasa tipo 2 (GGT2 o RabGGT) opera por un mecanismo diferente. La GGT2 reconoce el complejo de las proteínas Rab GTPasas con una proteína accesoria Rab específica (REP, por sus siglas en inglés) para conectar uno o dos geranilgeranilos en cisteínas en un motivo tipo CXC C-terminal de una manera más flexible.

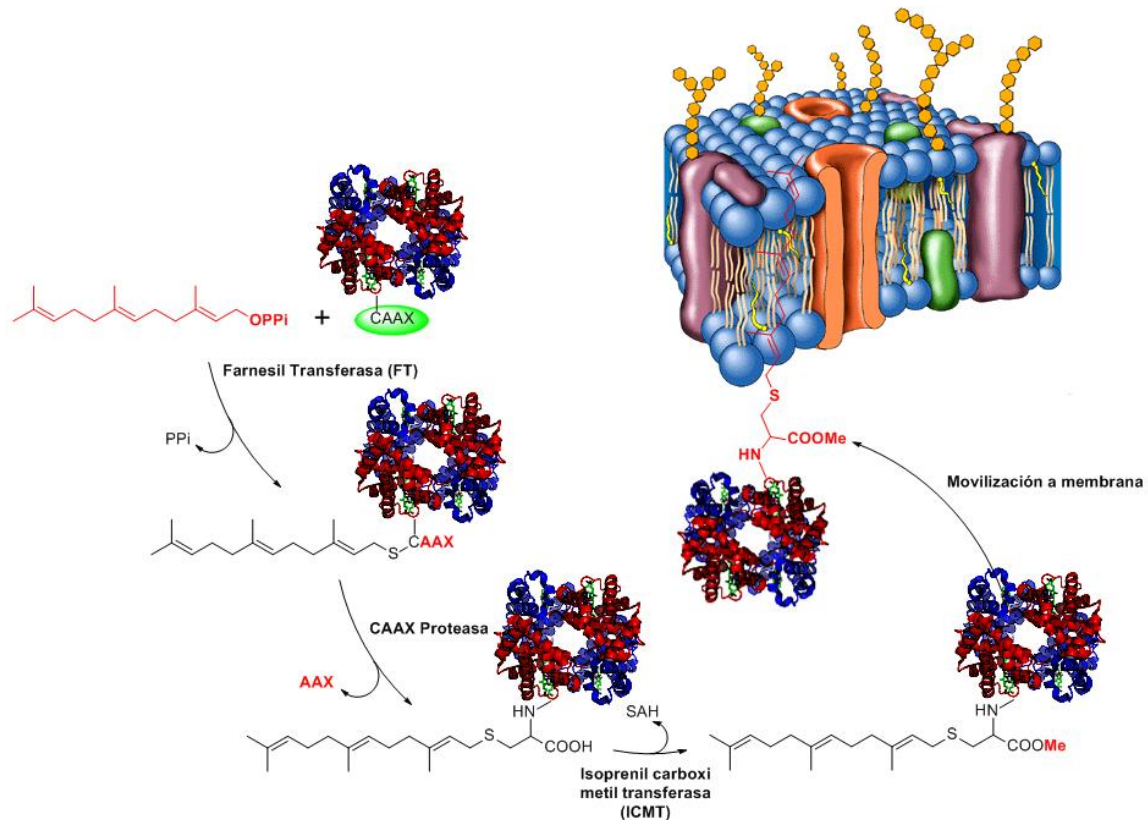


Figura 1.20. Mecanismo de la isoprenilación de proteínas.

Las proteínas de unión a guanina (proteínas G) tales como Ras, Rap, Rho y Rab comprenden el grupo más grande de proteínas isopreniladas. Entre estas, las proteínas Ras han atraído particular atención debido al importante rol que ocupan en la carcinogénesis. Las funciones normales de estas se desarrollan en las vías de transducción de señales celulares, esenciales para el crecimiento celular y la diferenciación. Las mutaciones específicas encontradas en las proteínas Ras, las vuelven oncogénicas, y encontrándose en alrededor del 30% de todos los tumores humanos, incluyendo cerca del 90% de los cánceres de páncreas y en el 50% de los cánceres de colon.<sup>[1.50]</sup> Debido a que la farnesilación es un requisito absoluto para la función oncogénica de Ras; la inhibición de este proceso abrió un nuevo campo en el desarrollo de agentes quimioterapéuticos contra estos cánceres.<sup>[1.51]</sup> Las extensas campañas de generación de nuevos inhibidores de las FTasa llevadas adelante por las grandes corporaciones farmacéuticas han logrado posicionar a varios de estos compuestos en etapas clínicas, con amplias posibilidades de que se encuentren en el mercado en corto tiempo.

## 1.7.2 ISOPRENILACIÓN DE METABOLITOS

La isoprenilación de metabolitos aromáticos secundarios juegan un rol crítico en la biosíntesis de un amplio rango de moléculas que ejercen importantes efectos a través de diferentes clases de organismos filogenéticamente distintos, desde bacterias hasta células animales y vegetales. Frecuentemente, la adición de un isopreno a una molécula, la hace más activa comparada a su precursor. Estos productos naturales híbridos representan una nueva frontera para el desarrollo de fármacos, en particulares antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos, antibacterianos o antiparasitarios.<sup>[1.52]</sup>

La complejidad lograda en los productos es altamente importante debido a la gran cantidad de procesos biológicos que dependen de interacciones entre proteínas. Muchas de las moléculas pequeñas que tienen la capacidad de alterar estas interacciones son productos naturales con estructuras moleculares de alta complejidad.<sup>[1.24]</sup>

El fenómeno de moléculas decoradas con motivos isoprenoides puede ser analizado desde dos perspectivas:

- 1- Según el tipo de isopreno que se transfiere (isoprenil transferasas)
- 2- Según el metabolito secundario o molécula pequeña aceptora

### 1.7.2.1 ISOPRENIL TRASFERASAS

Dentro de las enzimas que participan en reacciones con isoprenos existen un tipo particular que catalizan la transferencia de unidades de isoprenos a distintos tipos de sustratos. De acuerdo al tipo de isopreno que es transferido podemos clasificarlas en: dimetilalil transferasas, geranil transferasas, farnesil transferasas, geranilgeranil transferasas y hexaprenil transferasas (**Figura 1.21**).

Entre las primeras se encuentra la adenilato isopenteniltransferasa aislada de mulberry (*Morus alba*)<sup>[1.53]</sup> que cataliza la transferencia de dimetilalilo al grupo N6-amino de adenosina fosfato. Dentro de este mismo grupo existen distintas enzimas que catalizan la incorporación de dimetilalilo en triptofano o moléculas que lo contienen. Estas son las dimetilaliltriptofano sintasa, que han sido aisladas en distintos organismos, catalizando la incorporación del dimetilalilo en la posición 4<sup>[1.54]</sup> o en la posición 7.<sup>[1.55]</sup> Finalmente podemos mencionar la enzima CloQ que cataliza la unión del dimetilalilo en la posición 3 del 4-hidroxifenilpiruvato.<sup>[1.56]</sup> Entre las geranil transferasas podemos mencionar Orf2, que

produce la unión de geranilo en forma inespecífica en hidroxinaftalenos y otros sustratos,<sup>[1.57]</sup> y la Fnq que puede catalizar la incorporación del geranilo en la posición 3 de flaviolin, en C1 o C3 del geranilo.<sup>[1.58]</sup> Dentro de este mismo grupo podemos mencionar la 4-Hidroxibenzoato geraniltransferasa<sup>[1.59]</sup> y la brevianamide F preniltransferasa.<sup>[1.60]</sup> Las farnesil transferasas conocidas hasta el momento son las mencionadas anteriormente que produce la modificación postraduccional de proteínas y la proteína Cox10, que incorpora la cadena de farnesilo en el grupo vinilo del pirrol A del hemo.<sup>[1.61]</sup> Finalmente, la proteína Coq2 que pertenece a la biosíntesis de ubiquinona y produce la unión de un hexaprenilo en la posición 3 de ácido 4- hidroxibenzoico.<sup>[1.62]</sup> Muchas de estas enzimas han sido recientemente caracterizadas por lo que es muy poco lo que se conoce de ellas.

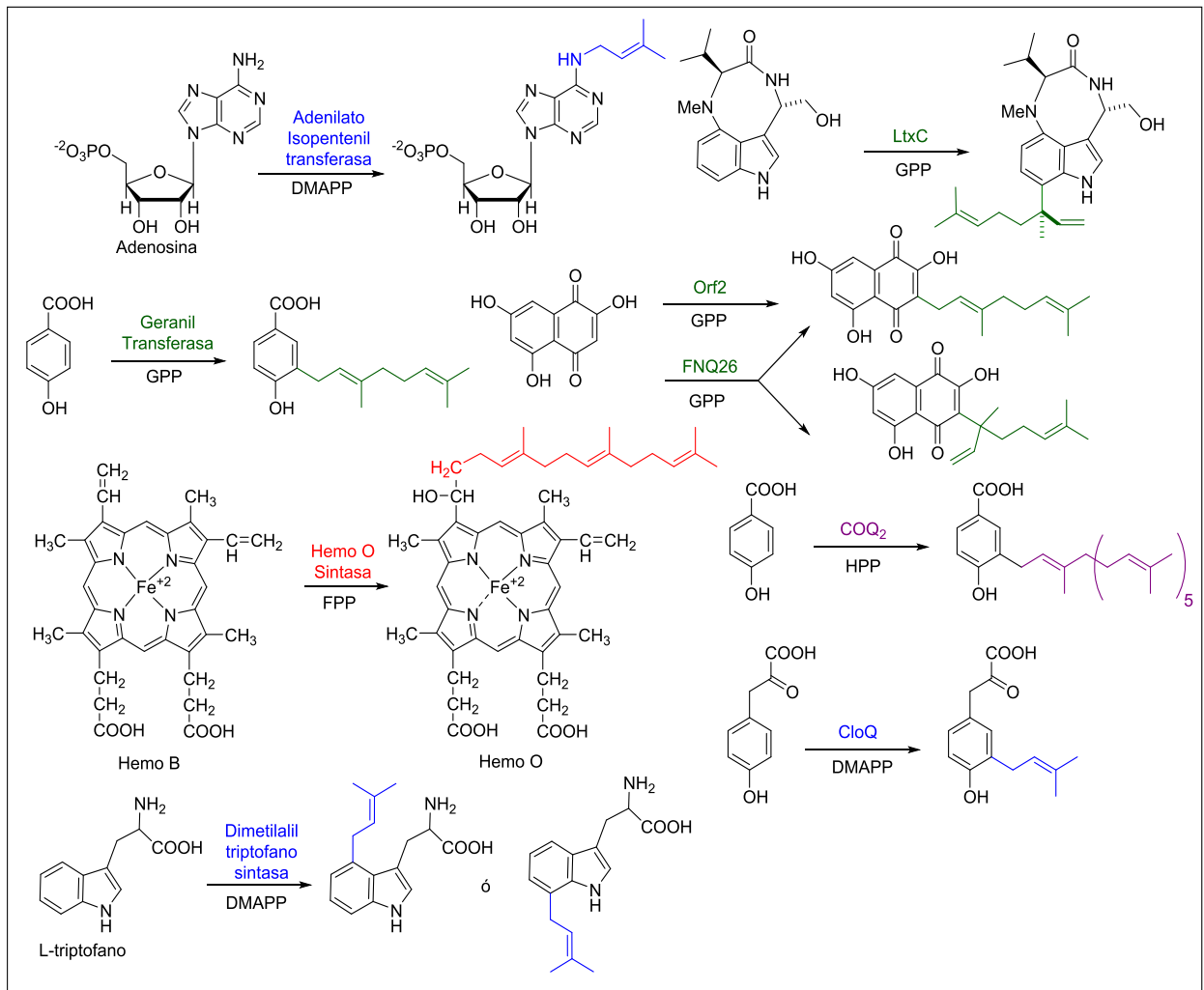


Figura 1.21. Ejemplo de isoprenil transferasas

## 1.7.2.2 FENOLES C-ISOPRENILADOS

Según lo reportado en la literatura, fenoles y naftoles isoprenilados tienen la particularidad de aumentar la actividad biológica de los sustratos que los contienen.<sup>[1.63, 1.64]</sup> Los fenoles isoprenilados constituyen una interesante familia de productos naturales presentes en plantas y en organismos marinos. Estos compuestos tienen una amplia variedad de actividades biológicas, entre las que se destacan la antiinflamatoria, la antifúngica, la anti-HIV, la anti-Alzheimer y más frecuentemente, las antineoplásicas. Los fenoles orto-isoprenilados juegan un importante rol en la mediación de muchos procesos biológicos tales como la respiración celular mediadas por ubiquinonas isopreniladas. A su vez, han mostrado tener actividad contra distintas enfermedades parasitarias. Como ejemplo se pueden mencionar el ácido grifólico, la grifolina y la piperogalina, aislados de *Peperomia galioides*, activos contra *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*, agentes etiológicos de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, respectivamente (Figura 1.22).<sup>[1.65]</sup> Otro ejemplos lo constituye la Ascofuranona, un antibiótico producido por el hongo *Ascochyta viciae*,<sup>[2]</sup> que inhibe la deshidrogenasa del ácido dihidroorótico y presenta actividad (tanto *in vitro*, como *in vivo*) contra *Trypanosoma brucei* (agente etiológico de enfermedad del sueño ó Tripanosomiasis africana),<sup>[1.66]</sup> antitumoral,<sup>[1.67]</sup> y como modulador del sistema inmune.<sup>[1.68]</sup>

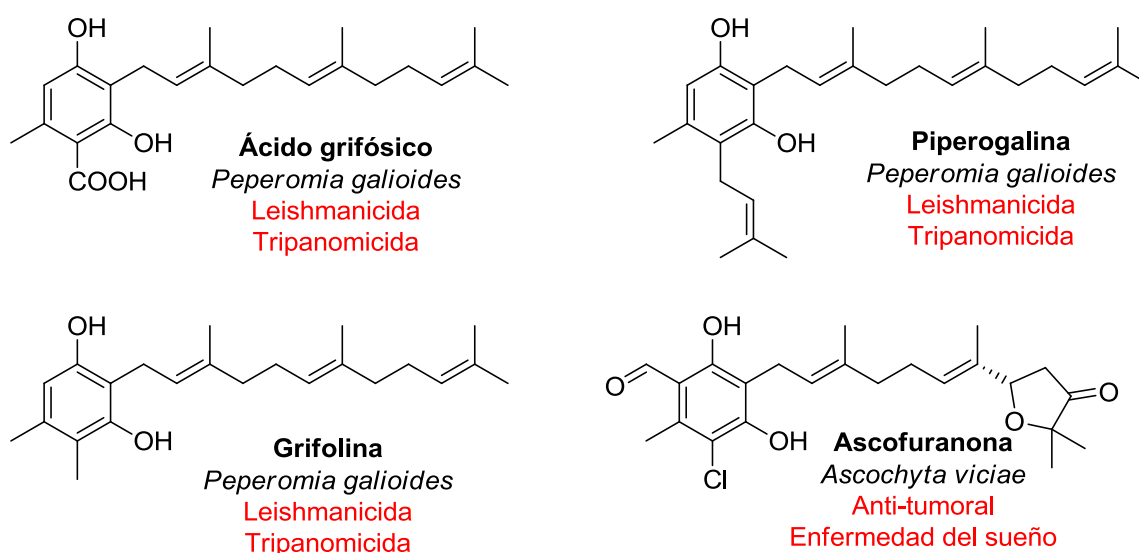


Figura 1.22. Fenoles C-Isoprenilados

### 1.7.2.3 QUINONAS C-ISOPRENILADAS

Las quinonas actúan principalmente como agentes oxidantes y electrófilos. Por este motivo tiene un rol preponderante como fármacos biorreductivos, como potenciadores de estrés oxidativo y como catalizadores redox. Se les asocia dos tipos diferentes de mecanismo de acción, por un lado la estimulación del estrés oxidativo y por otro, la alquilación de nucleófilos celulares.<sup>[1.69]</sup>

Los productos naturales que derivan de quinonas ó naftoquinonas y que contienen isoprenilos en su estructura muestran actividades biológicas muy interesantes. De hecho, las plantas que producen estas clases de compuestos son reconocidas por poseer usos terapéuticos. Algunos ejemplos interesantes incluyen la planta *Rubia cordifolia*, utilizada en la medicina tradicional china, de donde se aísla mollugina y rubicordifolina, ambos compuestos con actividad antitumoral. La Firmianona, recientemente aislada como un único enantiómero del árbol *Firmia plantanifolia*, cuyas raíces se usaban en China para tratar el reuma y el asma. Los extractos de las raíces de *Lippia microphylla*, comúnmente conocida como “alecrim de tabuleiro”, eran usados como expectorante, astringente y diurético en la medicina tradicional de Brasil.

Por otro lado, la vitamina K, también conocida como fitomenadiona o vitamina antihemorrágica, es un compuesto químico derivado de la 2-metil-naftoquinona. Son vitaminas lipofílicas e hidrofóbicas, principalmente requeridas en los procesos de coagulación de la sangre, estando involucrados además en la generación de glóbulos rojos.

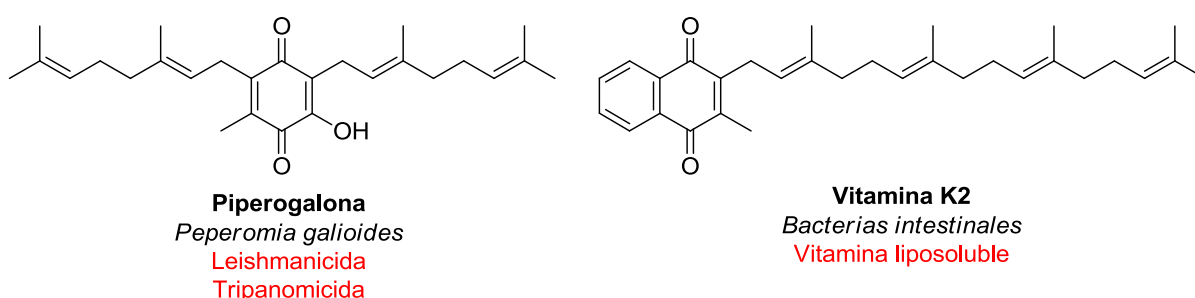


Figura 1.23. Ejemplo de quinonas isopreniladas bioactivas

### 1.7.2.4 FENIL PROPANOIDES ISOPRENILADOS

Los fenilpropanoides son una familia diversa de compuestos orgánicos que son sintetizados por las plantas desde el aminoácido fenilalanina. Estos compuestos se

encuentran en todo el reino vegetal, donde sirven como componentes esenciales de una serie de polímeros estructurales, proporcionan protección contra los rayos UV, defensa contra los herbívoros y patógenos y median las interacciones planta-polinizador como pigmentos florales y compuestos de aroma. De hecho el primer reporte literario de un metabolito secundario isopreniloxigenado, fue un derivado de un fenilpropanoide lactonizado, el aureptano (aislado de *Citrus aurantium L.*).

Muchos fenilpropanoides isoprenilados exhiben diversas actividades como agentes antimicrobianos, anticancerígenos y tienen propiedades hipotensivas.<sup>[1.70]</sup> Pueden nombrarse, por ejemplo, la pondaplina aislada de *Annoba glaba*<sup>[1.71]</sup> o el boropinal aislado de *Boronia pinnata*<sup>[1.72]</sup> que tienen actividades en líneas celulares; o las marianinas A y B, aisladas del hongo *Mariannaea camptospora*, que tienen actividad antimicrobiana.<sup>[1.73]</sup>

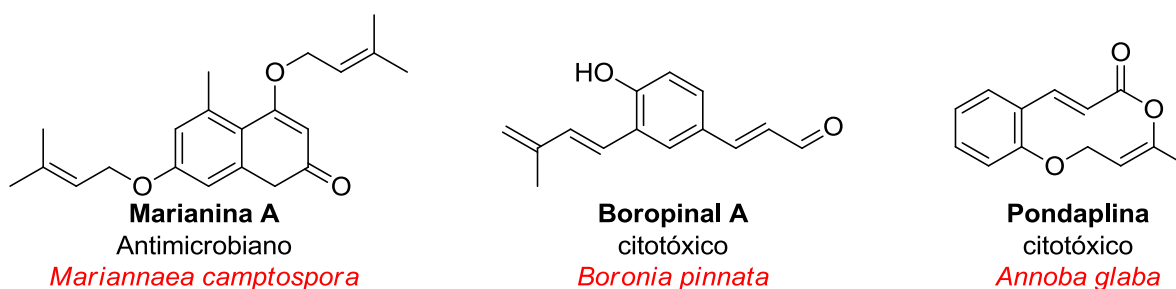


Figura 1.24. Ejemplos de fenilpropanoides isoprenilados con actividad biológica.

### 1.7.2.5 FLAVONOIDES ISOPRENILADOS

Los flavonoides son abundantes en plantas, especialmente en leguminosas. Algunos de ellos tienen la propiedad de unirse al receptor de estrógeno humano con afinidad similar al estradiol. Por este motivo ha generado en la comunidad científica un gran interés, en particular hacia la búsqueda de terapias contra desordenes cardiovasculares u osteoporosis.<sup>[1.74]</sup> Como sucede con todas las moléculas que se isoprenilan, esta decoración incrementa la hidrofobicidad, resultando en un aumento en la afinidad a membranas biológicas y una mejora en la interacción con el blanco proteico.<sup>[1.63]</sup> La mayoría de los flavonoides son C-isoprenilados y son considerados metabolitos inducibles (en este caso, fitoalexinas), actuando en mecanismo de defensas a patógenos. En los últimos años se ha comenzado a estudiar el efecto de la prevención contra el cáncer, con el enriquecimiento de estas fitoalexinas en las comidas.<sup>[1.75]</sup>

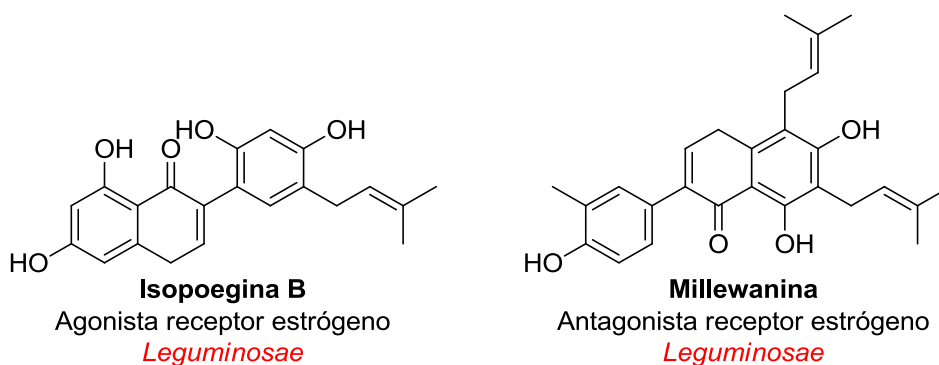


Figura 1.25. Ejemplo de flavonoides isoprenilados con actividad biológica.

#### 1.7.2.6 ALCALOIDES ISOPRENILADOS

El primer ejemplo de un alcaloide conteniendo una cadena isopreniloxigenada fue aislado de *Haplophyllum perforatum*, en un trabajo realizado por Rasulova y Bessonova.<sup>[1.76]</sup> Este compuesto, la 7-isopenteniloxi- $\gamma$ -fagarina, es encontrado también en *H. latifolium*, *H. ferganicum* y *Zanthoxylum arborescens*. De estas últimas fuentes también se aislaron otros alcaloides isopreniloxigenados, llamados evoxina, acetilevovoxina, anhidroevovoxina, evodina y haplatina.<sup>[1.77]</sup>

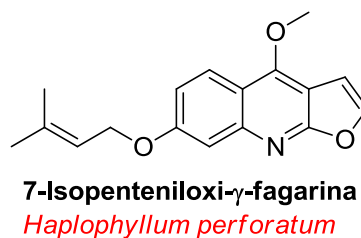


Figura 1.26. Ejemplo de alcaloides isoprenilados con actividad biológica.

## 1.8 BIBLIOGRAFÍA

- 1.1. Schreiber, S. L. (2011). "Organic synthesis toward small-molecule probes and drugs." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(17): 6699-6702.
- 1.2. Gu, Y. and Jerome, F. (2013). "Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry." Chemical Society reviews **42**(24): 9550-9570.
- 1.3. Sletten, E. M. and Bertozzi, C. R. (2009). "Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality." Angewandte Chemie **48**(38): 6974-6998.
- 1.4. Malliaras, G. G. (2013). "Organic bioelectronics: a new era for organic electronics." Biochimica et biophysica acta **1830**(9): 4286-4287.
- 1.5. Mi, D., Kim, J. H., Kim, H. U., Xu, F. and Hwang, D. H. (2014). "Fullerene derivatives as electron acceptors for organic photovoltaic cells." Journal of nanoscience and nanotechnology **14**(2): 1064-1084.
- 1.6. Lander, E. S., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- 1.7. Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." Journal of molecular biology **94**(3): 441-448.
- 1.8. (1972). "Medicinal Chemistry." IUPAC Publication.
- 1.9. Stern, L. C. (1875). "Papyrus Ebers: Das hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift, herausgegeben mit Inhaltsangabe und Einleitung versehen von Georg Ebers, mit Hieroglyphisch-Lateinischem Glossar von Ludwig Stern, mit Unterstützung des Königlich Sächsischen Cultusministerium."
- 1.10. Ji, H. F., Li, X. J. and Zhang, H. Y. (2009). "Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?" EMBO reports **10**(3): 194-200.
- 1.11. Baron, J. H. (2012). "Evolution of clinical research: A history before and beyond James Lind." Perspectives in clinical research **3**(4): 149.
- 1.12. Daemrich, A. and Mohanty, A. (2014). "Healthcare reform in the United States and China: pharmaceutical market implications." Journal of pharmaceutical policy and practice **7**(1): 9.
- 1.13. Sulimov, V. B., Katkova, E. V., Oferkin, I. V., Sulimov, A. V., Romanov, A. N., Roschin, A. I., Beloglazova, I. B., Plekhanova, O. S., Tkachuk, V. A. and Sadovnichiy, V. A. (2014). "Application of molecular modeling to urokinase inhibitors development." BioMed research international **2014**: 625176.
- 1.14. Kalva, S., Azhagiya Singam, E. R., Rajapandian, V., Saleena, L. M. and Subramanian, V. (2014). "Discovery of potent inhibitor for matrix metalloproteinase-9 by pharmacophore based modeling and dynamics simulation studies." Journal of molecular graphics & modelling **49**: 25-37.
- 1.15. John, S., Thangapandian, S. and Lee, K. W. (2012). "Potential human cholesterol esterase inhibitor design: benefits from the molecular dynamics simulations and pharmacophore modeling studies." Journal of biomolecular structure & dynamics **29**(5): 1-16.
- 1.16. Rester, U. (2008). "From virtuality to reality - Virtual screening in lead discovery and lead optimization: a medicinal chemistry perspective." Current opinion in drug discovery & development **11**(4): 559-568.
- 1.17. Aher, R. B. and Roy, K. (2014). "First Report on Two-Fold Classification of Plasmodium Falciparum Carbonic Anhydrase Inhibitors using QSAR Modeling Approaches." Combinatorial chemistry & high throughput screening.
- 1.18. Li, C., Fang, J. S., Lian, W. W., Pang, X. C., Liu, A. L. and Du, G. H. (2014). "In vitro anti-viral effects and 3D QSAR study of resveratrol derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 neuraminidase." Chemical biology & drug design.

- 1.19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics.html>.
- 1.20. Luscombe, N. M., Greenbaum, D. and Gerstein, M. (2001). "What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field." *Methods Inf Med* **40**(4): 346-358.
- 1.21. Brown, F. (2005). "Editorial opinion: chemoinformatics - a ten year update." *Current opinion in drug discovery & development* **8**(3): 298-302.
- 1.22. Gordon, E. M., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. and Gallop, M. A. (1994). "Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions." *Journal of medicinal chemistry* **37**(10): 1385-1401.
- 1.23. Dolle, R. E., Bourdonnec, B. L., Goodman, A. J., Morales, G. A., Thomas, C. J. and Zhang, W. (2008). "Comprehensive Survey of Chemical Libraries for Drug Discovery and Chemical Biology: 2007." *Journal of Combinatorial Chemistry* **10**(6): 753-802.
- 1.24. Schreiber, S. L. (2000). "Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery." *Science* **287**(5460): 1964-1969.
- 1.25. Lange, J. H., van Stuijvenberg, H. H., Coolen, H. K., Adolfs, T. J., McCreary, A. C., Keizer, H. G., Wals, H. C., Veerman, W., Borst, A. J., de Looft, W., Verveer, P. C. and Kruse, C. G. (2005). "Bioisosteric replacements of the pyrazole moiety of rimonabant: synthesis, biological properties, and molecular modeling investigations of thiazoles, triazoles, and imidazoles as potent and selective CB1 cannabinoid receptor antagonists." *Journal of medicinal chemistry* **48**(6): 1823-1838.
- 1.26. Evans, B. E., Rittle, K. E., Bock, M. G., DiPardo, R. M., Freidinger, R. M., Whitter, W. L., Lundell, G. F., Veber, D. F., Anderson, P. S., Chang, R. S. and et al. (1988). "Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists." *Journal of medicinal chemistry* **31**(12): 2235-2246.
- 1.27. Kim, J., Kim, H. and Park, S. B. (2014). "Privileged structures: efficient chemical "navigators" toward unexplored biologically relevant chemical spaces." *Journal of the American Chemical Society* **136**(42): 14629-14638.
- 1.28. DeSimone, R. W., Currie, K. S., Mitchell, S. A., Darrow, J. W. and Pippin, D. A. (2004). "Privileged structures: applications in drug discovery." *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **7**(5): 473-494.
- 1.29. Duarte, C. D., Barreiro, E. J. and Fraga, C. A. (2007). "Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates." *Mini reviews in medicinal chemistry* **7**(11): 1108-1119.
- 1.30. Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2012). "Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010." *Journal of natural products* **75**(3): 311-335.
- 1.31. Noren-Muller, A., Reis-Correa, I., Jr., Prinz, H., Rosenbaum, C., Saxena, K., Schwalbe, H. J., Vestweber, D., Cagna, G., Schunk, S., Schwarz, O., Schiewe, H. and Waldmann, H. (2006). "Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(28): 10606-10611.
- 1.32. Breinbauer, R., Vetter, I. R. and Waldmann, H. (2002). "From protein domains to drug candidates-natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries." *Angewandte Chemie* **41**(16): 2879-2890.
- 1.33. Wetzel, S., Bon, R. S., Kumar, K. and Waldmann, H. (2011). "Biology-oriented synthesis." *Angewandte Chemie* **50**(46): 10800-10826.
- 1.34. van Hattum, H. and Waldmann, H. (2014). "Biology-oriented synthesis: harnessing the power of evolution." *Journal of the American Chemical Society* **136**(34): 11853-11859.
- 1.35. Macarron, R., Banks, M. N., Bojanic, D., Burns, D. J., Cirovic, D. A., Garyantes, T., Green, D. V., Hertzberg, R. P., Janzen, W. P., Paslay, J. W., Schopfer, U. and Sittampalam, G. S. (2011). "Impact of high-throughput screening in biomedical research." *Nature reviews. Drug discovery* **10**(3): 188-195.
- 1.36. Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B. and Baganz, F. (1998). "Systematic functional analysis of the yeast genome." *Trends in biotechnology* **16**(9): 373-378.
- 1.37. Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M. A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S.,

- Jeroncic, K., Stothard, P., Amegbey, G., Block, D., Hau, D. D., Wagner, J., Miniaci, J., Clements, M., Gebremedhin, M., Guo, N., Zhang, Y., Duggan, G. E., Macinnis, G. D., Weljie, A. M., Dowlatabadi, R., Bamforth, F., Clive, D., Greiner, R., Li, L., Marrie, T., Sykes, B. D., Vogel, H. J. and Querengesser, L. (2007). "HMDB: the Human Metabolome Database." *Nucleic acids research* **35**(Database issue): D521-526.
- 1.38. Kean, S. (2011). "Human genome 10th anniversary. The Human Genome (patent) Project." *Science* **331**(6017): 530-531.
- 1.39. Weckwerth, W. (2003). "Metabolomics in systems biology." *Annual review of plant biology* **54**: 669-689.
- 1.40. (1991). "J. D. Conolly and R. A. Hill." *Dictionary of Terpenoids, Chapman & Hall, London*.
- 1.41. Flesch, G. and Rohmer, M. (1988). "Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose." *European journal of biochemistry / FEBS* **175**(2): 405-411.
- 1.42. Christianson, D. W. (2007). "Chemistry. Roots of biosynthetic diversity." *Science* **316**(5821): 60-61.
- 1.43. Wendt, K. U. and Schulz, G. E. (1998). "Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes." *Structure* **6**(2): 127-133.
- 1.44. Gao, J., Liao, J. and Yang, G. Y. (2009). "CAAX-box protein, prenylation process and carcinogenesis." *American journal of translational research* **1**(3): 312-325.
- 1.45. Al-Quadani, T., Price, C. T., London, N., Schueler-Furman, O. and AbuKwaik, Y. (2011). "Anchoring of bacterial effectors to host membranes through host-mediated lipidation by prenylation: a common paradigm." *Trends in microbiology* **19**(12): 573-579.
- 1.46. Kamiya, Y., Sakurai, A., Tamura, S. and Takahashi, N. (1978). "Structure of rhodotorucine A, a novel lipopeptide, inducing mating tube formation in *Rhodospiridium toruloides*." *Biochemical and biophysical research communications* **83**(3): 1077-1083.
- 1.47. Zhang, F. L. and Casey, P. J. (1996). "Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences." *Annual review of biochemistry* **65**: 241-269.
- 1.48. Wollack, J. W., Zeliadt, N. A., Mullen, D. G., Amundson, G., Geier, S., Falkum, S., Wattenberg, E. V., Barany, G. and Distefano, M. D. (2009). "Multifunctional prenylated peptides for live cell analysis." *Journal of the American Chemical Society* **131**(21): 7293-7303.
- 1.49. Chan, L. N., Hart, C., Guo, L., Nyberg, T., Davies, B. S., Fong, L. G., Young, S. G., Agnew, B. J. and Tamanoi, F. (2009). "A novel approach to tag and identify geranylgeranylated proteins." *Electrophoresis* **30**(20): 3598-3606.
- 1.50. Sebt, S. M. (2003). "Blocked pathways: FTIs shut down oncogene signals." *Oncologist* **8 Suppl 3**: 30-38.
- 1.51. Tamanoi, F., Gau, C. L., Jiang, C., Edamatsu, H. and Kato-Stankiewicz, J. (2001). "Protein farnesylation in mammalian cells: effects of farnesyltransferase inhibitors on cancer cells." *Cell Mol Life Sci* **58**(11): 1636-1649.
- 1.52. Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L. and Curini, M. (2007). "Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites." *Phytochemistry* **68**(7): 939-953.
- 1.53. Abe, I., Tanaka, H., Abe, T. and Noguchi, H. (2007). "Enzymatic formation of unnatural cytokinin analogs by adenylate isopentenyltransferase from mulberry." *Biochemical and biophysical research communications* **355**(3): 795-800.
- 1.54. Unsold, I. A. and Li, S. M. (2005). "Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*." *Microbiology* **151**(Pt 5): 1499-1505.
- 1.55. Kremer, A., Westrich, L. and Li, S. M. (2007). "A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization." *Microbiology* **153**(Pt 10): 3409-3416.


- 1.56. Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C. T., Li, S. M. and Heide, L. (2003). "CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(5): 2316-2321.
- 1.57. Kuzuyama, T., Noel, J. P. and Richard, S. B. (2005). "Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products." Nature **435**(7044): 983-987.
- 1.58. Haagen, Y., Unsold, I., Westrich, L., Gust, B., Richard, S. B., Noel, J. P. and Heide, L. (2007). "A soluble, magnesium-independent prenyltransferase catalyzes reverse and regular C-prenylations and O-prenylations of aromatic substrates." FEBS letters **581**(16): 2889-2893.
- 1.59. Yazaki, K., Kuniyama, M., Fujisaki, T. and Sato, F. (2002). "Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a ket enzyme in shikonin biosynthesis." The Journal of biological chemistry **277**(8): 6240-6246.
- 1.60. Grundmann, A. and Li, S. M. (2005). "Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*." Microbiology **151**(Pt 7): 2199-2207.
- 1.61. Saiki, K., Mogi, T., Ogura, K. and Anraku, Y. (1993). "In vitro heme O synthesis by the *cyoE* gene product from *Escherichia coli*." The Journal of biological chemistry **268**(35): 26041-26044.
- 1.62. Forsgren, M., Attersand, A., Lake, S., Grunler, J., Swiezewska, E., Dallner, G. and Climent, I. (2004). "Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ." The Biochemical journal **382**(Pt 2): 519-526.
- 1.63. Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. and Delle Monache, G. (2005). "Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology." Current medicinal chemistry **12**(6): 717-739.
- 1.64. Botta, B., Delle Monache, G., Menendez, P. and Boffi, A. (2005). "Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation." Trends in pharmacological sciences **26**(12): 606-608.
- 1.65. Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R. and Cave, A. (1995). "Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*." Journal of natural products **58**(2): 324-328.
- 1.66. Yabu, Y., Yoshida, A., Suzuki, T., Nihei, C., Kawai, K., Minagawa, N., Hosokawa, T., Nagai, K., Kita, K. and Ohta, N. (2003). "The efficacy of ascofuranone in a consecutive treatment on *Trypanosoma brucei brucei* in mice." Parasitology international **52**(2): 155-164.
- 1.67. Magae, J., Hayasaki, J., Matsuda, Y., Hotta, M., Hosokawa, T., Suzuki, S., Nagai, K., Ando, K. and Tamura, G. (1988). "Antitumor and antimetastatic activity of an antibiotic, ascofuranone, and activation of phagocytes." The Journal of antibiotics **41**(7): 959-965.
- 1.68. Magae, J., Suzuki, S., Nagai, K., Yamasaki, M., Ando, K. and Tamura, G. (1986). "In vitro effects of an antitumor antibiotic, ascofuranone, on the murine immune system." Cancer research **46**(3): 1073-1078.
- 1.69. Begleiter, A. and Leith, M. K. (1990). "Activity of quinone alkylating agents in quinone-resistant cells." Cancer research **50**(10): 2872-2876.
- 1.70. Perez, C., Almonacid, L. N., Trujillo, J. M., Gonzalez, A. G., Alonso, S. J. and Navarro, E. (1995). "A new irregular phenylpropanoid from *Apollonias barbujuana*." Planta medica **61**(6): 535-536.
- 1.71. Liu, X.-X., Pilarinou, E. and McLaughlin, J. L. (1999). "Pondaplin: A novel cyclic prenylated phenylpropanoid from *Annona glabra*." Tetrahedron Letters **40**(3): 399-402.
- 1.72. Ito, C., Itoigawa, M., Otsuka, T., Tokuda, H., Nishino, H. and Furukawa, H. (2000). "Constituents of *Boronia pinnata*." Journal of natural products **63**(10): 1344-1348.
- 1.73. Fukuda, T., Sudoh, Y., Tsuchiya, Y., Okuda, T., Fujimori, F. and Igarashi, Y. (2011). "Marianins A and B, prenylated phenylpropanoids from *Mariannaea camptospora*." Journal of natural products **74**(5): 1327-1330.
- 1.74. Simons, R., Gruppen, H., Bovee, T. F., Verbruggen, M. A. and Vincken, J. P. (2012). "Prenylated isoflavonoids from plants as selective estrogen receptor modulators (phytoSERMs)." Food & function **3**(8): 810-827.
- 1.75. Boue, S. M., Cleveland, T. E., Carter-Wientjes, C., Shih, B. Y., Bhatnagar, D., McLachlan, J. M. and Burow, M. E. (2009). "Phytoalexin-enriched functional foods." Journal of agricultural and food chemistry **57**(7): 2614-2622.

- 1.76. Rasulova, K. A. and Bessonova, I. A. (1992). "Alkaloids of *Haplophyllum perforatum*." Chem Nat Compd **28**(2): 214-216.
- 1.77. Rózsa, Z., Rábik, M., Szendrei, K., Kálmán, A., Argay, G., Pelczer, I., Aynechi, M., Mester, L. and Reisch, J. (1986). "Dihydroperfamine, an alkaloid from *haplophyllum glabrinum*." Phytochemistry **25**(8): 2005-2007.


## CAPÍTULO 2

# ENFERMEDADES DESATENDIDAS

# 2015



Las enfermedades tropicales desatendidas son principalmente enfermedades infecciosas que proliferan en entornos empobrecidos, especialmente en el ambiente caluroso y húmedo de los climas tropicales, condiciones que se pueden encontrar en el norte de nuestro país y nuestra región.



## 2 ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS

Causante de millones de muertes sobre la faz de la tierra, sobre todo a niños menores de 5 años y afectando a más de mil millones de personas, las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) reducen de manera permanente el potencial humano, manteniendo a las personas sumidas en la pobreza. La desatención en el sector público se establece cuando se dejan de lado en las agendas de gobierno y no se transfieren recursos suficientes de los ya limitados presupuestos en salud de la mayoría de los países en donde son endémicas. Suponen por lo tanto una enorme carga económica, recibiendo el mote de “las enfermedades de la pobreza”. Una de las características más importantes es el carácter global de las ETD, puesto que prevalecen en todos los continentes, a excepción de la Antártida (**Figura 2.1**).

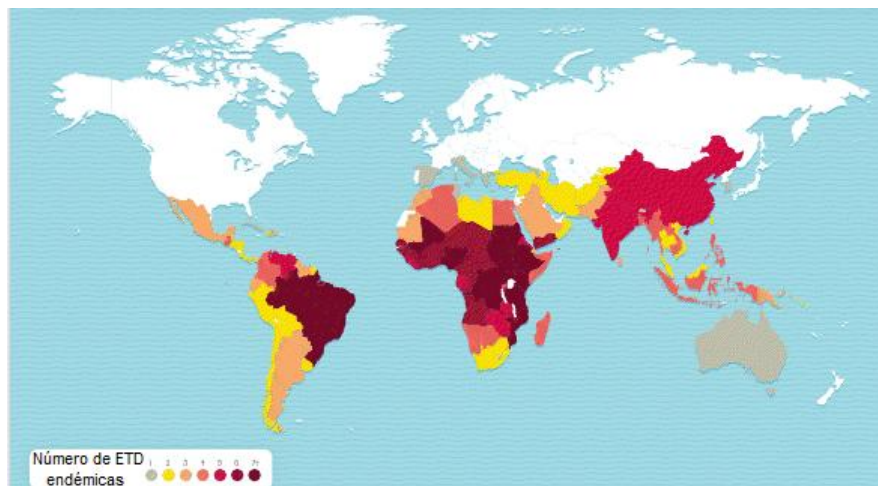


Figura 2.1. Número de ETD endémicas por países. El área endémica afecta al 50% de la población mundial (Imagen adaptada de psiimpact.com).

Fundamentalmente el término desatendido hace referencia a la nula asignación de recursos de la industria farmacéutica para combatirlos y erradicarlos de la faz de la tierra. Una de las razones es que deben competir con otras dolencias más notorias, que pueden causar una mortalidad mayor y despiertan una mayor atención a nivel nacional e internacional. La consecuencia inmediata es el inadecuado e ineficiente arsenal quimioterapéutico con los que se combaten a las ETDs, prácticamente inalterado en los últimos 50 años. Adicionalmente, la continua aparición de cepas resistentes a medicamentos comerciales, encienden las alarmas en todo el mundo.

La desatención también se propaga en la investigación y el desarrollo. Los incentivos para crear nuevos medios de diagnóstico, medicamentos y vacunas son escasos para estas enfermedades que suponen un mercado de clientes sin capacidad de pago. Por ese motivo, los círculos académicos trabajando en conjunto con organismos públicos o privados, tienen el deber y la obligación de hacerse cargo del escaso aporte en la investigación y el desarrollo que dejan otras áreas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>[2.1]</sup> afronta a estas enfermedades en forma agrupada por dos cuestiones. En primer lugar, aunque clínica y quimioterapéuticamente son distintas si se consideran sus causas y sus efectos físicos, todas esas afecciones causan graves incapacidades y deficiencias a las personas de por vida. La segunda razón, la asociación estrecha que tienen con la pobreza tienden a solaparlas geográficamente. Todas estas enfermedades aparecen en regiones donde las condiciones de higiene y la precariedad se hacen presentes.

Muchas de ellas requieren de un vector para afectar al hombre, por lo tanto el factor de distribución geográfico del mismo es crítico en estas dolencias. En zonas tropicales o subtropicales abundan los insectos vectores de enfermedades, lo que constituye una problemática crónica, a la que debe sumarse que cada día hay más personas que sufren simultáneamente dos o más de esas infecciones.

Estas enfermedades afectan enormemente la productividad económica de adultos jóvenes, entorpecen el crecimiento y el desarrollo cognitivo de los niños y causan un gran sufrimiento humano, con problemas frecuentes de estigmatización social y discriminación. Entre las dificultades que presentan, se enumeran ceguera, debilidad, deformidades o amputaciones.

Su progresividad es insidiosa, puesto que recurrentemente aparecen graves trastornos después de varios años de infección asintomática, en la que no se despertó la necesidad a procurar atención médica por parte de los infectados. En esa etapa asintomática los parásitos se multiplican en el hospedador, migrando a través del cuerpo y multiplicándose en los tejidos, los órganos internos, los ojos o el sistema linfático. Algunos destruyen la piel y todo el tejido subcutáneo. Entonces, de no detectarse y tratarse a tiempo, el daño causado es irreversible. Otras ETD pueden matar al paciente en el transcurso de semanas o meses una vez que se alcanza la fase avanzada de la afección.

La erradicación de las ETD requiere un estrecho vínculo interdisciplinario entre los diferentes estamentos (investigación académica, hospitales, gobiernos) y los programas de control, entre los que se puede encontrar el Programa Especial para la Investigación y el Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR, por sus siglas en inglés), un programa global soportado por la OMS.<sup>[2.2]</sup>

La cartera actual de enfermedades de la pobreza del programa TDR incluye las dolencias que se detallan en la **Tabla 2.1**

Tabla 2.1. Cuadro comparativo de las principales enfermedades tropicales desatendidas, según el programa TDR.

Enfermedad	Agente etiológico	Individuos afectados	Área Incidencia
<b>Malaria</b>	<i>Plasmodium falciparum</i> (protozoo). Vector: mosquito del género <i>Anopheles</i>	500 millones de casos anuales y 1 millón de muertes al año. <sup>[2.3]</sup> Es la enfermedad global parasitaria más importante.	
<b>Tripanosomiasis africana</b>	<i>Trypanosoma brucei</i> (Protozoo) Vector: Mosca Tse-Tse	500 mil personas en África infectadas. <sup>[2.1]</sup>	
<b>Enfermedad de Chagas</b>	<i>Trypanosoma cruzi</i> (protozoo) Vector: triatomino	Entre 14 y 16 millones de personas se infectan anualmente. <sup>[2.4]</sup>	
<b>Leishmaniasis</b>	Protozoos del género <i>Leishmania</i> . Vector: mosquitos del género <i>Phlebotomus</i> y <i>Lutzomyia</i> .	12 millones de personas infectadas. 2 millones de nuevas infecciones anuales. <sup>[2.1]</sup>	
<b>Dengue</b>	Virus del género <i>Flavivirus</i> . Vector: Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	100 millones de infectados y 2,5 millones de muertes anuales. <sup>[2.1]</sup>	
<b>Esquistosomiasis</b>	Gusano platelminto de la clase trematodos	200 millones de personas infectadas. 120 millones sintomáticos y 20 millones con secuelas graves. <sup>[2.1]</sup>	

Enfermedad	Agente etiológico	Individuos afectados	Área Incidencia
<b>Tuberculosis</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis.</i>	14,6 millones de casos crónicos activos; 8,6 millones de casos nuevos y 1,3 millones de muertes. <sup>[2.1; 2.5]</sup>	
<b>Lepra</b>	<i>Mycobacterium leprae</i>	232 857 nuevos casos en 2012. <sup>[2.1]</sup>	
<b>Filiariasis linfática</b>	Nemátodos filarios del orden <i>Spirurida</i> . Vector: mosquitos de las familias <i>Culicidae</i> o <i>Phlebotomidae</i> o moscas <i>Tabanidae</i>	120 millones de personas infectadas y la mitad de la población es portadora en áreas endémicas severas. <sup>[2.1]</sup>	
<b>Oncocercosis</b>	Gusano parásito llamado <i>Onchocerca volvulus</i> . Vector: Jejenes.	37 millones de personas infectadas. <sup>[2.1]</sup>	
<b>Tracoma causante de ceguera</b>	Bacteria <i>Chlamydia trachomatis</i>	80 millones de personas infectadas. 6 millones perdieron la vista <sup>[2.1]</sup>	

Como se puede observar, parte de estas afecciones son causadas por parásitos protozoarios y tienen una altísima incidencia en nuestro país y la región. En particular, la enfermedad de Chagas, la malaria y las variantes de leishmaniasis revisten de mayor gravedad, teniendo en cuenta sus elevados índices de mortalidad y morbilidad. Por otro lado la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana tienen un altísimo impacto en el continente africano. Todas estas dolencias, a excepción de la malaria, son producidas por parásitos filogenéticamente emparentados (*Trypanosomatidae*), por lo que la comunidad científica tiende a desarrollar estrategias en forma agrupada para crear nuevos agentes destinados a combatirlas.

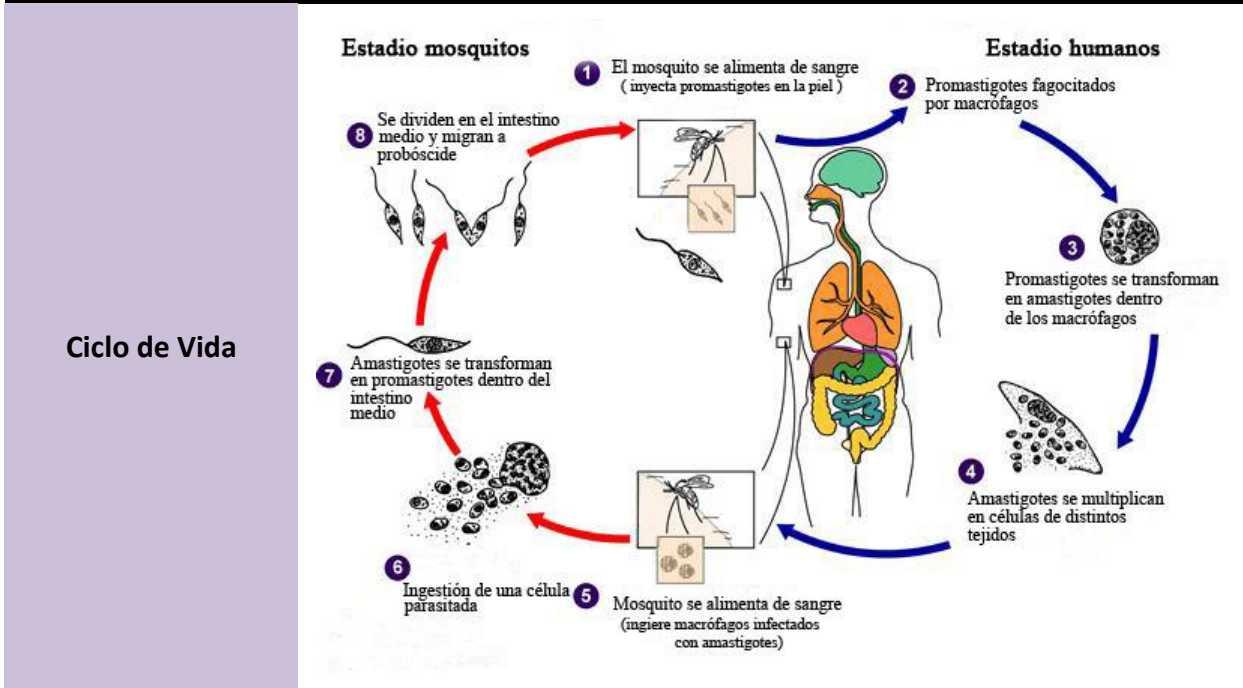
Las infecciones parasitarias tienen ciclos de vidas complejos que transcurren entre dos organismos, un vector invertebrado y un hospedero vertebrado como el hombre. Además, dentro de cada hospedador los parásitos pasan por diferentes estadios cambiando

su morfología y bioquímica. Esta complejidad dificulta enormemente el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos que son requeridos urgentemente ya que los medicamentos actuales son considerados obsoletos. La **Tabla 2.2** permite ilustrar la complejidad de los ciclos de vida y la quimioterapia actual de estas enfermedades.

Tabla 2.2. Comparativa entre ETD producidas por parásitos protozoarios.

Enfermedad de Chagas	
<b>Ciclo de Vida</b>	
<b>Quimioterapia</b>	<p>Las únicas drogas disponibles son el nifurtimox y el benznidazol. Ambos compuestos exhiben una importante actividad para el tratamiento de la enfermedad en la fase aguda, con una cura parasitológica de más del 80% de los pacientes tratados. La efectividad varía de acuerdo a la región geográfica, probablemente debido a la diferencia de susceptibilidad de las cepas de <i>T. cruzi</i> que se encuentren en esas áreas. Sin embargo, hay menos del 20% de cura parasitológica en pacientes en fase crónica de la enfermedad. Estas drogas poseen variados efectos secundarios, sin embargo son mejor toleradas por niños que por adultos.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>Nifurtimox</b> (introducida en los '60)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>Benznidazol</b> (introducida en los '70)</p> </div> </div>

**Leishmaniasis**



**Quimioterapia**

La principal quimioterapia para el tratamiento de la leishmaniasis es el estilbo-gluconato (Pentosa<sup>m</sup>), que es un derivado de antimonio altamente tóxico. Otras drogas utilizadas cuando los pacientes no responden a las drogas derivadas de antimonio, son la anfotericina B con una toxicidad relativamente baja pero con un alto costo y la pentamidina que es aún más tóxica que los derivados de antimonio y debe ser suministrada intrahospitalariamente.

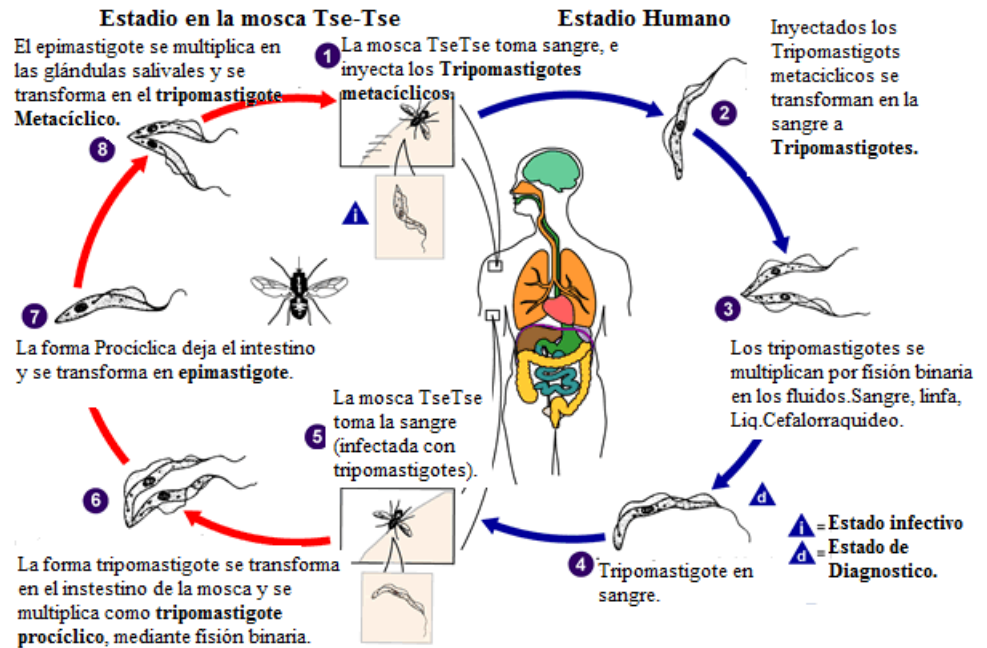
N=C(N)Nc1ccc(OCCCCCOc2ccc(N=C(N)N)cc2)cc1

**Pentamidina (1941)**

**Anfotericina B (1955)**

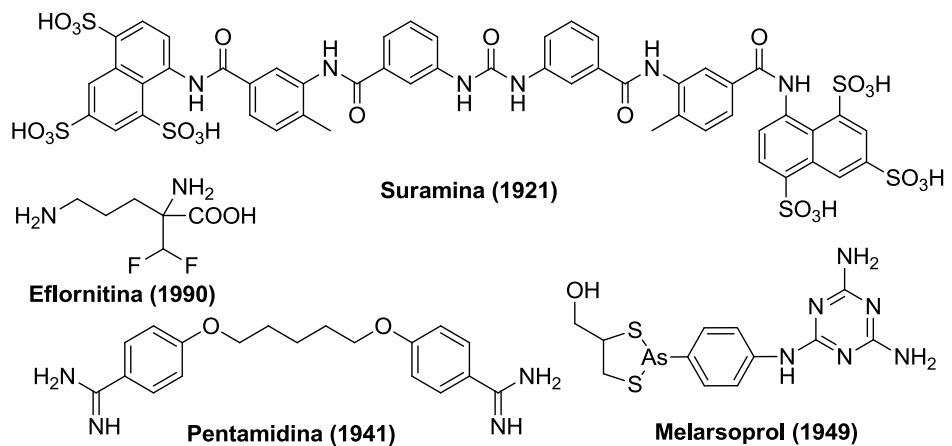
**Tripanosomiasis africana (Enfermedad del sueño)**

**Ciclo de Vida**



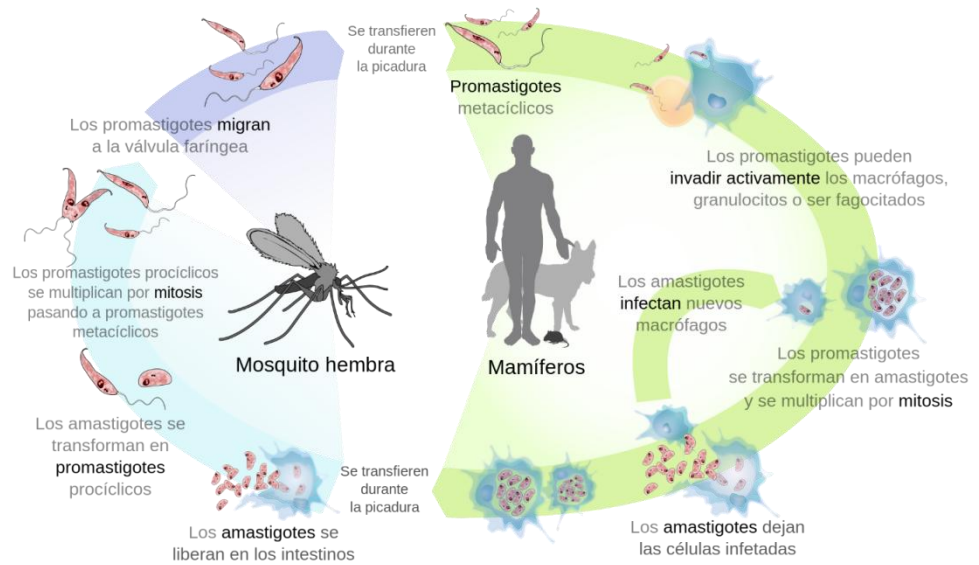
**Quimioterapia**

Los antiparasitarios utilizados en la primera etapa de la enfermedad del sueño tienen poca toxicidad y pueden ser administrados fácilmente, siendo vital 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:



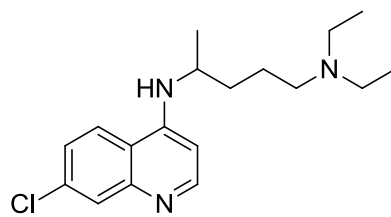
**Malaria**

**Ciclo de Vida**

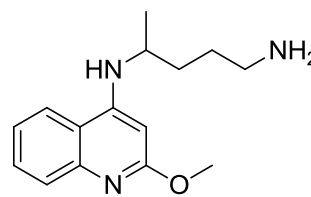


**Quimioterapia**

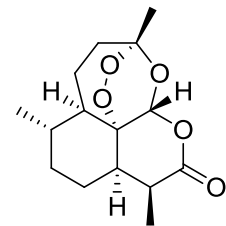
Entre las drogas más importantes para el tratamiento de la malaria se encuentran la cloroquina y la primaquina (que está contraindicada para el embarazo). La cloroquina raramente presenta efectos secundarios, pero se ha observado una creciente resistencia en *P. falciparum* en distintas áreas endémicas. Con el fin de tratar a estas cepas resistentes se utiliza una combinación de pirimetamina-sulfadoxina y primaquina como gametocida. También se utilizan derivados de artemisinina para tratar cepas multi-resistentes y terapias combinadas con el objeto de evitar desarrollo de resistencias.



**Cloroquina (1934)**



**Primaquina (1940)**



**Artemisina (1979)**

## 2.1 BIBLIOGRAFÍA

- 2.1. "Organización Mundial de la Salud; <http://www.who.int> ".
- 2.2. "Programa Especial para la Investigación y el Entrenamiento en Enfermedades Tropicales, <http://www.who.int/tdr/en/>."
- 2.3. Breman, J. G. (2001). "The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **64**(1-2 Suppl): 1-11.
- 2.4. Tarleton, R. L., Gurtler, R. E., Urbina, J. A., Ramsey, J. and Viotti, R. (2014). "Chagas disease and the london declaration on neglected tropical diseases." *PLoS neglected tropical diseases* **8**(10): e3219; "Institute for OneWorld Health. Chagas disease: A Latin American Nemesis."
- 2.5. Pascopella, L., Franks, J., Marks, S. M., Salcedo, K., Schmitz, K., Colson, P. W., Hirsch-Moverman, Y., Flood, J. and Sayles, J. (2014). "Opportunities for tuberculosis diagnosis and prevention among persons living with HIV: a cross-sectional study of policies and practices at four large Ryan White Program-Funded HIV clinics." *PloS one* **9**(7): e101313.

## CAPÍTULO 3

# BIOINFORMÁTICA Y QUIMIOINFORMÁTICA

# 2015



*El impacto científico, médico y social de las disciplinas que involucren a la informática, han generado los avances tecnológicos más espectaculares del siglo XXI.*



### 3. BIOINFORMÁTICA Y QUIMIOINFORMÁTICA

#### 3.1. SOBRE LA BIOINFORMÁTICA Y LA GENÓMICA COMPARATIVA

Según la definición del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (2001)<sup>[3.1]</sup> la bioinformática es un campo de la ciencia en el cual confluyen varias disciplinas que incluyen la biología, la computación, la matemática aplicada, la estadística, la inteligencia artificial, la química, la bioquímica y la tecnología de la información. El fin último de este campo es facilitar el descubrimiento de nuevos conceptos y generar conceptos globalizadores a partir de los cuales se puedan discernir principios unificadores en biología.

Los principales áreas de investigaciones de esta disciplina incluyen el alineamiento de secuencias, el montaje del genoma, la predicción de genes, el alineamiento estructural de proteínas, la predicción de la expresión génica y de la estructura de proteínas, las interacciones proteína-proteína y el modelado de la evolución.<sup>[3.2]</sup>

En 1984 Bach y Friedland reportan el desarrollo de un sistema computacional inteligente para la asistencia de diseño experimental en biología molecular (en particular para experimentos de clonación), denominado proyecto MOLGEN.<sup>[3.3]</sup> Desde ese momento y hasta el comienzo de la "revolución genómica", el concepto de bioinformática se refería sólo a la creación y mantenimiento de base de datos donde se almacena información tales como secuencias de nucleótidos y aminoácidos. El desarrollo de este tipo de base de datos no solamente involucra el diseño, sino que requiere también el desarrollo de interfaces complejas donde los investigadores pudieran acceder a los datos existentes, revisarlos o suministrar nueva información.<sup>[3.4]</sup>

Desde el apogeo de la biología molecular hasta la actualidad, la bioinformática ha sufrido procesos de renovación continuos, dirigido tal vez por un espíritu evolucionista innato (**Figura 3.1**).

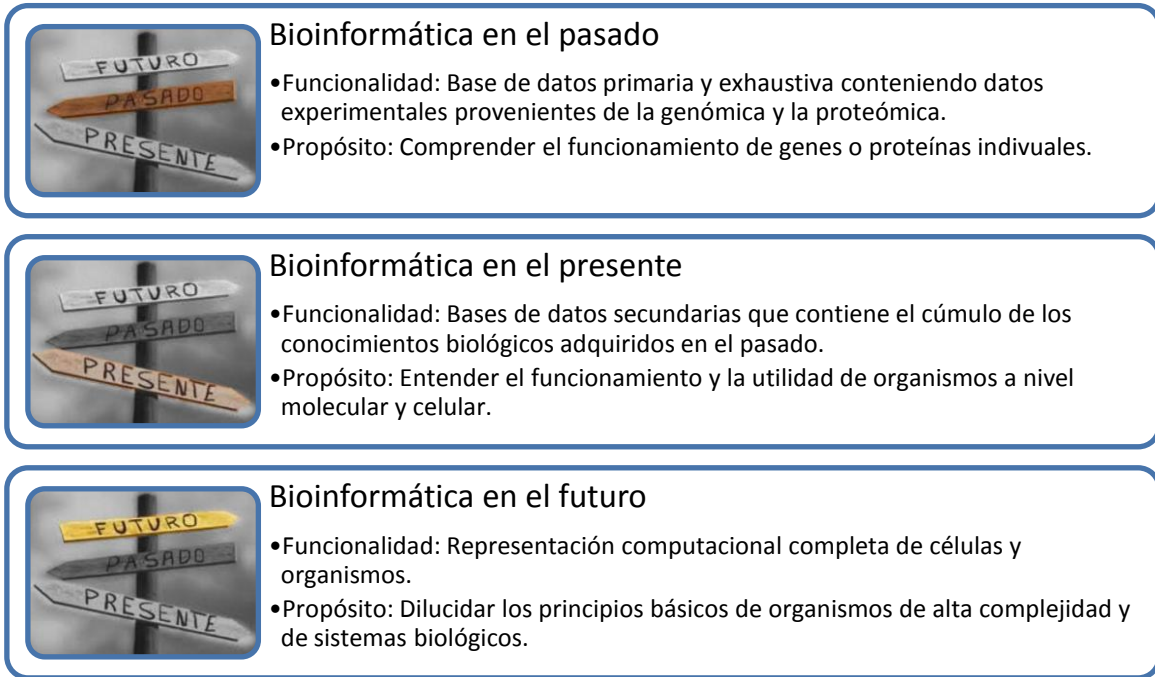


Figura 3.1. Paradigmas de la bioinformática.

La bioinformática magnificó su proyección desde la conclusión del Proyecto Genoma Humano en el año 2001<sup>[3.5, 3.6]</sup> y el desarrollo subsiguiente de otros grandes proyectos de genotipado (Proyecto HapMap, Proyecto 1000 Genomas) destinados a explorar la relación entre variantes genéticas y la predisposición a las enfermedades, diagnóstico y respuesta a los fármacos. (**Figura 3.2**) Estos proyectos requieren el desarrollo de herramientas computacionales que permitan extraer toda la información contenida en las bases de datos para generar nuevos conocimientos. Conjuntamente al avance unísono de la Biología Molecular y el desarrollo informático, ha aumentado las posibilidades de conocer el funcionamiento de los seres vivos a nivel molecular y celular. Surge entonces la necesidad de unificar toda esta información para alcanzar un panorama completo de la biología de la célula y así poder comprender cómo se alteran distintos procesos en presencia de enfermedades. Es por eso que hoy en día es difícil entender la investigación en el área de las enfermedades genéticas humanas sin la Bioinformática.

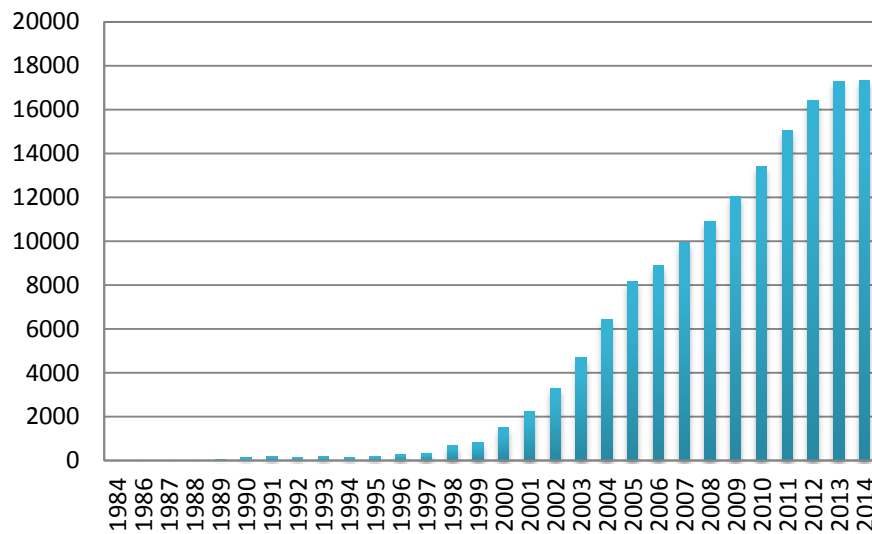


Figura 3.2. Publicaciones en bioinformática desde la presentación del primer borrador del proyecto genoma humano. Fuente: Pubmed.

Por otro lado, la genómica comparativa estudia las semejanzas y diferencias entre genomas de diferentes organismos. Entre sus objetivos busca utilizar la información proporcionada por las huellas dactilares de la evolución para comprender la funcionalidad y los procesos que actúan sobre el genoma. Aunque es todavía un campo de desarrollo reciente, promete adquirir nuevos conocimientos sobre distintos aspectos de la evolución de las especies modernas. La cantidad total de información contenida en los genomas más complejos (750 megabytes en el caso del ser humano) requiere la automatización de los métodos de genómica comparativa.

Para lograr el cometido, la genómica comparativa recurre a las diferencias y semejanzas de proteínas, ARN y regiones reguladoras de diferentes organismos y así dilucidar como la selección natural ha actuado sobre tales elementos. Sin embargo, a menudo esta tarea se ve dificultada debido a la multiplicidad de eventos que han tenido lugar a través de la historia de linajes individuales, dejando sólo trazas distorsionadas y superpuestas en el genoma de cada organismo. Por esta razón, los estudios por genómica comparativa de pequeños organismos modelo (la levadura, por ejemplo) son de gran importancia para avanzar en nuestro conocimiento de los mecanismos generales.

Los paquetes bioinformáticos centrales para el abordaje de los análisis bioinformáticos realizados son el BLAST,<sup>[3.7]</sup> el T-coffee<sup>[3.8]</sup> y el ClustalW2.<sup>[3.9]</sup> Todos son plataformas virtuales libres disponibles en línea.



El BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) fue desarrollado por el Instituto Nacional de Salud del gobierno de EE. UU., por lo que es de dominio público y puede usarse gratuitamente desde el servidor del

NCBI. Entre las ventajas de esta plataforma se encuentra la actualización constante de las bases de datos por partes del servidor y la rapidez debido a la utilización de un clúster de computadoras para efectuar los trabajos. BLAST busca regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas presentes en una base de datos contra una secuencia de interés y calcula la significancia estadística de los alineamientos usando un enfoque heurístico. Según los desarrolladores, BLAST puede ser utilizado para inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como ayudar a identificar miembros de una familia de genes.



T-Coffee (del inglés Tree-based Consistency Objective Function For alignment Evaluation) es un software para el alineamiento múltiple

de secuencias que utiliza un enfoque progresivo. Genera una biblioteca de alineamientos de pares para guiar el alineamiento múltiple de secuencias. Puede combinar también, alineamientos múltiples obtenidos previamente o utilizar información estructural de archivos PDB (3D-Coffee). Tiene características avanzadas para evaluar la calidad de los alineamientos e identificar la ocurrencia de motivos.



Clustal es un programa desarrollado por el University College Dublin y el European Bioinformatics Institute (EBI, por sus siglas en inglés), ampliamente utilizado para realizar alineamientos múltiples de secuencias.

La última versión es la 2.0.12. Hay dos variantes, la interfaz para líneas de comando (ClustalW) o la interfaz gráfica (ClustalX). Las principales tareas de este programa son realizar alineamiento por pares, crear un árbol filogenético y utilizar el árbol filogenético creado para realizar alineamientos múltiples.

### 3.2. SOBRE LA QUIMIOINFORMÁTICA

Debido a la enorme diversidad de blancos farmacológicos es difícil encontrar un denominador común para diseñar fármacos y en su defecto, expresar características moleculares comunes. Sin embargo, criterios de cuantificación simple (como límites para el peso molecular, logP o el número de dadores o aceptores de puentes de hidrógeno) permiten establecer una primera línea de trabajo en la búsqueda de nuevas moléculas

bioactivas. En ese terreno es fundamental aplicar herramientas de la quimioinformática en la ingeniería de nuevos medicamentos.

La quimioinformática es un término acuñado por F. K. Brown en el año 1998 definida como: *“La mezcla de aquellos recursos informáticos para transformar datos en información e información en conocimiento, con el propósito hacer más rápidas mejores decisiones en el ámbito de la identificación de los fármacos cabeza de serie (o de molécula inicial) y la optimización de fármacos.”* [3.10]

A pesar de su reciente aparición, el uso de herramientas quimioinformáticas para calcular las propiedades fisicoquímicas de una entidad molecular está en plena expansión (Figura 3.3).

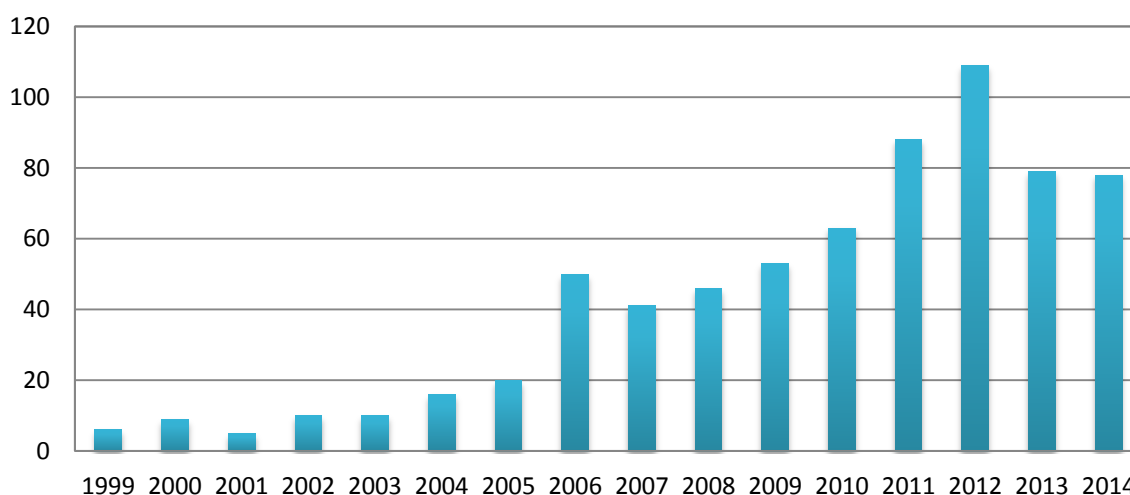


Figura 3.3. Publicaciones en quimioinformática desde su definición. Fuente: Scopus.

Los programas utilizados en este trabajo de tesis fueron Molinspiration Cheminformatics,<sup>[3.11]</sup> Osiris Property Explorer<sup>[3.12]</sup> y ChemMine Tools.<sup>[3.13]</sup> Todos estos programas se presentan como plataformas virtuales libres disponibles en línea.

**molinspiration**  
cheminformatics

Molinspiration Cheminformatics es un programa desarrollado en Java por una compañía privada fundada en 1986 en la Universidad de Bratislava, Eslovaquia. Se pueden enumerar como propiedades de predicción del Molinspiration: LogP, área superficial polar de la molécula, volumen molecular, reglas de Lipinski, número de enlaces rotables, peso molecular, dadores de puentes de hidrógeno y aceptores y peso molecular. En cuanto a los predictores de bioactividad la compañía define al *Druglikeness* como un complejo equilibrio de diversas

propiedades moleculares y características estructurales que determinan si la molécula particular es similar a los fármacos conocidos. Estas propiedades que incluyen hidrofobicidad, distribución electrónica, características de los puentes de hidrógeno, tamaño molecular, flexibilidad y presencia de farmacóforos influyen en el comportamiento de la molécula dentro de un organismo vivo (incluyendo biodisponibilidad, propiedades de transporte, afinidad a proteínas, reactividad, toxicidad, estabilidad metabólica y muchos otros). Molinspiration desarrolló la tecnología de sistemas expertos para el cálculo de la puntuación *druglikeness* hacia ligandos GPCR, moduladores de canales iónicos, inhibidores de quinasa, ligandos de receptores nucleares, inhibidores de la proteasa y otros blancos enzimáticos.




OSIRIS Property Explorer es una herramienta desarrollada por el departamento de investigación informática de la farmacéutica Actelion Ltd con asiento en Allschwill, Suiza. La versión libre del software está disponible en formato Java en el portal de “*Organic Chemistry*”. Entre sus principales herramientas se encuentra el cálculo del *drug score* de una molécula determinada. Este parámetro combina propiedades calculadas por el sistema de *druglikeness*, cLogP, LogS, peso molecular y riesgos tóxicos (mutagénicos, tumorigénicos, irritabilidad y efectos adversos utilizando algoritmos que permiten juzgar la calidad de un compuesto como potencial fármaco.

### ChemMine Tools


ChemMine Tools, es un servicio en línea para el análisis de datos de moléculas pequeñas. Proporciona en una interfaz web, un conjunto de herramientas quimioinformáticas de minería de datos que son útiles para diversas rutinas de análisis realizados en genómica química y el descubrimiento de fármacos. Las funcionalidades principales de ChemMine Tools se dividen en cinco grandes áreas de aplicación: visualización de datos, comparación de estructuras, búsqueda de similitud, agrupamiento de compuestos y predicción de propiedades químicas.


### 3.3. SOBRE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS


 LogP: El coeficiente de reparto (P) se define como la relación de las concentraciones en equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema bifásico consistente en dos disolventes considerablemente inmiscibles: n-octanol y agua:

$$Pow = ([n\text{-octanol}] / [agua])$$


El coeficiente de reparto (P) es entonces el coeficiente de reparto y se indica generalmente en forma de su logaritmo decimal (log P).

 El área superficial polar (ASP): Se define como la suma superficial de todos los átomos polares, principalmente oxígeno y nitrógeno y sus hidrógenos unidos. Es una medida utilizada en química medicinal en la optimización de la capacidad de un fármaco para penetrar células. Las moléculas con una superficie polar de más de  $140 \text{ \AA}^2$  tienden a ser pobremente permeables a las membranas celulares. Para que las moléculas penetren la barrera hematoencefálica (y por lo tanto actuar sobre los receptores en el sistema nervioso central), se requiere un ASP menor de  $90 \text{ \AA}^2$ .

 Índice de similitud molecular: Se puede convertir toda la información estructural de compuestos en mapas de caracteres binarios (mapa de bits), emulando a los sistemas bioinformáticos. En este contexto es posible utilizar esas huellas digitales para agrupar compuestos en clústeres estructurales según la similitud entre ellos, mediante algoritmos regidos por el coeficiente de Tanimoto. Este coeficiente es una estadística que se usa para comparar la similitud y la diversidad de conjuntos de muestras. El coeficiente de Tanimoto da dimensión de medidas de similitud entre conjuntos de muestras finitas, y se define como el tamaño de la intersección dividido por el tamaño de la unión de los conjuntos de la muestra. El coeficiente de Tanimoto tiene un rango de 0 a 1, los valores más altos indican una mayor similitud. Es importante destacar que un coeficiente de Tanimoto de 1 no significa necesariamente que dos compuestos son idénticos. Sólo significa que tienen descriptores estructurales idénticos o huellas digitales idénticas.<sup>[3.14]</sup>

 Evaluación de riesgos de toxicidad: El predictor del riesgo de toxicidad de OSIRIS calcula de manera empírica los posibles riesgos de una entidad química comparando la presencia de subestructuras de la molécula con una base de datos de fragmentos estructurales exhaustiva. Estas bases de fragmentos fueron creados rigurosamente teniendo en cuenta todos los compuestos de la base de datos RTECS, conocida por ser activa en ciertas clases de toxicidades (por ejemplo, mutagenicidad). Después del proceso de búsqueda de subestructuras, se determina la frecuencia de ocurrencia de los fragmentos. También determina las frecuencias de estos fragmentos dentro de las estructuras de más de 3.000 medicamentos comercializados, basándose en la suposición de que estos fármacos son en gran parte libre de efectos tóxicos. Finalmente, cualquier fragmento se considera un factor

de riesgo si se presenta en forma periódica en subestructura de compuestos nocivos y nunca o raramente en los medicamentos comercializados.

 Puntaje como droga (*drug score*): Es un parámetro que combina en una única fórmula todos los parámetros fisicoquímicos de una molécula (LogP, peso molecular, etc.), en combinación con los posibles riesgos toxicológicos (mutagénico, irritante, etc.). Se calcula según la siguiente ecuación:  $ds = \prod \left( \frac{1}{2} + \frac{1}{2} si \right) \cdot \prod ti$ . donde *ds*, es el puntaje como droga, *si* es la contribución de todos los parámetros fisicoquímicos de la molécula y *ti* es el factor de la contribución de los riesgos toxicológicos de la estructura. El valor de salida puede ser usado para juzgar el potencial farmacológico de una entidad química.

### 3.4. BIBLIOGRAFÍA

- 3.1. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics.html>."
- 3.2. Kanehisa, M. and Bork, P. (2003). "Bioinformatics in the post-sequence era." *Nature genetics* **33 Suppl**: 305-310.
- 3.3. Bach, R., Iwasaki, Y. and Friedland, P. (1984). "Intelligent computational assistance for experiment design." *Nucleic acids research* **12**(1 Pt 1): 11-29.
- 3.4. Luscombe, N. M., Greenbaum, D. and Gerstein, M. (2001). "What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field." *Methods Inf Med* **40**(4): 346-358.
- 3.5. Lander, E. S., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- 3.6. Kean, S. (2011). "Human genome 10th anniversary. The Human Genome (patent) Project." *Science* **331**(6017): 530-531.
- 3.7. "<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>."
- 3.8. "<http://www.tcoffee.org/>."
- 3.9. "<http://www.clustal.org/clustal2/>."
- 3.10. Brown, F. (2005). "Editorial opinion: chemoinformatics - a ten year update." *Current opinion in drug discovery & development* **8**(3): 298-302.
- 3.11. "<http://www.molinspiration.com/>."
- 3.12. "<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>."
- 3.13. "chemmine.ucr.edu."
- 3.14. Rogers, D. J. and Tanimoto, T. T. (1960). "A Computer Program for Classifying Plants." *Science* **132**(3434): 1115-1118.

## CAPÍTULO 4

## OBJETIVOS

# 2015



Cuadro "La lección de anatomía del Dr. Nicolaes Tulp".  
Pertenece a Rembrandt.

Durante el renacimiento, Paracelso sugería las propiedades curativas como algo inherente a cada sustancia o fármaco. Con él se inicia un importante concepto que derivaría en la búsqueda de los principios activos de los medicamentos. Por otro lado, en la ciudad de Florencia del año 1498, se publica el "Recetario florentino", considerado la primera farmacopea del mundo.







## OBJETIVO GENERAL

La presente tesis doctoral tiene como objetivo general abordar problemáticas en la frontera entre la química y la biología. Para abordar este encomiable desafío, es necesario idear nuevas aproximaciones generando herramientas con recursos procedentes de ambas disciplinas para buscar respuestas de esta área interdisciplinaria.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de esta tesis incluyen:

-  Posicionar los isoprenos como una estructura privilegiada mediante estudios teóricos y experimentales.
-  Utilizar conceptos y herramientas provenientes de la bioinformática y de la quimioinformática para el diseño de nuevas familias de compuestos isoprenilados.
-  Desarrollar nuevas rutas sintéticas tendientes a preparar de manera sencilla colecciones de compuestos isoprenilados.
-  Utilizar las herramientas desarrolladas para encontrar nuevas entidades químicas con actividad frente a los agentes etiológicos de enfermedades tropicales desatendidas.

## CAPÍTULO 5

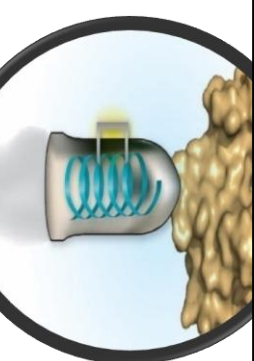
# ISOPRENILAZIDAS E ISOPRENILTRIAZOLES

## 2015

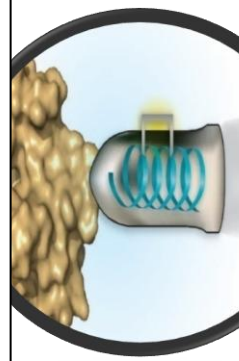


“La persistencia de la memoria”

Salvador Dali



*Hace cien años, Paul Ehrlich, el fundador de la quimioterapia, recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina. Su postulado de la creación de "balas mágicas" para su uso en la lucha contra las enfermedades humanas ha inspirado a generaciones de científicos a desarrollar el arsenal de eficaces terapias moleculares con que contamos en la actualidad. Los avances excepcionales en la biología molecular y la investigación genética han acelerado el desarrollo de fármacos. El paradigma declarado es el desarrollo de "drogas personalizadas y adaptadas" que se dirigen con precisión a blancos moleculares específicos. Es conveniente volver a examinar los fundamentos que llevan al descubrimiento de esos agentes para poder alcanzar los nuevos paradigmas.*



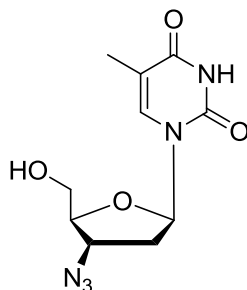
## 5. ISOPRENILAZIDAS COMO HERRAMIENTAS PARA LA GENERACIÓN DE DIVERSIDAD QUÍMICA.

La búsqueda de entidades moleculares capaces de generar diversidad estructural en un número discreto de reacciones es uno de los desafíos más importantes a la hora de concebir nuevas estrategias en la ingeniería de fármacos novedosos.

En ese contexto, resulta promisorio posicionar a las azidas alílicas como un importante sintón que permitan generar compuestos con fines biológicos o sintéticos.

### 5.1 USO DE AZIDAS ORGÁNICAS EN LA PREPARACION DE FÁRMACOS.

Las azidas orgánicas han ganado un gran interés en la comunidad científica desde su descubrimiento por Johann Peter Griess en 1864. Existen numerosos reportes de estructuras orgánicas que contienen azidas, teniendo algunas de ellas interesantes propiedades biológicas. Un ejemplo de esta es la Ziduidina (3'-azido-3'-deoxitimidina, **Figura 5.1**), un potente inhibidor de la replicación del virus T-linfotrópico tipo III y del virus asociados a la linfadenopatía (HTLV-III/LAV, por sus siglas en inglés)<sup>[5.1]</sup> utilizado en pacientes con HIV.



**Figura 5.1.** 3'-azido-3'-deoxitimidina

Históricamente, las azidas orgánicas han sido preparadas como intermediarios sintéticos comunes de grupos aminos. En tiempos recientes su uso se expandió a la síntesis de péptidos y en química combinatoria para introducir grupos nitreno.<sup>[5.2]</sup> Son además un sintón ampliamente usado en la síntesis de triazoles y tetrazoles, productos que tienen actividades biológicas destacadas como agentes anti-VIH, antimicobacterianos<sup>[5.3]</sup> y antiparasitarios.<sup>[5.4]</sup> Desde inicios del siglo XXI, el uso de las azidas orgánicas ha cobrado una enorme revitalización con el uso extensivo de la síntesis de los 1,2,3-triazoles. Este

renacimiento se debió al descubrimiento simultáneo de los grupos de los profesores Meldal<sup>[5.5]</sup> y Sharpless<sup>[5.6]</sup> que introdujeron una versión catalítica de la clásica cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre azidas y alquinos. Esta reacción catalizada por iones de cobre (I) posee una notable mejoría de la regioquímica y constituye uno de los ejemplos más representativos de lo que el Prof. Sharpless dio a conocer como “click chemistry” (Figura 5.2).

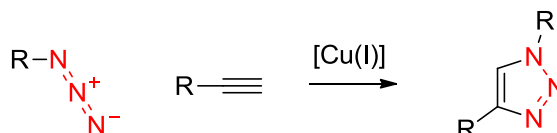


Figura 5.2. Cicloadición 1,3-Dipolar de Huisgen

Debido a que el grupo azida no está presente entre los grupos funcionales presente en moléculas de organismos vivos, su utilización en conjunto con la química “click” ha permitido desarrollar poderosas herramientas bioortogonales que ha hecho sustanciales contribuciones en el campo de las “ómicas”.<sup>[5.7]</sup>

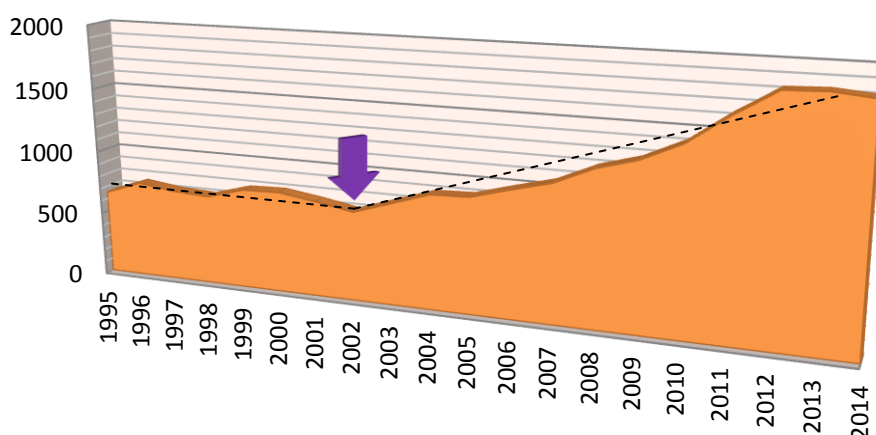


Figura 5.3. Publicaciones sobre azidas orgánicas. Fuente: Scopus.

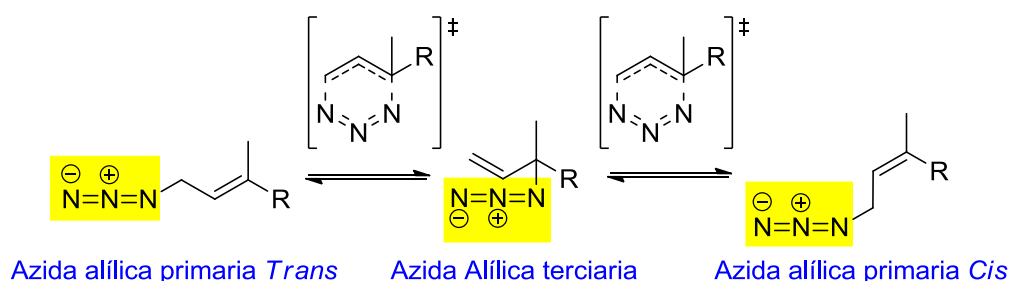
### 5.1.1 AZIDAS ALÍLICAS Y EL REARDENAMIENTO SIGMATRÓPICO: HISTORIA Y ESTADO DEL ARTE.

Dadas sus características únicas, los isoprenoles se enmarcan en el concepto de estructura privilegiada. El sustento de esta clasificación no sólo se encuentra en la enorme

diversidad y biodisponibilidad, sino también en la gran cantidad de principios activos en donde el motivo isoprenilo se haya presente.

Se denominan isoprenilazidas al producto de sustitución del alcohol de los isoprenos por un grupo azido. Estos compuestos, dada la particularidad de poseer el grupo azido en una posición alílica, son capaces de producir espontáneamente una reorganización estructural. En 1960 Young y colaboradores informaron el reordenamiento [3,3]-sigmatrópico de azidas alílicas (conocido como rearreglo de Winstein).<sup>[5.8]</sup> Los autores lograron observar que las azidas alílicas coexisten como una mezcla regioisomérica que se interconvierte rápidamente a temperatura ambiente (**Figura 5.4**). Posteriormente, VanderWerf y Heasley informaron que las azidas alílicas terciarias y secundarias se reordenan más rápido que las primarias,<sup>[5.9]</sup> siendo el regioisómero con el alqueno más sustituido el termodinámicamente favorecido.

Si bien esta reacción presenta características que la hacen sumamente atractiva, son escasos los reportes en donde se usan este tipo de compuestos. Esto se debe principalmente a que se requiere controlar la relación de los regioisómeros de la azida para que sean útiles sintéticamente. Esta dificultad depende en general de las características sustrato.<sup>[5.10]</sup>

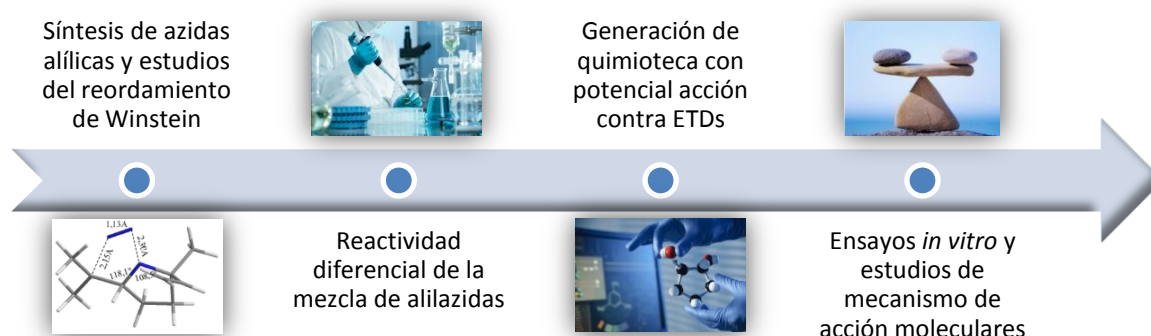


**Figura 5.4.** Reordenamiento de Winstein de azidas alílicas

Estudios experimentales y teóricos han aportado evidencias que apoyarían que el reordenamiento de las azidas alílicas transcurre a través de un mecanismo pericíclico concertado. En estudios teóricos *ab initio* de estos compuestos utilizando la teoría de densidad funcional (DFT, por sus siglas en inglés) han mostrado que el reordenamiento procede a través de un estado de transición de media silla.<sup>[5.11]</sup>

Ante este universo poco explorado, resultó de interés estudiar el equilibrio de las isoprenilazidas con el objeto de poder regular los factores que gobiernan el mismo. Es por eso que nos propusimos estudiar el reordenamiento [3,3]-sigmatrópico e indagar en el uso

de las isoprenil azidas en reacciones de cicloadición. En este capítulo se detallarán los estudios de un sistema que contiene en su estructura a un motivo privilegiado (isoprenilos) para generar una herramienta sintética de enorme utilidad, modularidad, versatilidad y potencialidad para la preparación de nuevos fármacos en química medicinal. Una vez generada esa herramienta, describiremos la preparación de colecciones de nuevas entidades químicas en la búsqueda de fármacos contra enfermedades tropicales desatendidas. Finalmente se describen los ensayos de actividad biológica contra los agentes etiológicos y los estudios tendientes a validar su mecanismo de acción. La **Figura 5.5** ilustra la estrategia de trabajo.



**Figura 5.5.** Estudio y aplicación de isoprenil azidas.

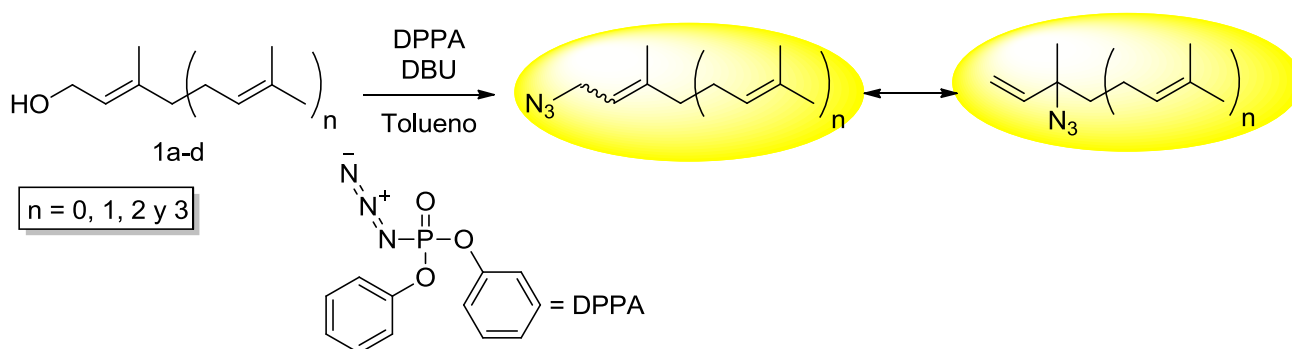
## 5.2 SÍNTESIS QUÍMICA DE AZIDAS ORGÁNICAS



En años recientes se han reportado numerosos protocolos para preparar azidas alílicas por síntesis química a partir de bromuros o alcoholes.<sup>[5,12-21]</sup> Sin embargo, los halogenuros alílicos son especies muy reactivas y tienden a descomponerse. Para salvaguardar esa problemática, las alilazidas fueron preparadas utilizando un protocolo modificado de una reacción de Mitsunobu (reacción de Thompson) a partir de los correspondientes alcoholes alílicos, por tratamiento con difenilfosforilazida (DPPA, por sus

siglas en inglés) y 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU).<sup>[5.22]</sup> Los isoprenoles seleccionados como material de partida fueron el prenil, el *E*-geraniol, el *E,E*-farnesol y el *E,E,E*-geranilgeraniol.

Los productos preparados (**IA-1** a **IA-11**) a partir de los alcoholes isoprenílicos fueron sintetizados con un rendimiento promedio del 87% y están formados por una mezcla de regioisómeros que se interconvierten rápidamente a temperatura ambiente (**Esquema 5.1**). En la **Tabla 5.1** se detallan los rendimientos, la relación de regioisómeros y la nomenclatura de cada estructura.



**Esquema 5.1.** Síntesis de las azidas alílicas a partir de los alcoholes correspondientes. En el caso de la prenil azida, únicamente se obtiene un regioisómero primario.

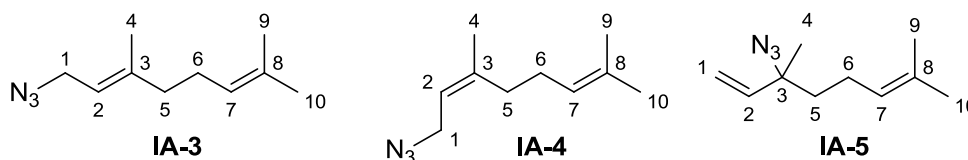
**Tabla 5.1.** Rendimientos y relación de isómeros

Entrada	Azida	Rendimiento	Primaria <i>E</i> (Proporción)	Primaria <i>Z</i> (Proporción)	Terciaria (Proporción)
1	Isoprenil azida	84%	<b>IA-1</b> (88% único isómero)		<b>IA-2</b> (12%)
2	Geranil azida	87%	<b>IA-3</b> (55%)	<b>IA-4</b> (34%)	<b>IA-5</b> (11%)
3	Farnesil azida	85%	<b>IA-6</b> (53%)	<b>IA-7</b> (36%)	<b>IA-8</b> (11%)
4	Geranil Geranil azida	92%	<b>IA-9</b> (54%)	<b>IA-10</b> (35%)	<b>IA-11</b> (11%)

### 5.3 ESTUDIOS EXPERIMENTALES Y TEÓRICOS DE LA COMPOSICIÓN EN EL EQUILIBRIO DE AZIDAS ALÍLICAS.

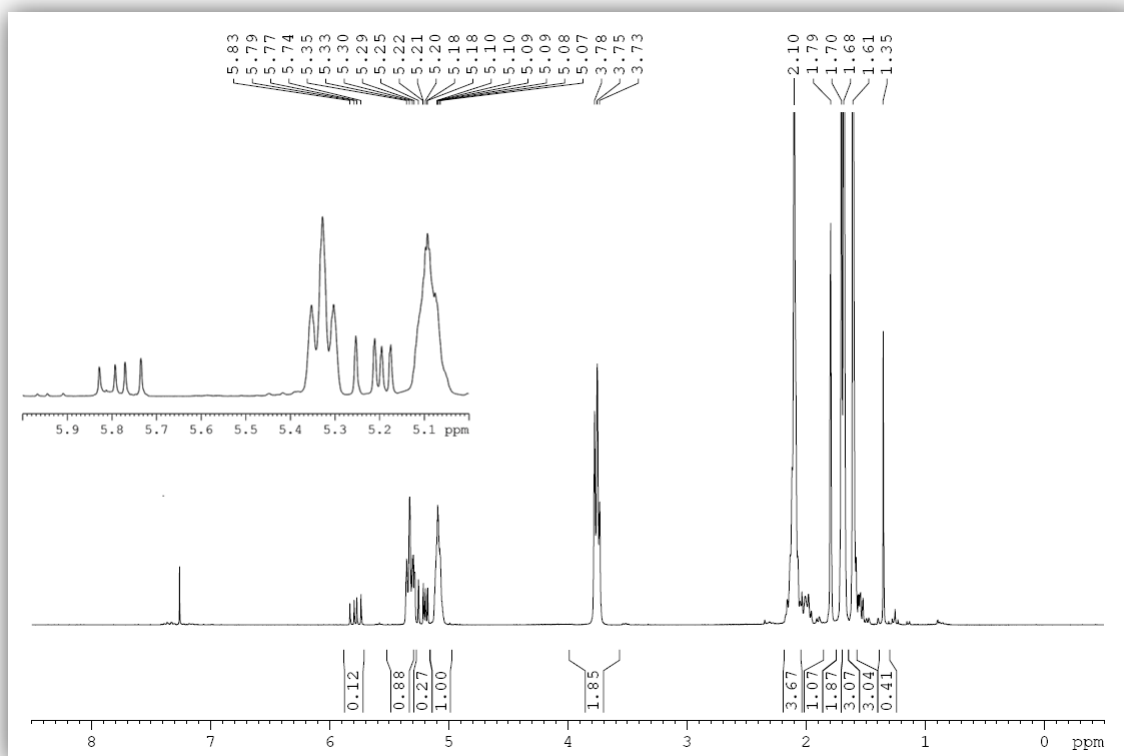
Una vez preparadas las azidas isoprenílicas, mediante RMN de  $^1\text{H}$  se dilucidó la composición del equilibrio de los isómeros a temperatura ambiente. Con el fin de clarificar la

metodología empleada, ejemplificaremos la sistemática utilizada con la mezcla de azidas preparadas a partir del geraniol. En la **Figura 5.6**, se ilustran las estructuras de la mezcla inseparable cromatográficamente de estas azidas monoterpénicas: geranilazida (**IA-3**), nerilazida (**IA-4**) y linaloilazida (**IA-5**).



**Figura 5.6.** Mezcla de azidas monoterpénicas

En la **Figura 5.7** se observa el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de esta mezcla. La ventana espectral correspondiente a la zona de protones olefínicos es la que confiere identidad para resolver la composición de la mezcla en equilibrio dinámico. Las 3 estructuras comparten una misma señal en ese rango del espectro y es la correspondiente al protón olefínico en C7. Esta señal corresponde al multiplete en 5,09 ppm y es la que se tomará como patrón referencial, integrando para 1 protón. Por otro lado, la señal correspondiente al sistema de doble de doblete en 5,78 ppm es asignable al protón olefínico del carbono 2 del doble enlace terminal de la linaloilazida **IA-5**. Este núcleo es perturbado por la polarización provocada por los protones olefínicos terminales, dando origen a los dos acoplamientos escalares de esta señal. El <sup>3</sup>J= 17,3 Hz es característico para acoplamientos *trans*, mientras que el <sup>3</sup>J= 10,3 Hz pertenece al acoplamiento *cis*. De la misma manera el sistema AB de dos dobles dobletes en 5,20 ppm corresponde a los protones olefínicos terminales de esa azida (mismas constantes de acoplamiento escalar). En comparación con la señal patrón, se observa que esta azida **IA-5** se encuentra en relación 1:9 en la mezcla. Debido a que estructuralmente este compuesto presenta el alqueno menos sustituido, era de esperarse que esté termodinámica desfavorecida con respecto a **IA-3** e **IA-4** y se encuentre en menor proporción en la mezcla.



**Figura 5.7.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la mezcla IA-3, IA-4 e IA-5.

Para resolver la composición de la mezcla entre las azidas primarias se realizaron experimentos de efecto nuclear Overhauser (enO), irradiando selectivamente el protón olefínico ubicado en el carbono  $\beta$  (C2) a la azida. La señal asignable a ese protón corresponde al triplete ubicado en 5,33 ppm (**Figura 5.8**).

Como este protón está ubicado a más de tres enlaces en relación a los protones del grupo metilo de la unidad isopreno que contiene a la azida, las interacciones escalares entre estos protones es despreciable, por lo que la transferencia de energía en el fenómeno de relajación de los espines excitados es muy deficiente entre ellos. De haber interacción (señal del espectro enO positiva) entre estos protones, se deberán a interacciones en el espacio, producidas por la proximidad entre ellos. Un arreglo *cis* es la única configuración posible para que estos protones se encuentren lo suficientemente cerca y haya transferencia de energía.

Los experimentos de enO irradiando la señal en 5,33 ppm mostraron efecto positivo sobre el singlete ubicado en 1,79 ppm. Esta señal es asignable al metilo de la estructura IA-4.

Integrando con la señal tomada como patrón fue posible determinar la proporción en el equilibrio de los regioisómeros en la mezcla.

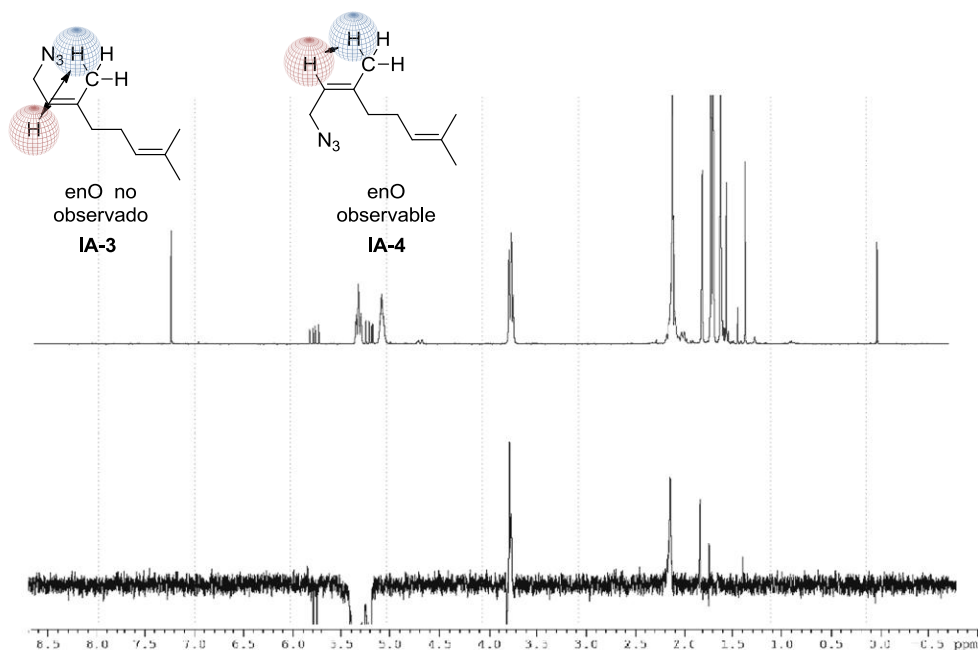


Figura 5.8. Espectros de enO sobre la mezcla de azidas alílicas.

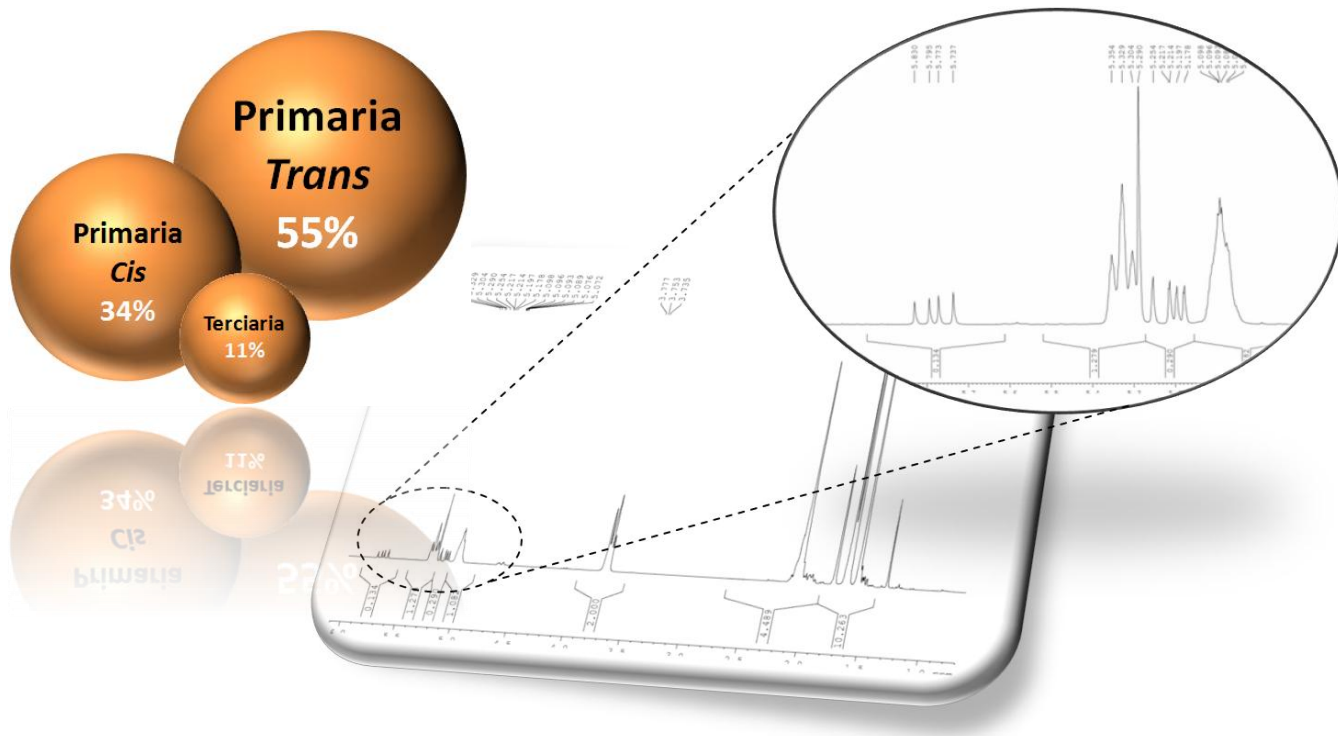
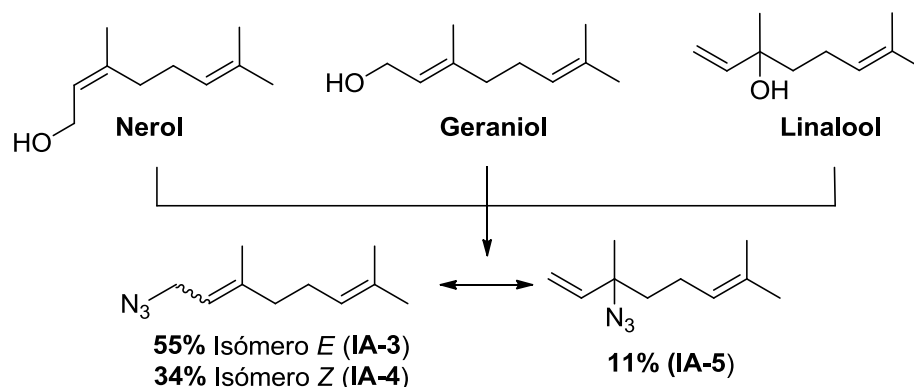


Figura 5.9. Izquierda: Composición del equilibrio de las azidas terpénicas a temperatura ambiente. Derecha: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la geranylazida.

En conclusión, a temperatura ambiente los compuestos mayoritarios de esta mezcla son las alil-azidas primarias (89%) frente a las alil-azida terciaria (11%). En cuanto a la constitución de las alil-azidas primarias, la mezcla está compuesta por un 55% del isómero *E* contra un 34% del isómero *Z* (Relación 6:4 entre ellas, **Figura 5.9**).

Experimentalmente, se observa que la relación de equilibrio es independiente del número de unidades isoprénicas (de la prenilazida a la geranilgeranilazida). Quedaba entonces demostrar si esta independencia era extrapolable a la regioisomería del alcohol de partida. Para corroborar dicha presunción, exploramos la síntesis de azidas monoterpénicas utilizando nerol y linalool en lugar de geraniol. Luego de la etapa de síntesis y purificación volvimos a obtener la misma relación de isómeros (**Esquema 5.2**, 5 geranilazida : 3 nerilazida : 1 linaloilazida). Este resultado demostró que no sería necesario partir de regioisómeros puros, pudiendo utilizar mezclas de alcoholes isoprenílicos para obtener los productos, lo que se traduce en una importante reducción de costos.



**Esquema 5.2.** Síntesis de la mezcla partiendo de Nerol, Geraniol ó Linalool.

Finalizados estos estudios se hacía necesario racionalizar el comportamiento experimental observado, habida cuenta que no existe antecedentes en la literatura de estudio teóricos de azidas terpénicas. Para lograr tal cometido era necesario hacer uso de la química computacional.

La química computacional es una rama de la química que utiliza algoritmos específicos para ayudar a resolver problemas químicos. Los resultados aportados por la química teórica, provienen de *software* determinados que permiten calcular las propiedades de moléculas. Mientras sus resultados normalmente complementan la información obtenida en experimentos químicos pueden, en algunos casos, predecir fenómenos químicos no

observados a la fecha. Por este motivo, la química computacional es una disciplina ampliamente utilizada para el diseño de nuevos medicamentos y materiales.

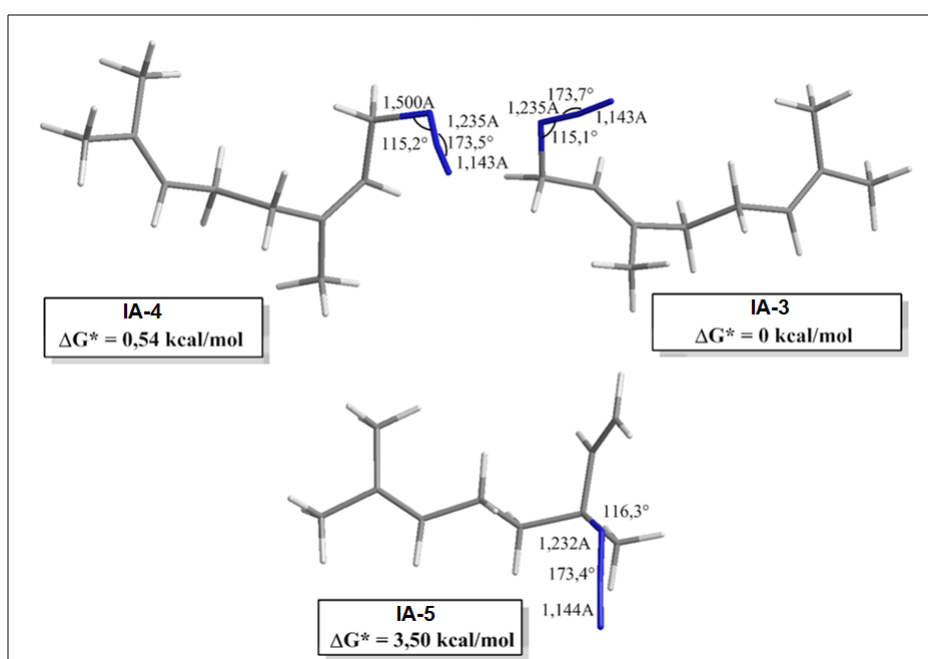
Citando ejemplos de propiedades moleculares que son factibles de alcanzar en forma teórica mediante el uso de la química computacional, se pueden mencionar a energías absolutas y relativas, distribuciones de cargas electrónicas, dipolos eléctricos y momentos multipolares superiores, frecuencias vibratorias, reactividades, fenómenos espectrales y secciones eficaces para la colisión con otras partículas.

Los métodos empleados cubren situaciones estáticas y dinámicas. En todos los casos, el tiempo de cálculo aumenta rápidamente a medida que el tamaño del sistema estudiado crece, sobre todo cuando se incrementan el número de átomos pesados. Este sistema puede ser una molécula simple, un grupo de éstas o un cuerpo sólido. Éstos métodos, por lo tanto, se basan en teorías que van desde la alta precisión, apropiados para pequeños sistemas, a una buena aproximación, utilizadas para grandes sistemas y en la biología. Los métodos más precisos son llamados *ab initio*, los cuales están basados totalmente en la teoría de los primeros principios. Los menos precisos son los empíricos o semi-empíricos, debido a que son obtenidos a partir de resultados experimentales, a menudo de átomos o moléculas relacionadas utilizadas en conjunto con la teoría.

Se partió entonces de la mezcla de isómeros del geraniol (**IA-3** a **IA-5**). Esta mezcla fue utilizada como modelo de estudio para realizar los cálculos computacionales, debido a que constituye la isoprenil azida de menor tamaño que posee todos los isómeros presentes en el equilibrio, permitiendo bajar los posibles costos de cálculos. Todos los cálculos *ab initio* fueron realizados con el paquete de programas Gaussian 03.<sup>[5.23]</sup> El funcional híbrido B3LYP<sup>[5.24, 5.25]</sup> en conjunto con la base 6-31G(d)<sup>[5.26]</sup> fue el utilizado para realizar los cálculos para cada conformero (estereoisómeros formados por rotación de enlaces simples) en su punto estacionario en fase gaseosa. La depuración de los conformeros de cada isómero fue resuelta por una búsqueda conformacional a nivel de mecánica molecular (con un campo de fuerza MM+). Los cálculos de frecuencia se utilizaron para caracterizar los mínimos. Todas las reacciones, las entalpías de formación y las entalpías de activación reportados fueron corregidos a la energía de punto cero (ZPE, por sus siglas en inglés) con frecuencias sin escala. Cálculos de coordenadas de reacción intrínsecos (IRC, por sus siglas en inglés) fueron

utilizados para confirmar las conexiones entre los reactantes, los productos y los estados de transición.

El escenario mecanístico derivado computacionalmente pone de relieve la correspondencia directa con los resultados experimentales, demostrando la robustez del método y el modelo seleccionado. Los valores de diferencia de energía libre de Gibbs en fase gas obtenidos para cada isómero presente en la mezcla tienen reciprocidad con lo observado. El  $\Delta G^*$  de la linaloil azida (**IA-5**) es 3,50 kcal/mol más grande que la correspondiente geranilazida (**IA-3**), el isómero energéticamente más estable. Por otro lado, la nerilazida (**IA-4**) difiere con la geranilazida en 0,54 kcal/mol, explicando el sutil predominio del isómero *E* sobre el isómero *Z* (**Figura 5.10**).



**Figura 5.10.** Cálculos de las diferencias de energía libre de Gibbs entre los componentes de la mezcla de alilazidas.

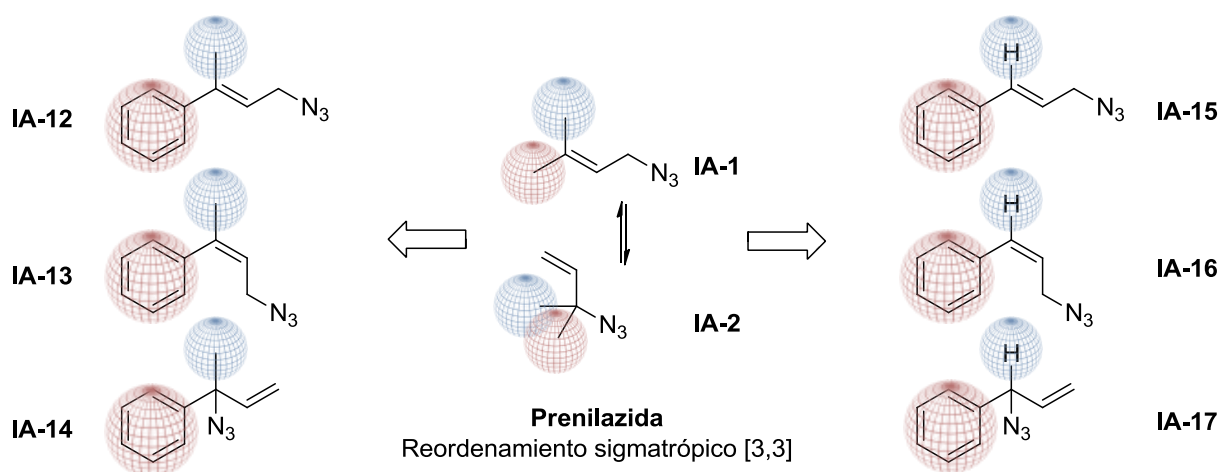
Los valores de ángulos de enlaces N1-N2-N3 y C1-N1-N2, así como las longitudes de enlaces C1-N1, N1-N2y N2-N3 y el ángulo diedro C1-N1-N2-N3 tienen valores análogos con los valores teóricos y experimentales reportados por Chen y Wang,<sup>[5.27]</sup> con el uso azidometilo y la ziduidina (**Figura 5.1**), sustentando nuevamente la solidez de nuestros cálculos (**Tabla 5.2**).

**Tabla 5.2.** Comparación de los parámetros estructurales entre los cálculos realizados y los valores reportados en la literatura

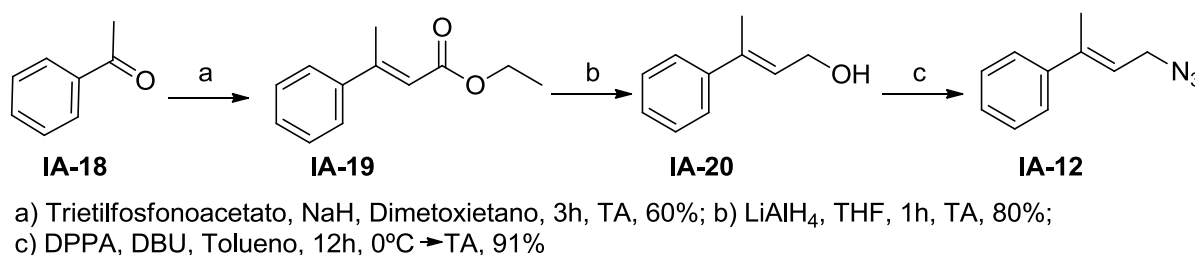
Parámetros Estructurales	Calculado	Reportado <sup>[5.27]</sup>
N1-N2 (Å)	1,23	1,23
N2-N3 (Å)	1,14	1,14
C1-N1 (Å)	1,50	1,47
< N1-N2-N3 (°)	173,5	173,3
< C1-N1-N2 (°)	115,1 (116,3 terciaria)	116,1
< C1-N1-N2-N3 (°)	179,9	180,0

### 5.3.1 EXPANSIÓN DEL SISTEMA EN ESTUDIO A SUSTRATOS AROMÁTICOS.

Como se describió en la introducción, compuestos aromáticos conteniendo isoprenilos tienen la particularidad de ser interesantes principios activos. En esta dirección, resultaba provechoso aplicar las herramientas generadas haciendo foco en la posibilidad de preparar sintones de estructuras diversas. Siguiendo esa filosofía, nos propusimos preparar las azidas **IA-12** a **IA-17**, inspirado en la mezcla de prenilazida (**IA-1** e **IA-2**), en el que se sustituye uno de los metilos por un anillo aromático, (**IA-12** a **IA-14**) o se reemplaza por un hidrógeno (**IA-15** a **IA-17**).

**Esquema 5.3.** Diseño de las estructuras azidoisoprenil bencenos propuestas.

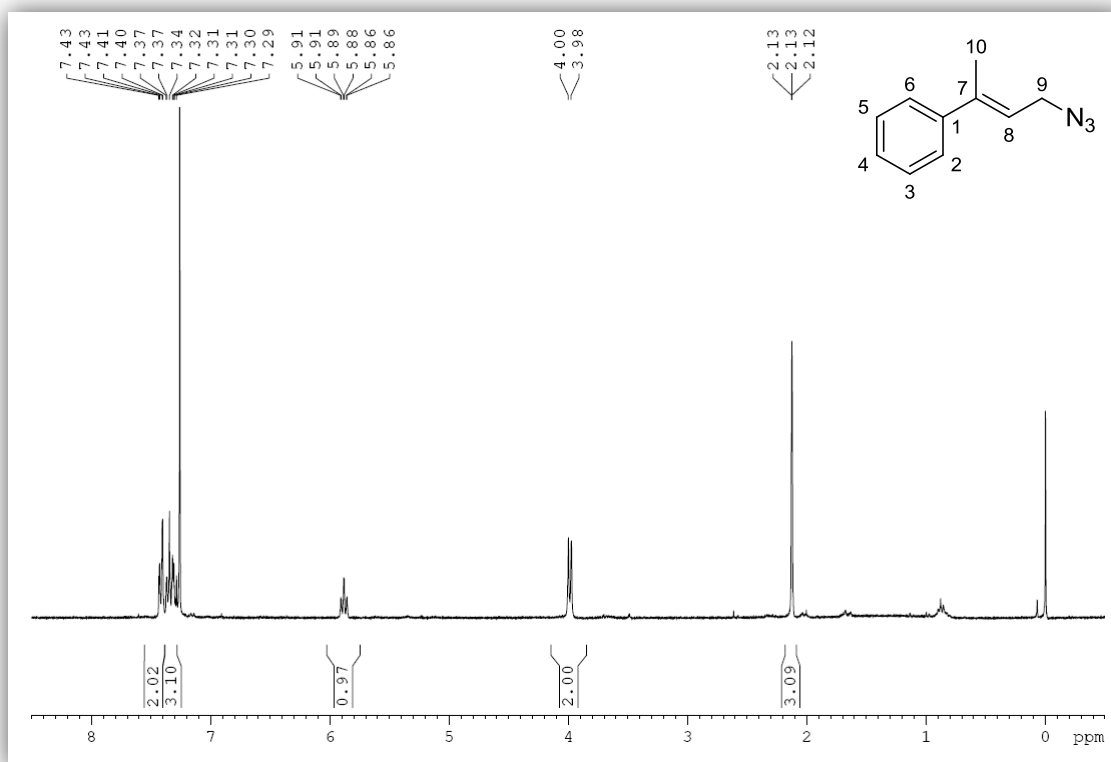
Para sintetizar la mezcla de isómero **IA-12** a **IA-14**, se partió del reactivo comercial acetofenona (**IA-18**), al cual se le realizó una homologación mediante una reacción de Horner–Wadsworth–Emmons, utilizando trietilfosfonoacetato como reactivo. La elección de ese fosfonato recae en la posibilidad de proveer el doble enlace con la estereoquímica pretendida (*E*). Luego de 3 horas de reacción a temperatura ambiente se obtuvo el éster  $\alpha,\beta$ -insaturado **IA-19** (*E:Z*, 92:8) con un 60% de rendimiento. En un paso sintético posterior se redujo el éster  $\alpha,\beta$ -insaturado con  $\text{LiAlH}_4$ , obteniendo el alcohol **IA-20** con un 80% de rendimiento en 1 hora de reacción. En esta etapa, fue posible la separación cromatográfica del isómero de interés. Seguidamente se preparó la azida **IA-12** utilizando la reacción de Thompson, con un 91% de rendimiento. (**Esquema 5.4**)



**Esquema 5.4.** Síntesis de **IA-12**

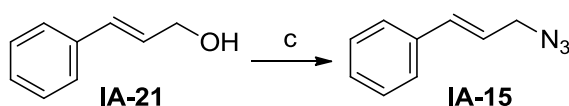
Analizando el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto **IA-12** (**Figura 5.11**) podemos observar la presencia de un multiplete en 7,42 ppm que integra para 2 protones y serían asignados a los protones aromáticos en posición *meta*. El multiplete en 7,32 ppm que integra para 3 protones correspondería a los protones *orto* y *para* del sistema aromático. En la zona de protones olefínicos aparece una señal a 5,88 ppm correspondiente a un doble triplete con constante de acoplamiento  $^3J=6,7$  Hz y  $^4J=1,3$  Hz. Este sistema correspondería de manera inequívoca al único protón olefínico del sistema (en C8, **Figura 5.11**), acoplado con los protones alílicos (C9) y con el metilo ubicado *Trans*. El cuatriplete en 3,99 ppm ( $^3J=6,7$  Hz), que integra para dos protones corresponde al metileno alilílico. Finalmente la última señal pertenece a un doblete con  $^4J=1,3$  Hz ubicado a 2,12 ppm y que integra para 3 protones, asignable al grupo metilo.

En resumen, en lugar de obtener la mezcla esperada se obtuvo un único producto, cuya estereoquímica coincidía con la del alcohol de partida.



**Figura 5.11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **IA-12**

Por otro lado, para la preparación de la mezcla de **IA-15** a **IA-17** se partió de cinamol, que en las condiciones de Thompson provee la **IA-15** en 12 horas con un 78% de rendimiento (**Esquema 5.5**).



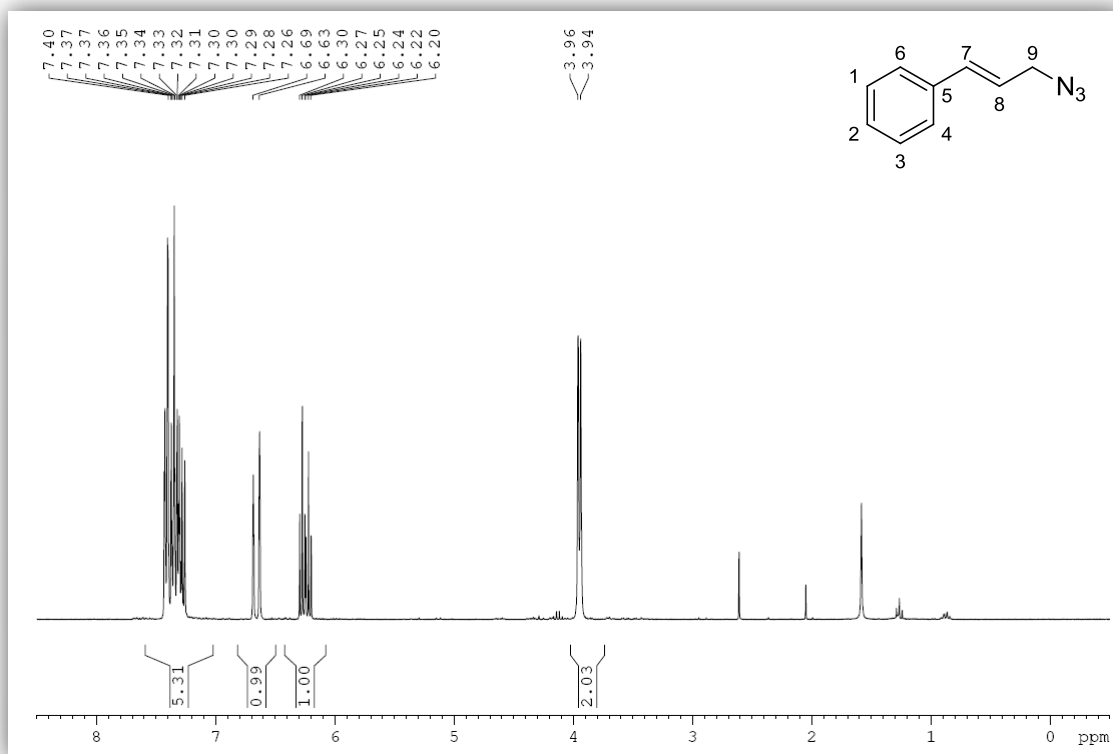
c) DPPA, DBU, Tolueno, 12h,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{TA}$ , 78%

**Esquema 5.5.** Síntesis de **IA-15**

Análogamente a lo observado anteriormente, sólo se obtuvo la cinamilazida (**IA-15**) como único producto. **IA-15** respeta la misma estereoquímica del cinamol **IA-21** utilizado como material de partida, sin sufrir reordenamiento alguno.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 5.12**) del producto **IA-15** respalda esta observación. Un multiplete que integra para 5 protones en la zona baja y ubicado a 7,35 ppm es asignable a los protones aromáticos del anillo. En 6,66 ppm aparece un sistema de doblete con un

$^3J=15,8$  Hz. Este valor elevado de constante de acoplamiento entre protones es distintivo para sistemas *Trans* de un alqueno y es asignable al protón olefínico alfa al sistema aromático. El sistema de doble tripletes ubicado en 6,25 ppm con constantes de acoplamientos  $^{TRANS}J=15,7$  Hz y  $^3J=6,6$  Hz pertenecen al protón olefínico ubicado en el C-8 de la molécula. Por último en 3,95 ppm aparece un doblete que integra para 2 protones y es asociado al único metileno de la molécula.

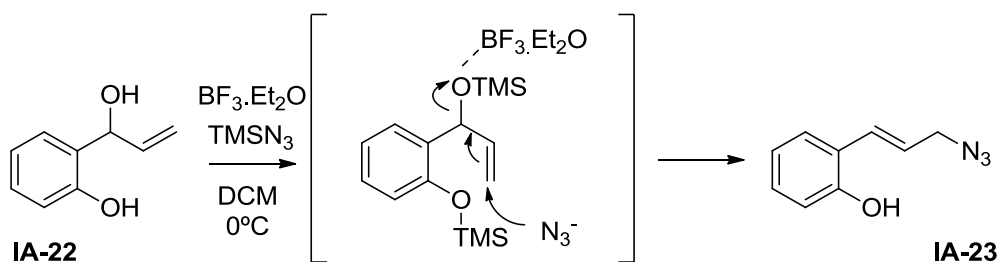


**Figura 5.12.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de IA-15.

Estas dos evidencias experimentales sugieren que por razones estéreo-electrónicas asociadas al anillo aromático el reordenamiento [3,3] sigmatrópico de Winstein estaría desfavorecido para este tipo de compuestos.

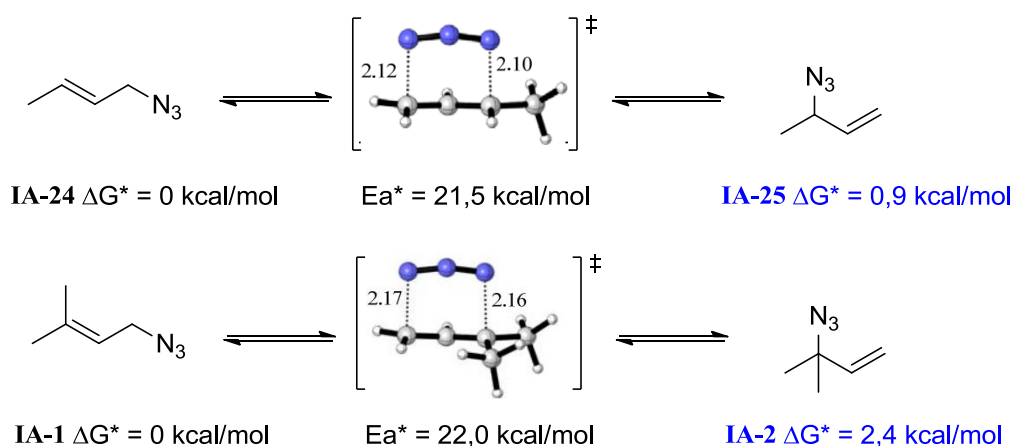
Un análisis exhaustivo de la literatura avaló estos resultados. En el año 2013 Srinu y Srihari sintetiza la *o*-hidroxi-cinamilazida primaria, partiendo del alcohol secundario.<sup>[5.20]</sup> Sin embargo, los autores postulan que el mecanismo de la reacción no involucra un reordenamiento [3,3]-sigmatrópico, sino que hay una activación del alcohol bencílico mediado por el trimetilsilil éter, con una consecuente adición nucleofílica de la azida sobre la

olefina y eliminación simultánea del grupo trimetilsiloxilo a través de una migración de doble enlace (**Esquema 5.6**).



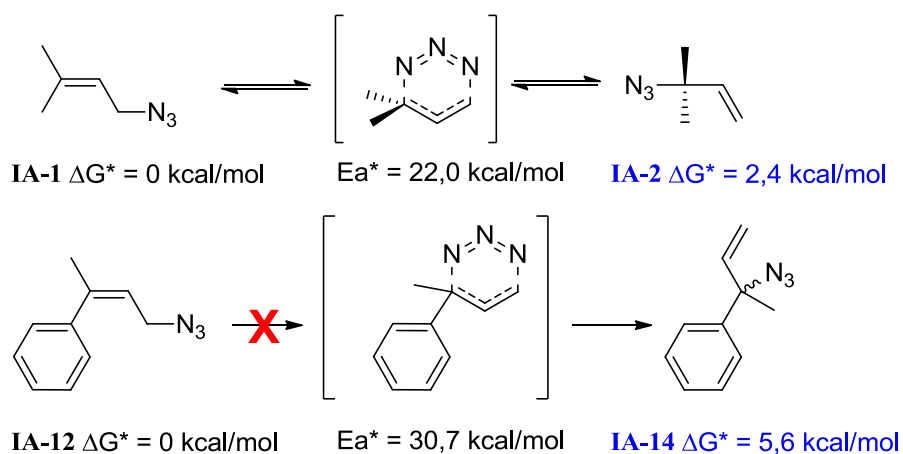
**Esquema 5.6.** Reacción y mecanismo reportados por Srinu y Srihari

Con el fin de explicar este comportamiento se hace necesario realizar un estudio teórico del sistema, para lo cual se tomó como base el trabajo reportado por Jabbari.<sup>[5,11]</sup> En sus estudios entre el 1-azido-2-buteno (**IA-24**, azida primaria) y el 3-azido-1-buteno (**IA-25**, azida secundaria), la entalpía de activación calculada es de 21,5 Kcal/mol y la diferencia de estabilidad de 0,9 Kcal/mol entre los isómeros. En cambio, cuando el reordenamiento se produce entre 1-azido-3-metil-2-buteno (**IA-1**, azida primaria) y 3-azido-3,3-dimetil-1-buteno (**IA-2**, azida terciaria), se requieren 22 Kcal/mol y la diferencia energética entre los dos regioisómeros aumenta a 2,4 kcal/mol. Es decir que la permutación de un átomo de hidrógeno por un grupo metilo en la estructura se traduce en un aumento de 1,5 kcal/mol entre las diferencias energéticas de los isómeros secundario y terciario.



**Figura 5.13.** Reordenamiento sigmatrópico entre alilazidas. Las distancias internucleares están expresadas en Angstrom.

Prosiguiendo con la propuesta, se calculó el perfil energético de las estructuras sintetizadas. El reemplazo del grupo metilo del compuesto **IA-1** por un anillo aromático (**IA-12**) conduce a un aumento en el impedimento estérico. Adicionalmente, la estabilidad del alqueno al encontrarse en un sistema conjugado y el cambio en el efecto inductivo desfavorecen termodinámicamente el reordenamiento [3,3]-sigmatrópico, elevando de 2,4 a 5,6 kcal/mol la diferencia energética. Sin embargo, el punto crítico es que la barrera de energía que el sistema debe vencer se eleva un 40% con respecto al equilibrio **IA-1/IA-2**. No permitiendo que ocurra el reordenamiento de Winstein a temperatura ambiente.



**Figura 5.14.** Estudio mecanicista del reordenamiento de las moléculas sintetizadas.

En conclusión, la sustitución de un metilo por un grupo aromático impide estérica y termodinámicamente que ocurra el reordenamiento [3,3]-sigmatrópico.

#### 5.4 REACTIVIDAD DE ISOPRENIL AZIDAS



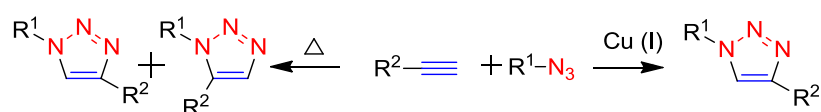
Los estudios experimentales e *in silico* realizados sobre mezclas de azidas alílicas permiten racionalizar el fenómeno de reordenamiento sobre este sistema particular. Sin embargo, posicionar estos sintones como herramienta útil para la química medicinal

requiere la generación de estrategias sintéticas adecuadas para resolver las mezclas en entidades moleculares de isomería única.

#### 5.4.1 CICLOADICIONES 1,3-DIPOLARES AZIDO-ALQUINO CATALIZADA POR Cu(I).

Con ese propósito, el siguiente paso fue explorar la reactividad de estas mezclas de isoprenil azidas en distintas reacciones. En particular se estudiaron reacciones de cicloadición 1,3-dipolares. Estas reacciones constituyen una poderosa herramienta sintética debido a sus múltiples aplicaciones, tanto en síntesis orgánica, como en las ciencias biomédicas o de los materiales.<sup>[5.28, 5.29]</sup> Estas reacciones se han establecido como un método general para la síntesis de heterociclos de cinco miembros. Su importancia e interés en química orgánica sintética se debe al amplio rango de 1,3-dipolos y dipolarófilos utilizables, las diferentes regio y estereoselectividad que se pueden obtener, las variadas condiciones de reacción y reactivos existentes y la posibilidad de realizar ulteriores transformaciones permitiendo obtener heterociclos altamente funcionalizados.

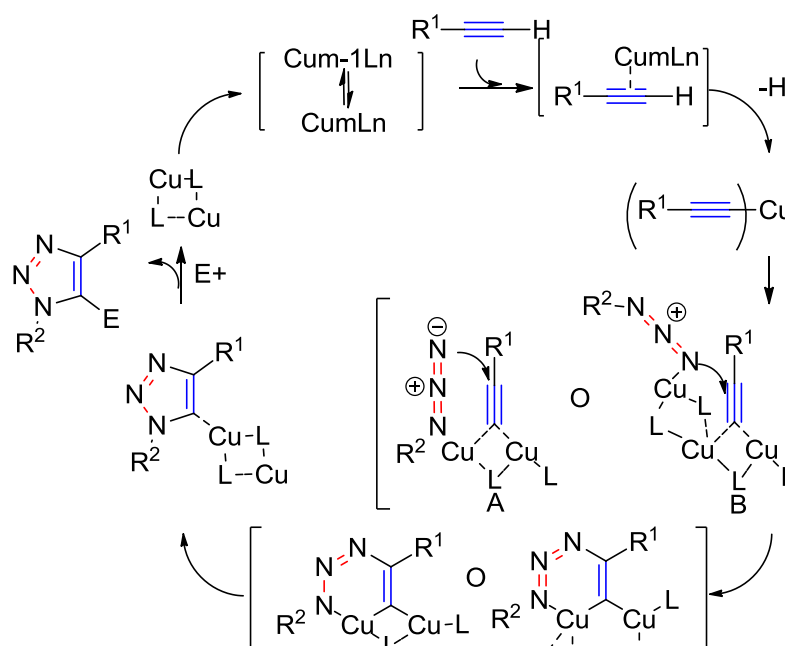
En particular, la cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas, denominada reacción de Huisgen,<sup>[5.30]</sup> ha sido la forma más efectiva para preparar 1,2,3-triazoles. En estas reacciones, que se llevan a cabo bajo condiciones térmicas, el grupo azido constituye el dipolo y el alquino actúa como dipolarófilo. Cabe aclarar que las azidas orgánicas son termodinámicamente inestables y se descomponen, pero factores cinéticos permiten que permanezcan prácticamente inertes hasta reaccionar con un dipolarófilo adecuado. Esta estabilidad cinética es la responsable de la baja velocidad de reacción en las cicloadiciones entre azidas y alquinos, por lo que se requieren elevadas temperaturas y largos tiempos de reacción, obteniéndose en la mayoría de los casos mezclas de los dos posibles triazoles regioisoméricos 1,4 y 1,5-disustituídos (**Figura 5.15**). Recientemente, Meldal<sup>[5.5]</sup> y Sharpless<sup>[5.6]</sup> desarrollaron en forma independiente reacciones de cicloadiciones 1,3-dipolares catalizadas por Cu(I), incrementando no sólo la velocidad de reacción sino también la regioselectividad de la cicloadición, obteniendo exclusivamente el regioisómero 1,4.



**Figura 5.15.** Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares entre azidas y alquinos

Las extraordinarias características que posee esta reacción de cicloadición han determinado que sea considerada como el paradigma de las reacciones encuadradas dentro del nuevo concepto de *“click chemistry”*, establecido por Sharpless.<sup>[5.31]</sup> Este concepto incluye reacciones que deben poseer una amplia aplicabilidad, elevada eficiencia tanto en términos de conversión, como de selectividad y que transcurran en condiciones suaves. Si bien se han publicado diversos trabajos con nuevas condiciones de cicloadición entre azidas y alquinos libres de catalizadores de Cu(I), la velocidad de estas reacciones sigue siendo lenta y con regioselectividad impredecible, con lo cual la versión catalítica continúa siendo la mejor opción.<sup>[5.32, 5.33]</sup>

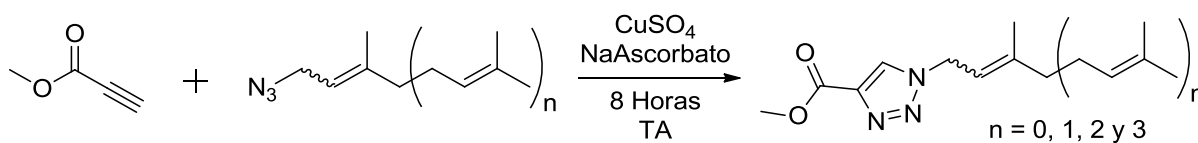
En cuanto al mecanismo de reacción involucrado, si bien la cicloadición térmica de alquinos y azidas ocurre de manera concertada, para la reacción catalizada por Cu(I) el mecanismo postulado en un primer momento fue por etapas fundamentado en estudios teóricos y cinéticos,<sup>[5.34]</sup> el cual suponía la formación inicial de un complejo de acetiluro de Cu(I) por coordinación del ión metálico con el alquino, seguido de la adición sobre el grupo azido para dar el correspondiente 1,2,3-triazol. Sin embargo, estudios recientes mediante experimentos cinéticos, estructurales y energéticos ha permitido generar un nuevo modelo. Estos resultados sugieren que en primer término la coordinación entre la azida y el acetiluro no necesariamente dependería de un único átomo de cobre. Se produciría entonces la formación de agregados de cobre, que favorecerían la coordinación por formación y mantenimiento de un estado de transición de 6 miembros entre la azida terminal y el carbono secundario cargado positivamente del acetiluro. Existen dos modelos de intermediarios,<sup>[5.35]</sup> el modelo propuesto inicialmente, que no explica los resultados experimentales de cinética de segundo orden del Cu(I) ni las evidencias estructurales observadas y el modelo moderno (**Figura 5.16**) que es consistente con la mayoría de los estos datos. El mecanismo continúa luego con una contracción del anillo de 6 miembros dando lugar al triazol, que continúa interaccionando con un clúster de cobre, para luego tomar un grupo electrófilo (como por ejemplo un protón) del medio, desprenderse del agregado de Cu(I) que vuelve al ciclo y liberar el 1,2,3-triazol.



**Figura 5.16.** Mecanismo postulado de la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I)

El interés en la síntesis eficiente y regioselectiva de 1,2,3-triazoles a través de las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar se ha multiplicado en los últimos años y continúa incrementándose, debido principalmente a que permiten el acceso a la construcción de diferentes heterociclos funcionalizados con probada actividad biológica y a las importantes aplicaciones en la industria, la agricultura y en la biotecnología.

Con estos precedentes decidimos utilizar el protocolo descrito por Sharpless para preparar 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos. Las mezclas de azidas utilizadas fueron las provenientes de la prenilazida, geranilazida, farnesilazida y geranilgeranilazida. El alquino modelo fue el propiolato de metilo. Se utilizaron  $\text{CuSO}_4$  como fuente de cobre y ascorbato de sodio como reductor.

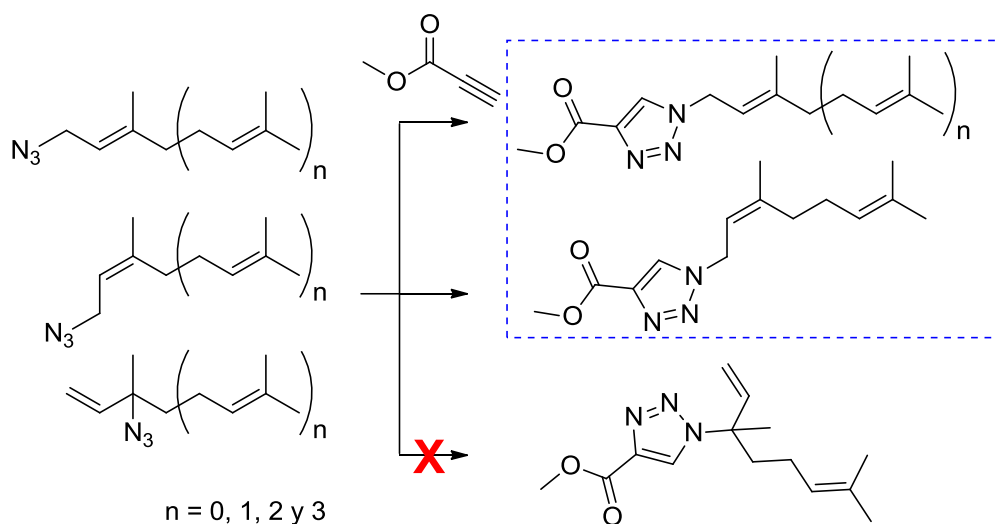


**Esquema 5.7.** Síntesis de triazoles terpénicos. Condiciones de reacción y tabla con compuestos y rendimientos.

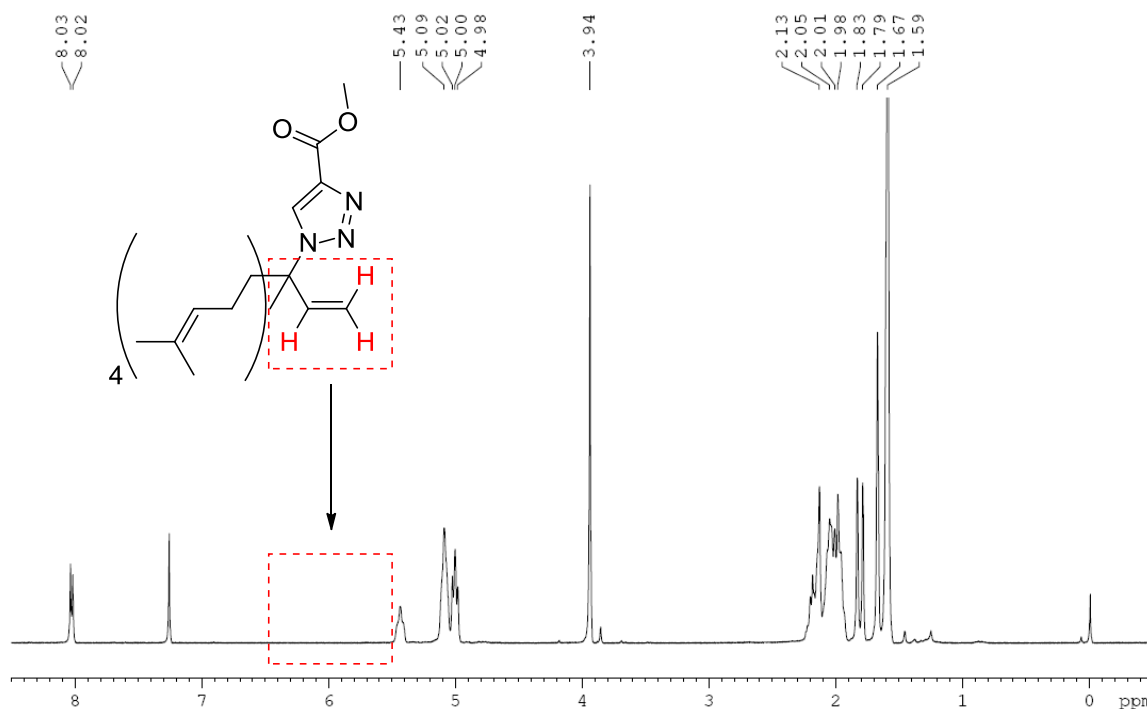
**Tabla 5.3.** Rendimiento de triazoles preparados por síntesis.

Entrada	Producto	n =	Rendimiento
1	Triazol-1	0	70%
2	Triazol-2 (E) y Triazol-3 (Z)	1	86%
3	Triazol-4 (E) y Triazol-5 (Z)	2	72%
4	Triazol-6 (E) y Triazol-7 (Z)	3	70%

Fokin y Sharpless realizaron en el año 2005 un exhaustivo estudio de la reactividad diferencial de las azidas alílicas en condiciones de cicloadiciones 1,3-dipolares con alquinos, demostrando que en presencia del equilibrio dinámico de las alilazidas, sólo las azidas primarias reaccionan.<sup>[5.36]</sup> Afín con estos resultados, de los tres productos potenciales (generados a partir de los dos isómeros de la azida primaria y por la azida terciaria), sólo se obtienen los compuestos provenientes de la mezcla de azidas primarias (**Esquema 5.8**)

**Esquema 5.8.** Modulación de la ciclación 1,3-dipolar de Huisgen hacia alilazidas primarias.

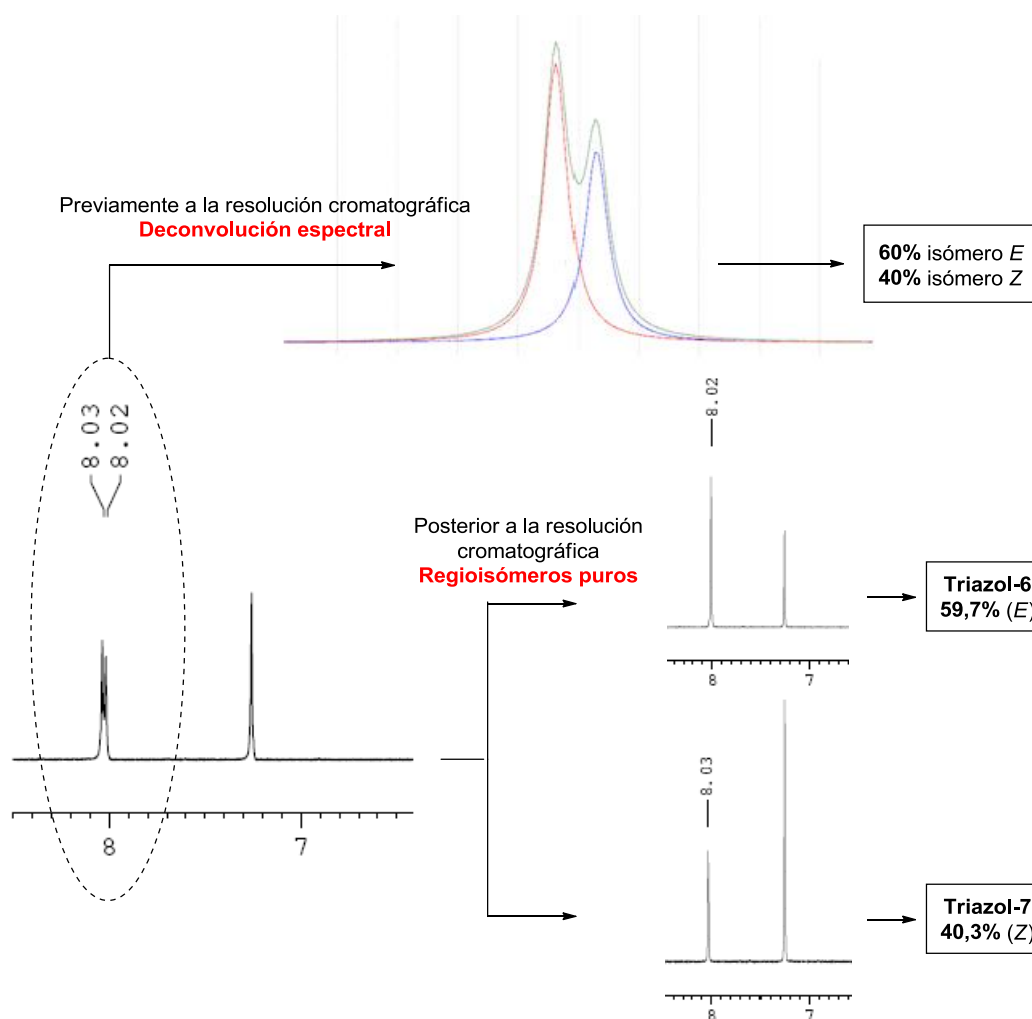
Este hecho es evidenciado por la falta de señales de protones olefínicos del grupo vinilo característicos de la azida terciaria en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de los compuestos sin purificar (**Figura 5.17**).



**Figura 5.17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la muestra sin resolver de **Triazol-6/Triazol-7**.

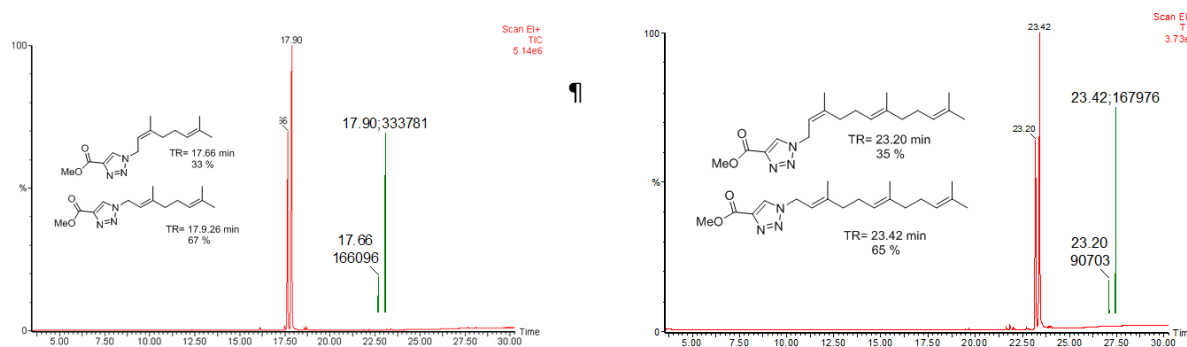
Sin embargo, la naturaleza química de estas moléculas permite resolver cromatográficamente los regioisómeros. Este hecho de vital importancia para el progreso de nuestra estrategia sienta las bases para desarrollar nuevas entidades moleculares farmacológicamente activas. Cabe destacar que en una única reacción una mezcla de 3 isómeros permitiría producir potencialmente dos productos cromatográficamente separables.

La señal característica en RMN de  $^1\text{H}$  de estos compuestos se halla en campos bajos y es asignable al protón del anillo triazol (8,03 ppm y 8,02 ppm, en este caso). Debido a la semejanza del entorno químico de los protones del **Triazol-6** y el **Triazol-7**, los desplazamientos químicos de las señales no son lo suficientemente distintos y aparecen solapados. Las metodologías utilizadas para calcular la relación de productos *E* (**Triazol-6**) y *Z* (**Triazol-7**) se centraron en técnicas de deconvolución espectral de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 5.18**) y cromatografía gaseosa acoplada a masa (CG-MS) previa a la resolución cromatográfica de la mezcla de los dos regioisómeros.



**Figura 5.18.** Cálculos de la relación de regioisómeros previo y posterior a la resolución cromatográfica.

En la **Figura 5.19** se muestran los cromatogramas de CG-MS de los compuestos **Triazol-2** y **Triazol-3** (panel de la izquierda) y **Triazol-4** y **Triazol-5** (panel de la derecha). Como se puede observar la composición de las mezclas es similar en los dos casos no habiendo picos adicionales asignables al producto de la azida terciaria. La asignación inequívoca de las señales se realizó con estándares puros de los dos isómeros, determinándose fehacientemente la regioquímica del doble enlace mediante experimentos enO de modo similar al descrito para las azidas isoprenílicas. El análisis de la composición de los isómeros en las azidas revela que la geranil azida tiene una relación Z/E de 38:62, siendo para la farnesil azida de 40:60. Si se compara con los valores obtenidos para los triazoles se observa que no ha habido un cambio significativo en la relación Z/E.

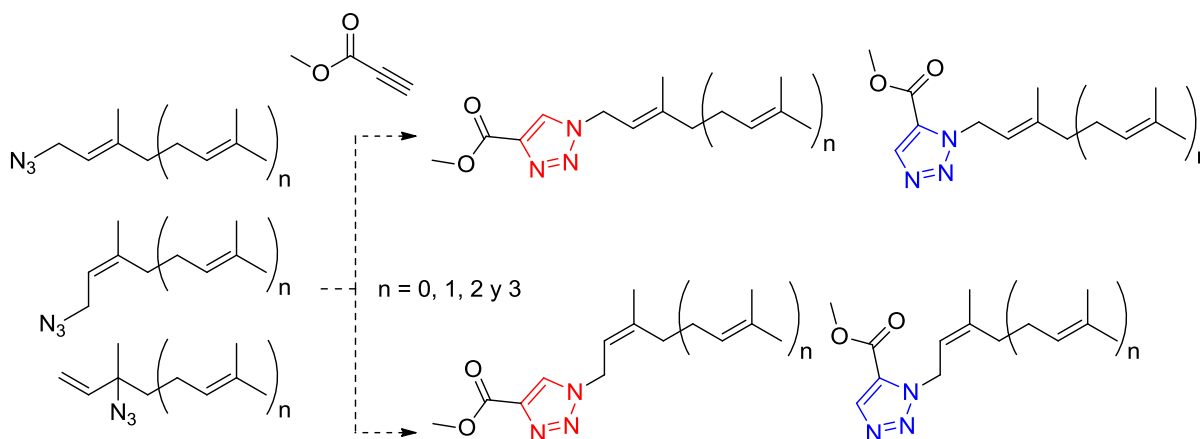


**Figura 5.19.** Cromatograma de CG-MS de los compuestos **Triazol-2** e **Triazol-3** (panel izquierdo) y compuestos **Triazol-4** e **Triazol-5** (panel derecho).

En base a todos los datos recabados, se puede concluir en forma fehaciente que la azida terciaria se equilibra rápidamente a las primarias y esta son las que reaccionan con el alquino. En conclusión ha sido posible demostrar que la cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas alílicas es una herramienta poderosa en la generación de productos isoprenilados de distinta regioquímica que se fundamenta en la accesibilidad de su separación cromatográfica.

#### 5.4.2 CICLOADICIÓN TÉRMICA INTRAMOLECULAR DE ISOPRENILAZIDAS

En condiciones térmicas es posible preparar triazoles 1,4-disustituídos y 1,5-disustituídos. Estos diferentes patrones de sustitución permiten introducir diversidad estructural en una misma reacción. Si esa misma premisa es extrapolada al sistema de azidas alílicas, potencialmente se podría duplicar el número de estructuras preparadas sin modificar el número de reacciones, comparados con las cicloadiciones catalizadas por Cu(I) (**Figura 5.20**).

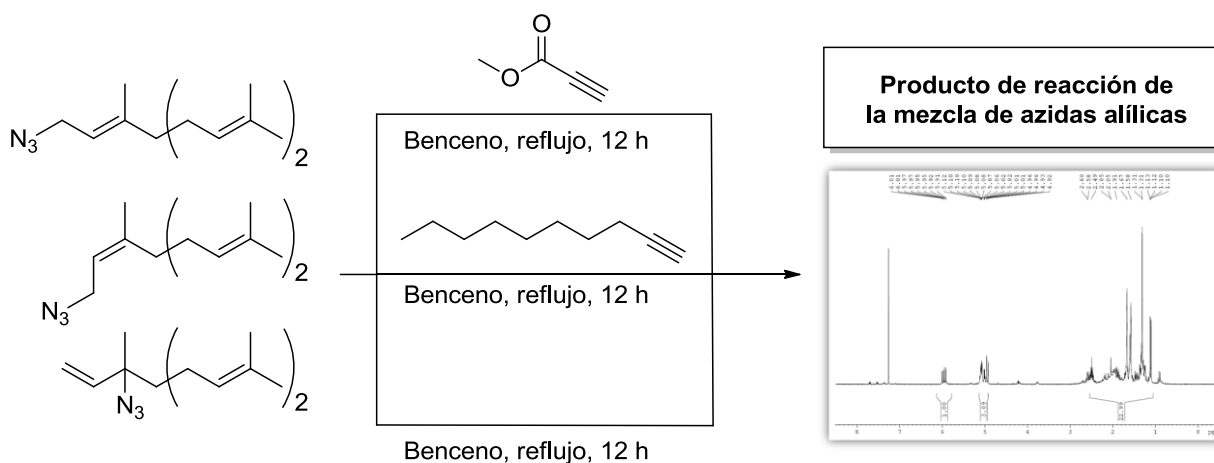


**Figura 5.20.** Potenciales productos de cicloadición térmica dipolar.

Con el fin de comprobar esta hipótesis se ensayó la cicloadición térmica de la mezcla de azidas alílicas sesquiterpénicas (**IA-6**, **IA-7** e **IA-8**) con propiolato de metilo en benceno a reflujo. La reacción cursó hasta desaparición del material de partida y una vez finalizada se purificó el producto obtenido encontrado que los datos espectroscópicos no coincidían con los esperados. Una hipótesis preliminar fue que debido a la volatilidad del propiolato de metilo durante el curso de la reacción se podría estar evaporando, siendo el producto obtenido el formado por la descomposición de la azida. Con el fin de salvaguardar este problema, permutamos el propiolato de metilo por decino, un alquino de mayor punto de ebullición (174 °C). Sin embargo finalizada la reacción y purificados los productos obtenidos se encontró que se recuperaba el decino y se obtenía otro producto que poseía características espectroscópicas coincidentes que el sintetizado en la reacción con propiolato de metilo.

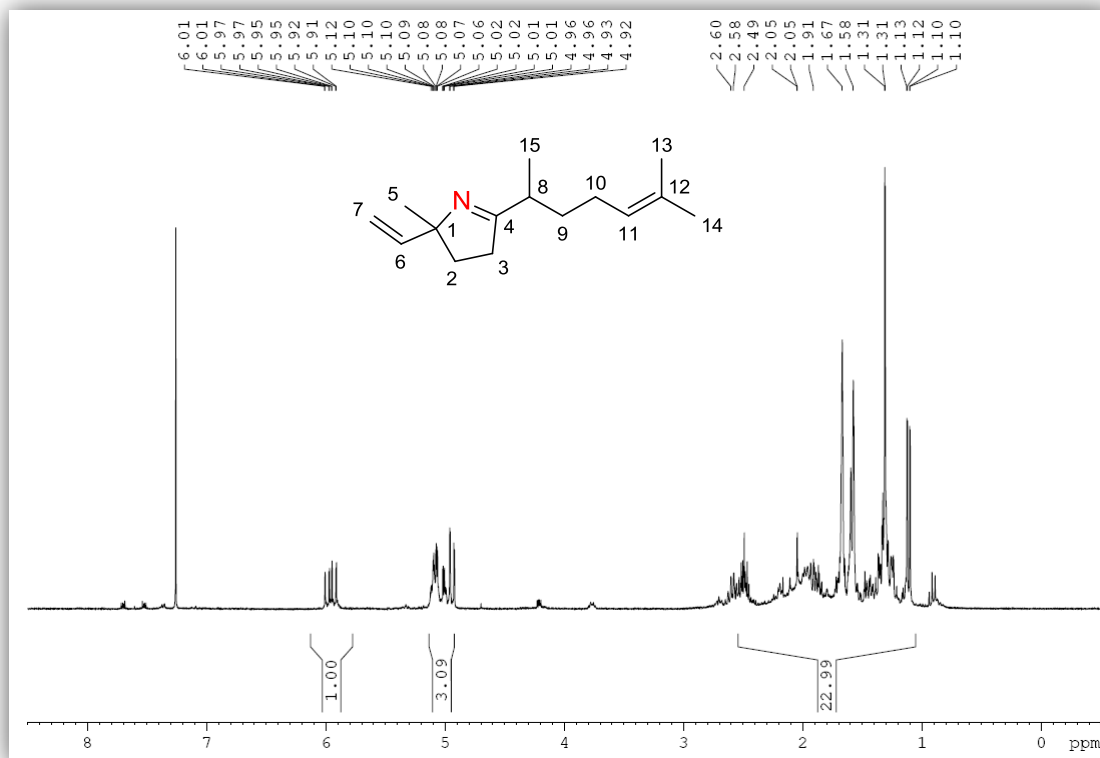
En base a estos resultados experimentales, consideramos posible que ese producto provendría de una reacción intrínseca de la mezcla de azidas alílicas. Bajo esta premisa, el alquino no reaccionaría y por lo tanto es posible recuperarlo en la etapa de purificación.

El paso lógico fue minimizar el sistema a la dilución de la mezcla de farnesilazidas en benceno y llevar la solución a reflujo del solvente en atmósfera de nitrógeno. El producto obtenido tenía nuevamente el mismo patrón de señales espectroscópicas que los productos anteriores (**Esquema 5.9**).



**Esquema 5.9.** Reacción térmica de la mezcla de farnesilazidas en presencia y ausencia de alquinos. El producto obtenido por todos los caminos es el mismo.

Dilucidar la estructura del producto requirió un profundo estudio espectroscópico. Finalmente se logró esclarecer que el producto furtivo se trataba de una imina cíclica (**Figura 5.21**).

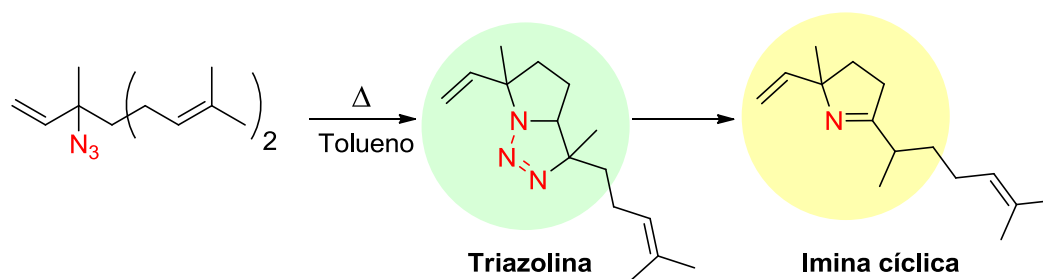


**Figura 5.21.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la cicloadición térmica de la mezcla de farnesilazidas.

Las señales características de este producto es el doble doblete en 5,96 ppm que integra para 1 protón con constantes de acoplamiento  $^3J_{trans} = 17,1$  Hz y  $^3J_{cis} = 10,4$  Hz asignable al protón vinílico ubicado en C-6. El solapamiento de señales entre 5,12 y 5,01 ppm engloba a los protones olefínicos de la unidad isoprénica (C-11) y a uno de los protones olefínicos terminales. La señal en 4,94 ppm correspondiente a un sistema de doblete con  $^3J_{cis} = 10,0$  Hz corresponde al restante protón olefínico terminal. El metilo unido a la pirrolina (C-5) aparece como un tipo singlete en 1,31 ppm, en cambio el metilo C-15 aparece como un doblete en 1,12 ppm con  $^3J = 6,9$  Hz, acoplado con el protón ubicado en C-8, que aparece como un multiplete en 2,58 ppm. Finalmente, los singletes a 1,67 y 1,58 ppm pueden ser asignados a los metilos C-13 y C-14, respectivamente.

La generación de este producto puede explicarse exclusivamente por la formación de un intermediario triazolina a partir de la azida alílica terciaria. En esta reacción de ciclación

térmica, el grupo azida reacciona intramolecularmente con el doble enlace rico en electrones que posee una distribución espacial propicia. En un segundo evento, la triazolina sufre una extrusión de una molécula de nitrógeno y un posterior reordenamiento, para genera la imina cíclica. Se experimentaron diferentes condiciones de reacción variando temperatura y presión (con agregado de nitrógeno gaseoso), aún así no se pudo detectar la triazolina intermediaria, obteniendo siempre la imina cíclica. Se encuentra reportado en la literatura que las 1,2,3-triazolinas son compuestos inestables y tienden a descomponerse.<sup>[5.37]</sup>



**Esquema 5.10.** Reacción de cicloadición intramolecular de la farnesil azida.

En este nuevo escenario logramos de manera inédita encuadrar la modulación de la reactividad de la mezcla hacia alilazidas terciarias. Este valioso hecho permite que podamos en forma selectiva hacer reaccionar uno de los componentes de la mezcla, de acuerdo a las necesidades sintéticas que se requieran.

Extendiendo la reacción a las otras mezclas preparadas, pudimos sintetizar un total de 3 iminas cíclicas, según se ilustra en la **Tabla 5.4**. Como era de esperar, no hubo reacción cuando la mezcla utilizada es la proveniente de las azidas **IA-1** e **IA-2**, puesto que estructuralmente no hay una distribución espacial adecuada para que ocurra el evento de ciclación intramolecular.

**Tabla 5.4.**

Entrada	Mezcla de Azidas	Rendimiento	Imina cíclica
1	Isoprenil azida ( <b>IA-1</b> e <b>IA-2</b> )	NR	<b>Imina-IA-2</b>
2	Geranil azida ( <b>IA-3</b> , <b>IA4</b> e <b>IA-5</b> )	61%	<b>Imina-IA-5</b>
3	Farnesil azida ( <b>IA-6</b> , <b>IA7</b> e <b>IA-8</b> )	80%	<b>Imina-IA-8</b>
4	Geranil Geranil azida ( <b>IA-9</b> , <b>IA10</b> e <b>IA-11</b> )	78%	<b>Imina-IA-11</b>

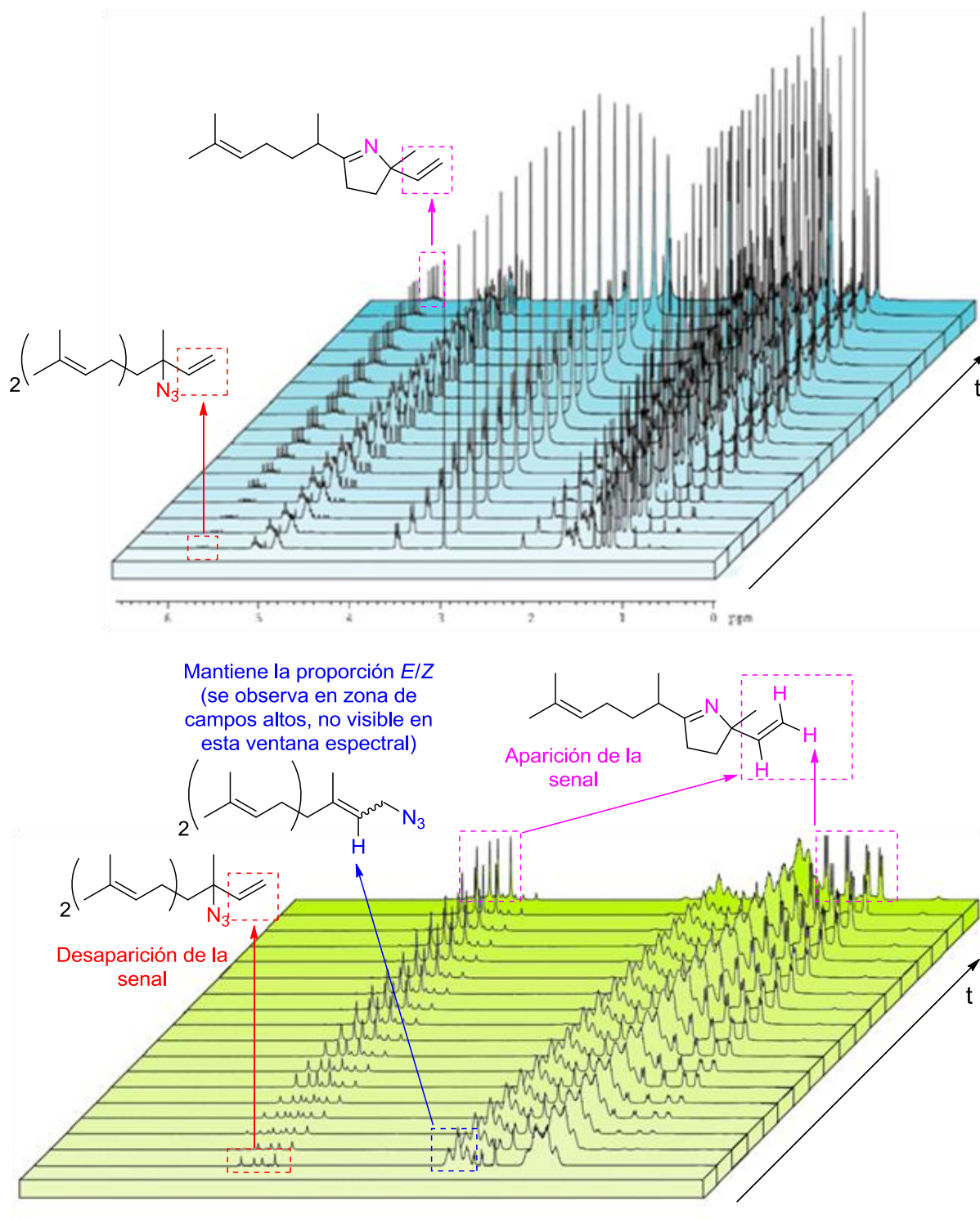
En forma paralela se ensayaron condiciones de reacción asistida por microondas a temperatura constante de 150 °C en tolueno. En esas condiciones se logran disminuir los tiempos de reacción de 12 horas a 20 minutos y aumentar el rendimiento de 80% a cuantitativo.

En un intento por comprender el mecanismo de esta reacción, decidimos hacer dos abordajes complementarios. Por un lado realizar determinaciones cinéticas de la reacción y por otro lado una aproximación teórica para justificar la naturaleza de los productos obtenidos.

#### *5.4.2.1 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LA REACCIÓN DE CICLOADICIÓN TÉRMICA INTRAMOLECULAR DE LAS FARNESIL AZIDAS.*

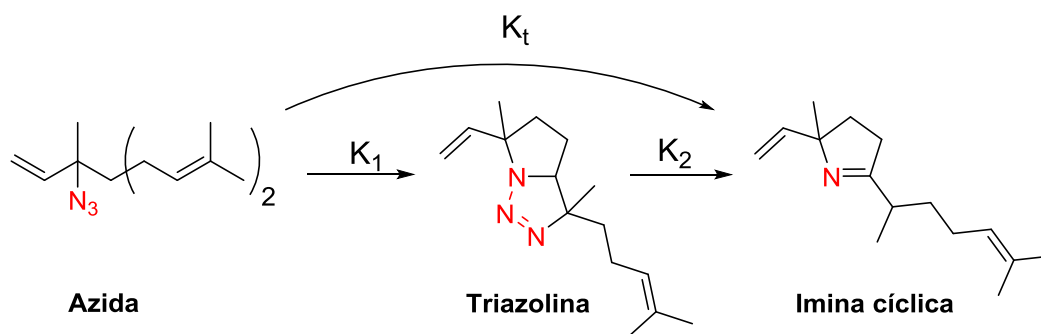
El uso de la espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  para determinar el curso de una reacción es ampliamente difundido. En ese contexto, para completar los estudios de la reacción de ciclación térmica intramolecular se llevó a cabo un experimento de seguimiento en el tiempo (*timecourse*). El diseño experimental consiste en adquirir espectros de RMN de  $^1\text{H}$  cada 60 minutos en DMSO- $d_6$ , solvente polar de un punto de ebullición alto y una ventana espectral que no interfiere con la señales de los reactivos y productos.

Como se aprecia en la **Figura 5.22**, únicamente la azida terciaria reacciona (desaparición de la señales de protones olefínicos del grupo vinilo característicos de la azida terciaria en la ventana espectral comprendida entre 6,0 y 5,5 ppm), mientras que la mezcla de azidas primarias mantiene la relación E/Z presentes en el material de partida. En ningún momento se observaron señales atribuibles a la triazolina intermediaria.



**Figura 5.22.** a) Timecourse de la ciclación térmica intramolecular de la mezcla de farnesilazidas; b) Expansión en el área de los protones olefínicos (4,5 ppm a 6,5 ppm).

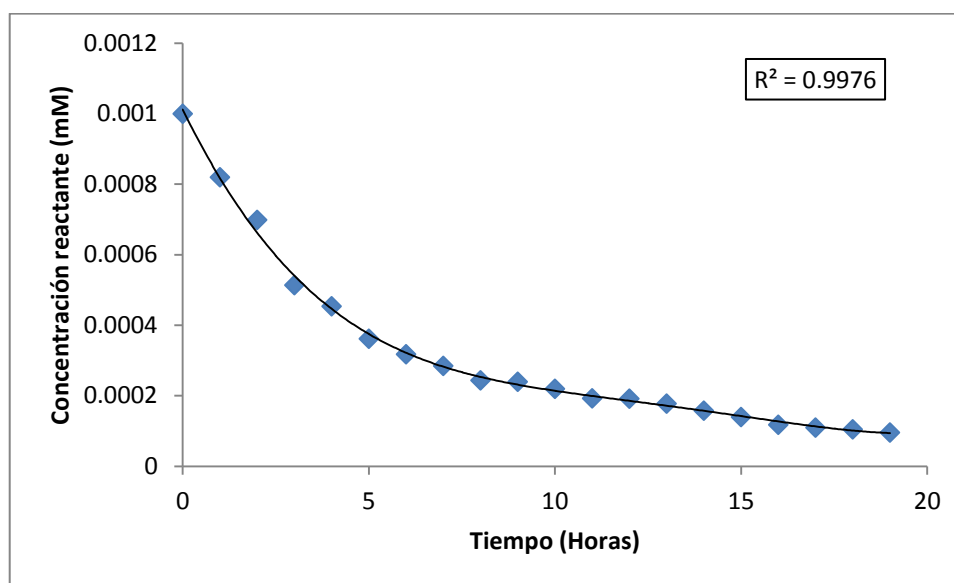
La reacción entonces transcurre en dos pasos discretos, como se observa en el Esquema 5.11.



**Esquema 5.11.** Ecuación de formación de la imina cíclica.

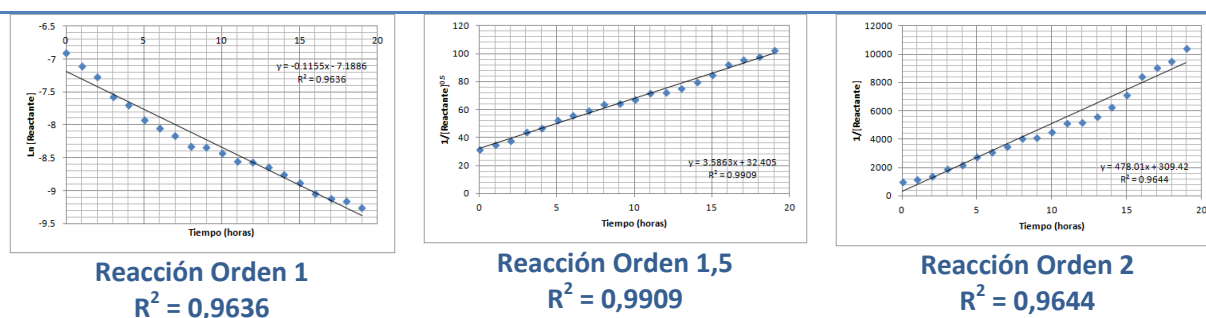
Una explicación plausible de la imposibilidad de aislar el intermediario triazolina es que el paso limitante de la velocidad sea la formación de este intermediario. Entonces, bajo ese modelo, una vez que ocurre el evento de choque efectivo entre el nitrógeno distal de la azida y el doble enlace rico en electrones con la disposición espacial óptima y la energía necesaria, se forma el intermediario bicíclico. Este sistema tiene considerablemente menos grados de libertad lo que facilitaría la extrucción de una molécula de nitrógeno (fuerza motriz de la reacción) y el reordenamiento para formar la imina cíclica. En definitiva, son las restricciones estéricas del biciclo frente al sistema terpénico lineal las que favorece un aumento en la velocidad de reacción de la segunda reacción, frente a la primera ( $k_1 < k_2$ ). En ese contexto, según las aproximaciones del estado estacionario la concentración de un intermediario en un sistema en evolución tenderían a cero.

El perfil cinético obtenido a partir del experimento de seguimiento en el tiempo, en donde se observa el consumo del reactante farnesilazida en función del tiempo de reacción, es el que se muestra a continuación.



**Figura 5.23.** Consumo del reactante en función del tiempo

Cálculos preliminares sugieren que la reacción es de orden 1,5 (**Figura 5.24**), sin embargo se requieren repetir estos experimentos de *timecourse* para que la conclusión sea estadísticamente significativa.



**Figura 5.24.** Cálculos preliminares del orden de reacción

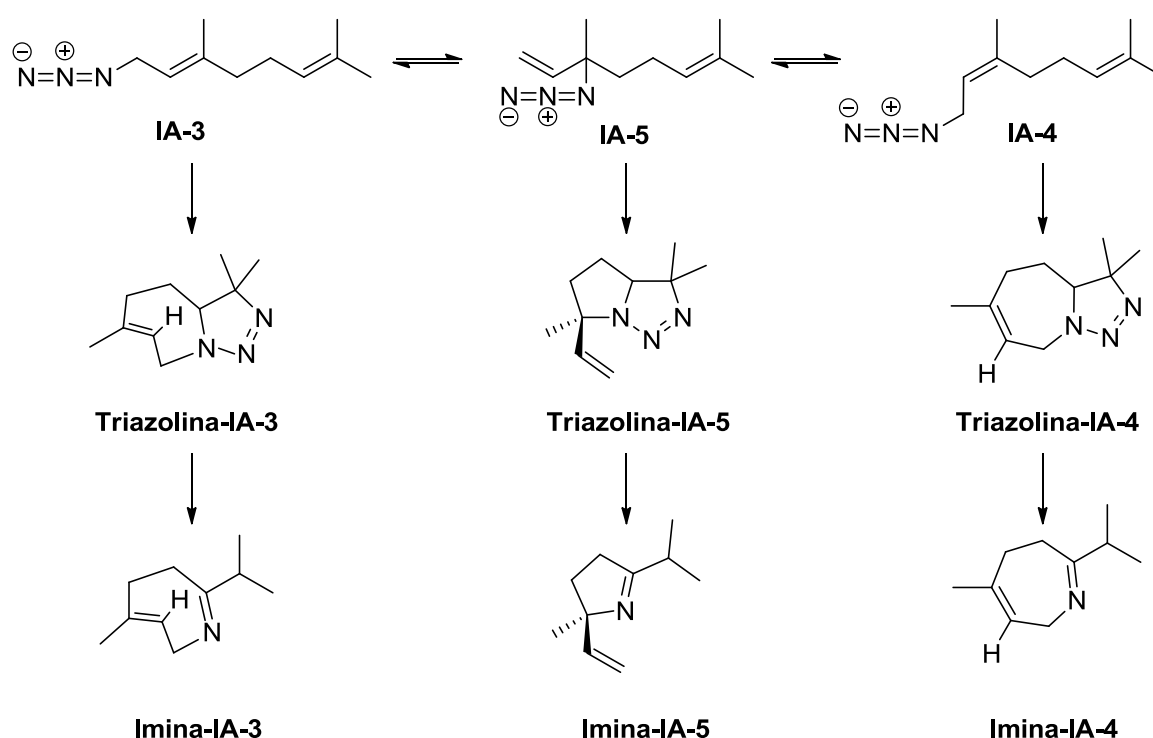
#### 5.4.2.2 ESTUDIOS TEÓRICOS DE LA REACCIÓN DE CICLOADICIÓN TÉRMICA INTRAMOLECULAR DE LA FARNESIL AZIDAS:

Con el fin de complementar los estudios experimentales realizados nos abocamos a realizar estudios teóricos exhaustivos para demostrar el origen de la regioselectividad de la reacción de ciclación térmica intramolecular. Estos estudios buscan además justificar la estabilidad termodinámica de la imina cíclica con respecto a la triazolina y por lo tanto, revelar la imposibilidad de aislar este intermediario en las condiciones ensayadas.

La modularidad de la reacción de cicloadición térmica intramolecular hacia un único isómero de la mezcla puede ser explicada termodinámicamente. Atendiendo esta cuestión, se

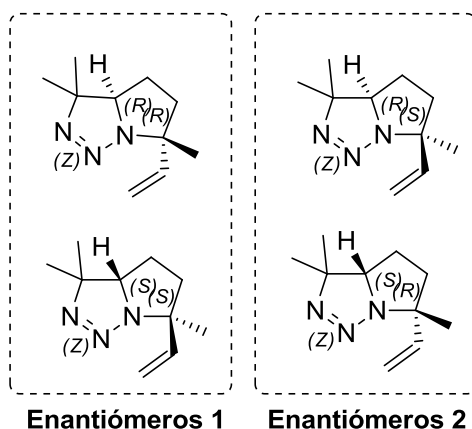
desarrolló el perfil energético de la reacción de formación de los intermediarios triazolinas producidos a partir de cada una de las 3 regioisómeros de alilazidas que conforman la mezcla.

Con el fin de obtener resultados comparables, metodológicamente el trabajo se realizó en las mismas condiciones que las desarrolladas en el apartado teórico de las mezclas de alilazidas. Del mismo modo, se modeló la mezcla de azidas sintetizadas a partir del geraniol, la estructura isoprénica más chicas con las que se pueden realizar las reacciones de ciclación térmica intramolecular. En el **Esquema 5.12** se detallan todas las reacciones estudiadas, con la metodología en B3LYP/6-31G(d).



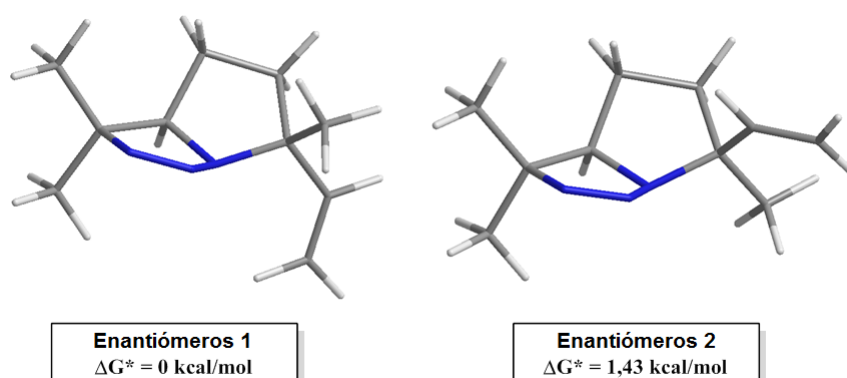
**Esquema 5.12.** Posibles productos de la reacción de ciclación 1,3-dipolar térmica intramolecular.

Debido a la rigidez estructural de triazolinas e iminas cíclicas, el número de confórmeros disminuye notablemente, traduciéndose en un menor tiempo de cálculo. Durante la ciclación intramolecular de la linaloilazida **IA-5**, el ataque de la azida al alqueno se puede realizar por cualquiera de las dos caras del doble enlace y la **Triazolina-IA-5** formada tiene dos centros estereogénicos, generándose potencialmente 4 mezclas de enantiómeros (**Figura 5.25**).



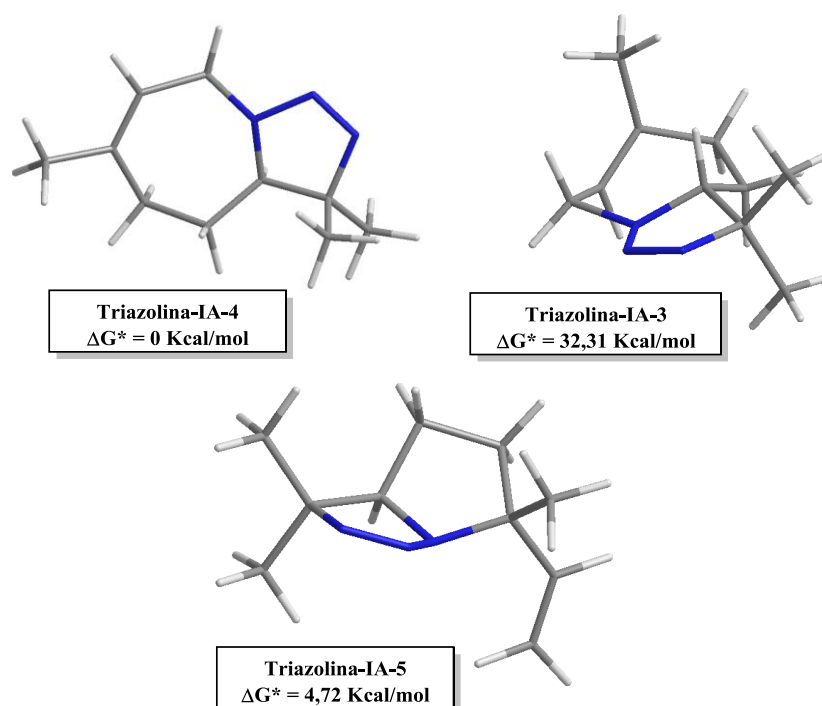
**Figura 5.25.** Potenciales triazolinas generadas durante la cicloadición intramolecular de la linaloilazida **IA-5**.

La estereoselectividad del sistema de anillos triazolina fue resuelta hacia la pareja de enantiómeros 1, debido a que tienen menor contenido energético que los enantiómeros 2 (**Figura 5.26**, 1,43 Kcal/mol de diferencia).



**Figura 5.26.** Diferencia de energías libres entre la triazolina (*R,R*) perteneciente a la serie enantiomérica 1 y la triazolina (*R,S*) perteneciente a la serie enantiomérica 2.

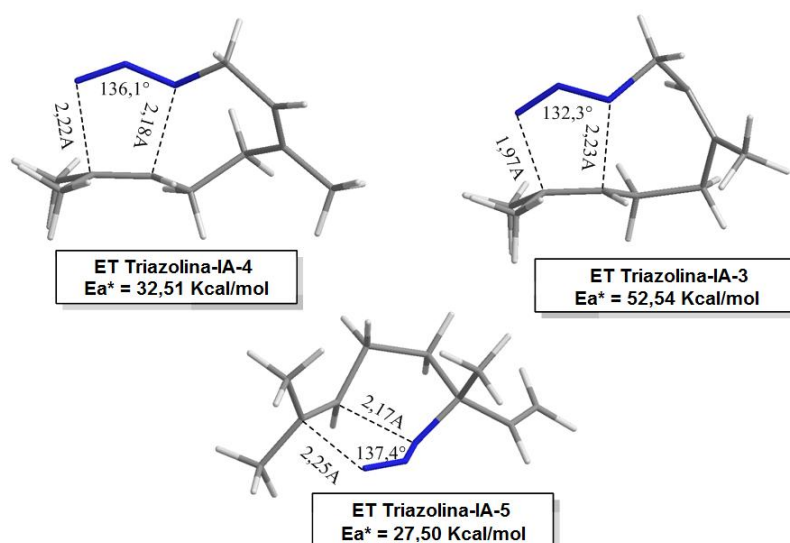
El resultado de los cálculos revela que la estructura bicíclica [5.3.0] decano (**Triazolina-IA-3**) generada a partir de la geranilazida es la termodinámicamente menos estable de las tres. Los valores calculados de energías para dicha triazolina muestran una diferencia de más de 32 Kcal/mol con el producto bicíclico de menor contenido energético. Asimismo, este es el único caso de los estudiados en el que el producto de reacción tiene mayor contenido energético con respecto al reactivo ( $\Delta G^*$  de reacción positivo). La explicación lógica de este resultado radica en la tensión estructural del biciclo [5.3.0] decano (**Triazolina-IA3-3**) por la presencia del alqueno *trans* interno.



**Figura 5.27.** Valores de diferencias de energía libre en fase gas calculadas con respecto a la estructura más estable por *Ab initio* de las triazolinas.

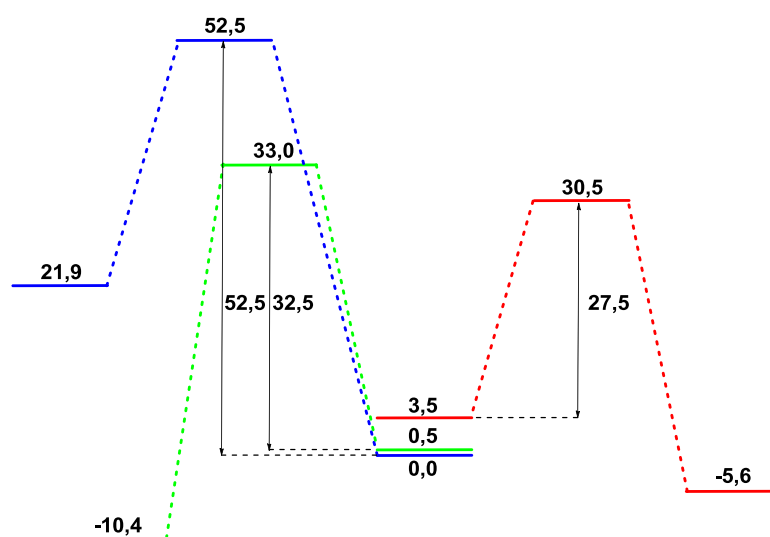
La triazolina formada a partir de la alilazida primaria Z es más estable (**Triazolina-IA-4**, biciclo [5.3.0] decano) que la alilazida terciaria (**Triazolina-IA-5**, biciclo [3.3.0] octano) en 4,72 Kcal/mol. Debido a la selectividad de la reacción de ciclación intramolecular cursa hacia la alilazida terciaria, la justificación para la formación de ese isómero se encontraría en la energía de activación de la reacción.

En este contexto, la siguiente etapa del estudio fue calcular las energías en el estado de transición para cada una de las 3 triazolinas (**Figura 5.28**). Los resultados indican que para formar la **Triazolina-IA-5** a partir de la alil azida terciaria **IA-5** se requiere vencer una barrera energética menor que para formar las otras triazolinas. Este hecho es trascendental, puesto a que hay una diferencia de 5 Kcal/mol entre la energía de activación para formar la **Triazolina-IA-5** frente a la **Triazolina-IA-4**. Se sugiere entonces que está favorecida la ciclación de la azida terciaria en comparación a las primarias.



**Figura 5.28.** Valores de energía libre calculadas por *Ab Initio* de los estados de transición de las triazolinas formadas a partir de las alilazidas por ciclación térmica intramolecular

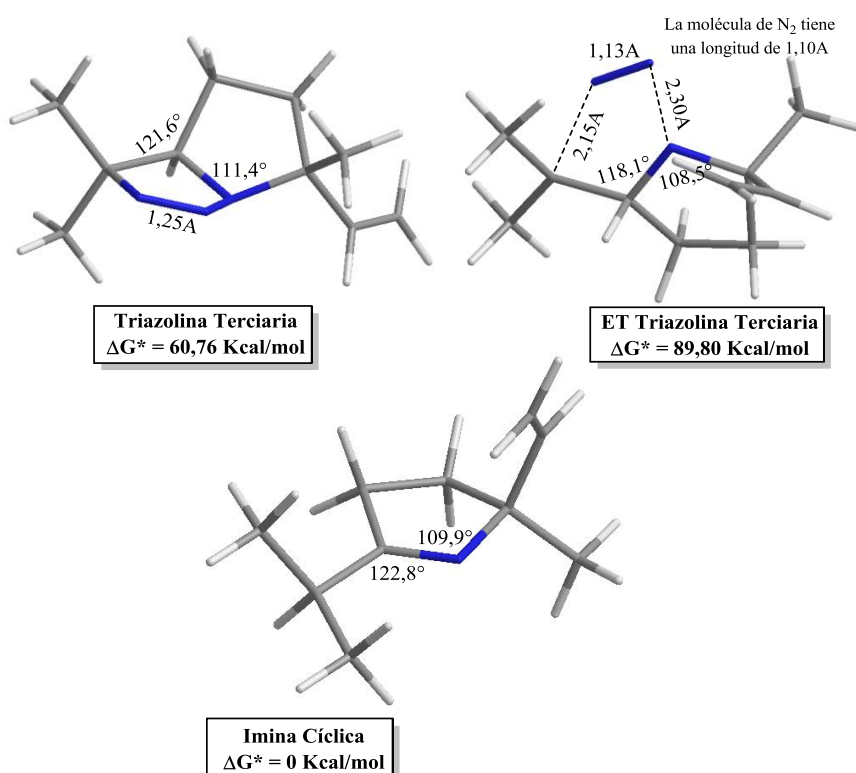
El análisis de las estructuras de los estados de transición muestra que las distancias N–C entre el N1 y N3 del grupo azida y los carbonos reaccionantes del alqueno varían en 0,04 Å (2,22 Å y y 2,18 Å) para la **Triazolina-IA-4** y 0,08 Å (2,25 Å y y 2,17 Å) para la **Triazolina-IA-5**. Estos valores indican que se trata de un estado de transición altamente sincrónico. Con estos resultados fue posible completar el perfil energético de la reacción (**Figura 5.29**) para la mezcla de las 3 alilazidas modelo.



**Figura 5.29.** Diagrama de energía comparativo entre los perfiles energéticos de las reacciones de cicloadición térmica intramolecular de cada alil-azida. En azul alilazida **IA-3**, en verde alilazida **IA-4** y en rojo alilazida **IA-5**. Energía en Kcal/Mol en función de coordenada de reacción.

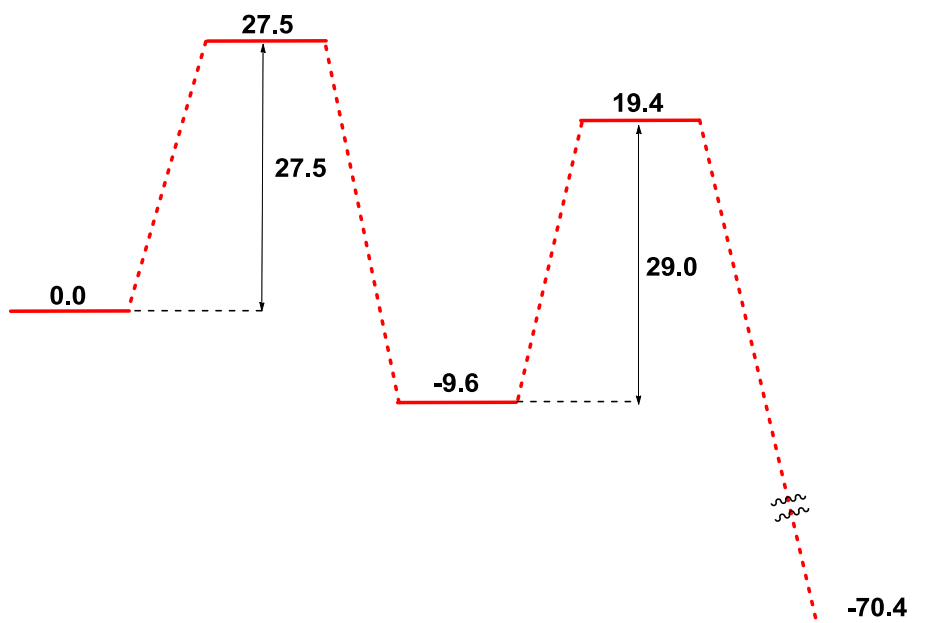
Resuelta la regioselectividad hacia la formación de la **Triazolina-IA-5**, se procedió a continuar los estudios para comprender la imposibilidad de aislar este intermediario triazolina.

Las iminas, debido a la mayor flexibilidad estructural con respecto a la triazolina, tienen un número mayor de isómeros conformacionales, esto aumenta el costo computacional. Se contemplaron los diastereoisómeros de la triazolina de partida. Sin embargo la extrusión del nitrógeno y posterior reordenamiento hace perder un centro estereogénico de la molécula, generando iminas que son enantiómericas. Análogamente, se buscó el estado de transición de la reacción desde la estructura intermedia **Triazolina-IA-5** hacia la **Imina-IA-5** (Figura 5.30).



**Figura 5.30.** Valores de energías libres de la imina cíclica y del estado de transición

Finalmente, se desarrolló el **perfil energético** completo desde el reactivo (**IA-5**) hasta el producto (**Imina-IA-5**), contemplando el intermediario triazolina (**Triazolina-IA-5**) y los dos estados de transición (Figura 5.31).

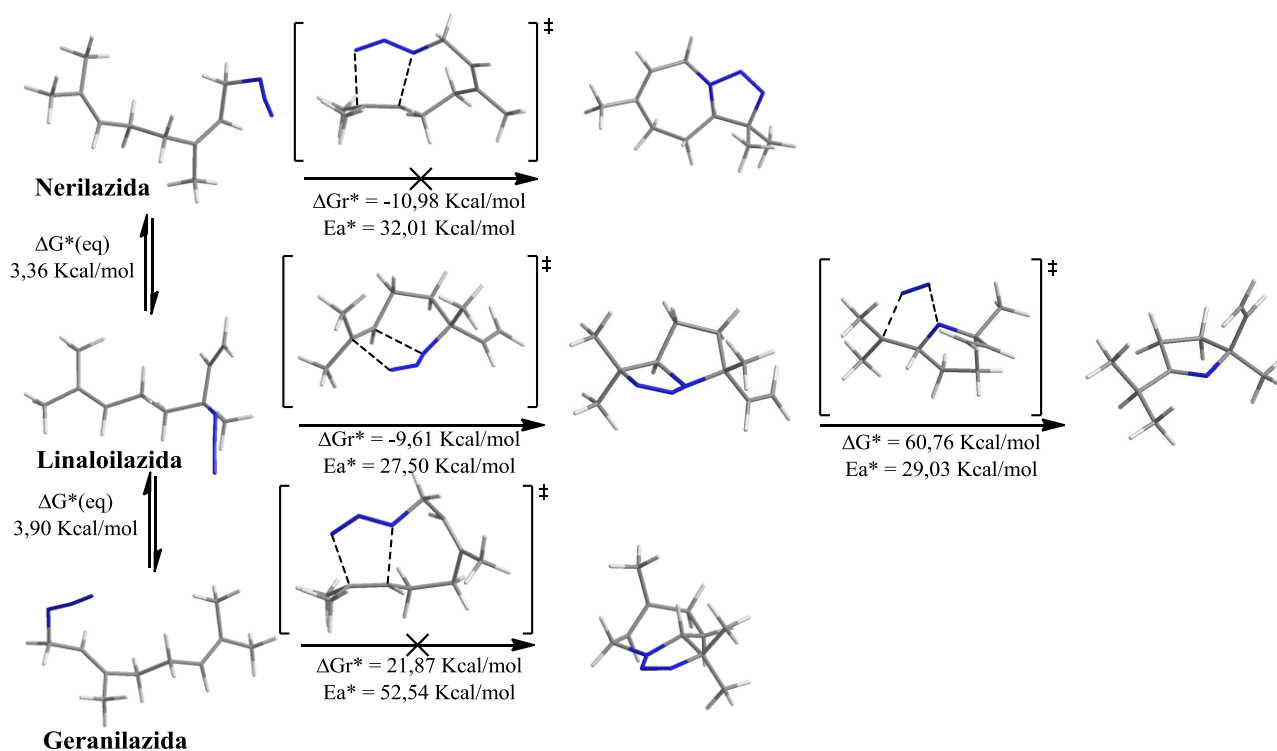


**Figura 5.31.** Diagrama de energía de la reacción de ciclación térmica intramolecular de la alilazida terciaria. Energía en función de coordenada de reacción.

Los cálculos de energías libres en fase gas a nivel B3LYP/6-31G(d) muestran una gran diferencia energética entre la imina y la triazolina ( $\Delta G^* = 60,76$  kcal/mol), demostrando que la triazolina sería termodinámicamente inestable en las condiciones de reacción. En forma consistente se puede concluir que la extrusión del nitrógeno es la fuerza conductora de la reacción de ciclación térmica intramolecular.

Fue posible obtener resultados teóricos satisfactorios en estos modelos. De este modo se logró demostrar que las reactividades de las azidas alílicas y en particular las isoprénicas pueden ser moduladas. Estos avances se podrían extender en su utilización en síntesis orientada a la diversidad, ampliándose incluso hacia otras áreas de investigación.

En resumen, como se observa en el **Esquema 5.13** y en concordancia con nuestros resultados teóricos y experimentales, es posible modular la reactividad de las isoprenilazidas dando lugar a productos de reacción de sólo algunos de los componentes de la mezcla, al mismo tiempo que se restablece el equilibrio. De esta forma posicionamos a estos sintones como herramientas privilegiadas a la hora de generar compuestos con esqueletos estructuralmente diversos para desarrollar nuevas quimiotecas.



**Esquema 5.13.** Perfil energético de las reacciones de azidas isoprénicas .

## 5.5 USO DE ISOPRENILAZIDAS PARA LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS CONTRA ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS

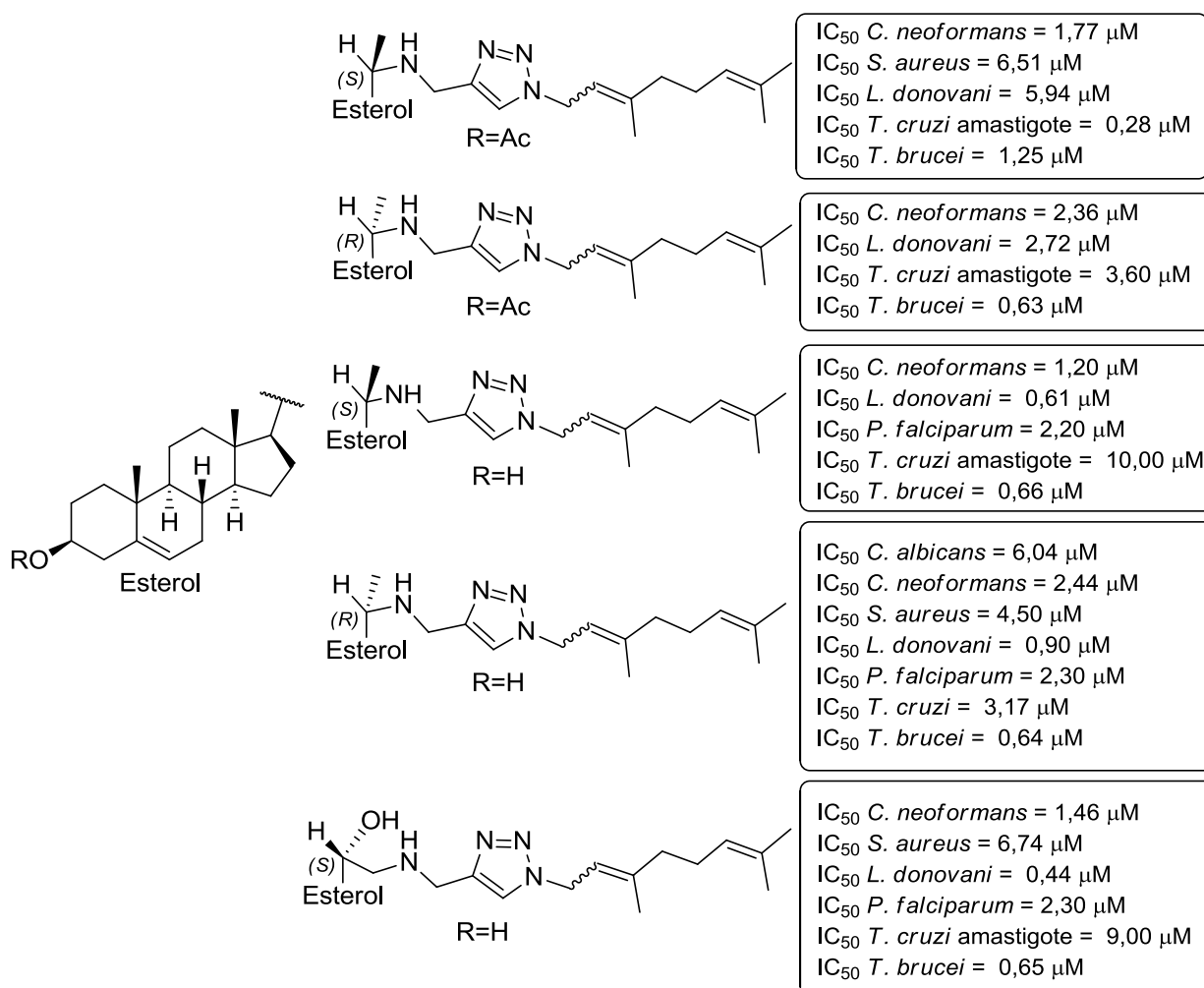


El desarrollo de estrategias sintéticas útiles tiene un fructífero campo de aplicación en química medicinal con la preparación de colecciones de compuestos novedosos con potenciales actividades biológicas. Bajo este paradigma, el uso de las herramientas de reactividad diferencial en estructuras privilegiadas, tiene la potencialidad de desarrollar quimiotecas con fines biológicos. Sinérgicamente, el hecho que el metabolismo o las vías

biosintéticas que involucran a terpenos poseen numerosos blancos privilegiados, tiene una poderosa significancia al momento de diseñar nuevos inhibidores.

Existen dos grandes estrategias válidas para desarrollar nuevos agentes quimioterapéuticos. La primera es buscar inhibidores contra blancos moleculares validados y la segunda buscar compuestos activos contra el microorganismo a combatir. Sin embargo, como se enunció oportunamente en la introducción de esta tesis, no es una tarea sencilla puesto a que hay que sortear varios filtros antes de lograr un compuesto idóneo para el tratamiento de una enfermedad; muchas de estas etapas requieren una estrecha coordinación interdisciplinaria.

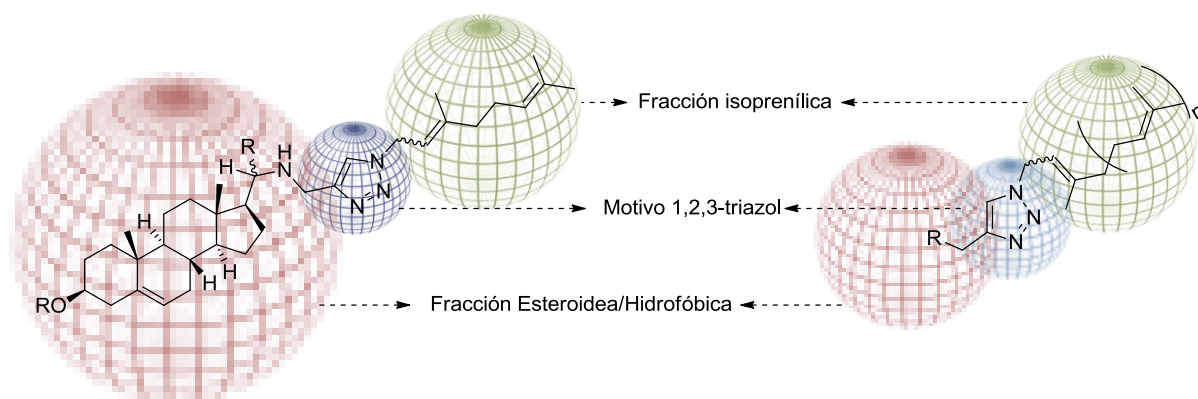
Previamente, nuestro grupo de trabajo preparó compuestos decorados con motivos isoprenílicos con excelentes niveles de actividades *in vitro* contra diversos organismos productores de enfermedades de alto impacto en humanos (**Figura 5.32**).<sup>[5.4, 5.38]</sup>



**Figura 5.32.** Triazolil azasteroles con potentes actividades en tripanosomátidos.

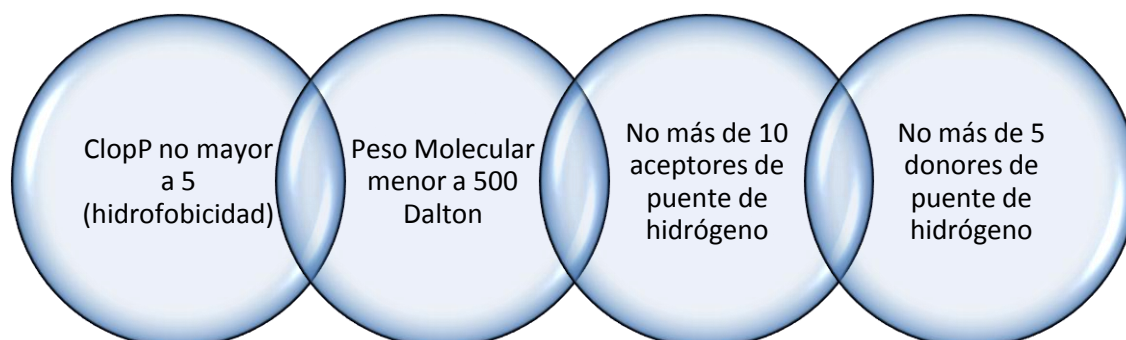
Estructuralmente estas moléculas tienen 3 regiones bien definidas. Un motivo esteroide, un arreglo 1,2,3-triazol y una porción isoprenoide.

En base a estos datos y con el propósito de aplicar la metodología desarrollada con las isoprenilazidas, diseñamos una nueva colección de productos triazólicos. El diseño requiere mantener el motivo 1,2,3-triazol para generar una quimioteca en las que se usufructúen las ventajas de separación cromatográfica en la obtención de productos regioisoméricamente puros. Por otro lado, se introdujo variabilidad en el largo de la cadena de la fracción isoprenoide y se reemplazó la región esteroidea por un dominio hidrofóbico de menor tamaño. El doble propósito de esta permutación es el de reducir el peso molecular de los compuestos a un tamaño menor a 500 daltons para ajustarse a las reglas de Lipinski <sup>[5.39]</sup> y el de validar el motivo isoprenil-1,2,3-triazol como farmacóforo.



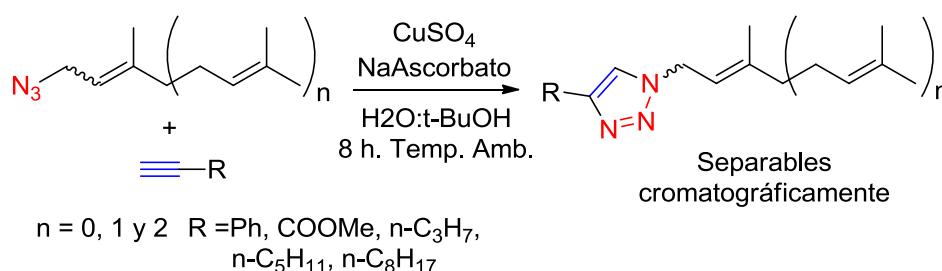
**Figura 5.33.** Diseño de la quimioteca.

La colección de compuestos de 1,2,3-triazol-1-isoprenil 4 sustituidos (IT) se preparó a partir de azidas alílicas y alquinos terminales, los dos bloques de construcción necesarios para desarrollar la metodología sintética. La elección de los alquil derivados se adecúa a la filosofía de las reglas de Lipinski, conocida también como regla de los 5 (**Figura 5.34**).



**Figura 5.34.** Reglas de Lipinski.

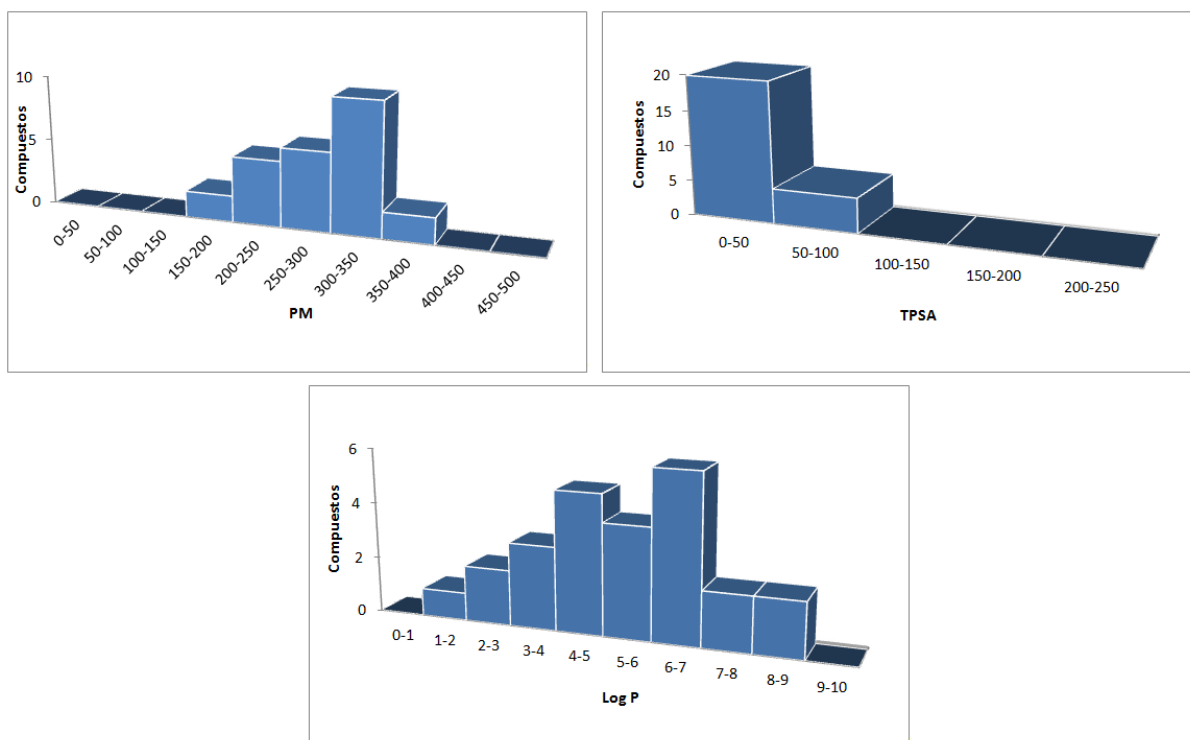
Se utilizaron mezclas de azidas alílicas de 1, 2 y 3 unidades isoprénicas (prenil azida, geranil azida y farnesil azida) y se seleccionaron 5 alquinos terminales variando el volumen y polaridad con el objeto de generar diversidad estructural (fenil acetileno, propiolato de metilo, pentino, heptino y decino, accesibles comercialmente). La combinación de la mezcla de las alilazidas y los alquinos posibilitó la síntesis eficiente de 25 compuestos con un 83% de rendimiento promedio. En aquellos casos en los que se encontraba presente una mezcla de productos (*E* y *Z* isoprenil derivados), la posibilidad de separarlos cromatográficamente permitió obtener estructuras regioisoméricamente puras.



	COOMe		Fenilo		Propilo		Pentilo		Octilo	
Prenilo	IT-1	83%	IT-2	93%	IT-3	74%	IT-4	83%	IT-5	80%
Z-geranilo	IT-6 (1)	86%	IT-7 (1)	75%	IT-8 (1)	87%	IT-9 (1)	85%	IT-10 (1)	82%
<i>E</i> -geranilo	IT-11 (1,5)		IT-12 (1,5)		IT-13 (1,5)		IT-14 (1,5)		IT-15 (1,5)	
Z-farnesilo	IT-16 (1)	72%	IT-17 (1)	81%	IT-18 (1)	83%	IT-19 (1)	89%	IT-20 (1)	69%
<i>E</i> -farnesilo	IT-21 (1,5)		IT-22 (1,5)		IT-23 (1,5)		IT-24 (1,5)		IT-25 (1,5)	

**Figura 5.35.** Compuestos preparados y rendimientos de la Quimioteca de 1,2,3-triazoles preparados. Entre paréntesis la relación de isómeros (en todos los casos se observó una relación 60:40 entre los isómero *E* y *Z*).

En la **Figura 5.36** se detallan gráficamente el perfil fisicoquímico de los **IT** preparados. Se describen los parámetros más relevantes (peso molecular, área superficial polar y LogP) de la colección, que permitirán predecir la potencialidad de los compuestos como líderes y complementarán los estudios de estructura/actividad. Se graficó la distribución de pesos moleculares, el área superficial polar y coeficiente de reparto octanol/agua en función del número de compuestos.



**Figura 5.36.** Distribución de los parámetros fisicoquímicos de la quimioteca IT.

## 5.6 ACTIVIDAD *IN VITRO* EN *T. CRUZI* Y *L. DONOVANI*



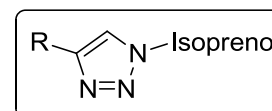
Una vez sintetizada y caracterizada la colección, se procedió a realizar los ensayos de actividades biológicas *in vitro* en dos tripanosomátidos, los agentes etiológicos responsables de la enfermedad de Chagas (*T. cruzi*) y la leishmaniasis visceral (*L. donovani*). Esta tarea requiere de estrechas vinculaciones y trabajo interdisciplinario.

Los ensayos de actividad biológica en *T. cruzi* fueron realizados en colaboración con el grupo de trabajo del Prof. Esteban Serra del Laboratorio de biología y bioquímica de *Trypanosoma cruzi* del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET-UNR). Todos los compuestos fueron testeados en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*,

usando la cepa CL-Brener. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.5**, en formato de mapa de calor.

**Tabla 5.5.** Mapa de calor de las actividades de la quimioteca en *T. cruzi*.

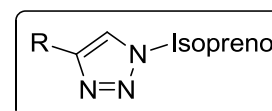
IC <sub>50</sub> μM	COOMe	Fenilo	Propilo	Pentilo	Octilo
Prenilo	>100	>100	>100	>100	27
Z-geranilo	87	39	44	36	34
E-geranilo	87	39	31	51	27
Z-farnesilo	15	32	17	18	>100
E-farnesilo	9	34	18	29	>100



Los ensayos de actividad en *L. donovani* fueron realizados con la colaboración del Prof. Dr. Babu Tekwani del National Center for Natural Products Research de la Universidad de Mississippi, en Estados Unidos de América. Todos los compuestos fueron ensayados en promastigotes de *L. donovani*. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.6**, en formato de mapa de calor.

**Tabla 5.6.** Mapa de calor de las actividades de la quimioteca en *L. donovani*.

IC <sub>50</sub> μM	COOMe	Fenilo	Propilo	Pentilo	Octilo
Prenilo	>100	>100	>100	>100	>100
Z-geranilo	>100	49	44	40	16
E-geranilo	>100	49	72	94	57
Z-farnesilo	11	49	33	11	52
E-farnesilo	31	48	51	44	36



El Dr. Babu Tekwani también fue el responsable de determinar la citotoxicidad de la colección en células VERO (células epiteliales de riñón de mono verde Africano *Chlorocebus*, es una línea celular iniciada en 1962 y es uno de los patrones farmacológico universales para realizar este tipo de ensayo). Ninguno de los triazoles preparados posee citotoxicidad a una concentración máxima de 4,75 μg/mL.

Con el objeto de vincular los datos fisicoquímicos de los compuestos preparados con las actividades contra tripanosomátidos para correlacionar la estructura con la actividad, se sintetizan los principales parámetros fisicoquímicos con las actividades en la **tabla 5.7**.

**Tabla 5.7.** Parámetros fisicoquímicos y actividades de las estructuras sintetizadas.

Entrada	Compuestos	ASPT	LogP	PM	Volumen	IC <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i> ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> ( $\mu\text{M}$ )
1	IT-1	57,01	1,3	195,22	182,968	>100	>100
2	IT-2	30,71	2,82	213,28	209,847	>100	>100
3	IT-3	30,71	2,47	179,1	188,603	>100	>100
4	IT-4	30,71	3,46	207,2	222,207	>100	>100
5	IT-5	30,71	4,92	249,2	272,612	27	>100
6	IT-6	57,01	3,2	263,15	260,549	87	>100
7	IT-7	30,71	4,91	281,2	287,428	39	49
8	IT-8	30,71	4,5	247,38	266,184	44	44
9	IT-9	30,71	5,45	275,2	299,788	36	40
10	IT-10	30,71	6,92	317,52	350,193	34	16
11	IT-11	57,01	3,2	263,15	260,549	87	>100
12	IT-12	30,71	4,91	281,28	287,428	39	49
13	IT-13	30,71	4,5	247,39	266,184	31	72
14	IT-14	30,71	5,45	275,2	299,788	51	94
15	IT-15	30,71	6,92	317,52	350,193	27	57
16	IT-16	57,01	5,25	331,15	338,13	15	11
17	IT-17	30,71	6,95	349,28	365,01	32	49
18	IT-18	30,71	6,5	315,39	343,766	17	33
19	IT-19	30,71	7,5	343,2	377,369	18	11
20	IT-20	30,71	8,76	385,52	427,775	>100	52
21	IT-21	57,01	5,25	331,15	338,13	9	31
22	IT-22	30,71	6,95	349,28	365,01	34	48
23	IT-23	30,71	6,5	315,39	343,766	18	51
24	IT-24	30,71	7,5	343,2	377,369	29	44
25	IT-25	30,71	8,76	385,52	427,775	>100	36

ASPT: área de superficie polar total; LogP: hidrofobicidad de un compuesto, expresado como el logaritmo del coeficiente de reparto agua/octanol del compuesto.

Del análisis de la actividad *in vitro* de los compuestos en ambos parásitos se desprende que los que contienen prenilo en su estructura son inactivos a concentraciones menores a 100  $\mu\text{M}$  en ambos parásitos, a excepción de **IT-5** (Tabla 5.7, Entrada 5) en *T. cruzi*. Este compuesto tiene el mayor LogP y volumen de esta subfamilia. En un paneo general de toda la quimioteca se observa que un aumento de estos dos parámetros (hasta una determinada cota máxima) se refleja directamente en una mejora en el valor de la actividad.

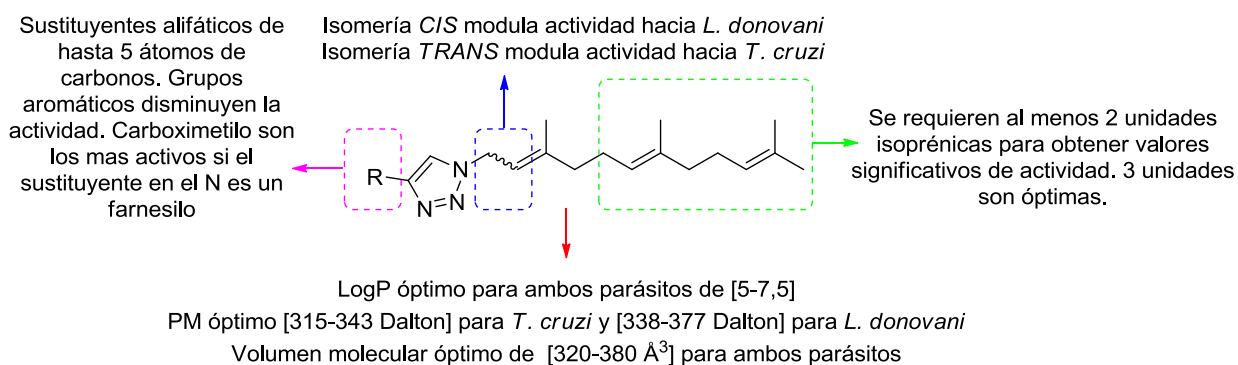
Los triazoles que contienen nerilos en sus estructuras (Tabla 5.7, Entrada 6 a 10) tienen valores moderados de IC<sub>50</sub> en ambos parásitos, a excepción del compuesto que contienen octilo (Tabla 5.7, Entrada 10) que tiene un valor de IC<sub>50</sub> de 16  $\mu\text{M}$ .

En cambio cuando el triazol está derivatizado con geranilo (**Tabla 5.7**, Entrada 11 a 15) y derivados sin funciones oxigenadas, prácticamente no hay diferencias en el orden de actividad (entre 34 y 44  $\mu\text{M}$ ). Globalmente, en triazoles que contienen monoterpenos, si hay presente grupos oxigenados, los compuestos pierden actividad en *T. cruzi* y en *L. donovani*.

Las últimas dos subfamilias son los compuestos que tienen, en su conjunto, las mejores actividades para ambos parásitos. Los compuestos **IT-16** (R=COOMe) e **IT-19** (R=pentilo) son los mejores candidatos como agentes leishmanicidas. A su vez estos compuestos tienen valores de peso molecular, LogP y volumen similares. En cambio, el mejor compuesto de toda la colección contra *T. cruzi* es **IT-21** que (*E,E*-farnesilo, R=COOMe) con un valor de  $IC_{50}$  de 9  $\mu\text{M}$ .

Los compuestos **IT-20** y **IT-25** son inactivos en *T. cruzi* a concentraciones menores a 100  $\mu\text{M}$  y moderadamente activos en *L. donovani*. Estas estructuras tienen los mayores valores de PM, volumen y LogP de toda la colección, sugiriendo que por encima de un umbral de valores (LogP>8,76; volumen>427  $\text{\AA}^3$  y PM>385 Da), estas estructuras comienzan a perder actividad.

En conclusión, los dos mejores compuestos contra *L. donovani* (**IT-16** e **IT-19**) y el mejor compuesto contra *T. cruzi* (**IT-21**) tienen parámetros fisicoquímicos acotados. El LogP de estas 3 estructuras se encuentran entre 5,25 y 7,50, los pesos moleculares entre 331 y 343 y el volumen entre 338 y 377  $\text{\AA}^3$ . La estereoquímica del doble enlace proximal al triazol modula la actividad diferencial hacia uno u otro parásito. Moléculas con volúmenes menores a 260  $\text{\AA}^3$  o mayores a 400  $\text{\AA}^3$  pierden actividad en ambos parásitos. En base a estos datos, podemos resumir el perfil mostrado por esta colección incluyendo, las propiedades fisicoquímicas y la actividad. (**Figura 5.37**).



**Figura 5.37.** Relación estructura/actividad de la colección de ITs.

## 5.7 ESTUDIOS DE LA QUIMIOTECA EN LA ENZIMA CYP51

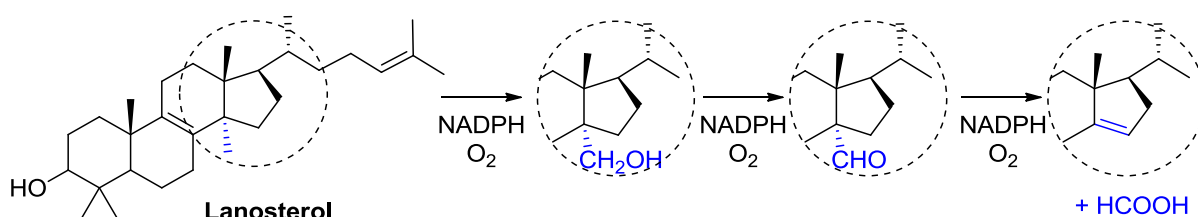


De las rutas metabólicas esenciales que involucran a isoprenos, dos son las que nos suscitan mayor interés. Por un lado, la farnesil pirofosfato sintasa, una enzima clave en la vía biosintética de isoprenoides y un blanco molecular privilegiado para el desarrollo de fármacos.<sup>[5.40]</sup> Por otro lado, la biosíntesis del ergosterol, en la que coexisten varios blancos enzimáticos claves para desarrollar inhibidores e involucra directamente a compuestos terpénicos. Sin embargo, son dos las dianas que sobresalen por encima del resto: la C14-demetilasa (blanco de acción de azoles antifúngicos)<sup>[5.41]</sup> y la C24-esterolmetiltransferasa (blanco de los azasteroles).<sup>[5.42]</sup> El carácter excepcional de estos blancos está fundamentado en la esencialidad que poseen en una gran variedad de organismos.

### 5.7.1 CYP51: ESTEROL 14 $\alpha$ -DEMÉTILASA

La citocromo P450 (CYP) es una superfamilia de proteínas compuestas por más de 281 familias con 2.500 miembros totales. Se conoce la función de una fracción de esa superfamilia, por ejemplo aquellas involucradas en la catálisis de la monooxidación de más de 10.000 compuestos orgánicos.<sup>[5.43, 5.44]</sup> Sin embargo, como contraste aún se desconocen las funciones de la mayor parte de la población de CYPs. En líneas generales se puede dividir funcionalmente a las P450 en dos grupos, el primero conformado por aquellas que metabolizan xenobióticos (fármacos, venenos, agroquímicos) y aquellas que participan en vías metabólicas claves (síntesis de hormonas esteroideas, biosíntesis de esterol, vitamina D, etc.). Mientras que el primer grupo está compuesto por enzimas promiscuas, capaces de unir una enorme variedad de sustratos posibles, el segundo grupo sólo cataliza reacciones regio y estereoespecíficas. Mutaciones en genes que codifican estas últimas enzimas producen individuos con enfermedades severas, llegando a ser mortales.<sup>[5.45]</sup>

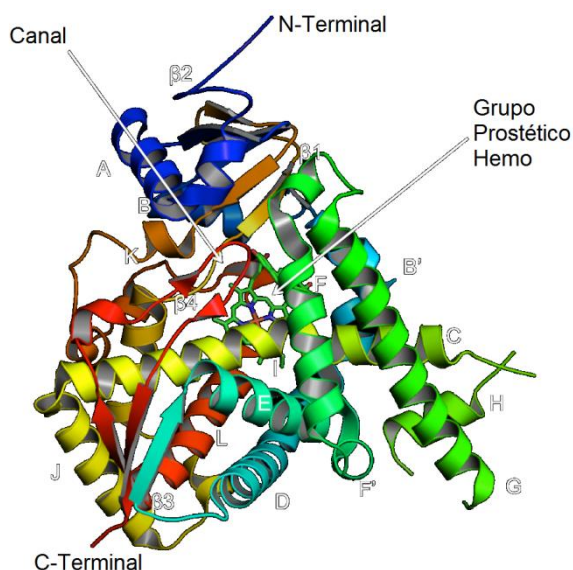
La esteroles 14 $\alpha$ -demetilasa (CYP51), descubierta en el año 1984 en *Sacharomyces cerevisiae*,<sup>[5.46]</sup> es la única familia de las P450 que está ampliamente distribuida en los diferentes reinos biológicos. Se encuentra en animales, plantas, hongos, levaduras, protozoos y bacterias<sup>[5.47]</sup> y se considera el más antiguo de los miembros de esta superfamilia.<sup>[5.48]</sup> En todos los casos la CYP51 cataliza una reacción de tres pasos para la demetilación en el C14 de un esteroles, cada paso requiere una molécula de oxígeno y NADPH. El grupo 14 $\alpha$ -metilo es convertido a alcohol en primera instancia, luego a aldehído y finalmente es removido como ácido fórmico en el último paso de reacción.



**Figura 5.38.** Mecanismo de acción de la CYP51 en *T. cruzi*. *T. brucei* utiliza obtusifoliol como sustrato.<sup>[5.49]</sup>

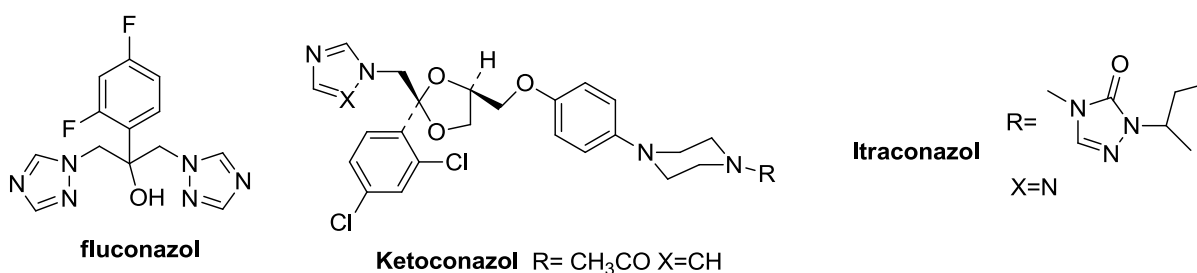
Esta familia se encuentra altamente conservada y la explicación de que exista un 22 a 33% de identidad de secuencia entre los genes de la CYP51 de los diferentes reinos es sólo posible si el mecanismo se ha conservado a través de cientos de millones de años en la familia de genes P450. Únicamente se conocen cuatro sustratos para la CYP51, por lo que estructuralmente es indispensable la presencia de un grupo hidroxilo en 3 $\beta$ , la posición 10 metilada, doble enlace en el en  $\Delta^{8-9}$  y dos diferentes arreglos en la cadena lateral. La esencialidad de esta enzima está ampliamente demostrada.<sup>[5.50]</sup>

Los tripanosomátidos son sensibles a los inhibidores de CYP51 ya que no pueden sobrevivir con el colesterol libre del huésped como única fuente. El bloqueo de esta enzima altera la estructura de varias organelas y disminuye el nivel de esteroides en el parásito. Además, la acumulación de esteroides 14 $\alpha$  metilados en tripanosomátidos produce efectos citotóxicos y citostáticos.<sup>[5.51]</sup>



**Figura 5.39.** Estructura tridimensional de la estero 14 $\alpha$ -demetilasa. Se observa el canal de acceso al sustrato y la ubicación del grupo prostético hemo.

En general los inhibidores de la CYP51 poseen en sus estructuras imidazoles o triazoles del tipo 1,2,4-triazol, como el fluconazol, el ketoconazol o el itraconazol (**Figura 5.40**). A pesar del grado de conocimiento que se ha alcanzado en el entendimiento de la actividad de estos compuestos en tripanosomátidos,<sup>[5.52, 5.53]</sup> no existe un correlato en su estudio con 1,2,3-triazoles.

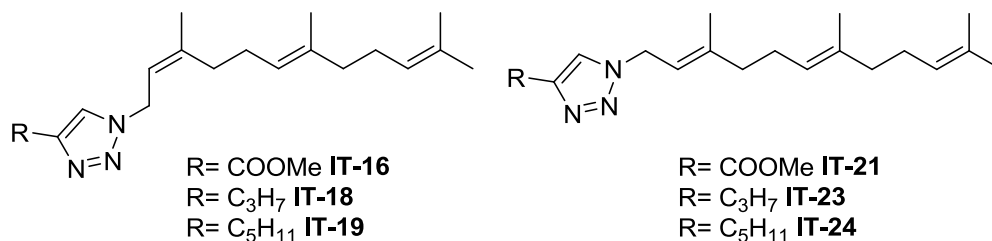


**Figura 5.40.** Inhibidores de la CYP51

Determinada la actividad biológica de toda la quimioteca en tripanosomátidos, el siguiente paso racional fue explorar un potencial mecanismo de acción de estos compuestos sobre el blanco CYP51.

Estos estudios fueron por una referente en el campo de las CYPs, la Prof. Dra. Galina I. Lepesheva del departamento de bioquímica de la Universidad de Vanderbilt (Estados Unidos). Se determinó la actividad inhibitoria de la estero demetilasa (CYP51-ERG11) de *T.*

*Cruzi* de los mejores análogos de la colección. Los compuestos seleccionados fueron el **IT-16**, **IT-18**, **IT-19**, **IT-21**, **IT-23** e **IT-24**, todos pertenecientes a la subfamilia de los derivados de triazolil N-sesquiterpenos.



**Figura 5.41.** Compuestos con las mejores actividades en tripanosomátidos.

La metodología utilizada involucra la expresión y purificación de la CYP51 de *T. cruzi* (TcCYP51) y el uso de la citocromo P450 reductasa como donante de electrones. La potencia inhibitoria de los compuestos se expresó como porcentaje de conversión de sustratos en presencia de los compuestos ensayados a concentración fija (100  $\mu$ M), a dos tiempos (5 minutos y 60 minutos). Los resultados se muestran en la **Tabla 5.8**.

**Tabla 5.8.** Comparación de la actividad antiparasitaria y la inhibición en la CYP51 de los compuestos más activos.

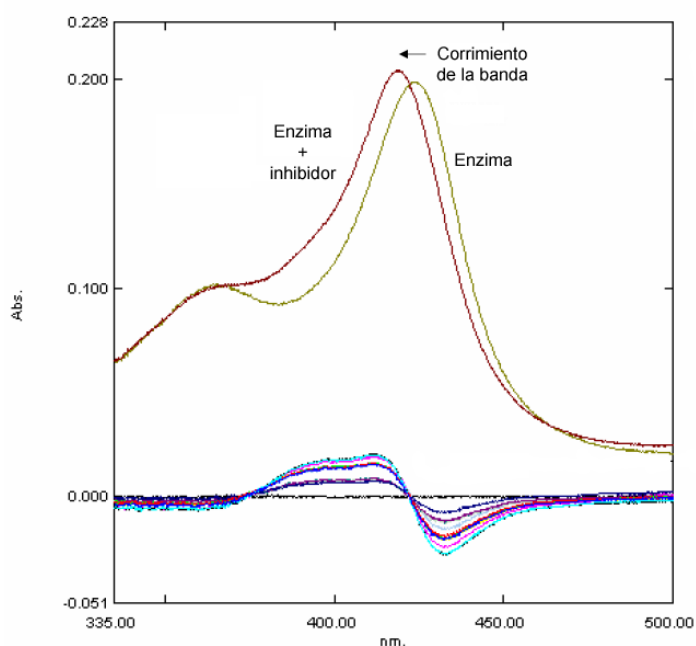
Id	Compuesto	Actividad antiparasitaria		Inhibición TcCYP51	
		IC <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i>	IC <sub>50</sub> <i>L. donovani</i>	5 minutos	60 minutos
1	<b>IT-16</b>	15 $\mu$ M	11 $\mu$ M	26%	59%
2	<b>IT-21</b>	9 $\mu$ M	31 $\mu$ M	35%	63%
3	<b>IT-18</b>	17 $\mu$ M	33 $\mu$ M	14%	49%
4	<b>IT-23</b>	18 $\mu$ M	51 $\mu$ M	27%	56%
5	<b>IT-19</b>	18 $\mu$ M	11 $\mu$ M	7%	39%
6	<b>IT-24</b>	29 $\mu$ M	44 $\mu$ M	9%	33%

Como puede observarse, uno de los compuestos más activos en tripanosomátidos (compuesto **IT-19**, entrada 5 de la **Tabla 5.8**) es que el presenta mayor potencia inhibitoria. Si bien, aunque la concentración de ensayo es elevada, la inhibición es persistente en el tiempo. Queda claro entonces que, si bien existiría una contribución en su actividad

antiparasitaria por inhibición de esta enzima, estos compuestos poseerían además otro mecanismo de acción alternativo.

Habiendo demostrado la acción inhibitoria del compuesto, queda por elucidar el modo de acción de los compuestos de estas entidades químicas novedosas sobre la TcCYP51. Estos estudios son posibles debido a que la CYP51 pertenece a la familia de las citocromos P450 y tienen la propiedad de producir un cambio en la banda Soret de absorbancia máxima cuando hay un cambio en el ligando.<sup>[5.54]</sup> La banda de Soret surge principalmente por un movimiento de dipolo de electrones que permite una transición  $\pi-\pi^*$  y es característicos de algunas familias de compuestos. Por ejemplo las citocromos P450 exhiben una banda Soret a 450 nm en su forma reducida cuando es saturada con monóxido de carbono. La interacción entre un sustrato con la CYP51 produce un desplazamiento hacia el rojo o hacia el azul del máximo de la banda Soret. Este desplazamiento está íntimamente relacionado con el modo de unión sustrato-enzima y se diferencia en dos tipos. Un desplazamiento hacia el azul en el máximo de esta banda (de 417 a 394 nm) es causado por la expulsión de una molécula de agua de la esfera de coordinación del hierro presente en el grupo hemo. Esta respuesta espectral (tipo 1) refleja la transición del hierro desde el estado de bajo espín hexa-coordinado con el estado de alto espín penta-coordinado. Por otro lado, la coordinación directa de un átomo básico (por ejemplo, nitrógenos alifáticos o aromáticos) al hierro hemo provoca un desplazamiento hacia el rojo en la banda de Soret (a valores de 426-429 nm) se denomina respuesta tipo 2. El modo de acción del tipo 2 es característico de los azoles.

Interesantemente los compuestos de esta colección producen un desplazamiento de las bandas Soret del grupo hemo de la enzima que reveló que el modo de unión de estos compuestos a la misma no se correlaciona con el observado con los azoles antifúngicos (Tipo 2), presentando una unión Tipo 1 modificada (**Figura 5.42**).



**Figura 5.42.** Estudios espectroscópicos del modo de unión de los compuestos a la CYP51.

Un análisis de la estructura cristalográfica de la CYP51 con su sustrato <sup>[5.55]</sup> permite visualizar que el sustrato tiene tres regiones diferenciales: un brazo hidrofóbico (motivo isoprenílico) que está sumergido en la porción más profunda de una cavidad hidrofóbica única, característica de la familia de la CYP51. Esta cavidad profunda para la unión al sustrato permite que la enzima interaccione eficientemente con el sustrato y lo ubique correctamente en el sitio activo. La fracción esteroide, cuyo átomo de oxígeno se ubica en una porción cercana al canal de entrada al sustrato y a 3,5 Å de la metionina 358, con la que coordina por medio de un puente hidrógeno. Por último la región catalítica, ubicada perpendicularmente a 4,5 Å del hierro del grupo hemo y coordinada a la leucina 356 y la tirosina 295 de la enzima. En un intento de comprender el mecanismo inhibitorio, se sugiere que la contribución de la actividad del compuesto **IT-19** en la CYP51 se podría proporcionar por la interacción del motivo isoprenoide con la cavidad hidrofóbica profunda de la enzima.

## 5.8 BIBLIOGRAFÍA

- 5.1. Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., Bolognesi, D., Barry, D. W. and Broder, S. (1985). "3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **82**(20): 7096-7100.
- 5.2. Brase, S., Gil, C., Knepper, K. and Zimmermann, V. (2005). "Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds." Angewandte Chemie **44**(33): 5188-5240.
- 5.3. Yempala, T., Sridevi, J. P., Yogeewari, P., Sriram, D. and Kantevari, S. (2014). "Rational design and synthesis of novel dibenzo[b,d]furan-1,2,3-triazole conjugates as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis." European journal of medicinal chemistry **71**: 160-167.
- 5.4. Porta, E. O., Carvalho, P. B., Avery, M. A., Tekwani, B. L. and Labadie, G. R. (2014). "Click chemistry decoration of amino sterols as promising strategy to developed new leishmanicidal drugs." Steroids **79**: 28-36.
- 5.5. Tornøe, C. W., Christensen, C. and Meldal, M. (2002). "Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides." The Journal of organic chemistry **67**(9): 3057-3064.
- 5.6. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. and Sharpless, K. B. (2002). "A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes." Angewandte Chemie **41**(14): 2596-2599.
- 5.7. Sletten, E. M. and Bertozzi, C. R. (2009). "Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality." Angewandte Chemie **48**(38): 6974-6998.
- 5.8. Gagneux, A., Winstein, S. and Young, W. G. (1960). "REARRANGEMENT OF ALLYLIC AZIDES." Journal of the American Chemical Society **82**(22): 5956-5957.
- 5.9. VanderWerf, C. A. and Heasley, V. L. (1966). "Studies on the Preparation and Rearrangements of Allylic Azides.1." The Journal of organic chemistry **31**(11): 3534-3537.
- 5.10. Trost, B. M. and Pulley, S. R. (1995). "On the flexibility of allylic azides as synthetic intermediates." Tetrahedron Letters **36**(48): 8737-8740.
- 5.11. Jabbari, A. (2010). "Transition States and Activation Barriers for [3,3]-Sigmatropic Shift of Allyl Azides" Org. Chem. J. **1**(1): 8.
- 5.12. Jayanthi, A., Gumaste, V. K. and Deshmukh, A. R. A. S. (2004). "A Simple One-Pot Method for the Preparation of Allyl Azides from Allyl Alcohols Using Triphosgene: Synthesis of N1-Cinnamyl Azetidion-2-ones." Synlett **2004**(06): 979-982.
- 5.13. Kanai, T., Kanagawa, Y. and Ishii, Y. (1990). "Hydrogen iodide strategy for one-pot preparation of allylic azides, nitriles, and phenyl sulfones from allylic alcohols." The Journal of organic chemistry **55**(10): 3274-3277.
- 5.14. Arimoto, M., Yamaguchi, H., Fujita, E., Ochiai, M. and Nagao, Y. (1987). "Iodosylbenzene-trimethylsilyl azide-boron trifluoride etherate: A highly efficient system for direct synthesis of allyl azides from allylsilanes." Tetrahedron Letters **28**(50): 6289-6292.
- 5.15. Murahashi, S., Taniguchi, Y., Imada, Y. and Tanigawa, Y. (1989). "Palladium(0)-catalyzed azidation of allyl esters. Selective synthesis of allyl azides, primary allylamines, and related compounds." The Journal of organic chemistry **54**(14): 3292-3303.
- 5.16. Alvarez-Manzaneda, E. J., Chahboun, R., Cabrera Torres, E., Alvarez, E., Alvarez-Manzaneda, R., Haidour, A. and Ramos López, J. M. (2005). "Reaction of allylic and benzylic alcohols and esters with PPh<sub>3</sub>/I<sub>2</sub>: one-pot synthesis of  $\beta,\gamma$ -unsaturated compounds." Tetrahedron Letters **46**(21): 3755-3759.
- 5.17. Uozumi, Y., Suzuka, T., Kawade, R. and Takenaka, H. (2006). " $\pi$ -Allylic Azidation in Water with an Amphiphilic Resin-Supported Palladium-Phosphine Complex." Synlett **2006**(13): 2109-2113.
- 5.18. Papeo, G., Posterl, H., Vianello, P. and Varasi, M. (2004). "Nicotinoyl Azide (NCA)-Mediated Mitsunobu Reaction: An Expedient One-Pot Transformation of Alcohols into Azides." Synthesis **2004**(17): 2886-2892.

- 5.19. Mizuno, M., Shioiri, T. and Mizuno, M. (1997). "Efficient method for the one-pot azidation of alcohols using bis(p-nitrophenyl) phosphorazidate." *Chemical communications*(22): 2165-2166.
- 5.20. Srinu, G. and Srihari, P. (2013). "A catalytic approach for the synthesis of allylic azides from aryl vinyl carbinols." *Tetrahedron Letters* **54**(19): 2382-2385.
- 5.21. Rueping, M., Vila, C. and Uria, U. (2012). "Direct Catalytic Azidation of Allylic Alcohols." *Organic letters* **14**(3): 768-771.
- 5.22. Thompson, A. S., Humphrey, G. R., DeMarco, A. M., Mathre, D. J. and Grabowski, E. J. J. (1993). "Direct conversion of activated alcohols to azides using diphenyl phosphorazidate. A practical alternative to Mitsunobu conditions." *The Journal of organic chemistry* **58**(22): 5886-5888.
- 5.23. Gaussian 09, R. D., Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, M. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- 5.24. Becke, A. D. (1993). "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange." *The Journal of chemical physics* **98**(7): 5648-5652.
- 5.25. Lee, C. a. Y., Weitao and Parr, Robert (1988). "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density." *Phys. Rev. B* **37**(2): 5.
- 5.26. Warren J. Hehre, L. R., P. von R. Schleyer, John Pople (1986). "AB INITIO Molecular Orbital Theory." 576.
- 5.27. Chen, F. F. and Wang, F. (2009). "Electronic structure of the azide group in 3 cent-azido-3 cent-deoxythymidine (AZT) compared to small azide compounds." *Molecules* **14**(7): 2656-2668.
- 5.28. Zeng, D., Zeglis, B. M., Lewis, J. S. and Anderson, C. J. (2013). "The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals." *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **54**(6): 829-832.
- 5.29. Kolb, H. C. and Sharpless, K. B. (2003). "The growing impact of click chemistry on drug discovery." *Drug discovery today* **8**(24): 1128-1137.
- 5.30. Huisgen, R. (1984). "1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry." Ed. Padwa: 76.
- 5.31. Kolb, H. C., Finn, M. G. and Sharpless, K. B. (2001). "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions." *Angewandte Chemie* **40**(11): 2004-2021.
- 5.32. Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J. and Bertozzi, C. R. (2008). "Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry." *Journal of the American Chemical Society* **130**(34): 11486-11493.
- 5.33. Wang, C. F., Makila, E. M., Kaasalainen, M. H., Liu, D., Sarparanta, M. P., Airaksinen, A. J., Salonen, J. J., Hirvonen, J. T. and Santos, H. A. (2014). "Copper-free azide-alkyne cycloaddition of targeting peptides to porous silicon nanoparticles for intracellular drug uptake." *Biomaterials* **35**(4): 1257-1266.
- 5.34. Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V. V., Noodleman, L., Sharpless, K. B. and Fokin, V. V. (2005). "Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates." *Journal of the American Chemical Society* **127**(1): 210-216.
- 5.35. Meldal, M. and Tornøe, C. W. (2008). "Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition." *Chemical reviews* **108**(8): 2952-3015.
- 5.36. Feldman, A. K., Colasson, B., Sharpless, K. B. and Fokin, V. V. (2005). "The allylic azide rearrangement: achieving selectivity." *Journal of the American Chemical Society* **127**(39): 13444-13445.

- 5.37. Hamadouche, M., Gaudel-Siri, A., Pons, J. M. and Abed, D. E. (2010). "Relative stability of a series of 1,2,3-triazolines. Theoretical study of substituent effects." Journal of Molecular Structure: THEOCHEM **956**(1-3): 33-37.
- 5.38. Porta, E. (2010). "Síntesis y determinación de actividades de azaesteroides como agentes antiparasitarios." Tesis.
- 5.39. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J. (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Advanced drug delivery reviews **46**(1-3): 3-26.
- 5.40. Dhar, M. K., Koul, A. and Kaul, S. (2013). "Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development." New biotechnology **30**(2): 114-123.
- 5.41. Buckner, F. S. and Urbina, J. A. (2012). "Recent Developments in Sterol 14-demethylase Inhibitors for Chagas Disease." International journal for parasitology. Drugs and drug resistance **2**: 236-242.
- 5.42. Urbina, J. A., Vivas, J., Lazard, K., Molina, J., Payares, G., Piras, M. M. and Piras, R. (1996). "Antiproliferative effects of delta 24(25) sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies." Chemotherapy **42**(4): 294-307.
- 5.43. Danielson, P. B. (2002). "The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans." Current drug metabolism **3**(6): 561-597.
- 5.44. Newcomb, M., Hollenberg, P. F. and Coon, M. J. (2003). "Multiple mechanisms and multiple oxidants in P450-catalyzed hydroxylations." Archives of biochemistry and biophysics **409**(1): 72-79.
- 5.45. Guengerich, F. P. (1997). "Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species." Chemico-biological interactions **106**(3): 161-182.
- 5.46. Yoshida, Y. and Aoyama, Y. (1984). "Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 alpha-demethylation. I. Purification and spectral properties." The Journal of biological chemistry **259**(3): 1655-1660.
- 5.47. Yoshida, Y., Aoyama, Y., Noshiro, M. and Gotoh, O. (2000). "Sterol 14-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily." Biochemical and biophysical research communications **273**(3): 799-804.
- 5.48. Nelson, D. R. (1999). "Cytochrome P450 and the individuality of species." Archives of biochemistry and biophysics **369**(1): 1-10.
- 5.49. Lipesheva, G. I., Nes, W. D., Zhou, W., Hill, G. C. and Waterman, M. R. (2004). "CYP51 from *Trypanosoma brucei* is obtusifoliol-specific." Biochemistry **43**(33): 10789-10799.
- 5.50. Lipesheva, G. I. and Waterman, M. R. (2004). "CYP51--the omnipotent P450." Molecular and cellular endocrinology **215**(1-2): 165-170.
- 5.51. de Souza, W. and Rodrigues, J. C. (2009). "Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs." Interdisciplinary perspectives on infectious diseases **2009**: 642502.
- 5.52. Chen, C. K., Leung, S. S., Guilbert, C., Jacobson, M. P., McKerrow, J. H. and Podust, L. M. (2010). "Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole." PLoS neglected tropical diseases **4**(4): e651.
- 5.53. Doyle, P. S., Chen, C. K., Johnston, J. B., Hopkins, S. D., Leung, S. S., Jacobson, M. P., Engel, J. C., McKerrow, J. H. and Podust, L. M. (2010). "A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection." Antimicrobial agents and chemotherapy **54**(6): 2480-2488.
- 5.54. Lipesheva, G. I., Hargrove, T. Y., Kleshchenko, Y., Nes, W. D., Villalta, F. and Waterman, M. R. (2008). "CYP51: A major drug target in the cytochrome P450 superfamily." Lipids **43**(12): 1117-1125.
- 5.55. Hargrove, T. Y., Wawrzak, Z., Liu, J., Waterman, M. R., Nes, W. D. and Lipesheva, G. I. (2012). "Structural complex of sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) with 14 $\alpha$ -methylenecyclopropyl- $\Delta^7$ -24, 25-dihydrolanosterol." Journal of Lipid Research **53**(2): 311-320.

## CAPÍTULO 6

# FENOLAS O-ISOPRENILADAS

# 2015



*En la actualidad, la interrelación entre la química y la biología marca nuevas direcciones para enfocar investigaciones científicas fascinantes. Prueba evidente de la enorme relación entre la química y la biología es el hecho que alrededor del 40% de los premios Nobel en Química concedidos en los últimos 60 años son a estudios en temas biológicos, en especial bioquímicos.*



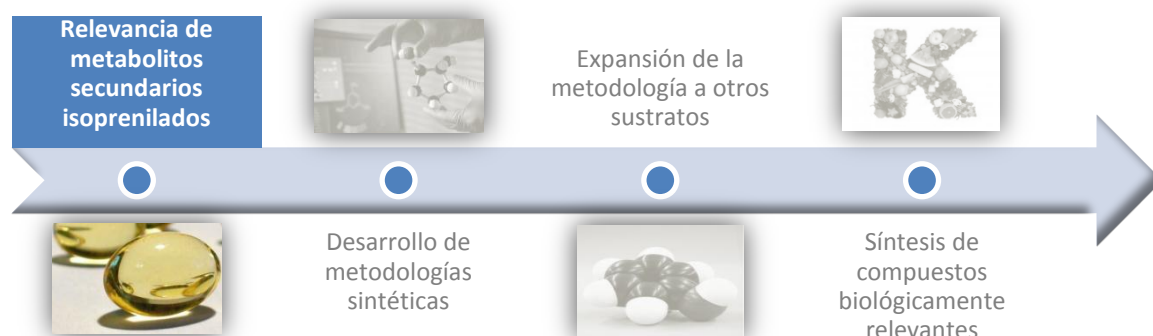
## 6. REACCIONES DE ISOPRENILACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS COMO VÍA DE GENERACIÓN DE PRODUCTOS SINTÉTICOS CON ALTO VALOR BIOLÓGICO.

Las moléculas orgánicas pequeñas pueden ser una poderosa herramienta para estudiar sistemas biológicos. Estas moléculas pueden actuar como principios activos o como sondas para ayudar a elucidar la regulación de procesos biológicos.

En el vasto universo del metaboloma, los metabolitos isoprenilados cumplen roles esenciales y estratégicos, sin embargo, su utilización como herramienta quimiogenómica no se encuentra extendida debido a que la preparación de este tipo de compuestos siempre constituyen un desafío sintético. Estas razones han sido la fuerza motriz para afrontar este desafío, en donde la recompensa se verá reflejada en el desarrollo de nuevas metodologías para preparar compuestos de gran relevancia biológica como vitaminas liposolubles, coenzimas claves o estructuras bioactivas contra dolencias generadas por microorganismos patógenos.

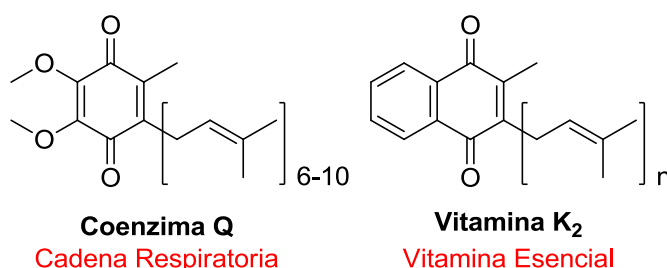


### 6.1 RELEVANCIA BIOLÓGICA DE FENOLES ISOPRENILADOS.



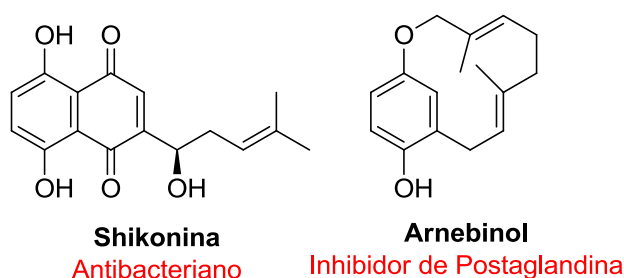
Los fenoles isoprenilados (y las quinonas derivadas de éstos) representan una importante subclase de productos naturales sintéticamente versátiles. Algunos miembros de

esta familia juegan un papel importante en la mediación de diversos procesos biológicos claves, entre los que se pueden mencionar el complejo ubiquinona-ubiquinol (conocido como coenzima Q) pieza clave en los procesos de respiración celular<sup>[6.1]</sup> o el complejo de vitaminas A, D, E y K; un grupo de vitaminas liposolubles esenciales para el ser humano. (Figura 1)



**Figura 6.1.** Estructuras de la Coenzima Q y de la Vitamina K.

Asimismo, compuestos con este motivo estructural presentan actividades biológicas promisorias, por ejemplo naftoquinonas isopreniladas como la shikonina (Figura 2) son agentes antibacterianos muy potentes.<sup>[6.2]</sup> El Arnebinol, un fenol orto-isoprenilado, inhibe la biosíntesis de prostaglandinas.<sup>[6.3]</sup> Han sido reportado también fenoles isoprenilados que exhiben actividad antifúngica,<sup>[6.4]</sup> antitumoral,<sup>[6.5]</sup> anti-HIV<sup>[6.6]</sup>, antioxidantes<sup>[6.7]</sup> y anti-Alzheimer;<sup>[6.8, 6.9]</sup> y dimetil-benzopiranos isoprenilados que exhiben una gama aún más amplia de actividades.<sup>[6.10]</sup>



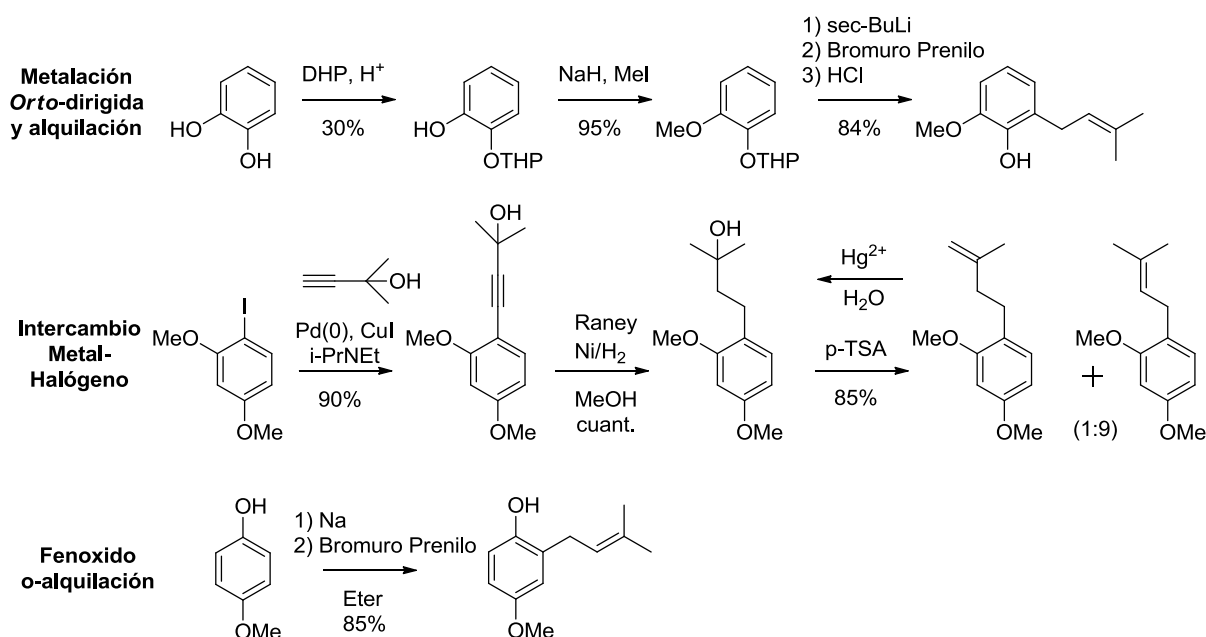
**Figura 6.2.** Estructuras de la Shikonina y del Arnebinol

Una búsqueda exhaustiva en ChemNetBase®,<sup>[6.11]</sup> una base de datos *online* de libre acceso que nuclea un extenso número de estructuras reportadas, indica que un 2,05% de los productos naturales hallados contienen el motivo *orto* isoprenil fenol. Sin embargo, este porcentaje disminuye a 0,55% cuando la búsqueda subestructural se realiza sobre fármacos

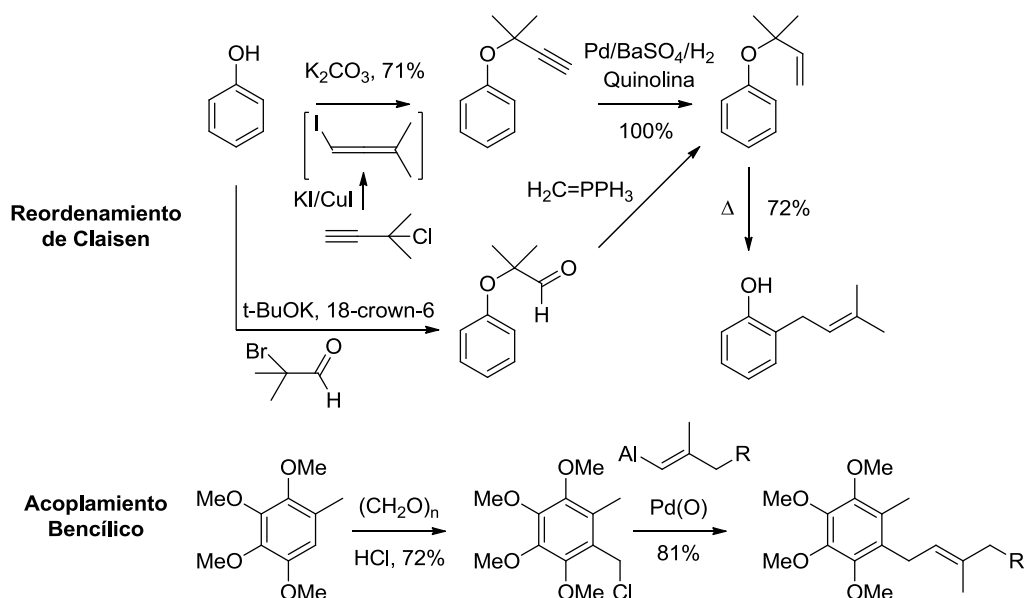
reportados. Esta merma se debe en parte a las bajas concentraciones con las que se extraen estos compuestos de las fuentes naturales, a la dificultad sintética para su preparación (menos del 0,15% de todos los compuestos sintetizados involucran estas estructuras) y que muchos de estos *hits* no han avanzado en su desarrollo como fármacos.

Si bien por lo expuesto y lo reportado por distintos autores,<sup>[6.12]</sup> este importante motivo estructural podría clasificarse como una estructura privilegiada; la síntesis de fenoles *orto*-isoprenilados no ha sido ampliamente estudiada. Esta situación es aún más compleja para sistemas en los que otros grupos hidroxilos coexisten en el anillo aromático, como sucede a menudo en productos naturales que contienen este motivo estructural. En ese contexto, modular reacciones que permitan diferenciar entre grupos funcionales presentes en el sistema aromático no es trivial debido a que poseen entornos estructurales y electrónicos similares. Una posible solución a este problema consiste en desimetrizar químicamente la molécula protegiendo uno de los motivos hidroxilo con un grupo protector. Ejemplos exitosos de metodologías de desimetrización incluyen las realizadas sobre dioles meso, usando catalizadores quirales<sup>[6.13]</sup> o enzimas dando lugar a productos quirales.<sup>[6.14]</sup>

Existen diversas estrategias para preparar fenoles *o*-isoprenilados. Entre las más destacadas se pueden mencionar: el acoplamiento bencílico,<sup>[6.15]</sup> el reordenamiento de Claisen,<sup>[6.16]</sup> el intercambio halógeno-metal y el acoplamiento mediado por metales,<sup>[6.17]</sup> sólo por nombrar algunos ejemplos (**Esquema 6.1**).



(Continúa en la siguiente página)



**Esquema 6.1.** Estrategias sintéticas para preparar Fenoles *Orto*-isoprenilados.

## 6.2 SÍNTESIS DE FENOLES *ORTO*-ISOPRENILADOS (FOI).

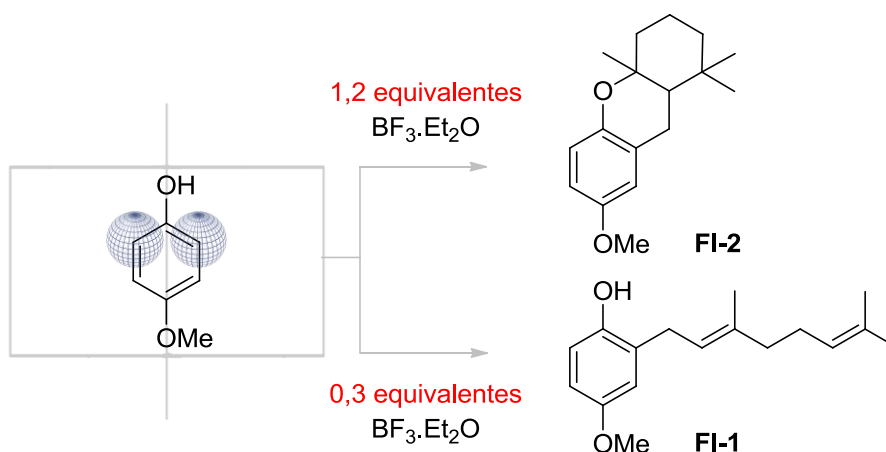


### 6.2.1 REACCIÓN DE FRIEDEL-CRAFTS COMO HERRAMIENTA PARA GENERAR FOIS.

En nuestro grupo de trabajo hemos optimizado la síntesis fenoles isoprenilados utilizando una alquilación de Friedel-Crafts<sup>[6.18]</sup> entre fenoles y alcoholes isoprenílicos en presencia de un ácido de Lewis como catalizador. Las condiciones desarrolladas, en consonancia con las reportadas por Ishibashi, utilizan borotrifluoreterato ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) como ácido de Lewis.<sup>[6.19]</sup> Esta reacción puede generar el producto de alquilación o mediante una cascada de ciclación  $\pi$ -catiónica, el producto policíclico. Este último cursa un mecanismo análogo a las de las ciclasas terpénicas que utilizan isoprenil difosfatos para dar los terpenos cíclicos. Previamente se estudiaron las condiciones de alquilación, encontrándose que la cantidad de equivalentes del catalizador y de isopreno utilizados permitía modular el curso

de la reacción hacia la preparación preferencial del compuesto alquilado o hacia el producto cíclico.<sup>[6,20]</sup> Tratándose de una sustitución electrofílica aromática ( $S_EAr$ ), la naturaleza del anillo aromático es un factor clave para el diseño de la estrategia sintética. La presencia del grupo oxhidrilo es indispensable por su doble rol, de fuerte activador del anillo aromático y de director *orto*, indispensable para obtener los productos de interés (FOI). En segundo plano, es necesario analizar los parámetros de simetría, los patrones de sustitución y la naturaleza de los sustituyentes para poder predecir el grado de alquilación y la regioquímica de los productos. En este contexto, el sustrato fenólico modelo seleccionado fue el p-metoxifenol, conocido como mequinol, el ingrediente activo en preparados de uso tópico para la despigmentización de la piel. Por lo tanto, no sólo se parte de un ingrediente activo de amplio uso medicinal, sino también una estructura simétrica que permite disminuir los grados de libertad de las variables en estudiar. Adicionalmente este compuesto es más estable comparada con la correspondiente hidroquinona, sin perder por esto la accesibilidad sintética para formar su quinona correspondiente.

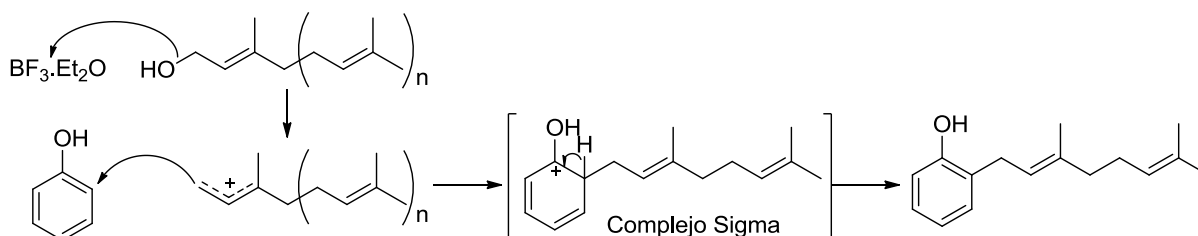
En líneas globales, el estudio y la optimización de la reacción de alquilación y de ciclación se realizaron previamente con el p-metoxifenol como fenol modelo y geraniol como alquilante. Los resultados encontrados mostraron que cuando se usaban 1,1 equivalentes de fenol, 1 equivalente de geraniol y cantidades variables de  $BF_3 \cdot Et_2O$  (de 0,3 a 1,2 equivalentes) en tolueno a 4 °C se obtenían los productos alquilados y policiclados en distinta proporción. Esto permitió determinar que, de acuerdo a la cantidad de equivalentes de  $BF_3 \cdot Et_2O$  utilizado, era posible modular la reacción para obtener el producto de alquilación (**FI-1**) o el producto de ciclación (**FI-2**, **Esquema 6.2**).



**Esquema 6.2.** Preparación de fenoles isoprenilados o cromanos en condiciones de Friedel-Crafts catalizadas por ácidos de Lewis.

Mecanísticamente, la reacción comienza con la formación de la especie electrofílica, el carbocatión alílico. Este carbocatión se genera por la deshidratación del alcohol isoprenílico conducida por el borotrifluoreterato (**Esquema 6.3**). A continuación, la reacción entre el carbocatión generado con los electrones  $\pi$  del sistema aromático dirige a un intermediario carbocatiónico denominado complejo sigma que, en último término, pierde el protón y se convierte en el producto final. Dada las características de la reacción, existe la posibilidad de que se genere un carbocatión terciario termodinámicamente más estable por medio de la transposición de un hidrógeno (reordenamiento del carbocatión). Si la temperatura se mantiene baja, la reacción se desarrolla bajo control cinético y el producto mayoritario se obtiene por reacción de la especie carbocatiónica primaria. Por el contrario, temperaturas más altas favorecen la formación del carbocatión terciario.

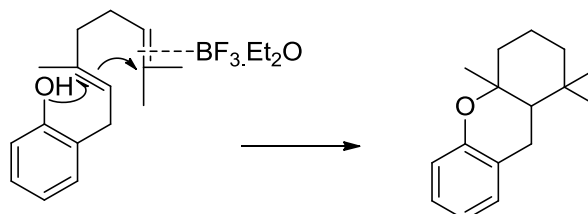
Otro factor clave es mantener estrictamente el regiocontrol de esta reacción para evitar la formación de productos polialquilados. El hecho de que los grupos alquilos activen el anillo aromático ante una sustitución electrofílica aromática produce que la especie monoalquilada sea más reactiva que el propio fenol de partida. En nuestro caso el regiocontrol se logró manteniendo la relación del isoprenol por debajo de un equivalente, en comparación con el fenol de partida.



**Esquema 6.3.** Mecanismo de reacción de la C-*orto*-isoprenilación del fenol.

En cuanto a los productos de ciclación, existen distintos antecedentes en la literatura en donde la reacción de alquilación produce cantidades significativas del cromano.<sup>[6.21]</sup> Esta reacción secundaria se ve desfavorecida cuando se usan ácidos de Lewis como el borotrifluoreterato en lugar de ácidos próticos, en particular cuando no se exceden las cantidades catalíticas. En estas condiciones se evita la formación del aducto de un protón y enlace  $\pi$  del alqueno y posterior ataque intramolecular del grupo hidroxilo al correspondiente carbocatión terciario. En cambio, cuando se emplean más de un

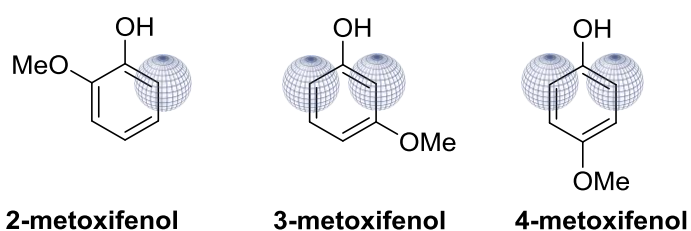
equivalente de ácido de Lewis se producen ciclaciones que son gobernadas por la coordinación del  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  con los electrones  $\pi$  y el posterior ataque intramolecular de los centros nucleofílicos presentes en la molécula (oxhidrilo y electrones  $\pi$  olefínicos).



**Esquema 6.4.** Mecanismo de reacción de la ciclación  $\pi$ -catiónica.

### 6.2.2 SINTESIS DE FENOLES ISOPRENILADOS A PARTIR DE METOXIFENOLES

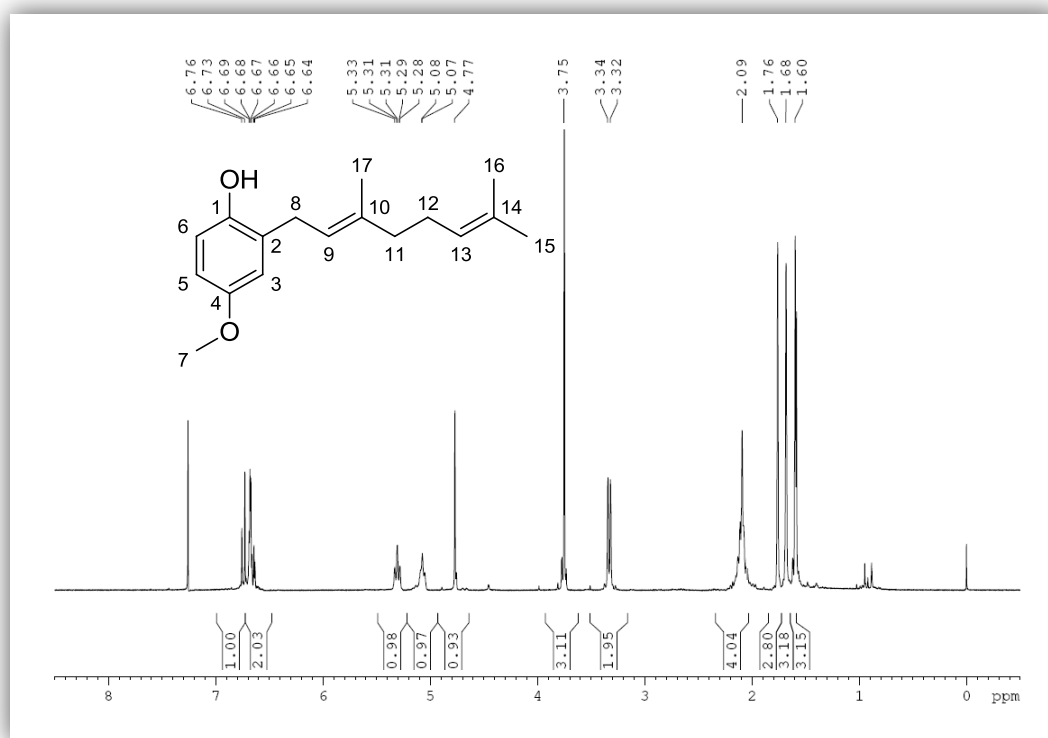
En vista de la relevancia de los fenoles isoprenilados comentados en la sección anterior resultaba imperioso un estudio más exhaustivo para posicionar esta metodología como una herramienta aplicable en química medicinal. Se buscó entonces, estudiar la aplicación de esta reacción a nuevos sustratos, comenzado por los distintos isómeros de los metoxi-fenoles. (**Figura 6.1**) El objetivo perseguido fue generar una colección de productos y estudiar sus propiedades biológicas para encontrar nuevas entidades químicas orientadas principalmente hacia enfermedades desatendidas.



**Figura 6.1.** Isómeros de metoxifenol. En azul, las posiciones con potencialidad de ser isopreniladas.

En primer lugar se volvieron a realizar las reacciones de ciclación y alquilación del 4-metoxifenol con geraniol con el propósito de generar material para los ensayos biológicos (**Esquema 6.1**). Siguiendo el procedimiento optimizado se obtuvieron el producto de alquilación **FI-1** y de ciclación **FI-2** con 45 % y 52 % de rendimiento, respectivamente. Los productos fueron completamente caracterizados con fines comparativos. Como se puede observar en la **Figura 6.2**, **FI-1** presenta en su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  singletes a 1,60 ppm

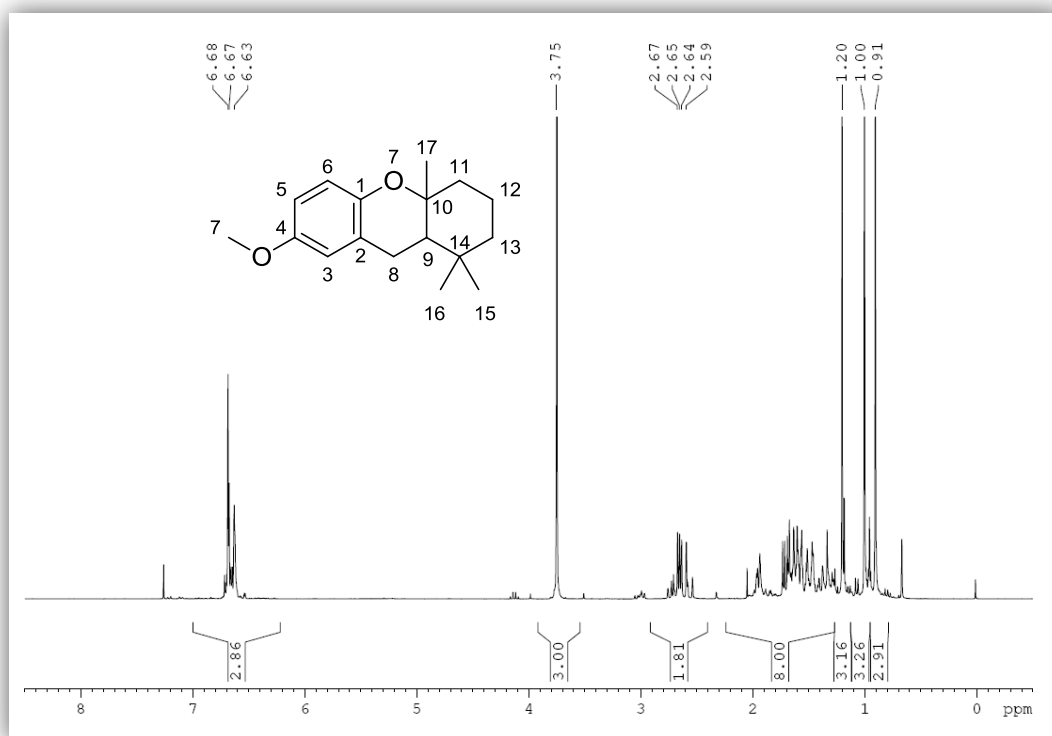
(C16), 1,68 ppm (C15) y 1,76 ppm (C17) asignables a los grupos metilos de la cadena del geraniol. A su vez, posee un multiplete en 2,09 ppm que integra para 4 protones que pertenece a los metilenos alílicos de C11 y C12 de la porción isoprénica distal al anillo aromático y doblete en 3,33 ppm correspondiente al metileno alfa al anillo aromático. Por otro lado, un singlete que integra para tres protones en 3,75 ppm pertenece al grupo metoxilo y el de 4,77 ppm al protón del fenol. Se observan además dos triplete en 5,08 ppm y 5,31 ppm, característicos de los protones olefínicos del geraniol. Por último, un doblete en 6,74 ppm con una constante de acoplamiento  $J = 8,5$  Hz corresponde al protón aromático en posición *orto* (C6). El doblete en 6,69 ppm con una  $J = 2,6$  Hz es asignable a C3-H, ese valor bajo de acoplamiento indica interacciones a larga distancia entre protones (acoplamiento  $^4J$  entre el C3-H y el C5-H) y por último el sistema de doblete de dobletes a 6,65 ppm con un  $^3J = 8,5$  Hz y  $^4J = 2,5$  Hz asignable al protón aromático en C5.



**Figura 6.2.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto FI-1.

Por otro lado, en la **Figura 6.3** se observa el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del cromano FI-2, que presenta señales que inequívocamente permiten determinar su estructura. Las principales diferencias entre los dos productos es la desaparición de las señales asignables a protones olefínicos y la señal del protón del grupo fenol. En la zona de protones aromáticos,

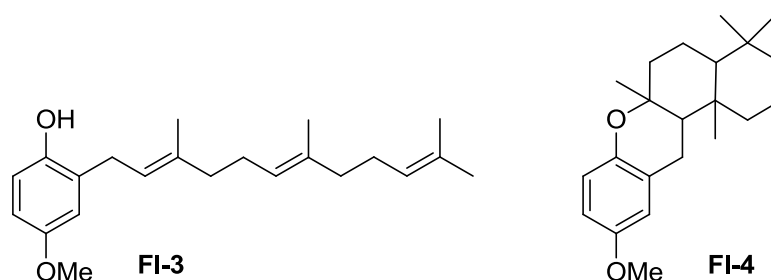
debido al cambio en el entorno químico, hubo desplazamientos en las señales. Por ejemplo el doblete asignable a C6-H que en el producto alquilado se ubicaba a 6,74 ppm, migró a 6,70 ppm en el producto ciclado. El multiplete a 6,64 ppm corresponde a C5-H y el doblete en 6,69 ppm se puede asignar a C3-H. Por otro lado, el singlete del grupo metoxilo se mantiene en 3,75 ppm y se observa un multiplete en 2,65 ppm correspondiente al metileno C8-H del anillo central. En la zona de 2,00-1,20 ppm aparecen las señales de todos los metilenos que conforman los ciclos B y C. El singlete en 1,20 corresponde al metilo C17. Por último, los singletes en 1,00 ppm y 0,91 ppm corresponden a los metilos C15 y C16, siendo intercambiables.



**Figura 6.3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **FI-2**.

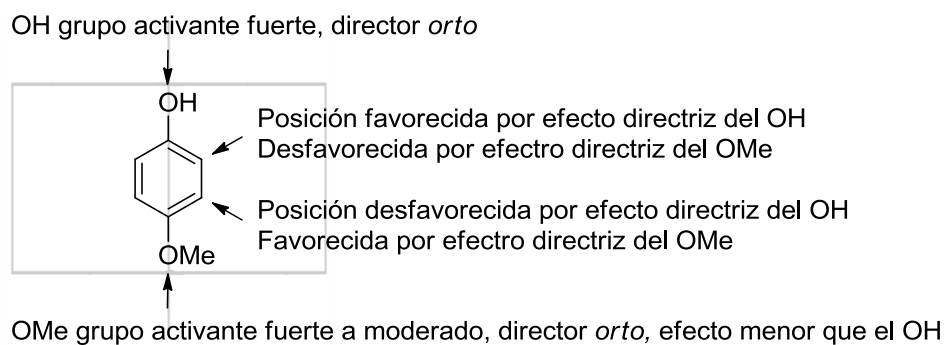
El paso siguiente fue realizar la reacción permutando el geraniol por farnesol. Como era de esperar, las reacciones proveen en los mismos tiempos y eficiencia que las anteriores, los productos de alquilación **FI-3** y el de ciclación **FI-4** con un 50% y un 48% de rendimiento, respectivamente (**Figura 6.4**). Estos nuevos productos, poseen características espectroscópicas similares a su contraparte sintetizada a partir de geraniol, siendo de este modo fácilmente asignables. Este resultado puso en evidencia que el curso de las reacciones

es independiente de la cantidad de unidades del sustrato isoprenílico, ampliando por ende, la aplicabilidad de la reacción en la generación de nuevos productos.



**Figura 6.4.** FOI sintetizados utilizando farnesol.

En este punto, es importante realizar un análisis profundo de estas reacciones a nivel mecanístico. Si bien el oxígeno es el segundo elemento más electronegativo de la tabla periódica, es capaz de donar densidad electrónica para estabilizar el estado de transición y el complejo sigma. Esto es posible porque los electrones no enlazantes del oxígeno adyacente a un carbocatión estabiliza la carga positiva mediante resonancia. Por esta razón, el grupo oxhidrilo es un poderoso activante y director *orto* en sustituciones electrofílicas aromáticas. El grupo metoxilo le sigue en fortaleza como grupo activante y tiene el mismo efecto directriz. Como el oxhidrilo es un grupo activante más fuerte que el metoxi, la alquilación está casi exclusivamente gobernado por este fenómeno, no observándose el compuesto alquilado en la posición 3. A pesar que estos dos grupos sustituyentes dirigen al electrófilo hacia diferentes sitios de reacción, predomina el sustituyente con mayor poder director (**Figura 6.5**). El comportamiento, como se sugirió anteriormente, es independiente del sustrato electrofílico en este sistema, entonces todo el efecto estructural que dirige la formación de los productos está regido por la cantidad de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  y por la naturaleza del fenol de partida.

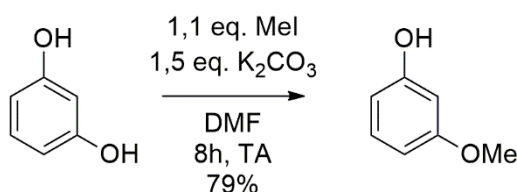


**Figura 6.5.** Análisis estructural de la reactividad del 4-metoxi fenol.

En conclusión, la combinación de un único fenol de partida, con dos alcoholes isoprenílicos en condiciones de alquilación y de ciclación, nos permitió preparar un total de 4 compuestos (**FI-1 a FI-4**).

Optimizadas las condiciones de ciclación y de alquilación con el p-metoxifenol, nos abocamos a extender el estudio aplicando las reacciones desarrolladas a los otros dos isómeros del p-metoxifenol: el o-metoxifenol y el m-metoxifenol.

El o-metoxifenol, que se conoce también como guayacol, es biosintetizado por una gran variedad de microorganismos y se encuentra disponible comercialmente. Derivados de este compuesto son ampliamente utilizados en medicina como agentes expectorantes, antisépticos y anestésicos locales. Por otro lado, el m-metoxifenol es un antiséptico dermal. Si bien es accesible en el mercado, fue sintetizado a partir del resorcinol (**Figura 6.6**) por metilación con ioduro de metilo en presencia de base ( $K_2CO_3$ ).

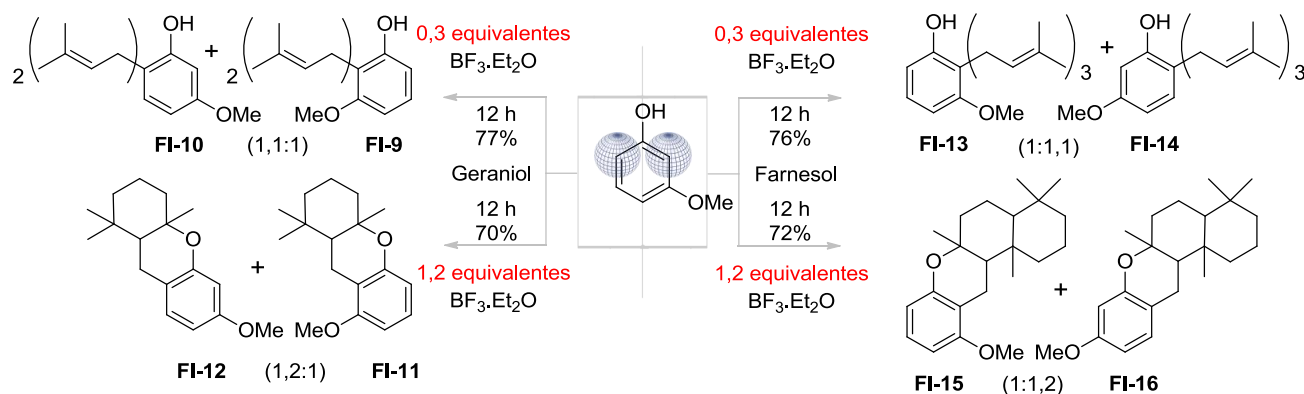


**Figura 6.6.** Síntesis del m-metoxifenol.

A diferencia del p-metoxifenol, estos dos fenoles no poseen simetría. El m-metoxifenol podría producir potencialmente más de un producto, debido a que posee dos posiciones *orto* diferenciadas con respecto al grupo oxhidrilo. En cambio el o-metoxifenol tiene únicamente una posición *orto* libre.

Cuando se realizaron las reacciones de Friedel-Crafts sobre el 2-metoxifenol en las condiciones de alquilación, se obtuvo el producto geranilado en la posición 3 (**FI-5**) en un 48% de rendimiento. Cuando se utilizó farnesol se obtuvo **FI-6** en un 54% de rendimiento, también alquilado en la misma posición. Para el caso de las reacciones en condición de ciclación, fue posible acceder a los productos usando geraniol (**FI-7**, 51%) y farnesol (**FI-8**, 58%).

En el caso del 3-metoxifenol se logró preparar los dos derivados mono-isoprenilados en la posición *orto* (C2 y C6), en las condiciones mencionadas anteriormente, siendo posible su separación cromatográfica (**Esquema 6.5**).



Esquema 6.5. Síntesis de FI-9 a FI-16.

En líneas generales, los FOIs preparados a partir del m-metoxifenol (FI-9 a FI-16) se obtuvieron con rendimientos levemente mejores que los sintetizados a partir del guayacol (FI-5 a FI-8), probablemente este efecto se deba a la sinergia en el efecto directriz que ejerce el grupo metoxilo ubicado en la posición 3. De la misma manera, para el caso de los productos FI-9 a FI-16, inicialmente se podría conjeturar que la posición *orto* del C2 está estéricamente impedida por el posicionamiento de los grupos oxhidrilo y metoxilo en sus adyacencias, esperando que se forme mayoritariamente el producto alquilado (o ciclado) en la posición 6. Sin embargo se observa que la reacción no es selectiva, obteniéndose en una relación 1,2:1 (C6: C2) los isómeros correspondientes a ambas alquilaciones. Una posible explicación para esta conducta es que el grupo metoxilo, que tiene efecto director *orto*, esté potenciando el efecto directriz del grupo oxhidrilo en la posición *orto* que comparten (Figura 6.7).

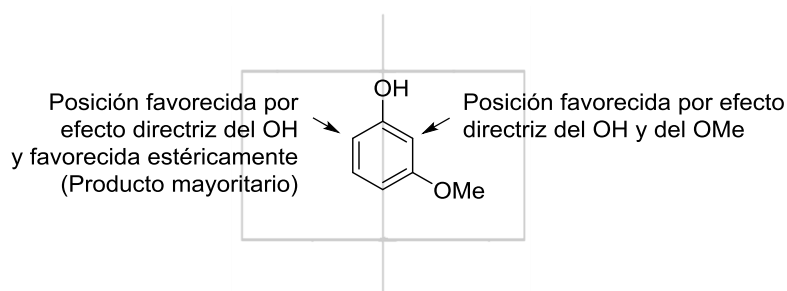


Figura 6.7. Análisis estructural de los productos preparados a partir 3-metoxifenol.

Para dilucidar el patrón de sustitución del anillo aromático se analizó cuidadosamente la región de campos bajos de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , donde aparecen las señales asignables a protones unidos a anillos aromáticos. En la Figura 6.8 se observan

una ampliación de la zona entre 6,30 y 7,30 ppm de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  asignados a cada estructura.

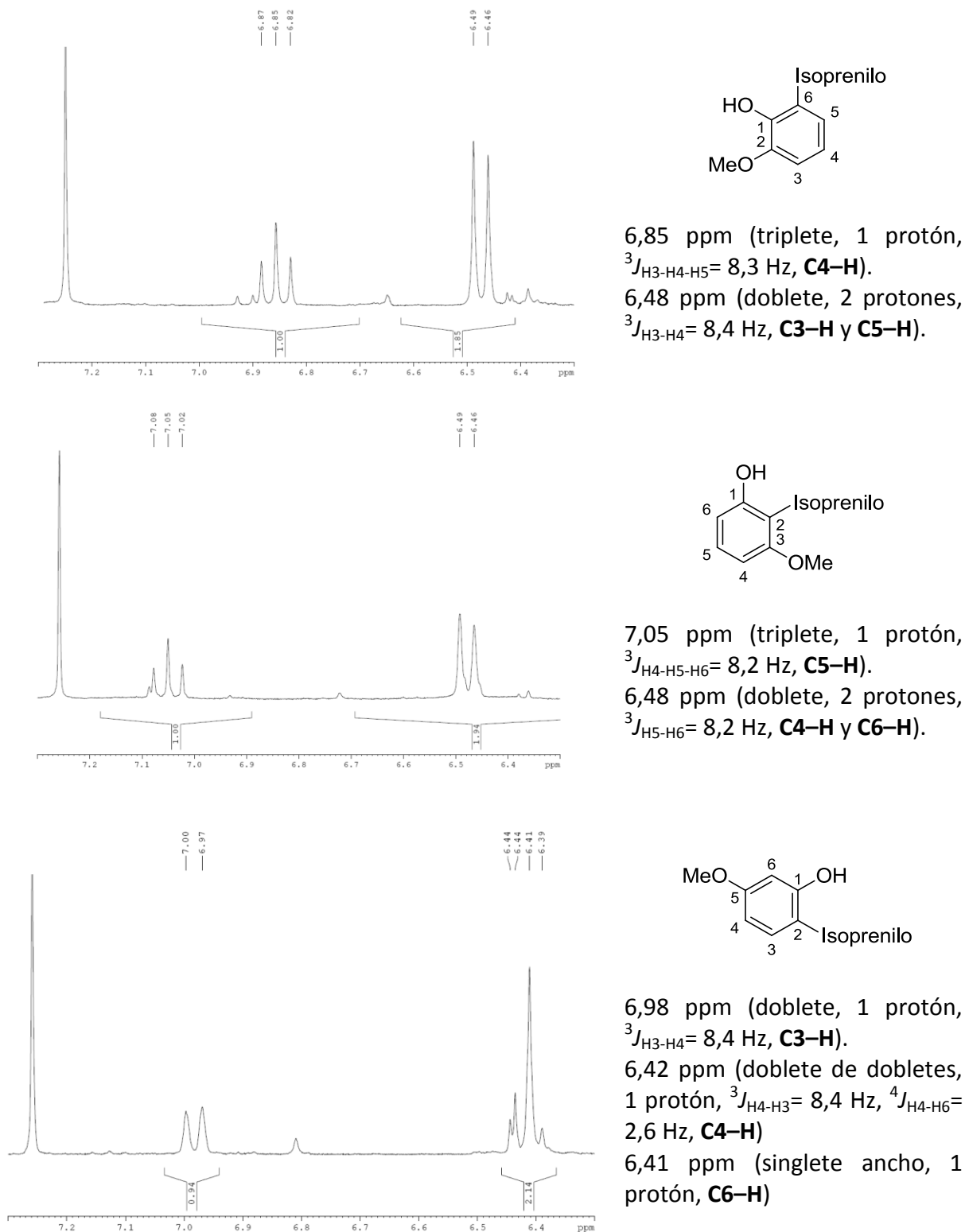


Figura 6.8. Ampliación de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (de 6,3 a 7,3 ppm).

En conclusión, la combinación de estos dos fenoles con los dos alcoholes isoprenílicos en las dos condiciones descriptas, permitieron obtener un total de 12 FOIs (**Tabla 6.1**).

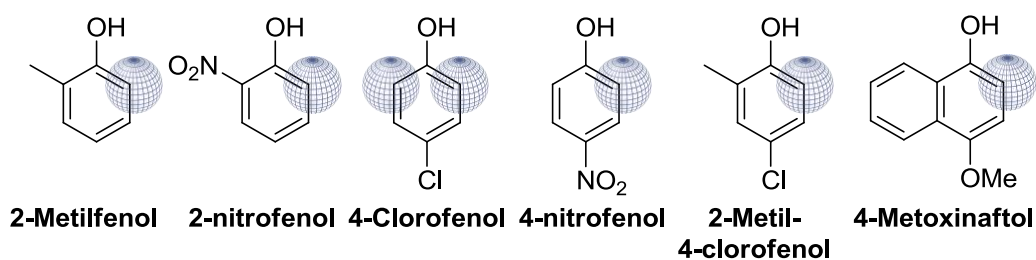
Tabla 6.1. Tabla de rendimientos de los FOI preparados.

Fenol de partida	Condiciones	Geranilo		Farnesilo	
		2-OMe	Alquilación	<b>FI-5</b>	48%
	Ciclación	<b>FI-7</b>	51%	<b>FI-8</b>	58%
3-OMe	Alquilación	<b>FI-9 y FI-10</b>	77% (1:1,1)	<b>FI-13 y FI-14</b>	76% (1:1,2)
	Ciclación	<b>FI-11 y FI-12</b>	70% (1:1,2)	<b>FI-15 y FI-16</b>	72% (1:1,1)
4-OMe	Alquilación	<b>FI-1</b>	45%	<b>FI-3</b>	50%
	Ciclación	<b>FI-2</b>	52%	<b>FI-4</b>	48%

### 6.2.3 EXPANSIÓN DE LA METODOLOGÍA A OTROS SUSTRATOS: ANILLOS AROMÁTICOS MONOHIDROXILADOS.



Finalizado los estudios de desimetrización de sustrato con el uso de los distintos regioisómeros de metoxifenoles, se amplió la gama a nuevos fenoles con el fin de estudiar los alcances y limitaciones de las condiciones desarrolladas. Se amplió la variabilidad con el uso de otros grupos activadores y desactivadores del anillo aromático y variando el patrón de sustitución para observar los efectos directores de la alquilación de Friedel-Crafts en la selectividad de la reacción. Los fenoles seleccionados fueron el 2-metilfenol (*o*-cresol), el 2-nitrofenol, el 4-clorofenol, el 4 nitrofenol y el 2-metil-4-clorofenol (**Figura 6.9**). Adicionalmente se extendió el estudio al 4-metoxinaftol para evaluar la reacción en fenoles policíclicos. Por otro lado, los productos de las reacciones de naftol y los fenoles escogidos permitirían diversificar estructuralmente la colección de FOI preparados, permitiendo además validar esta reacción como una nueva herramienta de síntesis orientada a la diversidad.



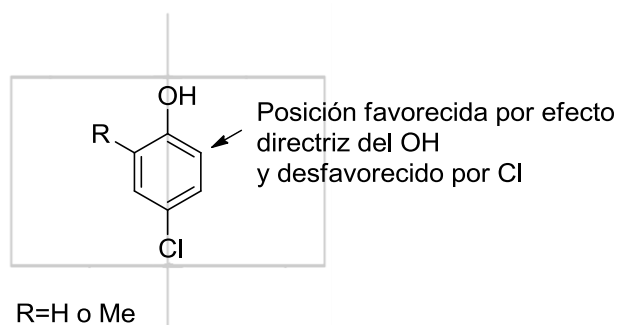
**Figura 6.9.** Compuestos aromáticos monohidroxilados utilizados.

**Tabla 6.2.** Rendimiento de los FOI preparados

Fenol de partida	Condiciones	Geranilo		Farnesilo	
		FI	%	FI	%
2-Me	Alquilación	<b>FI-17</b>	41%	<b>FI-18</b>	39%
	Ciclación	<b>FI-19</b>	32%	<b>FI-20</b>	41%
4-Cl	Alquilación	<b>FI-21</b>	42%	<b>FI-22</b>	38%
	Ciclación	<b>FI-23</b>	45%	<b>FI-24</b>	50%
2Me-4-Cl	Alquilación	<b>FI-25</b>	25%	<b>FI-26</b>	29%
	Ciclación	<b>FI-27</b>	23%	<b>FI-28</b>	28%
4-OMe-Naftol	Alquilación	<b>FI-29</b>	61%	<b>FI-30</b>	60%
	Ciclación	<b>FI-31</b>	49%	<b>FI-32</b>	55%

En general las reacciones cursaron produciendo similares rendimientos y selectividades a las encontradas para los sustratos previamente estudiados. Por el contrario, no fue posible la preparación de productos de isoprenilación de nitroderivados (2-nitrofenol y 4-nitrofenol) en las condiciones optimizadas, evidenciando el carácter fuertemente desactivante del grupo nitro. Debido a que el nitrógeno tiene densidad de carga positiva atrae por inducción la densidad electrónica del anillo aromático, siendo por lo tanto menos nucleofílico. Ergo, desfavorece la reacción con los electrófilos proveniente del isoprenilo.

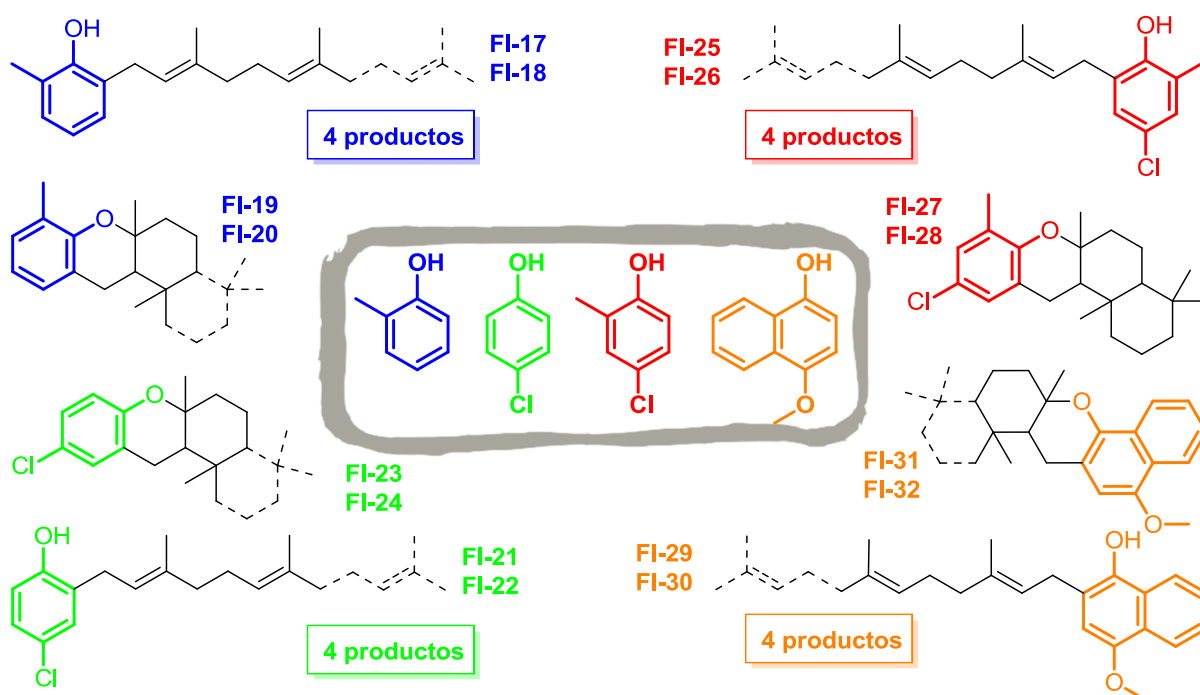
Por otro lado, a pesar de que el cloro sea un débil desactivante del anillo aromático, la utilización de derivados de 4-clorofenol es útil para sintetizar FOIs con potenciales efectos biológicos. La causa de la débil desactivación se debe buscar en la polarización del enlace carbono-cloro. Esta polarización atrae la densidad electrónica del anillo benceno y lo hace menos reactivo para la sustitución nucleofílica. Por esta razón, en ningún caso se obtuvieron rendimientos por encima del 50%.



**Figura 6.10.** Reactividad de derivados de 4-clorofenol.

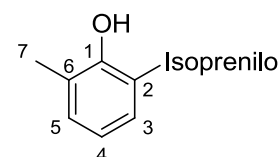
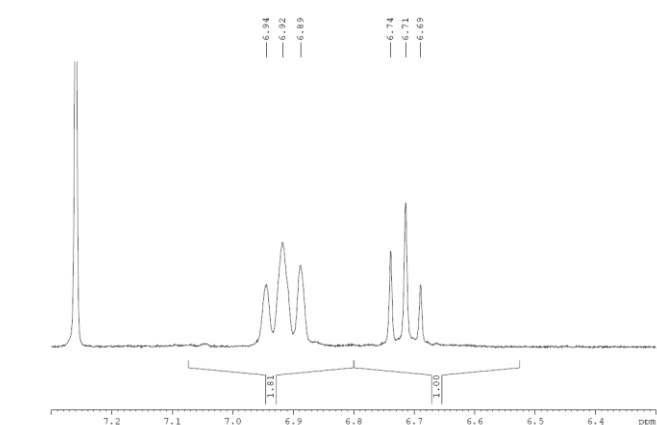
El caso del 4-metoxinaftol es particularmente interesante, dado que si bien este compuesto posee una única posición alfa al fenol, dispone de otras posiciones susceptibles de ser alquiladas. Afortunadamente, la reacción curso con buen control regioquímico, obteniéndose, como en casos anteriores, el producto alquilado en la posición orto.

En resumen, merced a la generalidad de la reacción de isoprenilación y de ciclación implementas sobre 3 nuevos fenoles y un naftol con geraniol y farnesol permitieron expandir la colección en 16 nuevos derivados con diversos sustituyentes en el anillo aromático (**Figura 6.11**).



**Figura 6.11.** Productos obtenidos (FI-17 a FI-32)

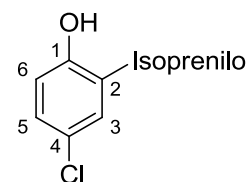
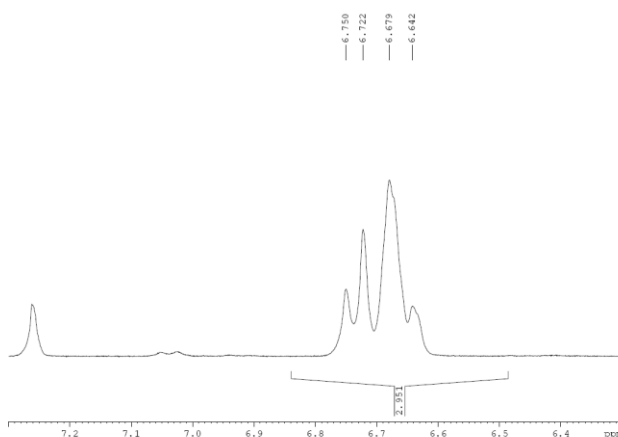
De manera análoga a lo resuelto en el apartado anterior, la elucidación estructural de los FOIs sintetizados requirió un análisis exhaustivo de una combinación de técnicas espectroscópicas. En particular el análisis del sistema de espín en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de los protones aromáticos permitió de manera inequívoca determinar el patrón de sustitución. (Figuras 6.12 y 6.13).



**6,93 ppm** (doblete, 1 Protón,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_4} = 8,0 \text{ Hz}$ , **C5-H**)

**6,90 ppm** (doblete, 1 Protón,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 8,0 \text{ Hz}$ , **C3-H**)

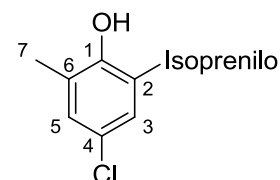
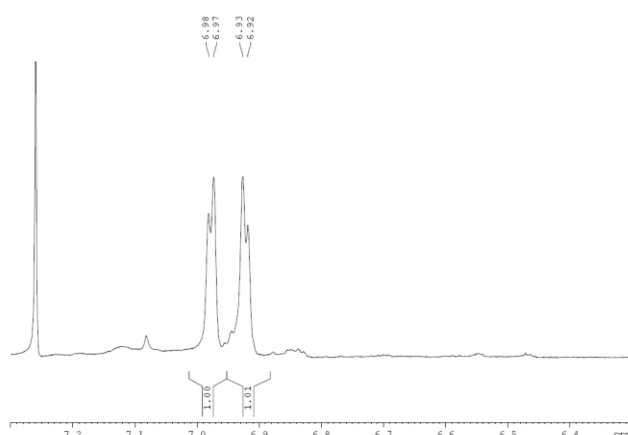
**6,71 ppm** (triplete, 1 Protón,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4-\text{H}_5} = 8,0 \text{ Hz}$ , **C4-H**)



**6,74 ppm** (doblete, 1protón,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_6} = 7,9 \text{ Hz}$ , **C5-H**)

**6,68 ppm** (singlete, 1 protón, **C3-H**)

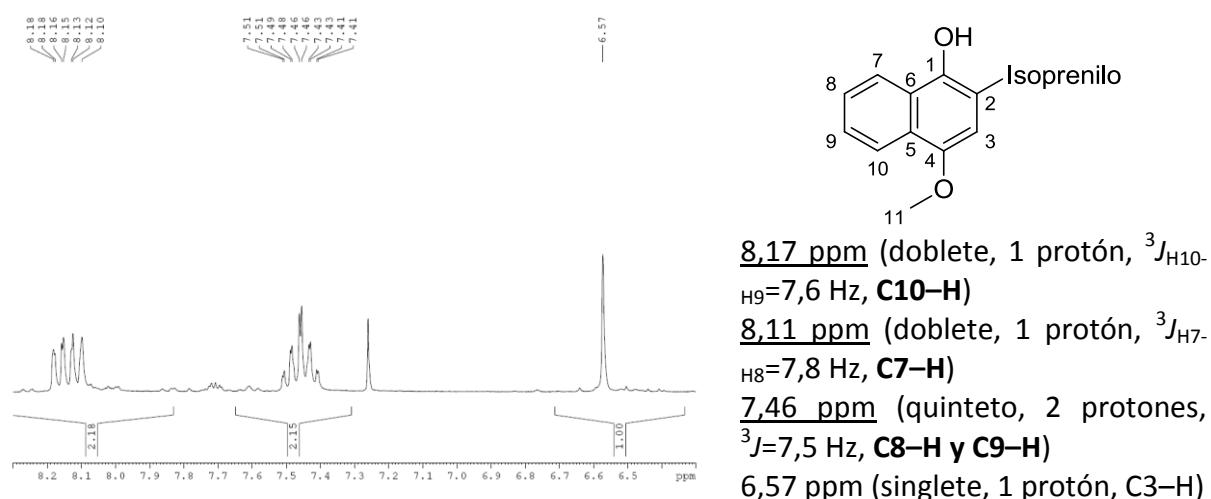
**6,66 ppm** (doblete, 1protón,  $^3J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 7,9 \text{ Hz}$ , **C6-H**)



**6,98 ppm** (doblete, 1 protón,  $^4J_{\text{H}_5-\text{H}_3} = 2,4 \text{ Hz}$ , **C5-H**).

**6,92 ppm** (doblete, 1 protón,  $^4J_{\text{H}_3-\text{H}_5} = 2,4 \text{ Hz}$ , **C3-H**).

**Figura 6.12.** Ampliación de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  en la región 6,3 a 7,3 ppm de FI-17, FI-21 y FI-25

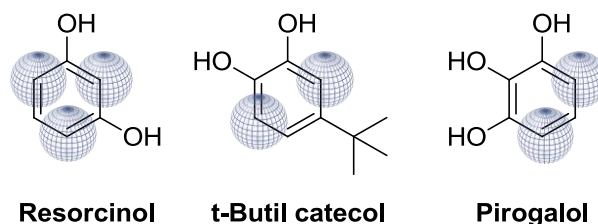


**Figura 6.13.** Ampliación de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  en la región 6,3 a 8,3 ppm de **FI-29**.

#### 6.2.4 EXPANSIÓN DE LA METODOLOGÍA A OTROS SUSTRATOS: ANILLOS AROMÁTICOS POLIHIDROXILADOS.

La necesidad de desarrollar la metodología en forma integral, requiere la expansión de los sustratos aromáticos a motivos polihidroxilados debido a la alta recurrencia de estos motivos en la naturaleza. Con ese objetivo, se partió de 3 nuevos compuestos aromáticos polihidroxilados: pirogalol (1,2,3-trihidroxi benceno), *tert*-butilcatecol (1,2-dihidroxi-4-*tert*-butil benceno) y resorcinol (1,3- dihidroxi benceno).

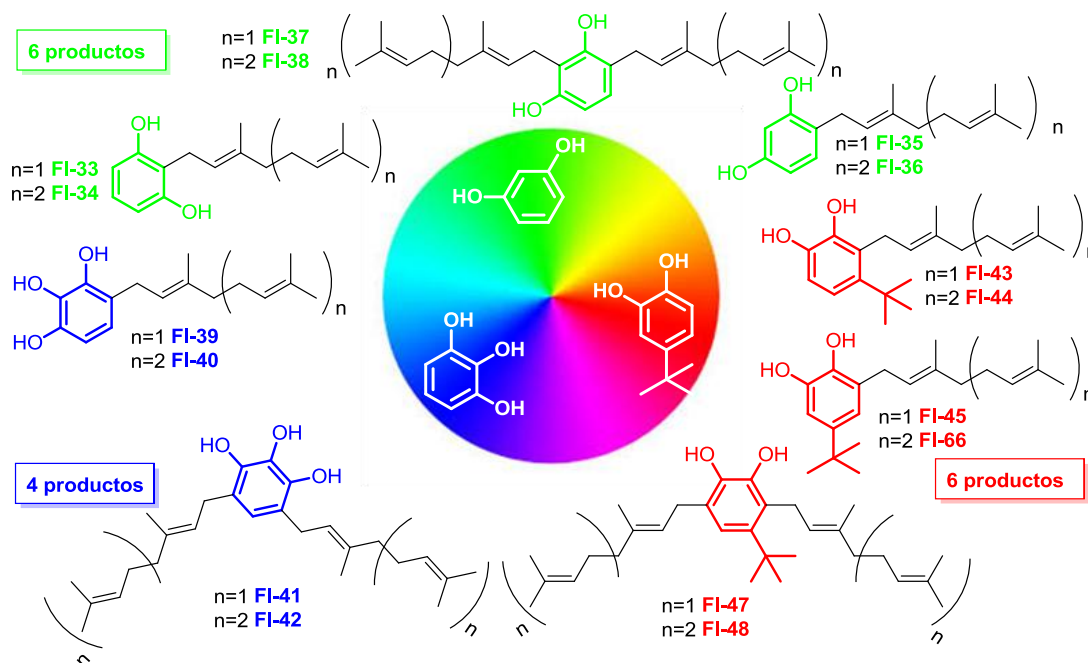
La presencia de fenoles con más de un oxhidrilo y con posiciones *orto* libres presentan una complicación adicional debido a que las condiciones de reacción puede reaccionar el sustrato aromático en más de una posición, incorporando más de un isopreno. Por otro lado, desde la perspectiva de generar nuevas estructuras, estos productos si pudieran ser potencialmente separables por técnicas cromatográficas, permitirían ampliar la colección con nuevos derivados. Por lo tanto, con un número relativamente pequeño de materiales de partidas se puede tener acceso a una gran cantidad de productos estructuralmente diversos.



**Figura 6.14.** Anillos bencénicos polihidroxilados.

Puesto a reaccionar los tres nuevos polifenoles bajo la metodología desarrollada nos permitieron generar 16 nuevos compuestos (todos pertenecientes a la familia de fenoles alquilados). En la **Figura 6.15** se detallan los productos obtenidos, que se suman a los 32 compuestos generados anteriormente. La síntesis de cromanos derivados de estos fenoles resultó infructuosa, debido en parte a la bajas polaridades de los compuestos preparados con la consecuente imposibilidad de separarlos cromatográficamente, obteniendo en todos los casos mezclas de productos de muy difícil resolución.

Actualmente todas estas estructuras se encuentran en la fase de ensayos *in vitro* contra diversos organismos patógenos en humanos.



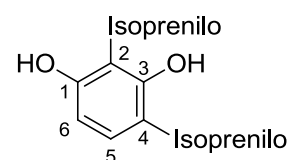
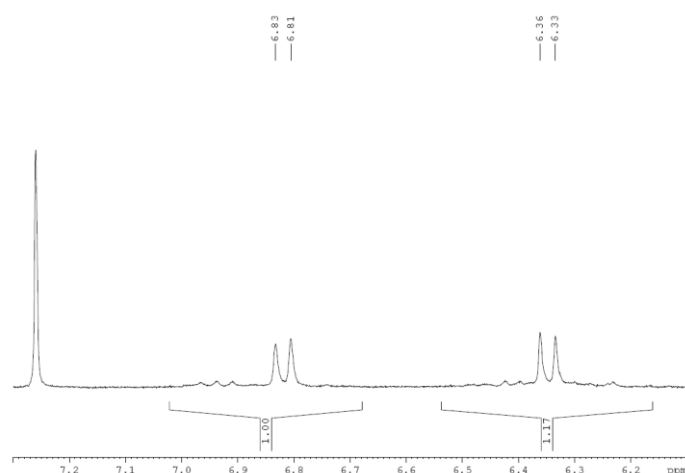
**Figura 6.15.** Quimioteca de anillos aromáticos polihidroxilados isoprenilados.

Tabla 6.3. Compuestos polifenólicos preparados y rendimientos obtenidos. Entre paréntesis se muestra la proporción de los productos aislados cromatográficamente.

Fenol de partida	Condiciones	Geranilo		Farnesilo	
Resorcinol	Alquilación	<b>FI-33, FI-33 y FI-35</b>	27% (1:1,2:2,1)	<b>FI-34, FI-36 y FI-38</b>	35% (1: 1,4: 2,7)
Pirogalol	Alquilación	<b>FI-39 y FI-41</b>	25% (1:1,8)	<b>FI-40 y FI-42</b>	29% (1:1,6)
t-butilcatecol	Alquilación	<b>FI-43, FI-45 y FI-47</b>	36% (1: 2,1: 4,5)	<b>FI-44, FI-46 y FI-48</b>	34% (1: 2,4: 6)

Los bajos rendimientos en comparación con las reacciones que les precede se deben a que si bien estequiométricamente se mantiene la relación entre alcoholes isoprenílicos y sustratos fenólicos, en estos casos particulares una única molécula de fenol puede reaccionar con más de una molécula del alcohol. Entonces, a pesar de tener la misma relación de isoprenoles la demanda por ellos aumenta en comparación con los casos anteriores. Se observa también que la relación de los productos dialquilados con respecto a los monoalquilados se inclina significativamente a favor de los primeros. Esto se debe a que ante una sustitución electrofílica aromática, la instalación de un grupo isoprenilo activa el anillo favoreciendo la generación de productos polialquilados. Afortunadamente, La presencia de grupos polares favoreció la cuidadosa separación cromatográfica necesaria para aislar los productos obtenidos.

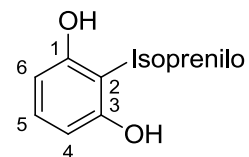
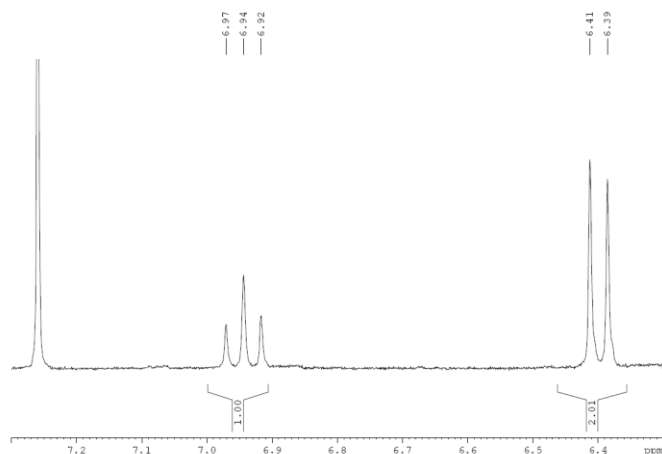
Nuevamente, la elucidación estructural de los FOIs sintetizados se apoyó en especial en los espectros de RMN, siendo especialmente importante los sistemas de espines generados por los protones aromáticos (**Figura 6.16**).



Análisis RMN de  $^1\text{H}$  de la zona aromática:

6,82 ppm (doblete, 1 protón,  $^3J_{\text{H5-H6}} = 8,1 \text{ Hz}$ , **C5-H**).

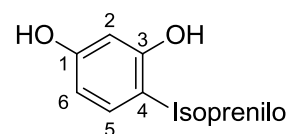
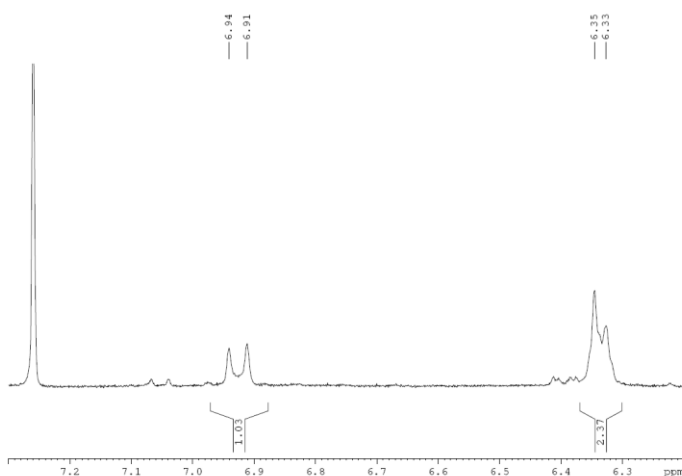
6,35 ppm (doblete, 1 protón,  $^3J_{\text{H5-H6}} = 8,2 \text{ Hz}$ , **C6-H**).



Análisis RMN de  $^1\text{H}$  de la zona aromática:

6,94 ppm (triplete, 1 protón,  $^3J_{\text{H4-H5-H6}} = 8,1 \text{ Hz}$ , **C5-H**).

6,40 ppm (doblete, 2 protones,  $^3J_{\text{H5-H6}} = 8,1 \text{ Hz}$ , **C4-H y C6-H**).

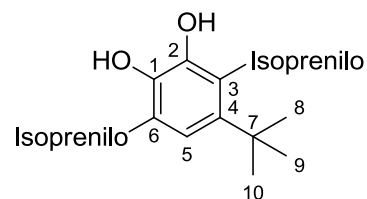
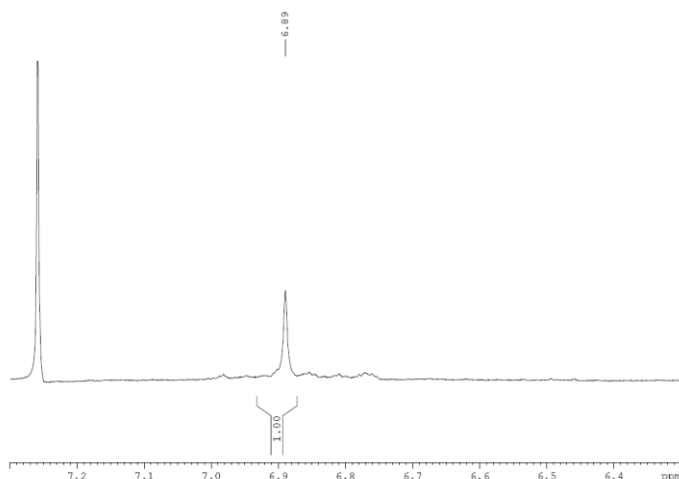


Análisis RMN de  $^1\text{H}$  de la zona aromática:

6,93 ppm (doblete, 1 protón,  $^3J_{\text{H4-H5-H6}} = 8,2 \text{ Hz}$ , **C5-H**).

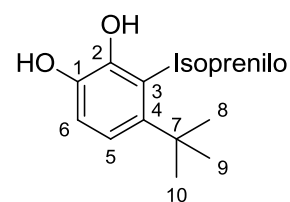
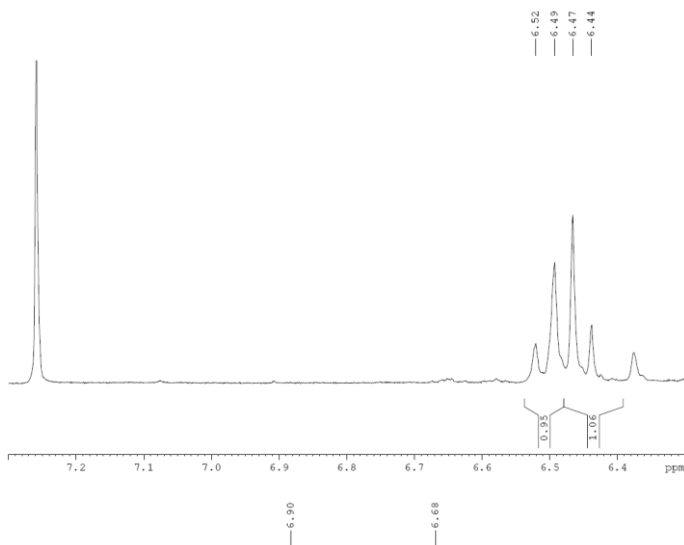
6,35 ppm (singlete, 1 protón, **C2-H**)

6,33 ppm (doblete, 1 protón, **C6-H**)



Análisis RMN de  $^1\text{H}$  de la zona aromática:

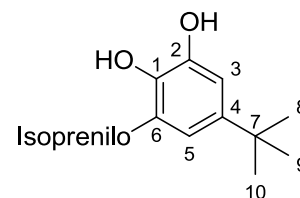
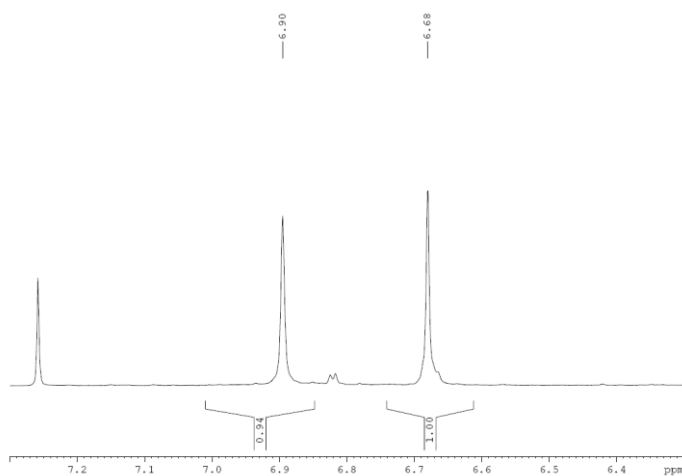
6,89 ppm (singlete, 1 protón, **C5-H**)



Análisis RMN de  $^1\text{H}$  de la zona aromática:

6,51 ppm (doblete, 1 protón,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_6} = 8,3$  Hz, **C5-H**)

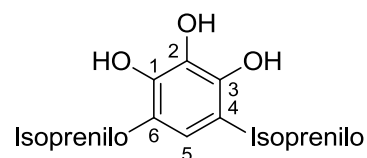
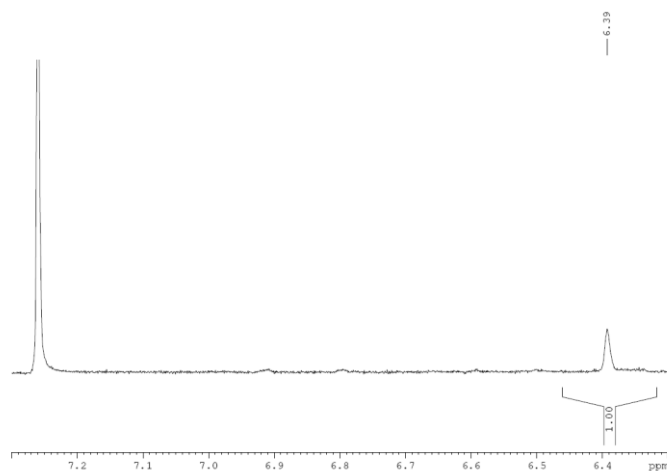
6,45 ppm (doblete, 1 protón,  $^3J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 8,3$  Hz, **C6-H**)



Análisis RMN de  $^1\text{H}$  de la zona aromática:

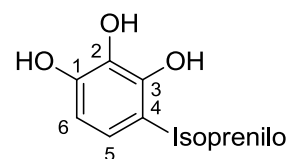
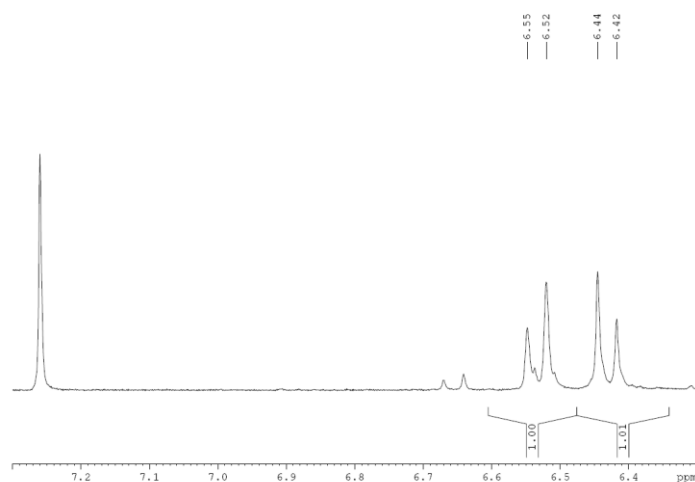
6,90 ppm (singlete, 1 protón, **C5-H**)

6,68 ppm (singlete, 1 protón, **C3-H**)



Análisis RMN de  $^1\text{H}$  de la zona aromática:

6,39 ppm (singlete, 1 protón, **C5-H**)



Análisis RMN de  $^1\text{H}$  de la zona aromática:

6,53 ppm (doblete, 1 protón,  $^3J_{\text{H5-H6}} = 8,3 \text{ Hz}$ , **C5–H**)

6,43 ppm (doblete, 1 protón,  $^3J_{\text{H6-H5}} = 8,3 \text{ Hz}$ , **C6–H**)

**Figura 6.16.** Ampliación de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  en la región de 6,3 a 7,3 ppm de los compuestos de los productos.

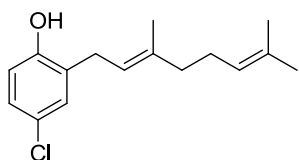
Como corolario, a pesar de los bajos rendimientos de los compuestos preparados con los nuevos sustratos fenólicos (como era de esperar por la falta de selectividad), es de destacar que con el producto de 6 reacciones se logró expandir la colección en 16 nuevos derivados mono y dialquilados.

### 6.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA QUIMIOTECA PREPARADA.

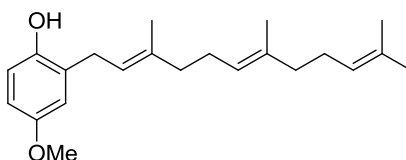
Generada la familia de FOI, en una siguiente instancia se hace imperiosa la necesidad de ensayar la actividad biológica de la colección preparada con el fin de identificar nuevas entidades químicas. Como en este caso la estrategia perseguida no posee ningún blanco de acción específico, los ensayos se realizaron sobre una variedad de organismos patógenos que producen enfermedades en humanos. Para ello contamos con un conjunto de colaboradores, entre los que se destaca el Dr. Babu Tekwani que ensayó las actividades antibacteriana contra algunas bacterias del grupo ESKAPE (acrónimo de los seis grupos de bacterias más resistentes a antibióticos: *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*), que constituyen un nuevo paradigma en patogénesis bacteriana, sobre todo en infecciones intrahospitalarias. Por otro lado, se determinó la actividad antifúngica sobre los hongos productores de la criptococosis (micosis sistémica, en general oportunista, producida por *Cryptococcus neoformans*) y la candidiasis (infección fúngica producida por el patógeno *Candida spp.*). Para el caso de las enfermedades tropicales desatendidas se ensayó la estudió

el efecto de la colección sobre *Plasmodium falciparum* y *Leishmania donovani*. Por último, con el objeto de determinar el índice terapéutico, se determinó la actividad citotóxica sobre células VERO, como fuera mencionado previamente. Por otro lado y gracias a una colaboración con el grupo del Dr. Juan Engel (UCSF; Estados Unidos), fue posible determinar la actividad antiparasitaria de los compuestos en el estadio amastigote de *T. cruzi* y *L. donovani*. Clínicamente, este estadio es el responsable de las manifestaciones crónicas de las enfermedades que se originan en la reproducción de estos organismos por fisión binaria en las células infectadas, afectando distintos tejidos.

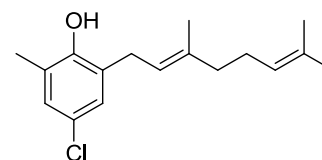
En una primera aproximación sólo se analizó el 25% de los productos preparados (FI-1 a FI-4 y de FI-17 a FI-28), con el fin de validar la estrategia. En primer lugar, es de destacar que ningún compuesto resultó ser citotóxico a la máxima concentración ensayada de 4,75 µg/mL. Los resultados se expresan como IC<sub>50</sub> en µM para los microorganismos detallados en donde se hallaron actividades menores a 40 µM. En cambio, para el estadio amastigote de *L. donovani* los resultados se muestran como porcentaje de inhibición del crecimiento de los parásitos con respecto a la droga comercial Anfotericina B, a una concentración 1 µM.



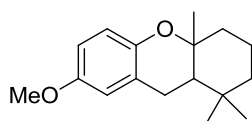
Activo en *Staphylococcus aureus*  
IC<sub>50</sub> = 17,4 µM



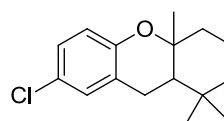
Activo en *Staphylococcus aureus*  
IC<sub>50</sub> = 22,2 µM  
Activo en promastigote de  
*Leishmania donovani*  
IC<sub>50</sub> = 10,9 µM



Activo en amastigote de  
*Leishmania donovani*  
A 1 µM tiene el 36% de la actividad de la  
droga comercial Anfotericina B

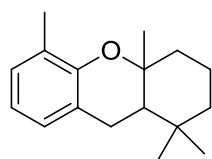


Activo en *Criptococcus neoformans*  
IC<sub>50</sub> = 10,2 µM  
Activo en *Staphylococcus aureus*  
IC<sub>50</sub> = 21,1 µM  
Activo en *Candida globara*  
IC<sub>50</sub> = 39,9 µM



Activo en amastigote de  
*Leishmania donovani*  
A 1 µM tiene el 36% de la actividad de  
la droga comercial Anfotericina B

(Continúa en la siguiente página)

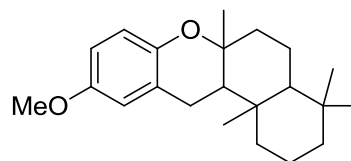


Activo en *Cryptococcus neoformans*

$IC_{50} = 6,8 \mu M$

Activo en *Staphylococcus aureus*

$IC_{50} = 25,5 \mu M$



Activo de amastigote de

*Leishmania donovani*

A  $1 \mu M$  tiene el 29% de la actividad de la droga comercial Anfotericina B

Figura 6.17. Compuestos biológicamente activos de la colección.

En la práctica, aproximadamente un 50% de los compuestos ensayados tienen actividad en al menos un organismo por debajo de  $40 \mu M$ . La evidencia experimental de estas actividades biológicas diversas, sienta las bases de la calificación de estas estructuras como privilegiadas.

Para realizar un análisis de estructura/actividad de este primer cribado de actividades, se preparó un mapa de calor **Tabla 6.4**. En este formato sólo se discriminan los compuestos que son activos en al menos un organismo a concentraciones menores a  $40 \mu M$ , sin importar el valor de su  $IC_{50}$ .

Tabla 6.4. Mapa de calor de actividades

Organismo patógeno	Compuestos															
	Geraniol								Farnesol							
	<i>p</i> -OMe		<i>o</i> -Me		<i>p</i> -Cl		<i>o</i> -Me- <i>p</i> -Cl		<i>p</i> -OMe		<i>o</i> -Me		<i>p</i> -Cl		<i>o</i> -Me- <i>p</i> -Cl	
	Alq.	Cicl.	Alq.	Cicl.	Alq.	Cic.	Alq.	Cic.	Alq.	Cicl.	Alq.	Cicl.	Alq.	Cic.	Alq.	Cic.
1	2	17	19	21	23	25	27	3	4	18	20	22	24	26	28	
<i>S. aureus</i>	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>C. neoformans</i>	Green	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>C. globara</i>	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>L. donovani (ama)</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>L. donovani (pro)</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

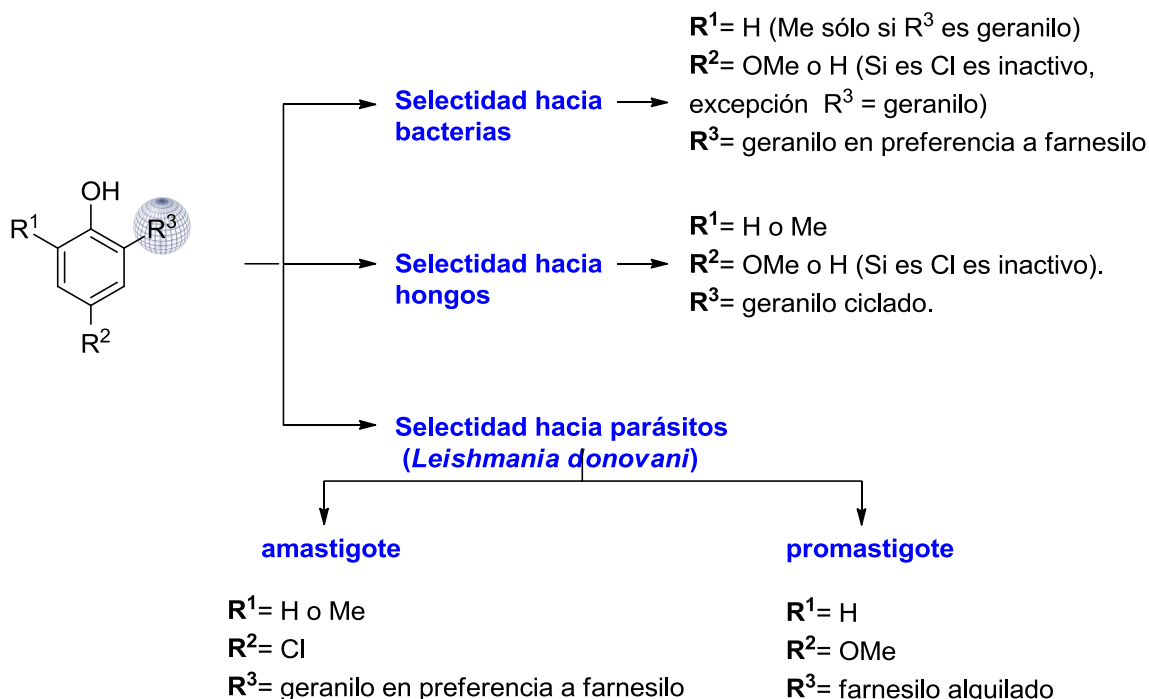
En líneas generales se observa que el 72% de los compuestos que resultaron activos, están isoprenilados con geraniol y sólo un 28% con farnesilo, sugiriendo que la presencia de dos unidades isoprénicas mejora la performance. Por otro lado, un 57% de los compuestos son derivados de cromano (ciclado), mientras que el restante 43% pertenecen a la familia de fenoles *orto*-isoprenilados (alquilado).

Todos los compuestos que están derivatizados con geranilo, al permutarse por farnesilo pierden su actividad. Análogamente, los compuestos decorados con farnesilo, si son reemplazados por geranilo dejan de ser activos a concentraciones menores a 40  $\mu\text{M}$ . Estos resultados ponen de manifiesto que el número de unidades isoprénicas modula la actividad entre organismos, posicionando a nuestra estrategia como ideal para preparar compuestos que actúen en forma diferencial en distintos organismos.

Un análisis pormenorizado en cada organismo nos muestra que *S. aureus* es el organismo al que más compuestos afectan (36%). Los valores de actividad varían entre un  $\text{IC}_{50}$  de 17,4 y 25,5  $\mu\text{M}$ , no observándose una tendencia marcada hacia compuestos ciclados o alquilados. Un hecho notable, es que los fenoles sustituidos con cloro, a excepción de **FI-21** no resultan activos en esta bacteria patógena. En cuanto a la actividad antifúngica, los compuestos ciclados demostraron tener las mejores actividades, particularmente sobre *C. neoformans*. Nuevamente, ningún haloderivado resultó activo.

Finalmente, el estadio amastigote de *L. donovani* resultó más susceptible a la acción de esta quimioteca, en comparación con el estadio promastigota. Los clorofenoles decorados con motivos geranilos son los mejores compuestos de esta colección para el estadio amastigote. Mientras que los p-metoxifenoles decorados con farnesilo tiene una marcada diferencia siendo el producto ciclado más activo en amastigotes y el alquilado en promastigotes.

En el **Esquema 6.6** se encuentra representada los factores que modulan la selectividad hacia los diferentes patógenos.



**Esquema 6.6.** Relación estructura/actividad de la colección de FOI ensayada.

En conclusión, la estrategia sintética permitió alcanzar un gran número de compuestos, utilizando un número bajo de materiales de partida en un único paso sintético, en donde es posible modular las condiciones para preparar productos de alquilación o de ciclación.

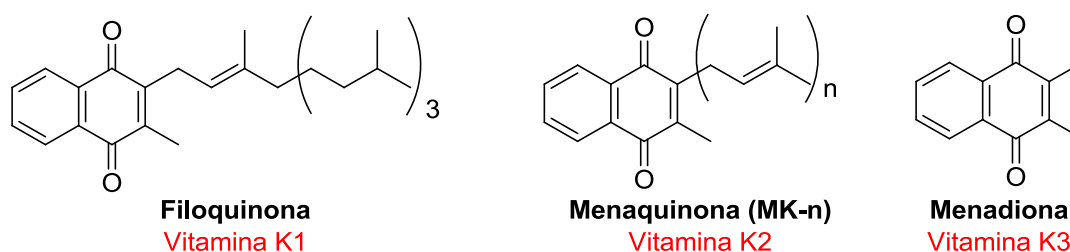
La estrategia implementada ha permitido expandir rápidamente el espectro de actividades biológicas encontradas en los productos naturales, permitiendo estudiar de manera integral a los alcances de los fenoles isoprenilados como estructura privilegiada.

## 6.4 SÍNTESIS DE METABOLITOS DE ALTA RELEVANCIA



Las vitaminas K son un grupo de vitaminas liposolubles estructuralmente similares, derivados de la 2-metil-naftoquinona. Fueron descubiertas en 1929 por el danés Henrik Dam

al intentar curar pollos que morían en poco tiempo de una grave enfermedad hemorrágica. Son principalmente requeridas en los procesos de coagulación de la sangre, en la eritropoyesis y en modificaciones postraduccionales. Naturalmente existen tres variantes de la vitamina K: K1, K2 y K3. La vitamina K1 (filoquinona) es sintetizada por plantas y la K2 (menaquinona) que es normalmente producida por una bacteria intestinal. Estas últimas reciben el nombre de MK-n, donde n es la cantidad de unidades isoprenias presentes en su estructura. Por otro lado, la vitamina K3 (menadiona) es una provitamina que tiene la capacidad de ser metabolizada por el cuerpo humano para producir vitámeros de la K2 (Figura 6.18).

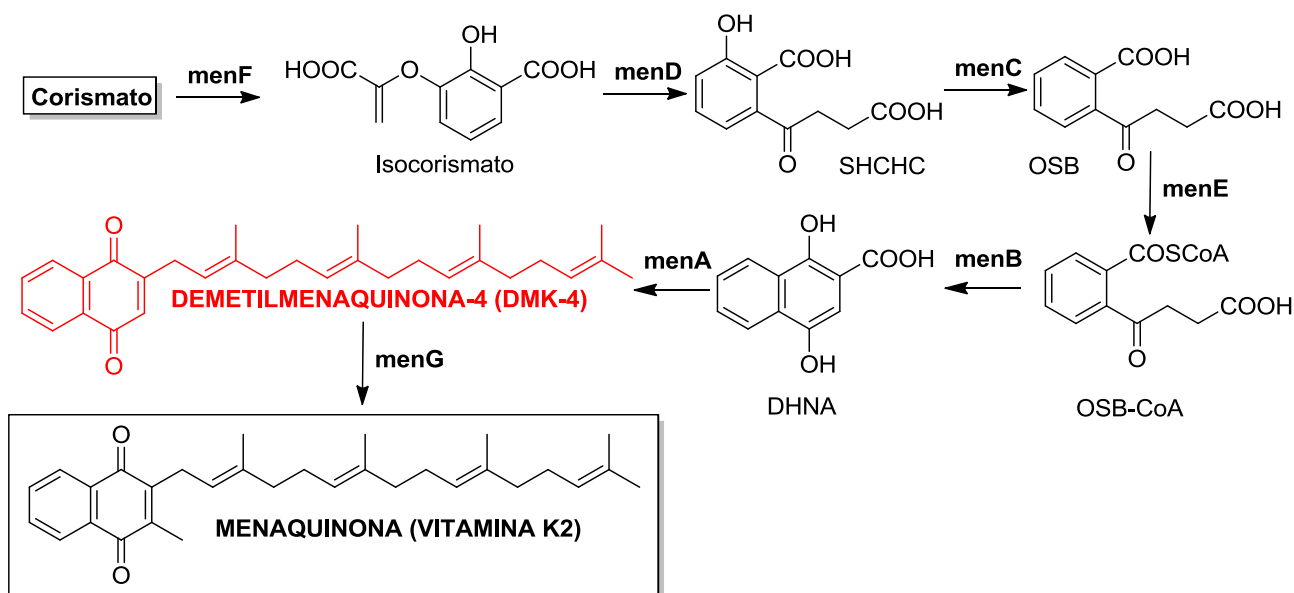


**Figura 6.18.** Estructura de las vitaminas K.

#### 6.4.1 VITAMINA K2

Distintas bacterias, como la *Escherichia coli*, pueden biosintetizar Vitamina K2. Es justamente en este organismo donde se realizaron los estudios para dilucidar la ruta biosintética de la menaquinona (**Esquema 6.7**). Esta ruta requiere un total de 7 enzimas para sintetizar menaquinona a partir del intermediario corismato (MenA a MenG). El corismato es un intermediario bioquímico importante en plantas y microorganismos, entre ellos de los aminoácidos aromáticos, indoles, alcaloides y ácido salicílico, entre otros. El primer paso de la síntesis es la conversión de corismato en isocorismato catalizado por MeF. El isocorismato es convertido en 2-succinil-6-hidroxi-2,4-ciclohexadieno-1-carboxilato (SHCHC) por MenD. El intermediario o-succinilbenzoico (OSB) es formado por MenC, para luego ser convertido en el intermediario OSB-CoA por MenE, que se convierte finalmente en el ácido dihidroxinaftoico (DHNA). El DHNA es sustrato de isopreniltransferasas, en este caso particular de una octapreniltransferasa (MenA) que transfiere un geranilgeranilo a la posición 2 del núcleo para formar el intermediario demetilado de la menaquinona, la demetilmenaquinona (DMK). El nombre del intermediario depende de la cantidad de

unidades de prenilos presentes en la estructura, de manera genérica se denominan DMK-n. El último paso de la reacción es la conversión de DMK-n en menaquinona por metilación, catalizado por la metiltransferasa MenG.



**Esquema 6.7.** Biosíntesis de la menaquinona 4.

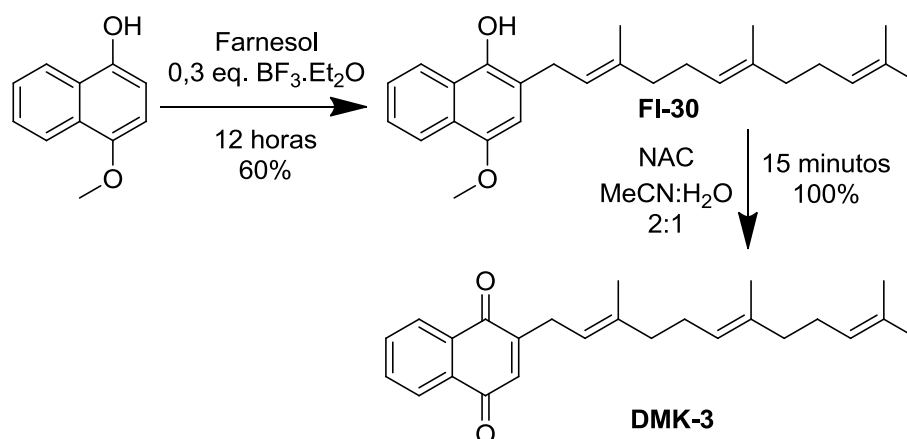
#### 6.4.1.1 SÍNTESIS DE DEMETILMENAQUINONA 4 (DMK-4).

Con el objetivo de comprender las rutas de biosíntesis que involucran isopreniltransferasas, sintetizamos la demetilmenaquinona 4 (DMK-4), utilizando las herramientas de síntesis desarrolladas anteriormente. La preparación de un producto natural en forma sintética fue históricamente el primer gran acercamiento entre la biología y la química. En particular, el atractivo de esta molécula reside en la posibilidad de utilizarla como estándar cromatográfico para el estudio de organismos capaces de biosintetizar vitamina K2, por tratarse de un actor principal de la ruta metabólica.

Como primera aproximación se sintetizó DMK-3 con el fin de optimizar la secuencia sintética debido a que se requiere de farnesol que es mucho más económico que el geranilgeraniol necesario para obtener la DMK-4. Esta sustitución está avalada experimentalmente por la robustez de la técnica y la independencia de los rendimientos de los productos en función del largo de cadena de los isoprenoles.

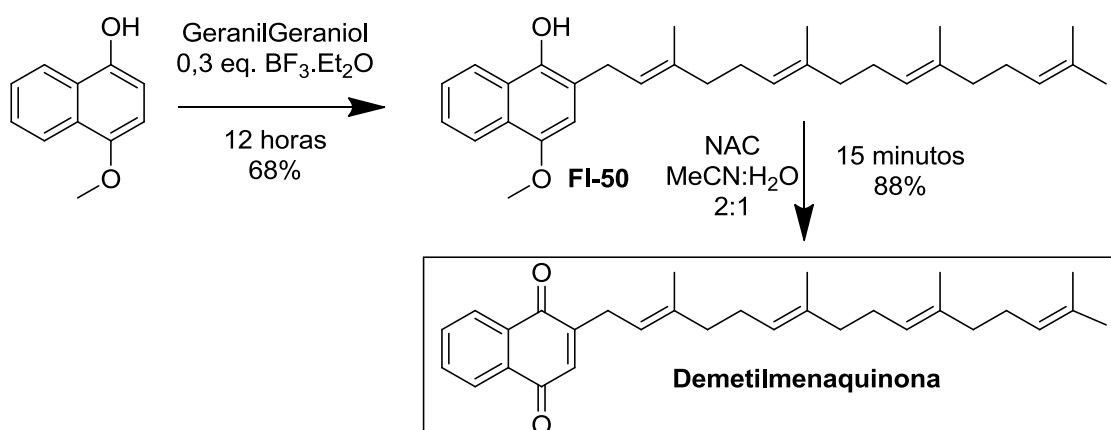
El primer paso lo constituye la alquilación con farnesol a la posición orto del 4-metoxinaftol, catalizada por  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  en condiciones de alquilación. En la reacción se obtuvo,

luego de 12 horas, el 2-farnesil-1-naftol **FI-30** con un 60% de rendimiento. En un posterior paso se oxidó el producto a su correspondiente naftoquinona **DMK-3**. Esta reacción redox se produce utilizando nitrato amónico cérico (NAC), debido a que el Ce(IV) es un oxidante muy fuerte ( $E^\circ = 1,61$  V). Se obtuvo la naftoquinona farnesilada en sólo 15 minutos a temperatura ambiente con rendimiento cuantitativo.



Esquema 6.8. Síntesis de DMK-3

Habiendo optimizado las condiciones de reacción, se preparó la DMK-4 en dos pasos a partir de 4-metoxinaftol. El paso de alquilación con geranilgeraniol tuvo una mejora del rendimiento a 68% con respecto al modelo. Posteriormente, el demetilmenaftol **FI-50** fue oxidado para dar DMK-4 con un 88% de rendimiento. La secuencia completa tuvo un rendimiento global de 60%, lo que para este tipo de compuestos es destacable. (Esquema 7).



Esquema 6.9. Síntesis de DMK-4

### 6.4.2 VITAMINA K1

Estructuralmente la filoquinona (también conocida como fitomenadiona) consiste en un núcleo de menadiona (3-metil naftoquinona) sustituido en C-2 por un grupo fitilo. Esta estructura le confiere estabilidad al aire y la humedad, siendo fotosensible. Funcionalmente es un aceptor de electrones durante el proceso de la fotosíntesis, formando parte de la cadena de transporte del fotosistema I. En animales es un cofactor clave en la formación del factor de coagulación II (protrombina), VII, IX y X. También es requerida para la generación de proteínas de factores anticoagulantes. Por esta razón la OMS incorporó a la vitamina K1 en la lista de medicamentos esenciales, que engrosa a los medicamentos más importante que se necesitan en un sistema de salud básica.<sup>[6.22]</sup>

La biosíntesis, comparte pasos comunes con las 2 vitaminas K. La divergencia con la vitamina K1 ocurre en la fitilación del núcleo aromático, mediada por MenA. En plantas MenA es una fitiltransferasa que se encuentra localizada en membrana.

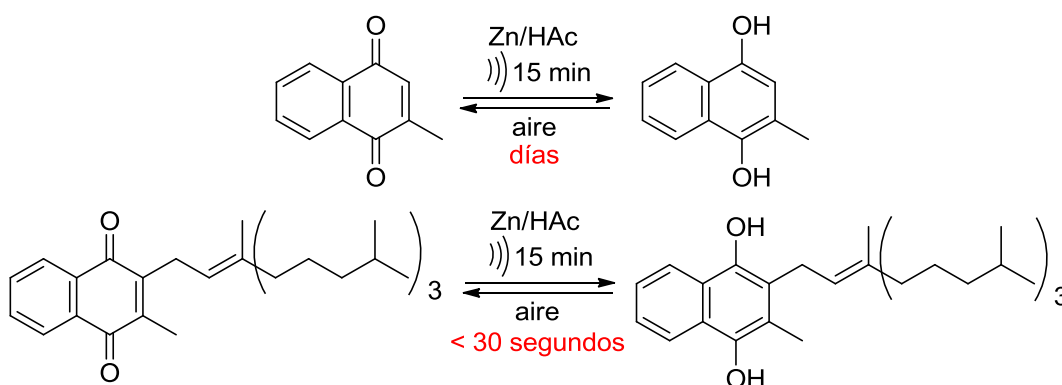
En el último cuarto de siglo, se reportaron análogos tioalquilados de vitamina K que demostraron promisorias propiedades medicinales, entre los que se incluyen actividades antitumorales.<sup>[6.23-25]</sup> Desde el primer reporte de la síntesis de la vitamina K1, realizada en forma independiente por los grupos de trabajo de Fieser, Binkley y Almquist y Klose, se han descrito una gran variedad de rutas sintéticas de la filoquinona. Sin embargo, muchas de ellas requieren un gran número de pasos sintéticos, con rendimientos globales pobres e isomerización del doble enlace de la cadena del fitilo.

#### 6.4.2.1 SÍNTESIS DE LA VITAMINA K1

La estabilidad de la vitamina K1 en condiciones atmosféricas normales se debe intrínsecamente a su estructura. Por otro lado, la vitamina K3 constituye estructuralmente el centro redox de las vitaminas K. La vitamina K3 también es un agente muy importante en la coagulación sanguínea, interviniendo en la síntesis de los factores VII, IX y X de la coagulación, junto con la protrombina. Esta vitamina también contribuye en la producción de glucógeno a partir de la glucosa hepática y puede desempeñar cierta interacción en la formación de un hueso y en la prevención de la osteoporosis.

Debido a las diferencias entre los potenciales de reducción y en un intento de buscar un rédito sintético, diseñamos un protocolo para obtener datos cualitativos de las tasas de reoxidación entre la vitamina K1 y la vitamina K3.

En un ambiente reductor proporcionado por Zn en polvo ( $E^0 = -0,76$  V) en ácido acético, forzamos la reducción de cada vitamina por separado asistida por ultrasonido. La reacción cursa en 15 minutos a temperatura ambiente, observando la decoloración de las naftoquinonas (amarillas en su forma oxidada a incolora en su forma reducida). A continuación se sometió ambas reacciones a la atmósfera y se tomó cada 30 segundos una muestra de la reacción para analizar la reoxidación por cromatografía en capa delgada de sílica gel, contra el patrón oxidado correspondiente. Mientras que para la vitamina K3 se observa una lenta reoxidación, la vitamina K1 presenta una elevada tasa de reoxidación, volviendo a su forma quinona en menos de 30 segundos (**Figura 6.19**).

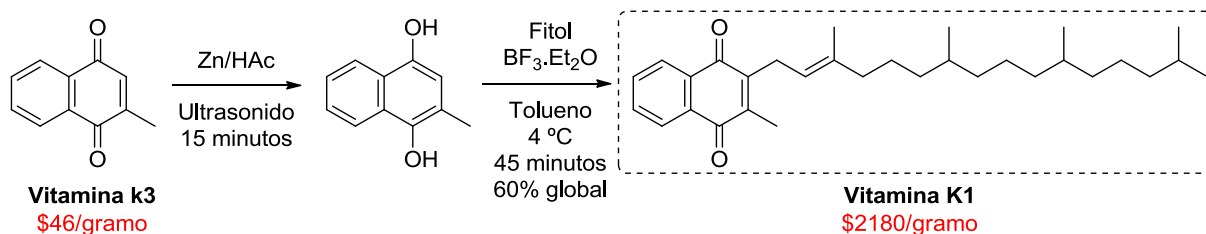


**Figura 6.19.** Ensayo de cualitativos de reoxidación.

Estas tasas de reoxidaciones diferenciales entre la vitamina K3 y la vitamina K1 constituyen una ventaja sintética que podría ser explotada. La combinación de esta propiedad con la reacción de Friedel-Crafts promueve una potencial accesibilidad sintética para obtener vitamina K1 o K2 a partir de la vitamina K3.

Utilizando la vitamina K3 como material de partida, se realizó la reducción con Zn en polvo en ácido acético asistida por ultrasonido. La reacción cursa en 15 minutos a temperatura ambiente, caracterizándose la rapidez, limpieza y alta eficiencia de la misma. Obtenido el menadiol (vitamina K3 reducida), sin purificar, se realiza la alquilación de Friedel-Crafts sobre la única posición *orto* libre del núcleo aromático. En esta etapa, la reacción cursa con rapidez, completándose en tan sólo 45 minutos con un 62% de

rendimiento global. La elevada tasa de reoxidación de la vitamina K1 provoca que todo el producto obtenido esté en su forma naftoquinónica, produciendo en un único paso la alquilación con el motivo fitilo y la posterior oxidación.



**Figura 6.20.** Síntesis de vitamina K1.

Como corolario, esta estrategia sintética es inédita para la preparación de vitaminas K o sus precursores y se posiciona como una novedosa, eficiente, rápida y limpia alternativa a todas las rutas de síntesis reportadas.

## 6.5 BIBLIOGRAFÍA


- 6.1. Brandt, U. (1999). "Proton translocation in the respiratory chain involving ubiquinone--a hypothetical semiquinone switch mechanism for complex I." BioFactors (Oxford, England) **9**(2-4): 95-101.
- 6.2. Hisa, T., Kimura, Y., Takada, K., Suzuki, F. and Takigawa, M. (1998). "Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon*, inhibits angiogenesis in vivo and in vitro." Anticancer research **18**(2A): 783-790.
- 6.3. Yao, X. S., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Kiuchi, F., Shibuya, M., Iitaka, Y., Seto, H. and Sankawa, U. (1991). "Biologically active constituents of *Arnebia euchroma*: structure of arnebinol, an ansa-type monoterpenylbenzenoid with inhibitory activity on prostaglandin biosynthesis." Chemical & pharmaceutical bulletin **39**(11): 2956-2961.
- 6.4. Wachter, G. A., Hoffmann, J. J., Furbacher, T., Blake, M. E. and Timmermann, B. N. (1999). "Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*." Phytochemistry **52**(8): 1469-1471.
- 6.5. Han, Q. B., Qiao, C. F., Song, J. Z., Yang, N. Y., Cao, X. W., Peng, Y., Yang, D. J., Chen, S. L. and Xu, H. X. (2007). "Cytotoxic prenylated phenolic compounds from the twig bark of *Garcinia xanthochymus*." Chemistry & biodiversity **4**(5): 940-946.
- 6.6. Meragelman, K. M., McKee, T. C. and Boyd, M. R. (2001). "Anti-HIV prenylated flavonoids from *Monotes africanus*." Journal of natural products **64**(4): 546-548.
- 6.7. Osorio, M., Aravena, J., Vergara, A., Taborga, L., Baeza, E., Catalan, K., Gonzalez, C., Carvajal, M., Carrasco, H. and Espinoza, L. (2012). "Synthesis and DPPH radical scavenging activity of prenylated phenol derivatives." Molecules **17**(1): 556-570.
- 6.8. Kang, S. Y., Lee, K. Y., Sung, S. H., Park, M. J. and Kim, Y. C. (2001). "Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships." Journal of natural products **64**(5): 683-685.
- 6.9. Verotta, L., Appendino, G., Belloro, E., Bianchi, F., Sterner, O., Lovati, M. and Bombardelli, E. (2002). "Synthesis and Biological Evaluation of Hyperforin Analogues. Part I. Modification of the Enolized Cyclohexanedione Moiety." Journal of natural products **65**(4): 433-438.
- 6.10. Nicolaou, K., Pfefferkorn, J., Schuler, F., Roecker, A., Cao, G. and Casida, J. (2000). "Combinatorial synthesis of novel and potent inhibitors of NADH:ubiquinone oxidoreductase." Chemistry & biology **7**(12): 979-992.
- 6.11. "<http://www.chemnetbase.com/>."
- 6.12. Anantachoke, N., Tuchinda, P., Kuhakarn, C., Pohmakotr, M. and Reutrakul, V. (2012). "Prenylated caged xanthenes: chemistry and biology." Pharmaceutical biology **50**(1): 78-91.
- 6.13. Mulzer, M., Lamb, J. R., Nelson, Z. and Coates, G. W. (2014). "Carbonylative enantioselective meso-desymmetrization of cis-epoxides to trans-beta-lactones: effect of salen-ligand electronic variation on enantioselectivity." Chemical communications **50**(69): 9842-9845.
- 6.14. Guanti, G., Banfi, L. and Riva, R. (1994). "Enzymatic asymmetrization of some prochiral and meso diols through monoacetylation with pig pancreatic lipase (PPL)." Tetrahedron: Asymmetry **5**(1): 9-12.
- 6.15. Zhang, S., Marshall, D. and Liebeskind, L. S. (1999). "Efficient Pd-Catalyzed Heterobenzylic Cross-Coupling Using Sulfonium Salts as Substrates and (PhO)(3)P as a Supporting Ligand." The Journal of organic chemistry **64**(8): 2796-2804.
- 6.16. Pettus, T. R. R., Inoue, M., Chen, X.-T. and Danishefsky, S. J. (2000). "A Fully Synthetic Route to the Neurotrophic Illicinones: Syntheses of Tricycloillicinone and Bicycloillicinone Aldehyde." Journal of the American Chemical Society **122**(26): 6160-6168.
- 6.17. Depew, K. M., Danishefsky, S. J., Rosen, N. and Sepp-Lorenzino, L. (1996). "Total Synthesis of Tryprostatin B: Generation of a Nucleophilic Prenylating Species from a Prenylstannane." Journal of the American Chemical Society **118**(49): 12463-12464.

- 6.18. Jäger, S., Porta, E. O. J. and Labadie, G. R. (En vías de publicación). "Tuning the acid catalyzed phenol prenylation as a molecular diversity tool."
- 6.19. Ishibashi, H., Ishihara, K. and Yamamoto, H. (2004). "A new artificial cyclase for polyprenoids: enantioselective total synthesis of (-)-chromazonarol, (+)-8-epi-puupehedione, and (-)-11'-deoxytaondiol methyl ether." Journal of the American Chemical Society **126**(36): 11122-11123.
- 6.20. Jäger, S. (2011). "Síntesis de compuestos prenilados con esqueletos estructurales variados." Tesina.
- 6.21. Jain, A. C. and Prasad, A. K. (1990). "Synthesis of amorilin (euchrenone a3) and 5,7-dihydroxy-6",6"-dimethyl-6,8-di-C-prenylpyrano[2",3",4',3']fla vanone." Indian Journal of Chemistry - Section B Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry **29**(6): 525-528.
- 6.22. (2013). "WHO Model List of Essential Medicines." [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML\\_18\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf?ua=1).
- 6.23. Kar, S., Adachi, T. and Carr, B. I. (2002). "EGFR-independent activation of ERK1/2 mediates growth inhibition by a PTPase antagonizing K-vitamin analog." Journal of cellular physiology **190**(3): 356-364.
- 6.24. Nishikawa, Y., Carr, B. I., Wang, M., Kar, S., Finn, F., Dowd, P., Zheng, Z. B., Kerns, J. and Naganathan, S. (1995). "Growth inhibition of hepatoma cells induced by vitamin K and its analogs." The Journal of biological chemistry **270**(47): 28304-28310.
- 6.25. Wei, G., Wang, M., Hyslop, T., Wang, Z. and Carr, B. I. (2010). "Vitamin K enhancement of sorafenib-mediated HCC cell growth inhibition in vitro and in vivo." International journal of cancer. Journal international du cancer **127**(12): 2949-2958.


## CAPÍTULO 7

### "DRUG TO GENOME TO DRUG"

2015




Malaria



En nuestro planeta cada 45 segundos muere un niño menor a 5 años de Malaria.

El reciclaje de fármacos ya en el mercado puede ser una solución para enfermedades olvidadas o raras



## 7. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS ISOPRENILADOS

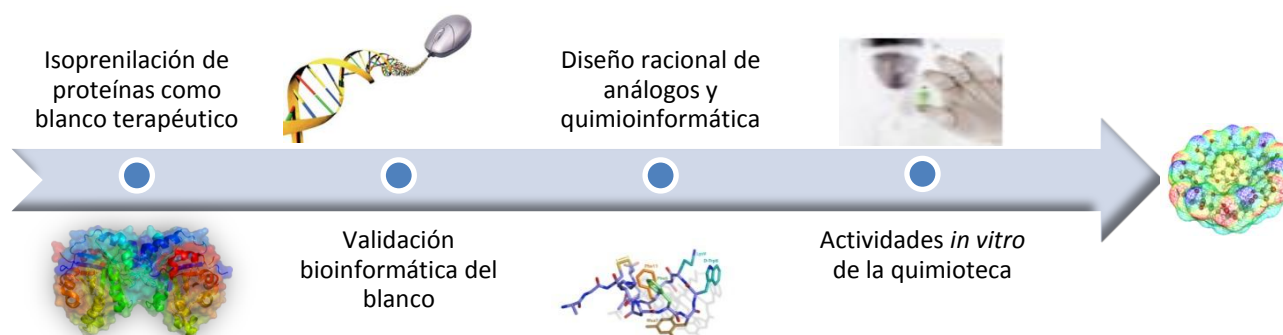
### 7.1 DIAGRAMA DE TRABAJO

El metabolismo de isoprenilación de proteínas es una modificación postraduccional clave para mantener la supervivencia de un organismo. En ese contexto, la búsqueda de inhibidores de esa ruta metabólica constituye una diana importante para la industria farmacéutica, sobre todo en el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer<sup>[7.1]</sup> y las ETDs.

Mediante la utilización de la vía de modificación postraduccional de proteínas por isoprenilación, el uso de un candidato a fármaco que se encuentra isoprenilado y en fases clínicas combinado con estrategias modernas de diseño de droga; nos propusimos desarrollar una quimioteca inédita con el objeto de encontrar nuevos candidatos para el desarrollo de fármacos contra enfermedades desatendidas.

La inspiración en una estructura conocida que se encuentra en estadios avanzados de fases clínicas tiene un enorme potencial para ser reposicionado. El reposicionamiento de fármacos es una concepción moderna que tiene basamento en encontrar nuevos usos terapéuticos para fármacos ya existentes. Este concepto vanguardista reduce sustancialmente los costos y tiempos asociados a todas las fases por la que debe pasar una entidad molecular para ser aprobados por los organismos de regulación. En este paradigma, trabajar con un medicamento ya existente, del que se conocen los efectos adversos, la toxicidad o la eficacia clínica constituye en una nueva piedra angular para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

El **Esquema 7.1** ilustra la estrategia propuesta para la generación de esa quimioteca.



**Esquema 7.1.** Estrategia abordada.

## 7.2 ESTRATEGIA "DRUG TO GENOME TO DRUG".

Como se hizo mención con anterioridad, la comunidad científica se enfrenta al reto de desarrollar nuevos fármacos, en parte motorizada por las constantes aparición de organismos resistentes a los principios activos comerciales o por la inexistencia o ineficacia de estos mismos. El avance de nuevas metodologías en la ingeniería de fármacos tiene como condición *sine qua non* los adelantos en la tecnología farmacéutica y el creciente número de organismos secuenciados, logros que permiten recorrer campos inexplorados en pos de obtener nuevos fármacos.

Existe un consenso mundial, fomentado por la Organización Mundial de la Salud y en círculos académicos, en desarrollar estrategias que combinen *Medium throughput assays* y técnicas basadas en el blanco molecular.<sup>[7.2, 7.3]</sup> En un intento de combinar las ventajas que poseen ambas metodologías, en el año 2011 se describió la estrategia "drug to genome to drug"<sup>[7.4, 7.5]</sup> como un novedoso e interesante enfoque para encontrar nuevos agentes quimioterapéuticos y reposicionar fármacos. En líneas generales, la estrategia consiste en realizar un cribado de una pequeña colección de compuestos que posee actividad en blancos conocidos en humanos y que tengan un ortólogo en los microorganismos a ensayar. Para ello, los autores de la estrategia plantean 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 inhibidores de perfil farmacológico y clínico conocido.

Como se observa en la **Figura 7.1**, las proteínas que se encuentran en la intersección entre el proteoma humano (negro), el del organismo a combatir (naranja) y las que son blanco de drogas de la farmacopea (violeta) será la zona de blancos ventajosos. Este conjunto de proteínas deberá contar con inhibidores que tienen estudios desarrollados de SAR, ADME, etc., para ser considerado un blanco privilegiado.

Desde una perspectiva global esta metodología se encuadra en el concepto de reposicionamiento de fármacos, combinado con síntesis dirigida a la biología para generar entidades químicas inspiradas en principios activos validados.

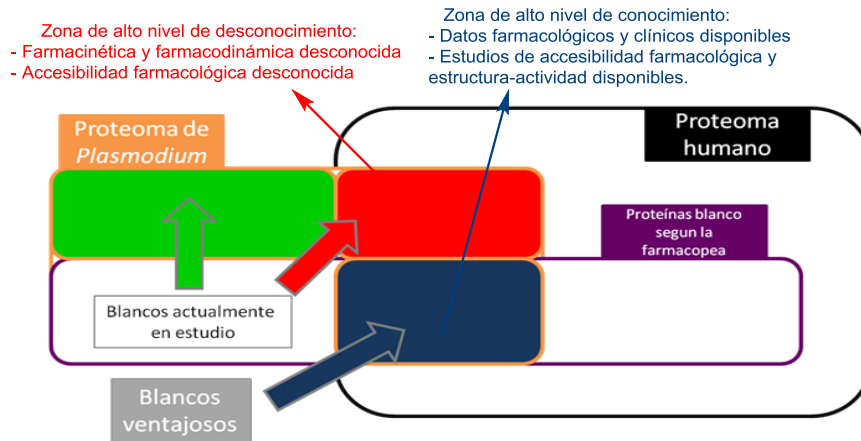
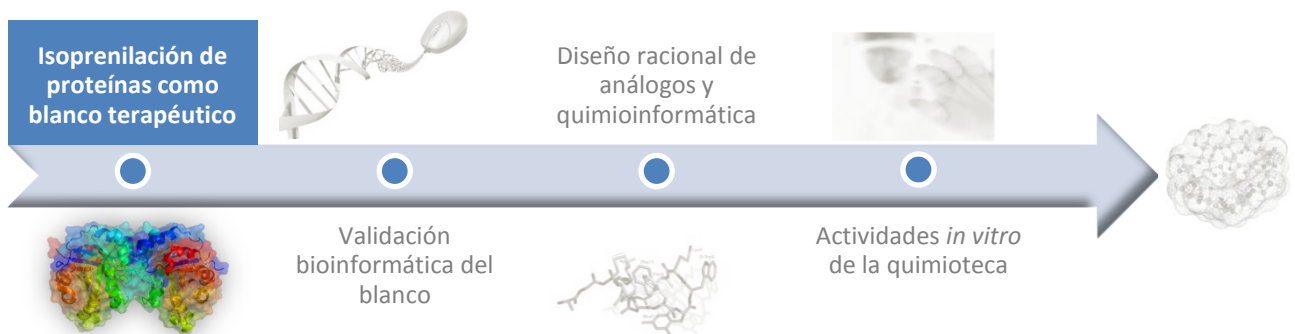


Figura 7.1. Racional de la estrategia de "drug to genome to drug" (adaptada de las referencias [7.2, 7.3])

Con este racional, Benoit Deprez y colaboradores sintetizaron una serie de análogos de Tadalafil (un potente inhibidor de la fosfodiesterasa humana, utilizada en casos de disfunción eréctil) con promisorias actividades antiplasmódicas, organismo en donde la fosfodiesterasa mostró ser el blanco de los compuestos preparados. Este trabajo ha dejado de manifiesto que la aproximación por *Drug to genome to drug* es un fértil terreno para la ingeniería de fármacos y la validación de nuevos blancos en diversos organismos.

### 7.3 ISOPRENILACIÓN DE PROTEINAS COMO BLANCO TERAPÉUTICO.



Como se mencionó en la introducción, se estima que más de 120 proteínas de mamíferos tienen motivos CAAX funcionales capaces de sufrir modificaciones postraduccionales mediante isoprenilación. En la misma línea, nuestros estudios bioinformáticos nos permitieron hallar 135 proteínas con capacidad de ser isopreniladas en *T. cruzi*.<sup>[7.6]</sup> En ambos casos, la mayoría de ellas cumplen roles en procesos de regulación celular, entre los que se incluyen la señalización, proliferación, migración celular, expresión

génica y el tráfico vesicular.<sup>[7.7, 7.8]</sup> Las proteínas CAAX incluyen GTPasas Ras y Rho, proteínas G y subunidades, proteína fosfatasa, fosfodiesterasas y lamininas nucleares, proteínas íntimamente relacionadas con la génesis tumoral. Esta modificación postraduccional consta de 3 pasos enzimáticos, que se resumen en la **Tabla 7.1**.

En los últimos años la enzima ICMT fue objeto de numerosos estudios debido al potencial que tiene como blanco para el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos, en particular, cuando el origen del cáncer se debe a transformaciones de proteínas Ras. Las mutaciones específicas encontradas en las proteínas Ras las vuelven oncogénicas y se encontrando en alrededor del 30% de todos los tumores humanos, incluyendo cerca del 90% de los cánceres de páncreas y en el 50% de los cánceres de colon.<sup>[7.9]</sup>

**Tabla 7.1. Pasos enzimáticos de la isoprenilación de proteínas**

<b>Paso enzimático</b>	<b>Características</b>
<b>Farnesilación o geranilgeranilación de motivos CAAX</b>	La farnesiltransferasa y la geranilgeraniltransferasa I son proteínas similares. Están formadas por dos subunidades: la subunidad alfa de 48 kDa, que es común para ambas enzimas, y la subunidad beta de 45 kDa, cuya identidad de secuencias es tan sólo del 25%. Estas enzimas reconocen el dominio CAAX en el extremo C-terminal de la proteína.
<b>Maduración proteolítica el extremo C-terminal isoprenilado</b>	La actividad proteasa del dominio CAAX están mediadas principalmente por Rce1 (por sus siglas en inglés, enzima convertidora de Ras y factor $\alpha$ ), una proteasa transmembrana del retículo endoplasmático, <sup>[7.10]</sup> y por la familia de proteínas Ste24p, una zinc metaloproteasa. <sup>[7.11]</sup> Se conocen desde el año 2013 la estructura cristalina del homólogo de Rce1 de <i>Methanococcus maripaludis</i> y de la STE24p de <i>Saccharomyces mikatae</i> . Sin embargo, es poca la información que se posee sobre la arquitectura enzimática y el mecanismo de este paso.
<b>Metilación de la isoprenilcisteína C-terminal.</b>	Catalizada por la Protein-s-isoprenilcisteín-O-metiltransferasa (ICMT, 32 kDa), el último paso consiste en la carboxil metilación de la cisteína isoprenilada terminal. Esta enzima se localiza en la membrana del retículo endoplasmático. El dador de metilo es la S-adenosil metionina (SAM).

Salirasib® (Ácido S-trans,trans-Farnesiltiosalicílico)<sup>[7.12]</sup> en un nuevo agente anticancerígeno que se encuentra en desarrollo por la empresa Concordia Pharmaceuticals Inc. con sede en Florida, USA. Salirasib® es un novedoso inhibidor de Ras, administrable por vía oral, indicado para el tratamiento de una amplia gama de neoplasias incluyendo páncreas, pulmón, colon y otros tipos de cáncer. Este compuesto posee un mecanismo de acción distinto a otros inhibidores de farnesiltransferasa (FTIs), ya que inhibe la unión de las isoformas de Ras a la membrana celular, un punto crítico en la vía de señalización. Fue

reportado inicialmente en 1995 como inhibidor de la enzima ICMT<sup>[7.13]</sup> y se encuentra actualmente en la etapa de pruebas clínicas.

El Salirasib<sup>®</sup> se erige como una molécula estructuralmente atractiva por su relativa simpleza, que la hace sintéticamente accesible y por poseer un motivo isoprenoide, una estructura privilegiada para el desarrollo de nuevos principios activos.

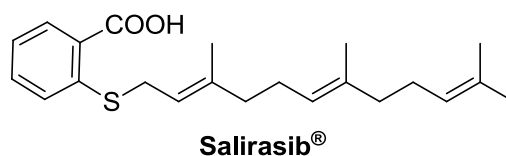
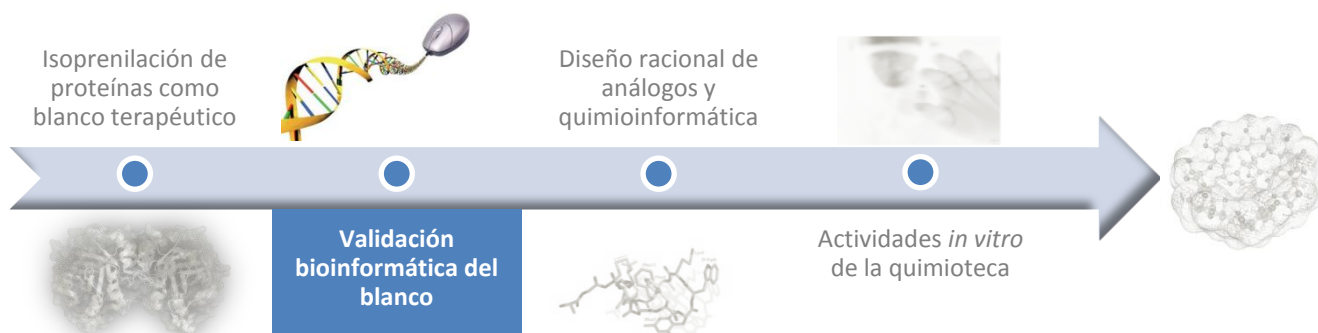


Figura 7.2. Estructura del Salirasib<sup>®</sup>

#### 7.4 VALIDACIÓN INFORMÁTICA DEL BLANCO.



El uso de herramientas bioinformáticas, particularmente de genómica y proteómica comparativa, fueron de vital importancia para poder validar el blanco de acción propuesto para el desarrollo de nuestra quimioteca inspirada en el Salirasib<sup>®</sup>. Principalmente la validación debe hacerse por tratarse de enzimas presentes en organismos filogenéticamente distintos, separados en eventos de especiación muy distantes en el tiempo.

Enmarcado entre las herramientas bioinformáticas, el alineamiento de secuencias primarias de aminoácidos es aplicado en el diseño de fármacos cuando se complementa con la información proveniente de la estructura tridimensional del blanco. Puntualmente en el caso de la ICMT, debido a la dificultad de cristalizar proteínas de membrana, únicamente se conoce una sola estructura cristalina proveniente del organismo arquea *Methanosarcina acetivorans* (*Ma*-ICMT).<sup>[7.14, 7.15]</sup> El profesor David Barford, del Instituto de Investigación en Cáncer de Londres, combinando los resultados de la difracción de rayos X de la *Ma*-ICMT cristalizada y el análisis de alineamiento de secuencias demostró que la estructura hallada es un buen modelo para el estudio en organismos eucariotas.<sup>[7.14]</sup> Complementando estos

datos, nuestros estudios bioinformáticos indican que existe un 32% de identidad y un 50% de semejanza entre la secuencia primaria de *Ma*-ICMT<sup>[7.15]</sup> y su análoga humana (*Hs*-ICMT).<sup>[7.16]</sup> El valor *e* del alineamiento es de  $2 \times e^{-6}$ , indicando una homología significativa. En la **Figura 7.3** se observa total de los aminoácidos involucrados en el sitio de unión al sustrato y al cofactor.

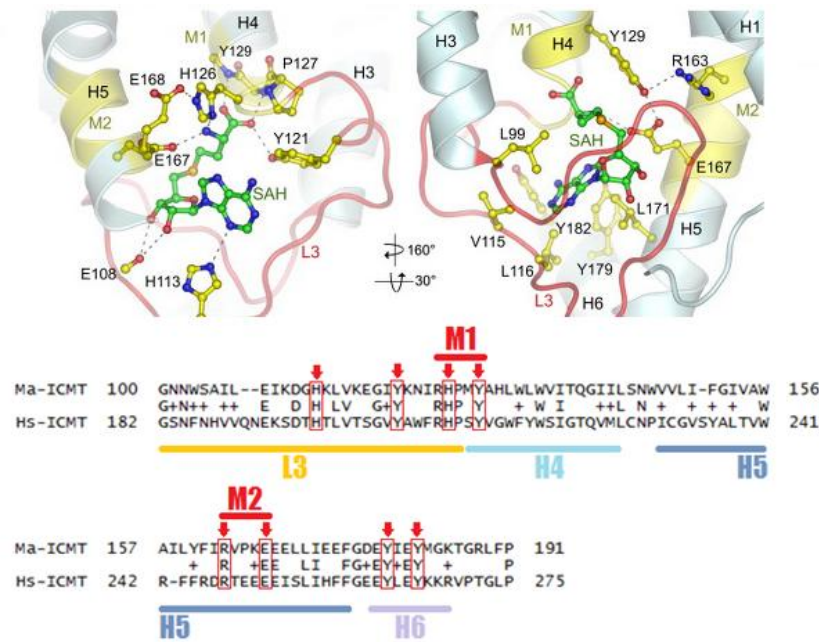
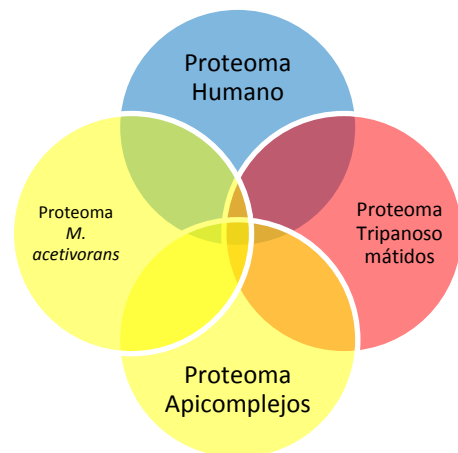


Figura 7.3. Arriba: Estructural de la ICMT de *M. acetivorans* con el sustrato y el cofactor. Adaptada de la referencia <sup>[7.14]</sup>. Abajo: Alineamiento de la secuencias de *Ma*-ICMT y *Hs*-ICMT. En rojo se observan los aminoácidos conservados del sitio de unión a sustrato y al SAM.

En una extensión de los estudios bioinformáticos se complementó la búsqueda con las secuencias homólogas en otros organismos de importancia en la salud pública mundial (*T. cruzi*,<sup>[7.17]</sup> *T. brucei*,<sup>[7.18]</sup> *L. donovani*,<sup>[7.19]</sup> *T. gondii*<sup>[7.20]</sup> y *P. falciparum*<sup>[7.21]</sup>), utilizando un enfoque heurístico (BLAST). A continuación se refinaron los alineamientos múltiples con enfoque progresivo en T-coffee. Todas las secuencias halladas corresponden a proteínas funcionales pertenecientes a la superfamilia de las ICMT y poseen el sitio de unión a sustrato conservado



(entre los aminoácidos 91-151 y 160-279). Existe además una completa conservación de los aminoácidos involucrados en el sitio activo y los que interaccionan con el cofactor SAM.

Los resultados muestran un 35% de identidad (y 51% de semejanza) entre las secuencias primarias de *Hs-ICMT* y los ortólogos en tripanosomátidos que causan dolencias en los hospederos humanos (en particular, *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. donovani*) y un 36% de identidad (y 54% de semejanza) entre la forma humana y la de apicomplejos infectivos (en particular, *T. gondii* y *P. falciparum*). Estos valores aumentan considerablemente cuando se analizan los dominios involucrados en el sitio catalítico. Un análisis detallado de estos estudios nos permitió observar el alto valor de *score* (90/100) que hay en el alineamiento de la región del sitio activo de las secuencias de tripanosomátidos, apicomplejos, humana y del archa modelo (**Figura 7.4**). Ente hecho nos permite concluir que el dominio catalítico de la enzima está altamente conservado a lo largo de la evolución.



Figura 7.4. Alineamiento de secuencias múltiple del sitio activo de ICMT de diferentes organismos realizado con enfoque progresivo.

Por otro lado, un árbol filogenético es una estructura que muestra las relaciones evolutivas entre especies que tienen una ascendencia común. La construcción se realiza

usando métodos cladísticos. Este tipo de árbol sólo representa un patrón de ramificación, es decir, que la longitud de sus ramas no representa el tiempo en donde ocurrió la especiación.

Con el objetivo de expandir los estudios de la IMTC, se preparó un árbol filogenético con las secuencias de los organismos de estudio utilizando el software ClustalW2. En la **Figura 7.5**, se observa el resultado de este estudio. Como se puede observar la construcción de este cladograma las divergencias entre los organismos coincide con los eventos de especiación sostenidos entre ellos. En líneas generales se abre la posibilidad de estudiar la factibilidad de utilizar las secuencias de ICMT como marcador filogenético.

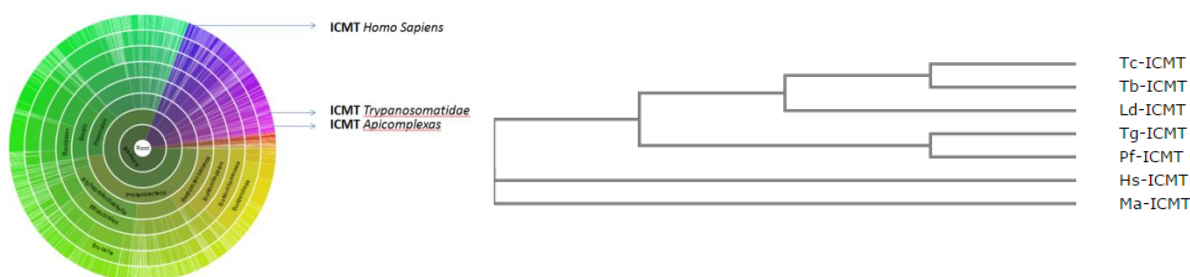
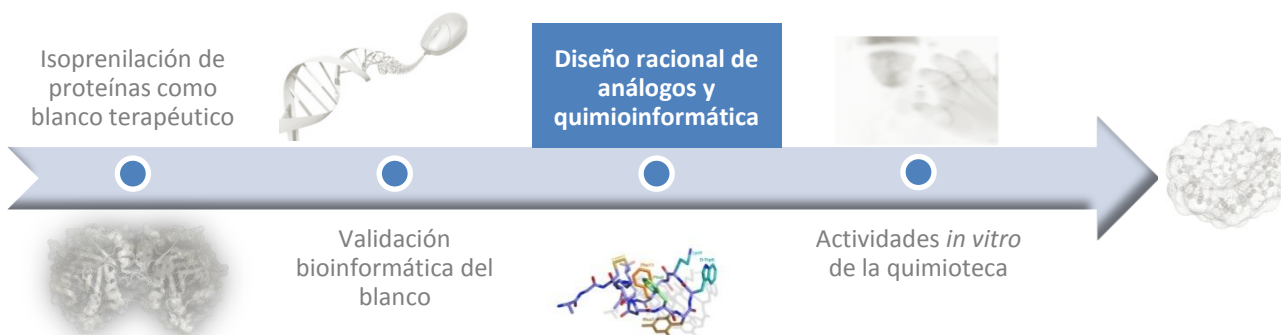


Figura 7.5. Árbol filogenético de las especies estudiadas, utilizando ICMT como marcador molecular.

En conclusión, con el aporte de los resultados bioinformáticos realizados, se puede afirmar que ICMT es un blanco idóneo para el reposicionamiento de fármacos (y una consecuente reingeniería) utilizando el concepto de "drug to genome to drug" con foco en la generación de nuevos compuestos antiparasitarios. De la misma manera, la síntesis de una biblioteca de análogos de Salirasib<sup>®</sup>, constituirá *ex profeso* en un pilar fundamental en la búsqueda de no sólo novedosos agentes antiparasitarios, sino también, de entidades moleculares anticancerígenas.

## 7.5 DISEÑO RACIONAL Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS.



El ácido S-trans-trans-farnesiltiosalicilato (AFTS) fue diseñado para mimetizar el motivo farnesilo en el extremo C-terminal de Ras23.<sup>[7.13]</sup> Experimentos posteriores demostraron que induce una deslocalización de la membrana celular con su consecuente degradación.<sup>[7.22]</sup> Posteriormente, el Prof. Yoel Kloog reportó nuevos análogos de Salirasib®, constituidos por derivados del ácido carboxílico de dicha molécula.<sup>[7.23]</sup> El derivado amida del AFTS tuvo buena actividad en la inhibición de crecimiento tumoral de células pancreáticas y cerebrales. Alternativamente, el grupo del Prof. Casey ha reportado <sup>[7.7]</sup> que la sustitución por un grupo amino del grupo acetamido en el derivado del indol desarrollado previamente, mejoraba notablemente la farmacocinética del líder que poseía un grupo acetamido.<sup>[7.24]</sup> Es de destacar que todos estos compuestos fueron sintetizados previamente a la elucidación de la estructura cristalográfica de la ICMT.

Por otro lado, el análisis de la estructura cristalográfica de la *Ma*-ICMT con el sustrato nos permiten observar que la proteína sustrato acomoda su extremo carboxi-terminal (que se halla isoprenilado) en una región de baja polaridad del túnel de sustrato de la ICMT. En esta posición ese extremo C-terminal se encuentra en línea directa con el metilo reactivo del SAM para que ocurra la metilación. Por otra parte, el dominio isoprenilo se ancla en la región superior del túnel de sustratos que es altamente hidrofóbica.

En base a estos datos postulamos un diseño para el desarrollo de nuevos análogos que consiste en mantener el núcleo el ácido tiosalicílico y producir variabilidad en la cadena lateral.

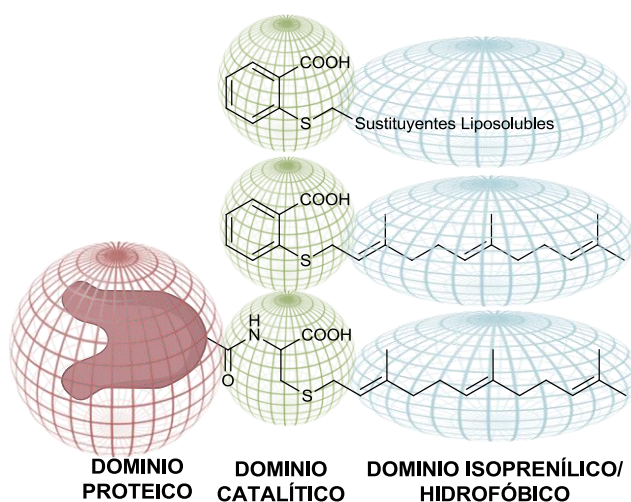
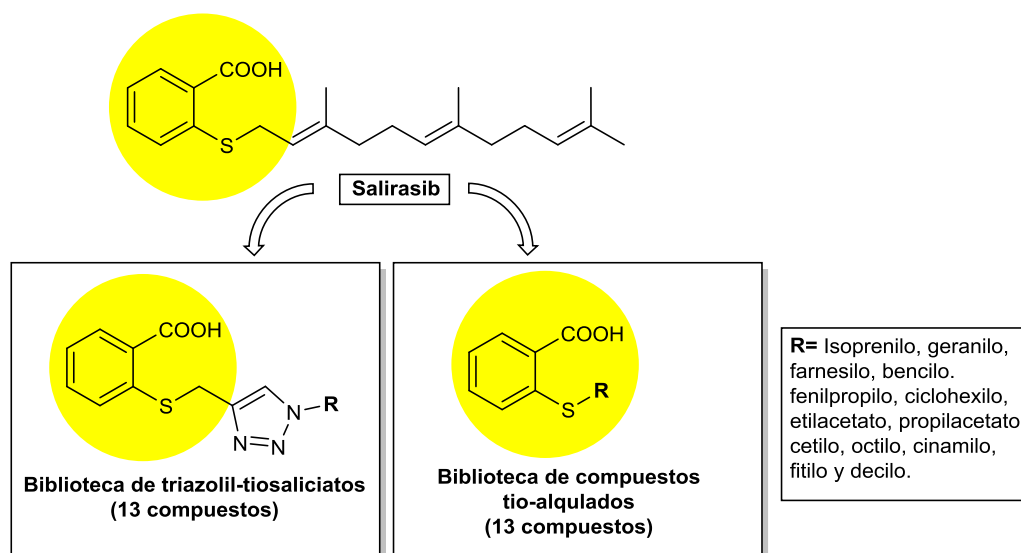


Figura 7.6. Diseño basado en síntesis orientada a la biología.

La elección de los sustituyentes en la cadena lateral fue basada en dos estrategias. Por un lado, la exploración de un conjunto diverso para cubrir un amplio rango de demandas estéricas y electrónicas y por otro escogiendo los sustituyentes con parámetros fisicoquímicos adecuados para la ICMT, según los inhibidores reportados en la literatura.

La preparación de las nuevas colecciones requerirá entonces de la introducción de grupos químicos de la cadena lateral utilizando dos tipos de reacciones:

- 1- Alquilaciones directas sobre el átomo de azufre generando estructuras inspiradas en el grupo tioeter del Salirasib®.
- 2- Reacciones de cicloadiciones 1,3-dipolares catalizadas por Cu(I): introducción de un motivo que actúa como *linker*, la rigidez estructural del triazol emula al doble enlace proximal al átomo de azufre.



**Esquema 7.2.** Racional para la preparación de los análogos de Salirasib®

### 7.5.1 FAMILIA DE COMPUESTOS TIO-ALQUILADOS (FTA)

En un primer intento se optimizaron las condiciones de S-alkilación, para la generación de la biblioteca FTA. Para ello, se utilizó como material de partida el ácido tiosalicílico y el bromuro de propargilo como agente alquilante. Las condiciones de alquilación deben ser estrictamente reguladas para que no ocurra una doble alquilación (sobre el átomo de azufre y sobre el grupo carboxílico). Se ensayaron distintas condiciones modificando la base y el solvente con el objetivo de lograr la selectividad buscada. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la **Tabla 7.2**. Las condiciones de la entrada

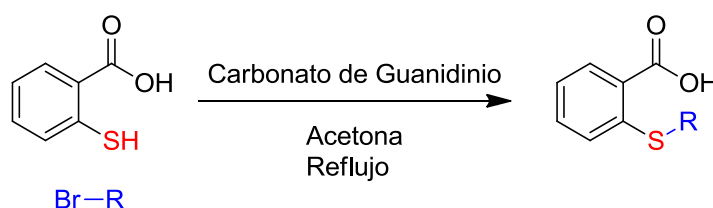
5 produjeron los mejores resultados generando el producto en 70 % de rendimiento, siendo la elegida para generar la biblioteca de compuestos S-alquilados.<sup>[7.13]</sup>

Tabla 7.2. Optimización de la reacción de S-alquilación del ácido tiosalicílico.

Entrada	Condiciones <sup>a</sup>	Resultados
1	KOH (1 eq.) Agua	No ocurre reacción
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1 eq.) Agua	No ocurre reacción
3	KOH (1 eq.) Metanol	Productos de descomposición
4	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1 eq.) Metanol	Producto de dialquilación
5	Cloruro de guanidinio(1 eq.) Acetona	Producto de S-alquilación, 70% de rendimiento

<sup>a</sup>) ácido tiosalicílico (1 eq.) y bromuro de propargilo (1eq.), reflujo, 12 h.

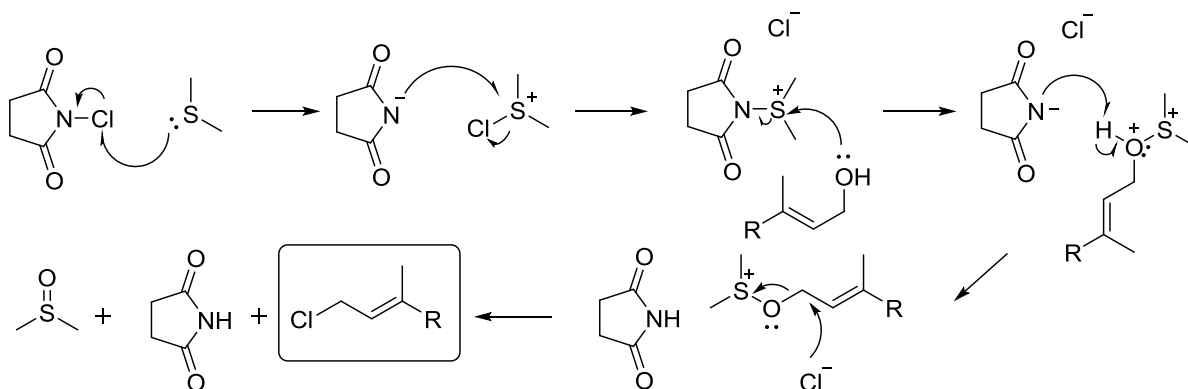
Habiendo optimizado la condición de S-alquilación nos abocamos a sintetizar una colección de 12 nuevos análogos y del Salirasib® (**Esquema 3**). Utilizando diversos halogenuros, las reacciones de alquilación cursaron en general sin contratiempos, siendo el rendimiento promedio de los productos purificados del 78%.



**Esquema 7.3.** Obtención de análogos de Salirasib® por alquilación de ácido tiosalicílico.

En particular, debido a inestabilidad de los halogenuros de isoprenilos (con la excepción del 1-bromo-3-metilbut-2-eno) para sintetizar de los compuestos **4**, **5**, **12** y **13** fue necesario preparar el cloruro alílico en un paso anterior a la alquilación. Usando las condiciones de Corey-Kim<sup>[7.25]</sup> se mezclaron el isoprenol con N-clorosuccinimida (NCS) y dimetilsulfuro (DMS) en diclorometano (DCM) anhidro a -40°C. El cloruro obtenido se utilizó, sin purificar, en la reacción de S-alquilación. El primer paso del mecanismo de la halogenación de Corey-Kim involucra una reacción S<sub>N</sub>2 entre el DMS nucleofílico y el cloro electrofílico del NCS, para formar el intermediario cloruro de sulfonio y el anión succinimidato. El anión ataca al sulfonio, produciendo la extrusión del cloruro y formando un nuevo intermediario sulfonio. Este agente es atacado por el alcohol nucleofílico del sustrato alílico, formando el anión succinimidato nuevamente y la especie oxonio.

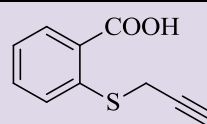
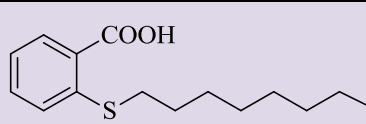
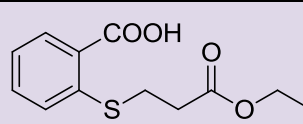
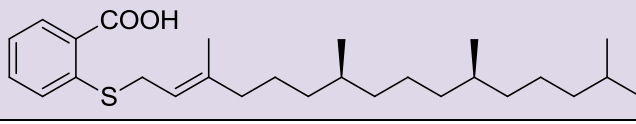
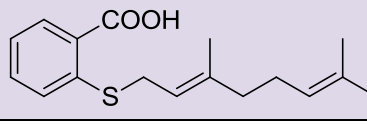
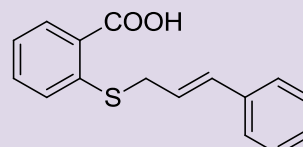
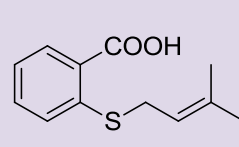
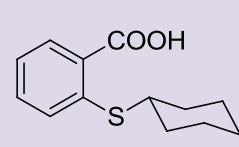
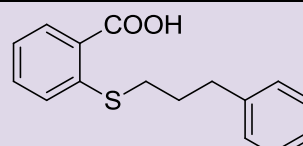
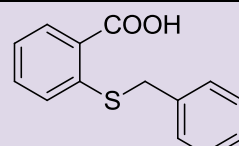
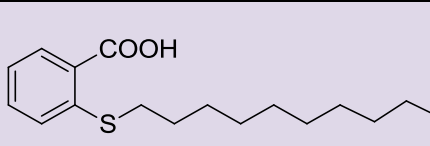
En un siguiente paso, el oxonio es deprotonado por el anión, generando una sal alcoxisulfonio. En ausencia de base que deprotone la especie, el cloruro ataca al carbono deficiente de electrones alfa al oxígeno, liberando DMSO y produciendo el compuesto de interés (**Esquema 7.4**).



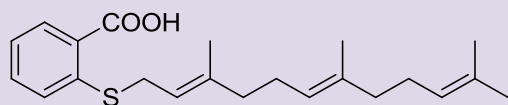
**Esquema 7.4.** Mecanismo de reacción de Corey-Kim.

Los productos sintetizados, purificados y caracterizados se muestran en la **Tabla 7.3**, informándose además su rendimiento.

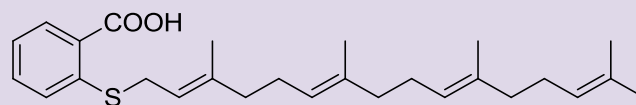
Tabla 7.3. Análogos sintetizados de la biblioteca **FTA** y rendimientos en la reacción.

<b>COMPUESTO 1</b> (70%)	<b>COMPUESTO 2</b> (83%)	<b>COMPUESTO 3</b> (78%)
		
<b>COMPUESTO 4</b> (85%)	<b>COMPUESTO 5</b> (88%)	
		
<b>COMPUESTO 6</b> (68%)	<b>COMPUESTO 7</b> (72%)	<b>COMPUESTO 8</b> (87%)
		
<b>COMPUESTO 9</b> (75%)	<b>COMPUESTO 10</b> (73%)	<b>COMPUESTO 11</b> (81%)
		

COMPUESTO 12 (79%)

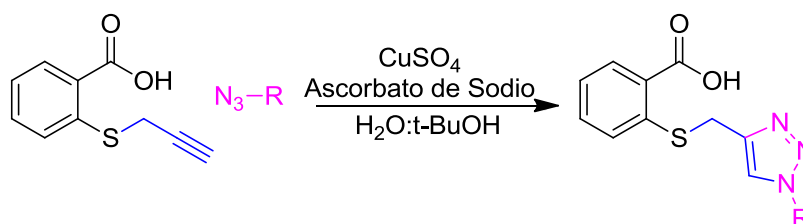


COMPUESTO 13 (85%)



### 7.5.2 FAMILIA DE COMPUESTOS TRIAZOLIL-TIOSALICILATOS (FTT)

Las cicloadiciones 1,3-dipolares catalizadas por Cu(I), se realizaron funcionalizando la cadena lateral con un alquino terminal (compuesto **1**) y utilizando diferentes azidas para generar diversidad (**Esquema 7.5**). Las azidas seleccionadas respetan los patrones estructurales utilizados en la biblioteca anterior, a fin de obtener colecciones de compuestos comparables. En condiciones de reacción de Sharpless, se prepararon un total de 12 productos finales con un rendimiento promedio del 85% en la etapa de cicloadición.

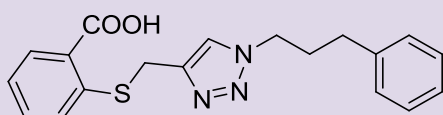


**Esquema 7.5.** Esquema sintético de los análogos de Salirasib® que contienen un anillo triazólico

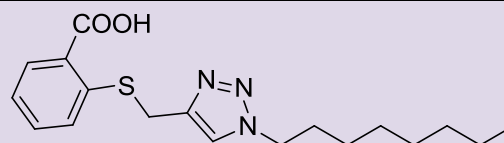
Los productos sintetizados, purificados y caracterizados se muestran en la siguiente **tabla 7.4**. Se informa además el rendimiento de cada compuesto en la etapa de cicloadición dipolar.

Tabla 7.4. Análogos sintetizados de la biblioteca FTT

COMPUESTO 14 (88%)

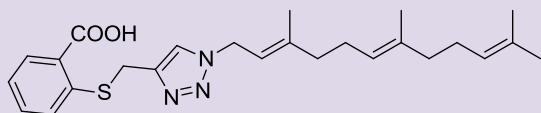
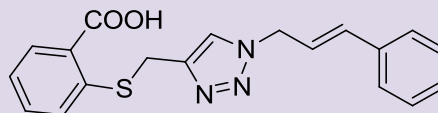
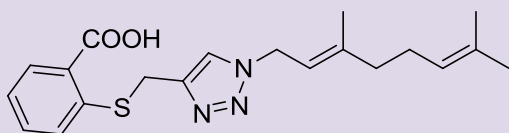
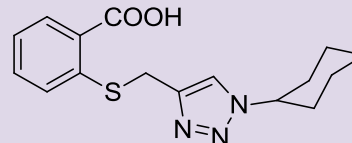
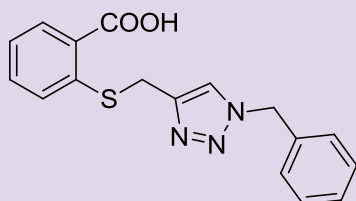
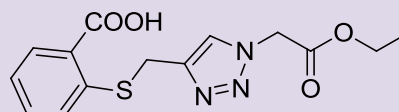
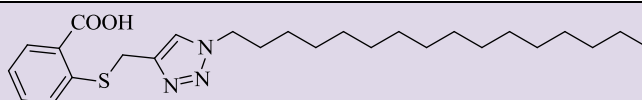
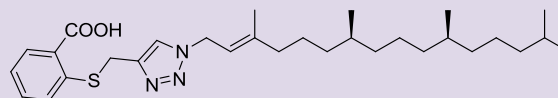
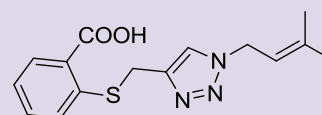
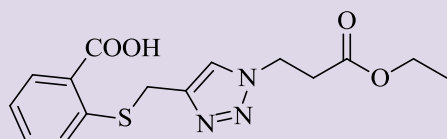


COMPUESTO 15 (78%)



COMPUESTO 16 (90%)

COMPUESTO 17 (86%)


**COMPUESTO 18 (84%)**

**COMPUESTO 19 (84%)**

**COMPUESTO 20 (80%)**

**COMPUESTO 21 (92%)**

**COMPUESTO 22 (81%)**

**COMPUESTO 23 (83%)**

**COMPUESTO 24 (91%)**

**COMPUESTO 25 (89%)**


## 7.5.3 ESTUDIOS QUIMIOINFORMÁTICOS







### 7.5.3.1 AGRUPAMIENTO DE COMPUESTOS POR SIMILARIDAD ESTRUCTURAL

Debido a que el diseño de las quimiotecas está inspirado en un único principio activo, resultó conveniente calcular la similitud estructural de la misma y ponderar la diversidad de la colección utilizando el software ChemMine Tools.<sup>[7.26]</sup>

Los compuestos sintetizados fueron agrupados en clústeres estructurales según su similitud de acuerdo al coeficiente definido por Tanimoto. El programa utiliza 3 descriptores para llevar a cabo esta tarea. El primer descriptor es el de pares de átomos, que se define como la distancia más corta entre átomos distintos al hidrógeno, el número de electrones  $\pi$  que contiene y el número de enlaces a otros átomos. El segundo descriptor es el de las huellas digitales binarias, un sistema basado en el conocimiento en el que cada bit denota la

presencia o ausencia de un fragmento o característica subestructural. El último descriptor es el de la subestructura común máxima, un concepto basado en la similitud gráfica que se define como la máxima subestructura compartida entre dos moléculas.

En la **Figura 7.7** se observan las agrupaciones que se producen cuando se grafica la distribución de los 25 compuestos en función de estos tres descriptores y tomando un corte de similitud de 0,5 (índice de Tanimoto  $\geq 0,5$ ). Como resultado de estos cálculos se obtuvieron 6 clústeres de agrupaciones diferentes (moléculas con alta similitud estructural):

-  **Clúster 1:** Compuestos **5, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 25** y Salirasib®. Agrupación más numerosa, estructuralmente similar al Salirasib®;
-  **Clúster 2:** Compuestos **2, 8** y **11**. Agrupación de S-alkil-tiosalicilatos sustituidos con hidrocarburos alifáticos de al menos 6 átomos carbono (dos lineales y uno cíclico);
-  **Clúster 3:** Compuestos **4** y **23**. Agrupación de derivados de fitilo.
-  **Clúster 4:** Compuestos **6, 9** y **10**. Familia de compuestos de FTA alquilados con sustituyentes aromáticos.
-  **Clúster 5:** Compuestos **14, 17** y **20**. Análogo al clúster 4, pero con compuestos provenientes de la familia FTT.
-  **Clúster 6:** Compuestos **1, 3** y **7**. Unidades estructurales con similitudes de Tanimoto menor a 0,5 con respecto al resto de la colección.

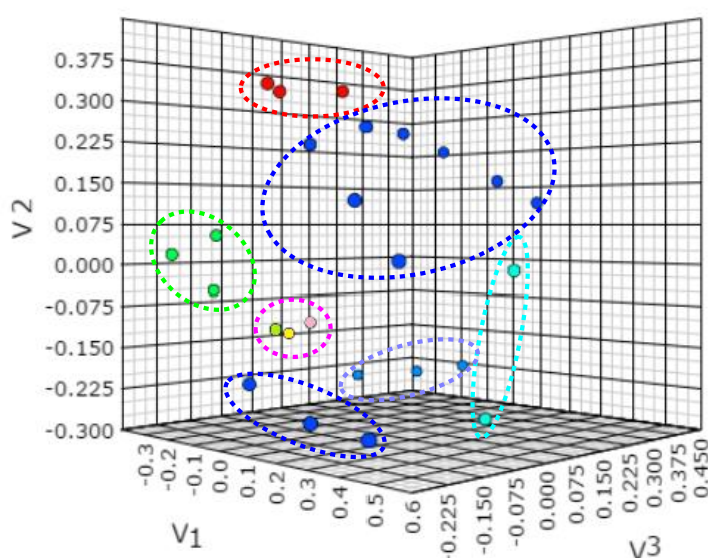


Figura 7.7. Distribución de clústeres.

Para completar este análisis se alinearon los mapas de huellas digitales de cada estructura y se preparó un mapa de calor acompañado por un cladograma de la colección. De modo similar a un árbol filogenético, estos datos permiten desarrollar una matriz la similitud global y local de la quimioteca preparada (**Figura 7.8**).

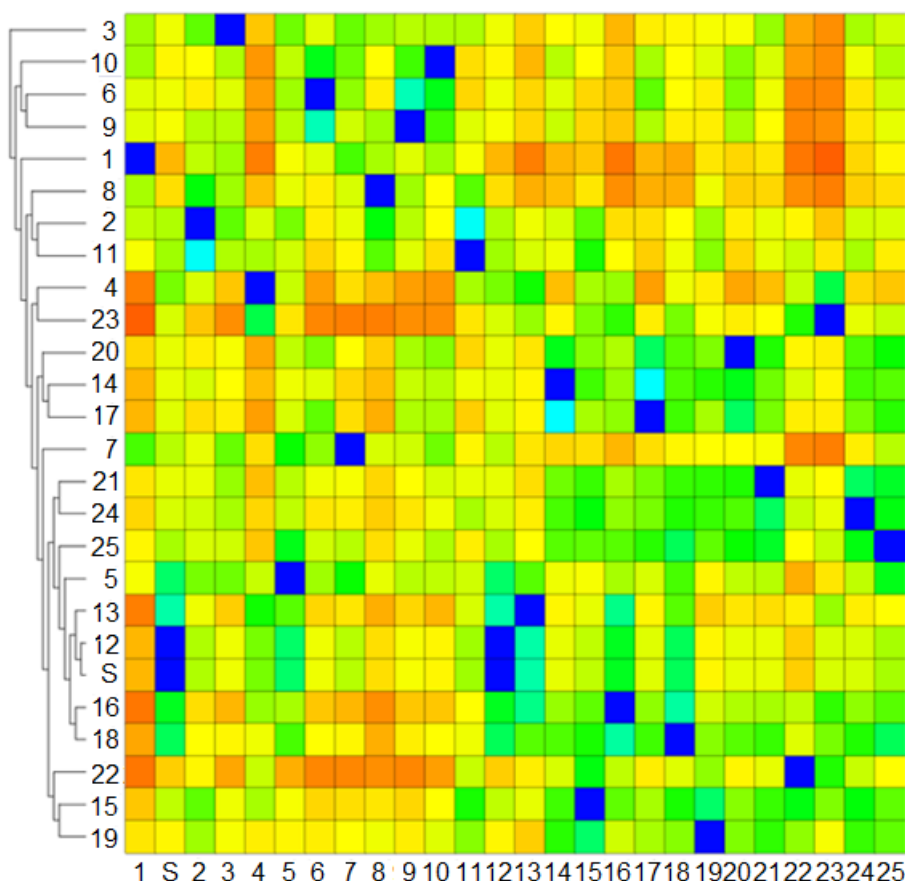


Figura 7.8. Mapa de calor y cladograma de la quimioteca preparada. En azul compuestos con índices de Tanimoto igual a 1, hacia el rojo compuestos con índices de Tanimoto menor a 0,25.

### 7.5.3.2 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LA QUIMIOTECA.

Inspirados en la estructura del Salirasib®, las colecciones generadas fueron desarrolladas buscando tener parámetros fisicoquímicos adecuados para unirse a la enzima ICMT e idealmente constituirse como moléculas con promisorias actividades biológicas. Por tal motivo fue imperioso realizar un análisis profundo de los parámetros fisicoquímicos de todos los inhibidores reportados para esta diana molecular. En ese contexto, la base de datos ChEMBL<sup>[7.27]</sup> resultó una herramienta indispensable para llevar a cabo esta tarea. Esta base de datos es mantenida por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI, por sus siglas en

inglés), del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL, por sus siglas en inglés) y es depurada manualmente.<sup>[7.28]</sup> La búsqueda en ChEMBL permitió encontrar 342 estructuras reportadas que se unen a la isoforma humana de ICMT. Seguidamente se graficó la distribución de distintos parámetros fisicoquímicos relevantes (peso molecular, área superficial polar y LogP) que poseen estos compuestos de probada actividad. (Figura 7.9)

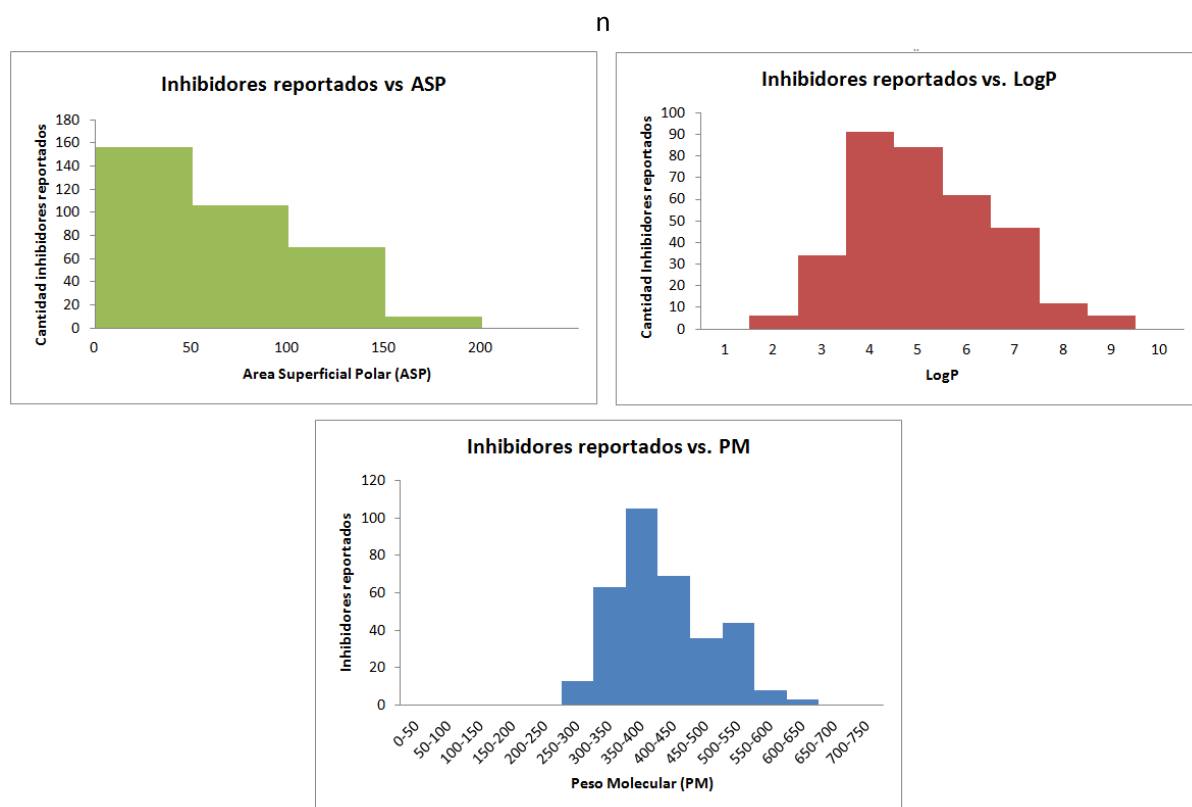


Figura 7.9. Perfiles fisicoquímicos de los inhibidores de ICMT reportados en la literatura.

El análisis pormenorizado de los gráficos desprende que la demanda estérica y electrónica de la enzima ICMT requiere de moduladores que poseen un peso molecular promedio de 375 umas, un LogP centrado en 4,5 y un área superficial polar menor a  $100 \text{ \AA}^2$ , con un cierto nivel de tolerancia en cualquiera de estas tres propiedades. En nuestro caso, los compuestos preparados tienen una PM promedio de 340 umas, un valor de LogP centrado 3,8 y un área superficial menor a  $100 \text{ \AA}^2$ . Si bien estos resultados no son concluyentes y requieren una validación experimental, es altamente promisorio que al menos un 80% de los compuestos preparados tienen perfiles fisicoquímicos óptimos para unirse a la ICMT (Figuras 7.10).

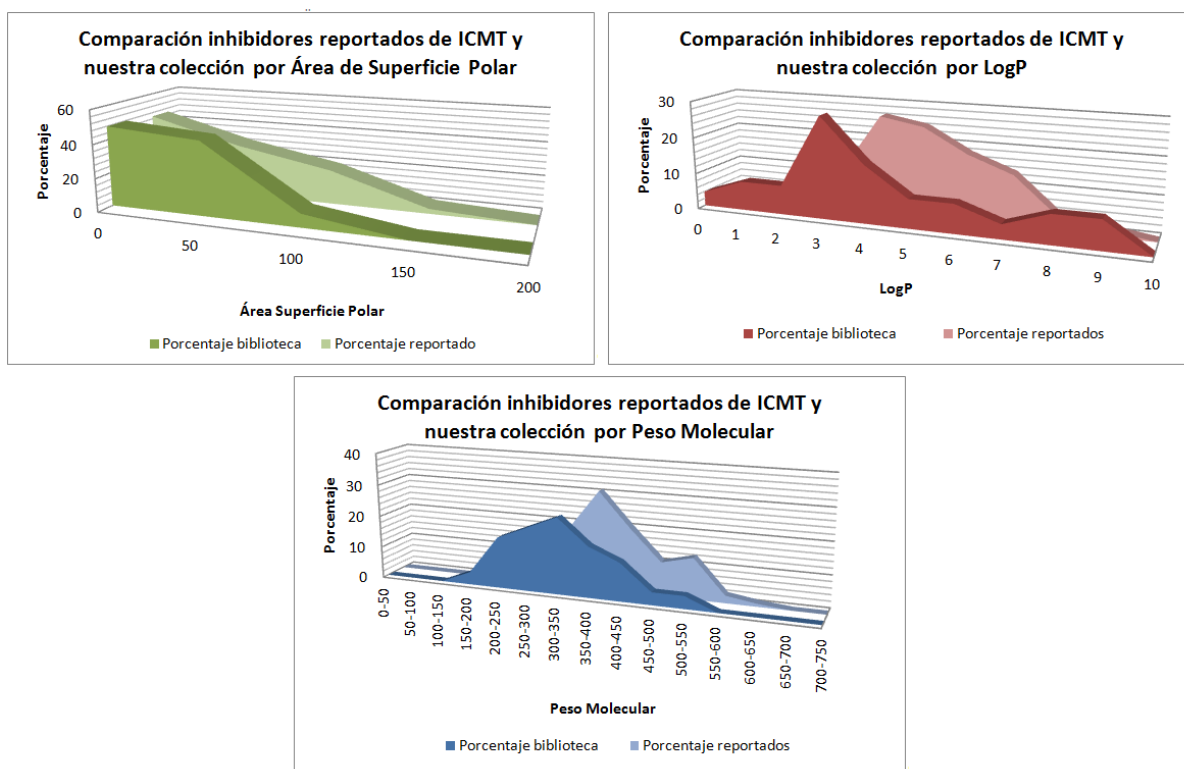


Figura 7.10. Comparación de los parámetros físicoquímicos entre nuestra colección y los inhibidores de ICMT reportados en la literatura.

Estos resultados, en conjunto con las actividades biológicas, nos permitirán seleccionar los mejores candidatos de la biblioteca preparada y elaborar un perfil de estructura-actividad más minucioso.

Por último, se debe destacar que la simulación de descriptores toxicológicos mostró que ninguno de los compuestos tienen potencial actividad mutagénica, tumorigénica, no producirían irritabilidad y no poseerían capacidad de producir defectos reproductivos. En cuanto a su bioactividad, la predicción revela que estas estructuras constituirían buenos inhibidores enzimáticos.

## 7.6 ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD *IN VITRO* DE LAS QUIMIOTECAS.



### 7.6.1 RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y ANTIPLASMÓDICA.

Una vez finalizada la etapa de síntesis y caracterización, se determinó la actividad la quimioteca contra *Plasmodium falciparum*, se ensayó la citotoxicidad sobre células VERO y contra diferentes líneas celulares humanas tumorales. Estos últimos fueron realizados merced a la colaboración establecida con el Prof. José Padrón (BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica, Universidad de la Laguna, España). A su vez, los ensayos de la colección de compuestos en *Plasmodium falciparum* (durante el ciclo eritrocítico del parásito), fueron efectuados por el autor de este trabajo gracias a una pasantía realizada en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo (ICB-USP, São Paulo, Brasil), bajo la tutela del Prof. Dr. Alejandro Katzin y su grupo de trabajo. El protocolo utilizado para las pruebas de actividad biológica fue la técnica del SybrGreen®, combinado con microscopía óptica, sincronizando los parásitos en el estadio anillo en el día.

Los ensayos de citotoxicidad de los compuestos en células VERO fueron realizados en colaboración con el Prof. Dr. Babu Tekwani del Centro Nacional para la Investigación de Productos Naturales de la Universidad de Mississippi (Oxford, Mississippi, Estados Unidos). Ninguno de los compuestos resultó citotóxico a la máxima concentración ensayada de 4,75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En el siguiente mapa de calor se muestran los resultados de actividad biológica de los 25 análogos ensayados, el puntaje como potencial fármaco y el clúster al que pertenece.

Tabla 7.5. Mapa de calor de la biblioteca de análogos de Salirasib®

COMPUESTO	"Drug score"	IC <sub>50</sub> <i>P. falciparum</i> (μM)	IC <sub>50</sub> líneas celulares (μM)					Cluster
			A549	HeLa	SW1573	T-47D	HBL-100	
1	0.61	3,6	>100	>100	>100	>100	>100	6
2	0.31	0,78	>100	100	>100	>100	>100	2
3	0.45	Estimula	>100	>100	>100	>100	>100	6
4	0.13	7,2	14	12	15	18	14	3
5	0.31	23,1	>100	>100	>100	>100	>100	1
6	0.43	46,9	>100	>100	>100	>100	>100	4
7	0.56	21	>100	>100	>100	>100	>100	6
8	0.41	22,8	>100	>100	>100	>100	>100	2
9	0.43	19,1	>100	>100	>100	>100	>100	4
10	0.4	21,8	>100	>100	>100	>100	>100	4
11	0.23	14,3	>100	>100	>100	>100	>100	2
12	0.2	14	34	34	41	42	22	1
13	0.15	12	38	29	37	41	23	1
14	0.4	2,6	>100	>100	>100	>100	>100	5
15	0.33	2,8	61	39	47	93	40	1
16	0.18	5,1	40	33	40	52	33	1
17	0.38	22,1	>100	>100	>100	>100	>100	5
18	0.31	15,8	>100	>100	>100	>100	>100	1
19	0.41	4,9	>100	>100	>100	>100	>100	1
20	0.48	1,7	>100	>100	>100	>100	>100	5
21	0.45	18,9	>100	>100	>100	>100	>100	1
22	0.13	3,1	9,2	6,9	9,3	20	14	1
23	0.11	10,2	5,4	4,3	5,8	9,6	10	3
24	0.44	16,6	>100	>100	>100	>100	>100	1
25	0.48	21	>100	>100	>100	>100	>100	1

Con fines comparativos se preparó la **tabla 7.7** en donde se listan los compuestos de acuerdo a la actividad antiplasmódica en forma decreciente, expresado en μM.

Tabla 7.6. Actividad de los compuestos de la colección contra *P. falciparum*.

COMPUESTO	"Drug score"	IC <sub>50</sub> <i>P. falciparum</i> ( $\mu$ M)	Cluster
2	0,31	0,78	2
20	0,48	1,7	5
14	0,40	2,6	5
15	0,33	2,8	1
22	0,13	3,1	1
1	0,61	3,6	6
19	0,41	4,9	1
16	0,18	5,1	1
4	0,13	7,2	3
23	0,11	10,2	3
13	0,15	12	1
Salirasib (12)	0,20	14	1
11	0,23	14,3	2
18	0,31	15,8	1
24	0,44	16,6	1
21	0,45	18,9	1
9	0,43	19,1	4
7	0,56	21	6
25	0,48	21	1
10	0,40	21,8	4
17	0,38	22,1	5
8	0,41	22,8	2
5	0,31	23,1	1
6	0,43	46,9	4
3	0,45	Estimula	6

El examen de los datos revela que diez de los compuestos de las quimioteca resultaron activos contra el parásito responsable de la enfermedad parasitaria de mayor impacto en el mundo, tomando como valor de corte IC<sub>50</sub> < 10  $\mu$ M. A su vez, prácticamente un 50% de ellos tienen valores de IC<sub>50</sub> menores al principio activo del cual se inspiraron. En particular, el compuesto **2** es 18 veces más activo que Salirasib® y tiene un IC<sub>50</sub> de 780 nM, convirtiéndose en el compuesto más activo de toda la colección contra el ciclo eritrocítico en humanos de *P. falciparum*. Le siguen en importancia el compuesto **20** (8 veces más activo que el farnesiltiosalicilato), **14** y **15** (5 veces) y **22** (4,5 veces). Todos estos compuestos poseen el motivo 1,2,3-triazol en sus estructuras, sugiriendo que es importante para mejorar

la actividad del tiosalicílico (a excepción del derivado S-octilo). Estructuralmente los compuestos más activos tienen sustituyentes alifáticos de cadenas larga o aromáticos y valores de *drug score* promedio, a excepción del compuesto **22**.

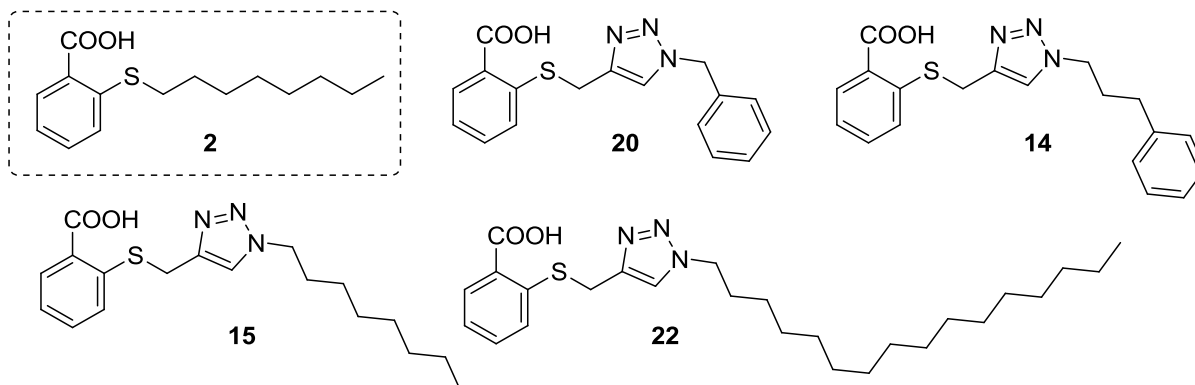


Figura 7.11. Compuestos más activos en *P. falciparum*.

Un resultado inesperado es el mostrado por compuesto **3** (Figura 7.12). Este análogo estimuló el crecimiento de los parásitos, generando que se reproduzcan en un mayor número comparado con los controles. Este resultado en apariencia contrario al comportamiento del resto de la colección, no posee una explicación sencilla y requiere de estudios complementarios para su racionalización.

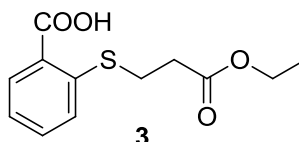


Figura 7.12. Estructura del compuesto 3.

En la Figura 7.13 se analiza el perfil de estructura-actividad de los compuestos de estas colecciones sobre el ciclo eritrocítico del *P. falciparum*.

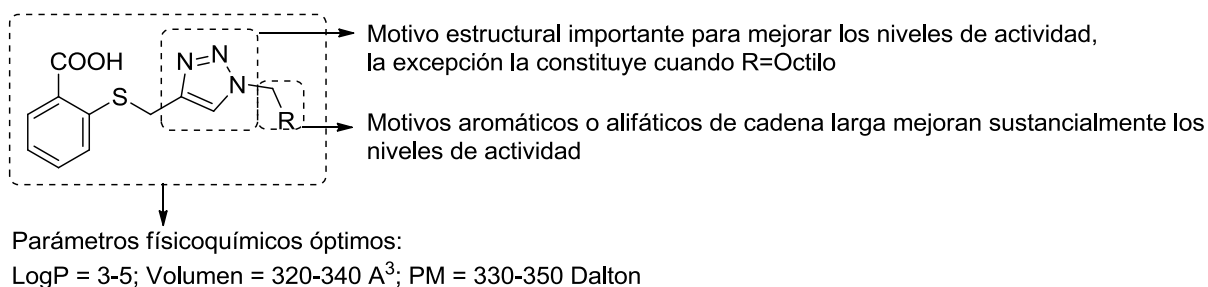
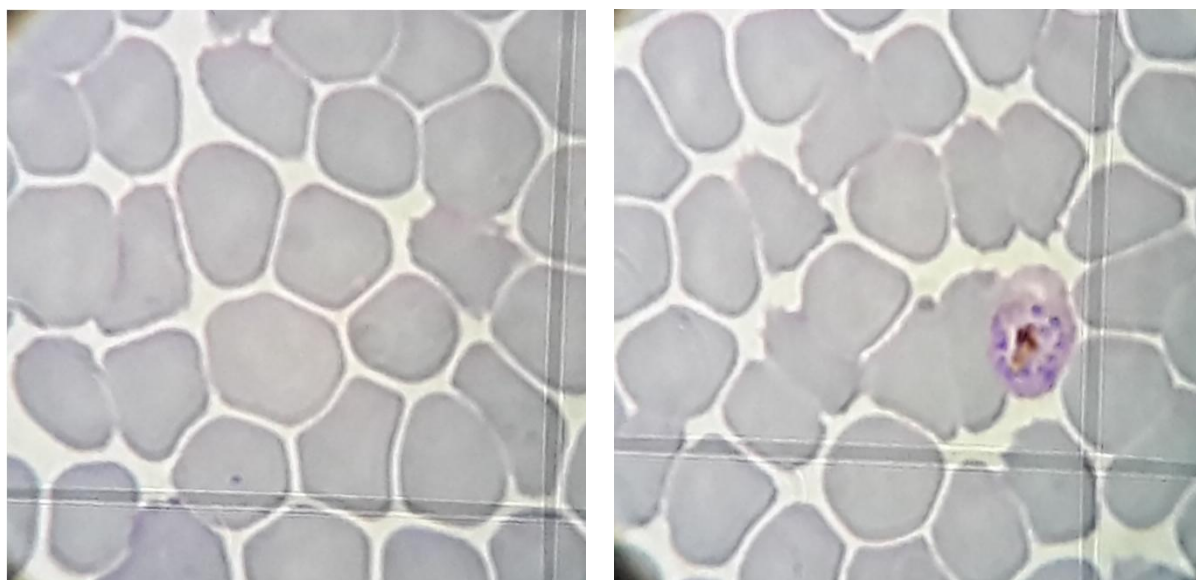


Figura 7.13. Análisis de estructura-actividad.

Adicionalmente se realizaron estudios de microscopía óptica para determinar modificaciones morfológicas sobre los glóbulos rojos y los parásitos. La observación de los preparados permitió concluir que los compuestos no producen modificaciones morfológicas sobre los glóbulos rojos en todas las concentraciones ensayadas (llegando hasta 150  $\mu\text{M}$ , **Figura 7.14**, panel izquierdo). Por otro lado, se observaron severas modificaciones sobre la morfología del parásito y un enlentecimiento en el ciclo de vida eritrocítico, arrojando a los parásitos tratados en concentraciones por encima del  $IC_{50}$  en los estadios esquizontes y trofozoítos. Estos resultados son una evidencia indirecta de que los compuestos están actuando de manera diferencial sobre el protozoo, sin afectar la viabilidad de los glóbulos rojos, siendo de este modo marcadamente selectivos.



**Figura 7.14.** Panel izquierdo: glóbulos rojos en presencia del compuesto **2** a 150  $\mu\text{M}$ . Panel derecho tratados con etanol (control negativo).

Alentados por estos resultados, se hizo indispensable indagar minuciosamente en la selectividad de estos compuestos hacia el parásito. Para lograr esta tarea fue necesario preparar sondas fluorescentes estructuralmente derivadas del Salirasib®. Hay un sinnúmero de reportes de moléculas pequeñas fluorescentes que se erigen como una imprescindible herramienta para la química biológica. Debido a su versatilidad estos compuestos tienen múltiples usos que van desde marcador de biomoléculas hasta sustratos de enzimas.

Por otro lado, existen una gran variedad de cromóforos disponibles para utilizar en el diseño de marcadores fluorescentes. En particular nuestro grupo de trabajo utiliza el 4-

nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD, por sus siglas). Su pequeño tamaño le confiere notables propiedades en la síntesis de moléculas pequeñas que pueden ser transferidas a enzimas. Levi y colaboradores reportaron que azúcares marcados con NBD son sustratos de las enzimas correspondientes sin perder actividad.<sup>[7.29]</sup>

Durante su estadía posdoctoral en nuestro grupo de trabajo, la Dra. Andrea Bracca sintetizó un total de 3 análogos de Salirasib<sup>®</sup> conteniendo el marcador fluorescente NBD en sus estructuras (**Figura 7.15**)

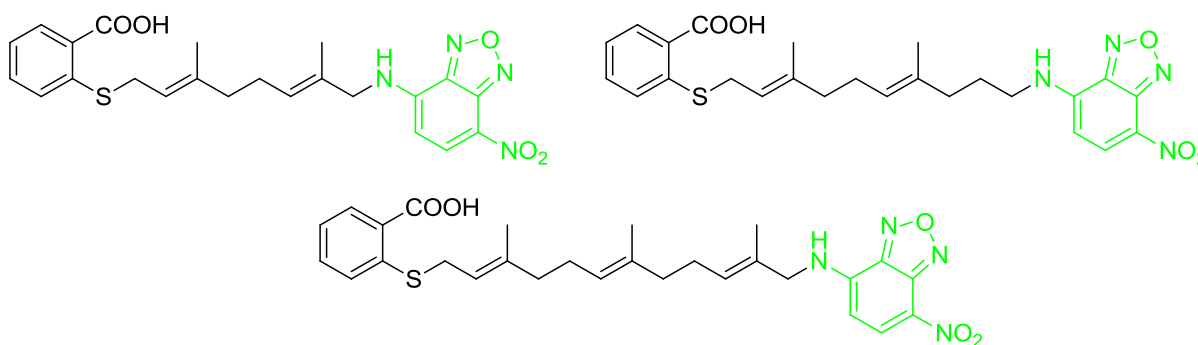


Figura 7.15. Análogos fluorescentes de Salirasib<sup>®</sup> sintetizados

Los ensayos preliminares de microscopía de fluorescencia fueron realizados en el laboratorio del Prof. Katzin (ICB-USP). Los resultados iniciales de la microscopía en *P. falciparum* cultivados con las sondas sintetizadas demuestran que estos compuestos ingresan de manera diferencial al parásito, sin encontrar marcas de fluorescencia en glóbulos rojos sin parasitar.

En la **Figura 7.16** se observa que los compuestos están distribuidos específicamente en los parásitos intracelulares en sus diferentes estadios (círculos amarillos), los esquizontes libres (círculo rojo), pero ausente en glóbulos rojos no infectados (círculo azul).

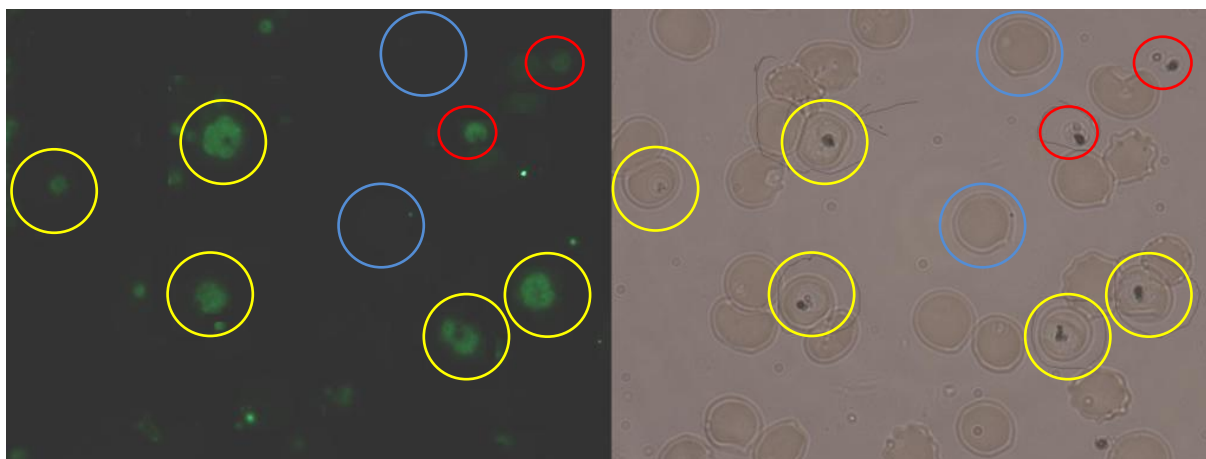


Figura 7.16. Microscopía de fluorescencia en *P. falciparum* cultivados con la sonda.

En conclusión, la convergencia de las evidencias experimentales directas (microscopía de fluorescencia) e indirecta (microscopía óptica) sugieren una alta selectividad de la colección preparada hacia el parásito en presencia de eritrocitos humanos.

## 7.6.2 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.

El cáncer es una enfermedad provocada por un grupo de células que se multiplican sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia, a otros tejidos. En general, tiende a llevar a la muerte a la persona afectada si no se trata adecuadamente. Se conocen más de 200 tipos diferentes de cáncer, siendo los más comunes los de piel, pulmón, mama y colorrectal.

La malignidad del cáncer es variable, dependiendo de la agresividad de sus células y otras características biológicas asociadas a esa variedad. El comportamiento de las células cancerosas se caracteriza por carecer del control reproductivo que requiere su función original. De este modo, las células pierden sus características originales y adquieren otras que no les corresponden, como la capacidad de invadir órganos próximos de forma progresiva, llegando incluso a diseminarse a distancia (metástasis), con crecimiento y división más allá de los límites normales del órgano al que pertenecían originalmente. A su vez tiene la capacidad de diseminarse por el organismo a través del sistema linfático o el sistema circulatorio, ocasionando el crecimiento de nuevos tumores en otras partes del organismo alejadas de la localización original.

El cáncer puede afectar a personas de todas las edades, incluso a fetos, pero el riesgo de sufrirlo se incrementa con la edad. Es responsable de cerca del 13 % de todas las muertes y es una de las primeras causas de decesos a nivel mundial; habiéndosele atribuido en el año 2012 unas 8,2 millones de descensos.<sup>[7.30]</sup>

Según la OMS, los cánceres más mortales son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. Por esta razón, la bioactividad de los compuestos se ensayó en las siguientes líneas cinco celulares:



Células A539: Línea celular de cáncer pulmonar humano;



HeLa: Línea celular de cáncer cérvico-uterino;



SW1573: Línea celular de cáncer alveolar;



T-47D: Línea celular de cáncer de mama;



HBL-100: Línea celular de cáncer de mama lactante.

Los resultados de los ensayos están listados en la **Tabla 7.8** y ordenados en actividad decreciente expresada en  $\mu\text{M}$ .

Tabla 7.7. Actividades de los compuestos en líneas celulares tumorales humanas.

COMPUESTO	"Drug score"	IC <sub>50</sub> A539 ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> HeLa ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> SW1573 ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> T-47D ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> HBL-100 ( $\mu\text{M}$ )	Clúster
23	0,11	5,4	4,3	5,8	9,6	10	3
22	0,13	9,2	6,9	9,3	20	14	1
4	0,13	14	12	15	18	14	3
<b>Salirasib (12)</b>	0,20	34	34	41	42	22	1
13	0,15	38	29	37	41	23	1
16	0,18	40	33	40	52	33	1
15	0,33	61	39	47	93	40	1
2	0,31	> 100	100	>100	>100	>100	2
1	0,61	>100	>100	>100	>100	>100	6
7	0,56	>100	>100	>100	>100	>100	6
20	0,48	>100	>100	>100	>100	>100	5
25	0,48	>100	>100	>100	>100	>100	1
21	0,45	>100	>100	>100	>100	>100	1
3	0,45	> 100	>100	>100	>100	>100	6
24	0,44	>100	>100	>100	>100	>100	1
9	0,43	>100	>100	>100	>100	>100	4
6	0,43	>100	>100	>100	>100	>100	4
19	0,41	>100	>100	>100	>100	>100	1
8	0,41	>100	>100	>100	>100	>100	2
14	0,40	>100	>100	>100	>100	>100	5
10	0,40	>100	>100	>100	>100	>100	4
17	0,38	>100	>100	>100	>100	>100	5
18	0,31	>100	>100	>100	>100	>100	1
5	0,31	>100	>100	>100	>100	>100	1
11	0,23	>100	>100	>100	>100	>100	2

De los 25 compuestos ensayados, 8 de ellos tienen actividades menores o iguales a  $100 \mu\text{M}$  en al menos una línea celular. Sorprendentemente, 3 de estos compuestos tienen niveles de actividad antiproliferativa hasta 8 veces mejores que Salirasib® (**Figura 7.17**) en todas las líneas celulares tumorales estudiadas (líneas celulares del cáncer de pulmón, mama y útero-cervical). Estructuralmente estos compuestos son similares (dos de ellos pertenecen

al clúster 3), y poseen una cadena lateral de 16 átomos de carbonos de longitud. En los compuestos que poseen triazol en la estructura se observa un incremento promedio de dos veces en la actividad (por ejemplo comparando el compuesto **23** y el **4**), sugiriendo que la extensión en la cadena carbonada es uno de los factores que produce un incremento en la bioactividad.

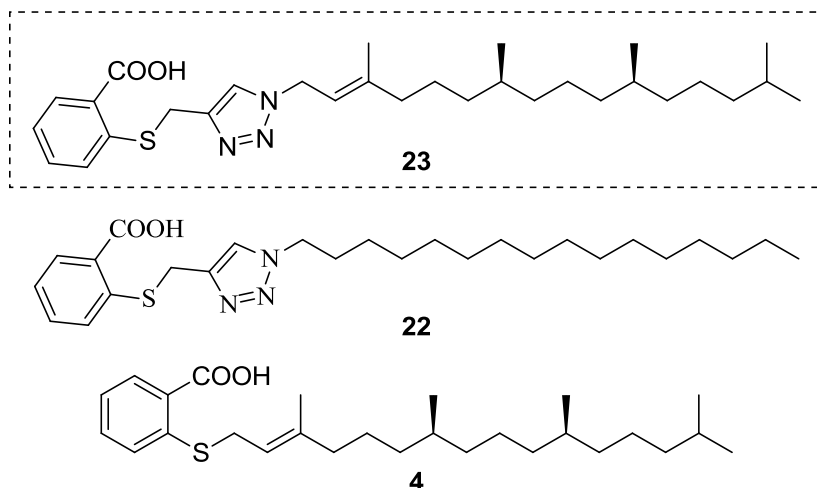


Figura 7.17. Compuestos con los mejores perfiles de actividad biológica en líneas celulares tumorales humanas.

En líneas generales, cuando los compuestos tienen actividad antiproliferativa no se observa una tendencia pronunciada de especificidad hacia una línea celular determinada, aunque las líneas celulares HeLa y HBL-100 parecen ser más sensibles ante estas colecciones.

Los compuestos **13**, **15** y **16** tienen valores de actividad comparables al Salirasib®. Nuevamente se observa que los análogos sustituidos con largas cadenas carbonadas saturadas o por terpenos de al menos 3 unidades de isoprenos presentan mayor actividad.

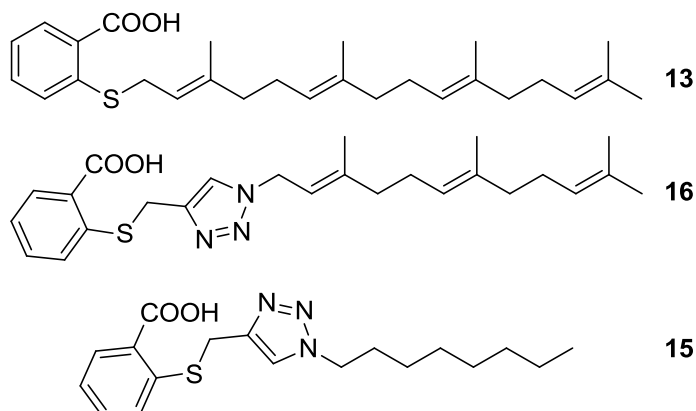
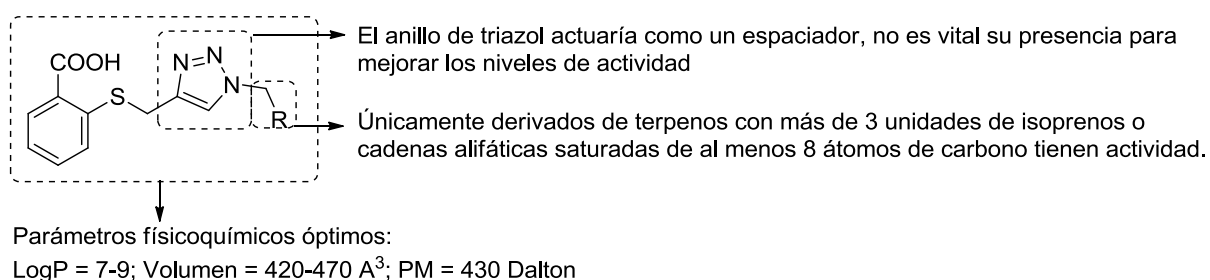


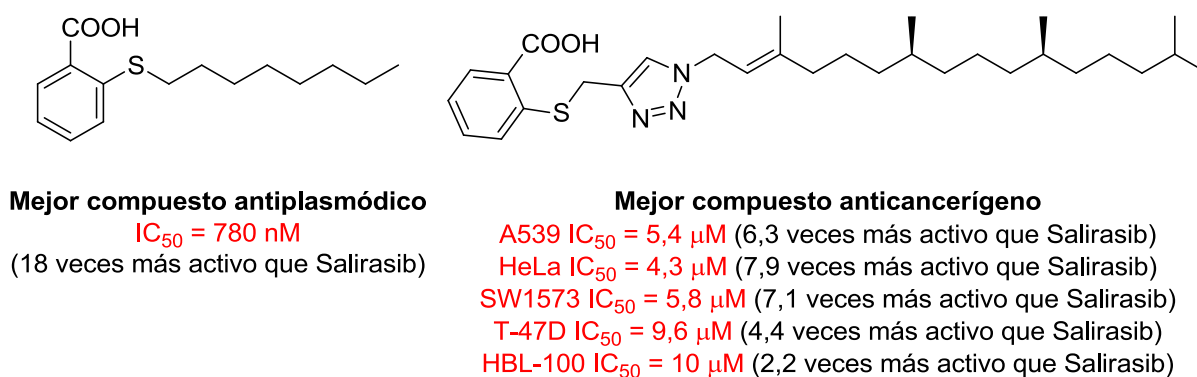
Figura 7.18. Compuestos con niveles de actividad en el orden del Salirasib®

En la **Figura 7.19** se ilustra los resultados del análisis de estructura-actividad de la colección contra las diferentes líneas celulares tumorales ensayadas.



**Figura 7.19.** Análisis de estructura-actividad.

Observando los compuestos más activos de la colección contra *Plasmodium* (el compuesto **2**, el cabeza de serie y los compuestos **14**, **15**, **20** y **22**) y contra líneas celulares tumorales humanas (**4**, **13**, **15**, **16**, **22** y el cabeza de serie **23**), podemos identificar claramente que se tratan de estructuras diferentes (a excepción de **15** y **22** que son muy activos en ambos blancos). Este hecho pone de manifiesto la existencia de selectividad y deja en claro que fue posible preparar una quimioteca que puede ser modulada siendo hacia el agente etiológica de la malaria o hacia la citotoxicidad de líneas celulares de cáncer (**Figura 7.20**).



**Figura 7.20.** Hits de la colección como agente antimalárico y como anticancerígeno.

En lo que respecta a la actividad antiplasmódica, la estrategia requerirá validar el blanco de acción para lo cual se buscará en el futuro ensayar las actividad de la colección en el blanco enzimático parasitario.

## 7.7 BIBLIOGRAFÍA

- 7.1. Baines, A. T., Xu, D. and Der, C. J. (2011). "Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues." *Future medicinal chemistry* **3**(14): 1787-1808.
- 7.2. Pink, R., Hudson, A., Mouries, M. A. and Bendig, M. (2005). "Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery." *Nature reviews. Drug discovery* **4**(9): 727-740.
- 7.3. Fidock, D. A., Rosenthal, P. J., Croft, S. L., Brun, R. and Nwaka, S. (2004). "Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening." *Nature reviews. Drug discovery* **3**(6): 509-520.
- 7.4. Beghyn, T. B., Charton, J., Leroux, F., Laconde, G., Bourin, A., Cos, P., Maes, L. and Deprez, B. (2011). "Drug to genome to drug: discovery of new antiplasmodial compounds." *J Med Chem* **54**(9): 3222-3240.
- 7.5. Beghyn, T. B., Charton, J., Leroux, F., Henninot, A., Reboule, I., Cos, P., Maes, L. and Deprez, B. (2012). "Drug-to-genome-to-drug, step 2: reversing selectivity in a series of antiplasmodial compounds." *Journal of medicinal chemistry* **55**(3): 1274-1286.
- 7.6. Porta, E. O. and Labadie, G. R. (2012). "Following the tracks of the trypanosoma cruzi prenilome." *3º Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional*.
- 7.7. Winter-Vann, A. M., Baron, R. A., Wong, W., dela Cruz, J., York, J. D., Gooden, D. M., Bergo, M. O., Young, S. G., Toone, E. J. and Casey, P. J. (2005). "A small-molecule inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase with antitumor activity in cancer cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(12): 4336-4341.
- 7.8. Reid, T. S., Terry, K. L., Casey, P. J. and Beese, L. S. (2004). "Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity." *Journal of molecular biology* **343**(2): 417-433.
- 7.9. Sebti, S. M. (2003). "Blocked pathways: FTIs shut down oncogene signals." *Oncologist* **8 Suppl 3**: 30-38.
- 7.10. Manolaridis, I., Kulkarni, K., Dodd, R. B., Ogasawara, S., Zhang, Z., Bineva, G., O'Reilly, N., Hanrahan, S. J., Thompson, A. J., Cronin, N., Iwata, S. and Barford, D. (2013). "Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1." *Nature* **504**(7479): 301-305.
- 7.11. Pryor, E. E., Jr., Horanyi, P. S., Clark, K. M., Fedoriw, N., Connelly, S. M., Koszelak-Rosenblum, M., Zhu, G., Malkowski, M. G., Wiener, M. C. and Dumont, M. E. (2013). "Structure of the integral membrane protein CAAX protease Ste24p." *Science* **339**(6127): 1600-1604.
- 7.12. "<http://www.concordiapharma.com/index.htm>."
- 7.13. Marciano, D., Ben-Baruch, G., Marom, M., Egozi, Y., Haklai, R. and Kloog, Y. (1995). "Farnesyl derivatives of rigid carboxylic acids-inhibitors of ras-dependent cell growth." *Journal of medicinal chemistry* **38**(8): 1267-1272.
- 7.14. Yang, J., Kulkarni, K., Manolaridis, I., Zhang, Z., Dodd, R. B., Mas-Droux, C. and Barford, D. (2011). "Mechanism of isoprenylcysteine carboxyl methylation from the crystal structure of the integral membrane methyltransferase ICMT." *Molecular cell* **44**(6): 997-1004.
- 7.15. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/371927770>."
- 7.16. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/6912430>."
- 7.17. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/407847401>."
- 7.18. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/71745750>."
- 7.19. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/398023451>."
- 7.20. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/672294430>."
- 7.21. "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/258597559>."
- 7.22. Aharonson, Z., Gana-Weisz, M., Varsano, T., Haklai, R., Marciano, D. and Kloog, Y. (1998). "Stringent structural requirements for anti-Ras activity of S-prenyl analogues." *Biochimica et biophysica acta* **1406**(1): 40-50.

- 7.23. Goldberg, L., Haklai, R., Bauer, V., Heiss, A. and Kloog, Y. (2009). "New derivatives of farnesylthiosalicylic acid (salirasib) for cancer treatment: farnesylthiosalicylamide inhibits tumor growth in nude mice models." Journal of medicinal chemistry **52**(1): 197-205.
- 7.24. Go, M. L., Leow, J. L., Gorla, S. K., Schuller, A. P., Wang, M. and Casey, P. J. (2010). "Amino derivatives of indole as potent inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase." Journal of medicinal chemistry **53**(19): 6838-6850.
- 7.25. Corey, E. J., Kim, C. U. and Takeda, M. (1972). "A method for selective conversion of allylic and benzylic alcohols to halides under neutral conditions." Tetrahedron Letters **13**(42): 4339-4342.
- 7.26. "<http://chemmine.ucr.edu/>."
- 7.27. "<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>."
- 7.28. Gaulton, A., Bellis, L. J., Bento, A. P., Chambers, J., Davies, M., Hersey, A., Light, Y., McGlinchey, S., Michalovich, D., Al-Lazikani, B. and Overington, J. P. (2012). "ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery." Nucleic acids research **40**(Database issue): D1100-1107.
- 7.29. Levi, J., Cheng, Z., Gheysens, O., Patel, M., Chan, C. T., Wang, Y., Namavari, M. and Gambhir, S. S. (2007). "Fluorescent fructose derivatives for imaging breast cancer cells." Bioconjugate chemistry **18**(3): 628-634.
- 7.30. "Organización Mundial de la Salud; <http://www.who.int> ".

## CAPÍTULO 8


## RESUMEN Y CONCLUSIONES

# 2015




*“El arte y la ciencia de hacer preguntas es la fuente de todo el conocimiento”*

Thomas Louis Berger



La tendencia en el futuro se dirigirá a tratar a las personas y no a tratar las enfermedades. Aunque los individuos de la especie humana se asemejen como mínimo en un 99% desde el punto de vista estrictamente genético, la evolución de cada enfermedad en cada persona se manifiesta de diversas formas y la respuesta a los tratamientos cursan de manera distinta. Mientras se transita ese cambio de paradigma, la química medicinal debe seguir desarrollándose para combatir (o idealmente eliminar de la faz de la tierra) todas las dolencias que aquejan a nuestra especie.



## RESUMEN Y CONCLUSIONES

El esfuerzo mancomunado del trabajo de investigación interdisciplinaria permite hallar respuestas concretas a preguntas formuladas en el ambiente científico en forma sinérgica y cooperativa. Sin embargo esta tarea trae emparejado la génesis de nuevos interrogantes, fiel a la naturaleza esquiva de las ciencias naturales.

La importancia de comprender el funcionamiento de sistemas biológicos ha hecho (y sigue haciendo en la actualidad) que gran parte de la investigación en las ciencias químicas dirijan sus esfuerzos a responder interrogantes de las ciencias biológicas.

En el vasto universo de los sistemas biológicos, los isoprenos y los compuestos isoprenilados juegan un rol central, no sólo por estar involucrados bioquímicamente en vías esenciales, sino porque están ampliamente distribuidos en la biósfera. Sobre esa piedra fundamental se depositaron las bases de los desarrollos metodológicos y las estructuras generadas en la presente tesis.

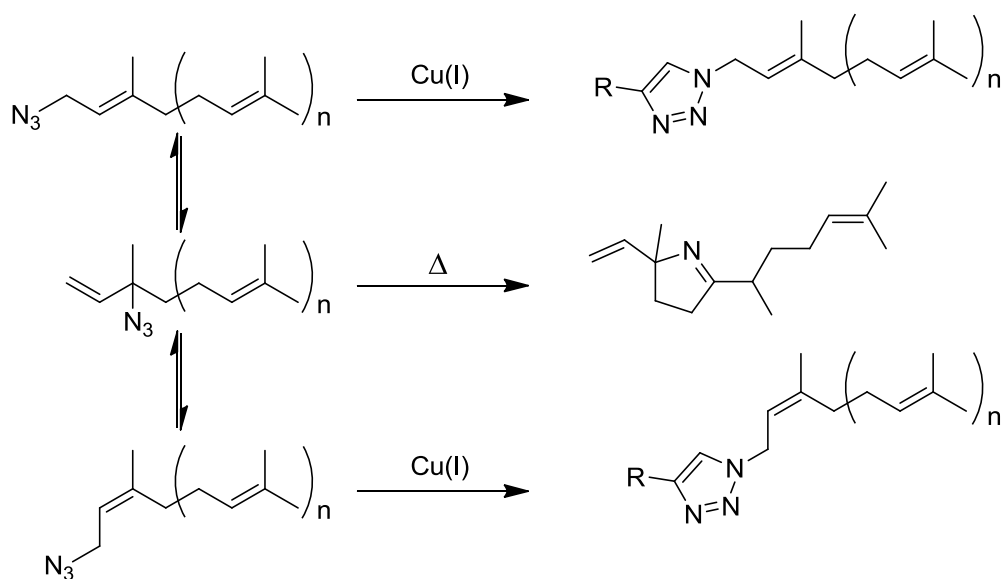
En particular los principales logros alcanzados de este trabajo son:



Mediante estudios experimentales e *in silico* fue posible racionalizar el reordenamiento de mezclas de isoprenil azidas.



Fue posible modular la reactividad de las isoprenilazidas dependiendo de los reactivos y condiciones utilizadas dando lugar a productos de reacción de las azidas terciarias o primarias.





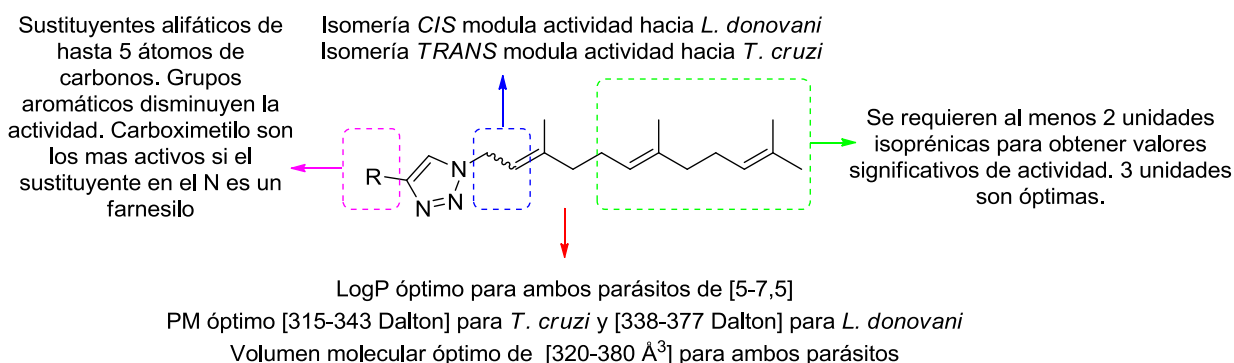
De forma exitosa se posicionó a las azidas isoprenílicas como estructura privilegiada para generar compuestos con esqueletos estructuralmente diversos para el desarrollo de nuevas quimiotecas.



El uso de la metodología de reactividad diferencial de la mezcla de azidas alílicas en combinación con herramientas quimioinformáticas, permitió preparar un total de 25 isopreniltriazolil derivados con muy buenas actividades como agentes leishmanicidas y tripanomicidas.



El análisis de estructura/actividad de los isoprenil-triazoles reveló que es posible modular la estructura para dirigir en forma singular la actividad hacia un parásito o hacia otro. Por otro lado, debido al elevado porcentaje de compuestos bioactivos es posible proponer que el núcleo isopreniltriazol actuaría como la unidad farmacofórica.



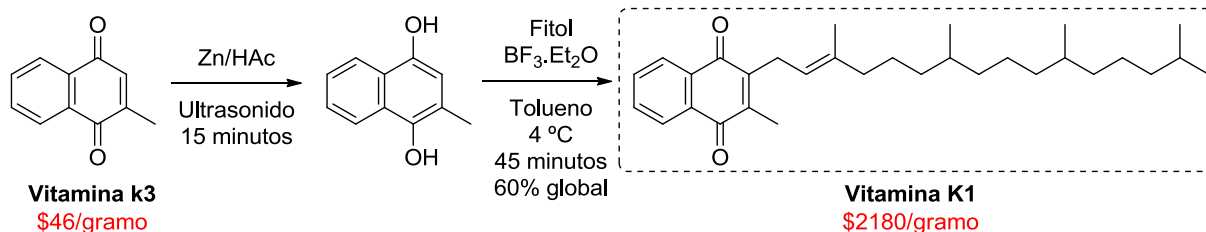
Los resultados de los estudios de los mejores candidatos de la quimioteca de isoprenil triazoles en la CYP51, indican que si bien existiría una contribución en su actividad antiparasitaria por inhibición de esta enzima, estos compuestos poseerían otro u otros blancos de acción.



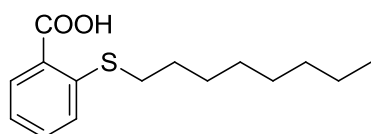
Se desarrolló en forma exitosa una metodología integral para la síntesis rápida, eficiente y regioselectiva de fenoles *orto*-isoprenilados. La exploración de esta técnica nos permitió generar diversidad estructural por combinación de diferentes fenoles, alcoholes isoprenílicos y condiciones de reacción. Los ensayos preliminares de actividades biológicas en organismos unicelulares patógenos, valida el uso para la química medicinal de la estrategia desarrollada.



El potencial de la técnica de preparación de fenoles *orto*-isoprenilados, permitió la accesibilidad sintética a la vitamina K1 a partir de la vitamina K3 y a la DMK-4 (el precursor inmediato a la vitamina K2), de manera inédita y eficiente.

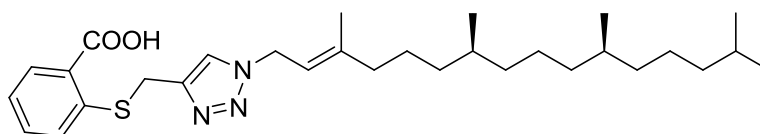


Inspirados en el Salirasib<sup>®</sup>, se desarrolló una quimioteca de 25 compuestos mediante técnicas de reingeniería de fármacos y bajo el paradigma de reposicionamiento de fármacos orientados a enfermedades tropicales desatendidas. Un 40% de los compuestos tuvieron mejores niveles de actividad como agentes antimaláricos que Salirasib<sup>®</sup> y un 12% de ellos tuvieron notables mejoras como agentes anticancerígenos, comparados con su estructura musa.



**Mejor compuesto antiplasmodico**

$IC_{50} = 780 \text{ nM}$   
(18 veces más activo que Salirasib)



**Mejor compuesto anticancerígeno**

A539  $IC_{50} = 5,4 \mu\text{M}$  (6,3 veces más activo que Salirasib)  
 HeLa  $IC_{50} = 4,3 \mu\text{M}$  (7,9 veces más activo que Salirasib)  
 SW1573  $IC_{50} = 5,8 \mu\text{M}$  (7,1 veces más activo que Salirasib)  
 T-47D  $IC_{50} = 9,6 \mu\text{M}$  (4,4 veces más activo que Salirasib)  
 HBL-100  $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$  (2,2 veces más activo que Salirasib)



Experimentos de microscopía de fluorescencia utilizando sondas diseñadas en nuestro laboratorio en conjunto con los ensayos de integridad morfológicas de glóbulos rojos, evidencian que estos compuestos actúan como agentes parasiticidas y no como disruptores de membrana.



El presente trabajo integra con éxito el uso de modernas herramientas de química medicinal, la ingeniería de fármacos y el desarrollo de metodologías sintéticas aplicados a isoprenos como estructuras privilegiadas para desarrollar familias de compuestos orientados a resolver problemáticas de índole química y biológica.

## CAPÍTULO 9

## MATERIALES Y MÉTODOS

# 2015



*La disciplina de la química medicinal permite la creación de un futuro brillante para la salud humana y un mundo en el que podemos confiar en el sistema de atención, sabiendo que se están realizando investigaciones todo el tiempo en el desarrollo de medicamentos para tratar enfermedades comunes y raras por igual.*



## 9 MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 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 y en bomba de vacío.

Todos los materiales de partida fueron adquiridos en SIGMA-Aldrich

Las reacciones efectuadas a 0 °C se llevaron a cabo mediante empleo de baño de hielo. Las reacciones realizadas a altas temperaturas y a reflujo se realizaron empleando baños de silicona mediante calentamiento con platinas termoeléctricas. Las reacciones a reflujo se refrigeraron por uso de circulación cerrada PolyScience con una mezcla de agua y etilenglicol 1:1.

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

### 9.2 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 la muestra en  $\text{CDCl}_3$  o en MeOD 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, su asignación y tipo de C. Los desplazamientos químicos fueron informados en unidades de partes por millón (ppm), relativas al patrón de referencia correspondiente y las constantes de acoplamiento 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 (del Inglés, *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) que permiten diferenciar carbonos cuaternarios, metínicos, metilénicos y metílicos. En el análisis de espectros bidimensionales se utilizará la técnica de HSQC editado (por las siglas en inglés de *Heteronuclear Single Quantum Coherence Edited*). También resultó imprescindible para la determinación certera de estructuras moleculares la realización de experimentos de Efecto Nuclear Overhauser (en inglés *NOE*, por *Nuclear Overhauser Effect*).

Los espectros de masa de alta resolución fueron registrados en un LC MS-MS del servicio de Espectrometría de Masa de alta resolución del IQUIR-IBR.

### 9.3 CROMATOGRAFÍA









Las cromatografías de capas delgadas (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 ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ), 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.

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 elusión con presión de nitrógeno. Las siembras se realizaron con las muestras a purificar adsorbidas sobre sílica gel o en solución.

### 9.4 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  $P_2O_5$  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.
-  **N,N-Dimetilformamida anhidra:** Secada sobre óxido de calcio, destilada a presión reducida y almacenada en botellas con tamices moleculares de 4 Å.
-  **Acetonitrilo anhidro:** Estacionado y destilado sobre CaH bajo atmósfera de nitrógeno y almacenado en botellas con tamices moleculares de 4 Å.
-  **Tetrahidrofurano anhidro:** Refluído sobre sodio bajo atmósfera de nitrógeno seco en presencia de benzofenona como indicador, destilado y almacenado en botellas con tamices moleculares de 4 Å.
-  **Tolueno anhidro:** Refluído sobre sodio bajo atmósfera de nitrógeno seco en presencia de benzofenona como indicador, destilado y almacenado en botellas con tamices moleculares de 4 Å.
-  **Acetona:** Estacionada y destilada sobre  $CaSO_4$  bajo atmósfera de nitrógeno seco y almacenada en botellas con tamices moleculares de 4 Å.
-  **Dimetoxietano:** Estacionado y destilado sobre Na bajo atmósfera de nitrógeno seco y almacenado en botellas con tamices moleculares de 4 Å.

## 9.5 MÉTODO GENERAL DE PREPARACIÓN DE AZIDAS ALÍLICAS (MÉTODO DE THOMPSON).

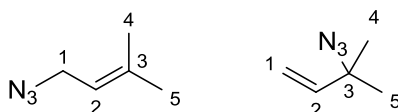
Se diluye un equivalente de alcohol alílico en tolueno seco (2 mL por mmol) y se agregan 1,3 equivalentes de difenilfosforazidato (DPPA), enfriando el sistema a 0 °C. A la mezcla de reacción se le agrega 1,3 equivalentes de 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU), dejando reaccionar los componentes a 0 °C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se eleva la temperatura del sistema a la registrada por el ambiente, dejando que la reacción curse durante toda la noche en atmósfera inerte.

Finalizada la reacción, se agrega agua al sistema y se procede a realizar 3 extracciones con AcOEt. La fase orgánica se seca con  $Na_2SO_4$  anhidro y se extrae todo el solvente por evaporación con el uso del evaporador rotatorio y secado con bomba de vacío. La mezcla de

azidas alílicas se purifican por cromatografía en columna de sílica gel con corrida isocrática de hexano.

### 9.5.1 Síntesis de mezcla de azidas alílicas provenientes del prenol (IA-1 e IA-2).

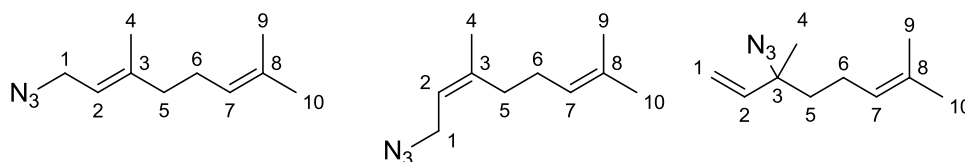
Siguiendo el protocolo general descrito para la síntesis de azidas alílicas, se disolvió el alcohol 3-metilbut-2-en-1-ol (100 mg; 1,16 mmoles) en tolueno seco (2,5 mL). Se adiciona 1,3 equivalentes de DPPA (400 mg; 1,51 mmoles) y a continuación, luego del enfriado a 0°C, se añade 1,3 equivalentes de DBU (232 mg, 1,51 mmoles). La reacción cursó en atmósfera inerte durante 2 horas a 0°C y luego 8 horas a temperatura ambiente. Debido a la volatilidad de los productos, se obvia la etapa de purificación. Sobre una solución del compuesto en tolueno se procedió a calcular el rendimiento de la reacción, obteniendo un 84% (108 mg).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,78$  ppm (dd, Integra 0,14, 1H,  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1\text{trans}} = 17,3$  Hz y  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1\text{cis}} = 10,7$  Hz,  $\text{C}2_{\text{T-H}}$ ); 5,385 (tt, 1 H,  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1} = 7,3$  Hz,  $\text{C}2_{\text{P-H}}$ ); 5,28 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}1\text{trans}-\text{H}2} = 17,3$  Hz,  $\text{C}1_{\text{T-H}}$ ); 5,20 (d, integra 0,14, 1H,  $^3J_{\text{H}1\text{trans}-\text{H}2} = 10,7$  Hz,  $\text{C}1_{\text{T-H}}$ ); 3,80 (d, integra 1,21, 2H,  $^3J_{\text{H}1-\text{H}2} = 7,3$  Hz,  $\text{C}1_{\text{P-H}}$ ); 1,86 (s, integra 1,84, 3H,  $\text{C}5_{\text{P-H}}$ ); 1,76 (s, integra 1,84, 3H,  $\text{C}4_{\text{P-H}}$ ) y 1,61 (s, integra 1,22, 6H,  $\text{C}4_{\text{T-H}}$  y  $\text{C}5_{\text{T-H}}$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 141,2$  ppm ( $\text{C}72$ , cuaternario); 139,6 ( $\text{C}p3$ , cuaternario); 117,4 ( $\text{C}p2$ , CH); 113,9 ( $\text{C}71$ ,  $\text{CH}_2$ ); 49,6 ( $\text{C}73$ , cuaternario); 48,2 ( $\text{C}p1$ ,  $\text{CH}_2$ ); 26,1 ( $\text{C}74$  y  $\text{C}75$ ,  $\text{CH}_3$ ); 25,7 ( $\text{C}p4$ ,  $\text{CH}_3$ ) y 18,1 ( $\text{C}p5$ ,  $\text{CH}_3$ ).

### 9.5.2 Síntesis de mezcla de azidas alílicas provenientes del geraniol (IA-3, IA-4 e IA-5).

Siguiendo el protocolo general descrito para la síntesis de azidas alílicas, se disolvió geraniol (600 mg; 3,90 mmoles) en tolueno seco (8 mL). Se adiciona 1,3 equivalentes de DPPA (1320 mg; 5,00 mmoles) y a continuación, luego del enfriado a 0°C, se añade 1,3 equivalentes de DBU (770 mg, 5,00 mmoles). La reacción cursó en atmósfera inerte durante 2 horas a 0°C y luego 8 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se obtuvo 608 mg de la mezcla de productos como un líquido incoloro con un 87% de rendimiento.

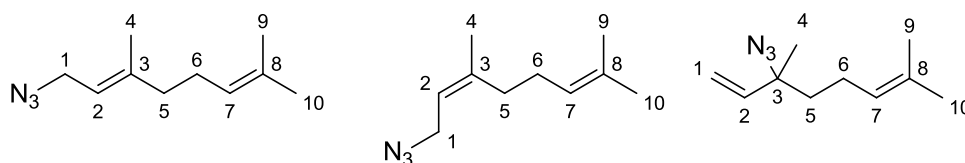


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,78$  ppm (dd, Integra 0,14, 1H,  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1\text{trans}} = 17,3$  Hz y  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1\text{cis}} = 10,7$  Hz,  $\text{C}2_{\text{T-H}}$ ); 5,33 (t, 1 H,  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1} = 7,3$  Hz,  $\text{C}2_{\text{E-H}}$  y  $\text{C}2_{\text{Z-H}}$ ); 5,23 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}1\text{trans}-\text{H}2} = 17,3$  Hz,  $\text{C}1_{\text{T-H}}$ ); 5,20 (d, integra 0,14, 1H,  $^3J_{\text{H}1\text{trans}-\text{H}2} = 10,7$  Hz,  $\text{C}1_{\text{T-H}}$ ); 5,09 (m, 1H,  $\text{C}7_{\text{H}}$ ); 3,75 (dd<sub>superpuestos</sub>, 2 H,  $^3J_{\text{H}1-\text{H}2} = 7,2$  Hz,  $\text{C}1_{\text{E-H}}$  y  $\text{C}1_{\text{Z-H}}$ ); 2,10 (s<sub>ancho</sub>, 4H,  $\text{C}5_{\text{H}}$  y  $\text{C}6_{\text{H}}$ ); 1,79 (s, integra 1,15, 3H,  $\text{C}4_{\text{Z-H}}$ ); 1,70 (s, integra 2,02, 3H,  $\text{C}4_{\text{E-H}}$ ); 1,68 (s, 3H,  $\text{C}10_{\text{H}}$ ), 1,61 (s, 3H,  $\text{C}9_{\text{H}}$ ) y 1,35 (s, integra 0,45, 3H,  $\text{C}4_{\text{T-H}}$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 143,1$  ppm ( $\text{C}E3$ , cuaternario); 143,0 ( $\text{C}Z3$ , cuaternario); 140,1 ( $\text{C}72$ , cuaternario); 132,3 ( $\text{C}Z8$ , cuaternario);

132,1 (C<sub>7</sub>8, cuaternario); 131,9 (C<sub>E</sub>8, cuaternario); 123,6 (C<sub>E</sub>7, CH); 123,5 (C<sub>T</sub>7, CH); 123,4 (C<sub>Z</sub>7, CH); 117,9 (C<sub>Z</sub>2, CH); 117,0 (C<sub>E</sub>2, CH); 114,6 (C<sub>T</sub>1, CH<sub>2</sub>); 64,9 (C<sub>T</sub>3, cuaternario); 48,0 (C<sub>E</sub>1, CH<sub>2</sub>); 47,9 (C<sub>Z</sub>1, CH<sub>2</sub>); 40,1 (C<sub>T</sub>5, CH<sub>2</sub>); 39,5 (C<sub>E</sub>5, CH<sub>2</sub>); 32,1 (C<sub>Z</sub>5, CH<sub>2</sub>); 26,7 (C<sub>Z</sub>6, CH<sub>2</sub>); 26,4 (C<sub>E</sub>6, CH<sub>2</sub>); 25,6 (C<sub>Z</sub>10, C<sub>E</sub>10, CH<sub>3</sub>); 23,3 (C<sub>Z</sub>4, CH<sub>3</sub>); 23,1 (C<sub>T</sub>4, CH<sub>3</sub>); 22,8 (C<sub>T</sub>6, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C<sub>T</sub>9, CH<sub>3</sub>); 17,6 (C<sub>E</sub>9, CH<sub>3</sub>); 17,6 (C<sub>Z</sub>9, CH<sub>3</sub>) y 16,4 (C<sub>E</sub>4, CH<sub>3</sub>). **EMAR** (APCI): Masa calculada para C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>N<sup>+</sup> 152,14447; masa encontrada 152,14438. **IR (film)**:  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 2969 (=CH-), 2928 (-CH<sub>2</sub>-), 2884 (-CH<sub>2</sub>-C-N-), 2098 (-N<sub>3</sub>), 1664 (-C=C-).

### 9.5.3 Síntesis de mezcla de azidas alílicas provenientes del nerol.

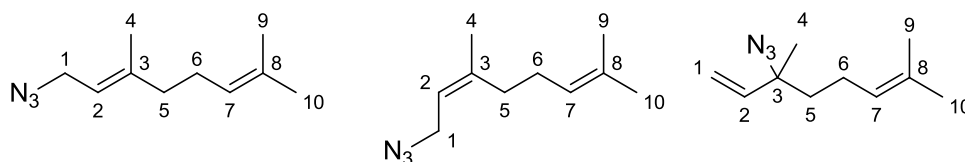
Siguiendo el protocolo general descrito para la síntesis de azidas alílicas, se disolvió nerol (100 mg; 0,65 mmoles) en tolueno seco (2 mL). Se adiciona 1,3 equivalentes de DPPA (220 mg; 0,83 mmoles) y a continuación, luego del enfriado a 0°C, se añade 1,3 equivalentes de DBU (129 mg, 0,83 mmoles). La reacción cursó en atmósfera inerte durante 2 horas a 0°C y luego 8 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se obtuvo 104 mg de la mezcla de productos como un líquido incoloro con un 89% de rendimiento.



Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C coinciden con el informado para la mezcla de azidas alílicas provenientes del geraniol.

### 9.5.4 Síntesis de mezcla de azidas alílicas provenientes del linalool.

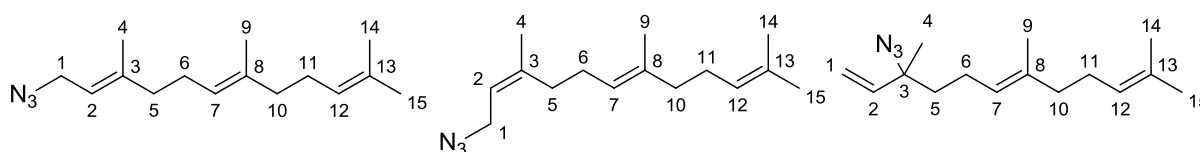
Siguiendo el protocolo general descrito para la síntesis de azidas alílicas, se disolvió geraniol (100 mg; 0,65 mmoles) en tolueno seco (2 mL). Se adiciona 1,3 equivalentes de DPPA (220 mg; 0,84 mmoles) y a continuación, luego del enfriado a 0°C, se añade 1,3 equivalentes de DBU (129 mg, 0,84 mmoles). La reacción cursó en atmósfera inerte durante 2 horas a 0°C y luego 8 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se obtuvo 99 mg de la mezcla de productos como un líquido incoloro con un 85% de rendimiento.



Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C coinciden con el informado para la mezcla de azidas alílicas provenientes del geraniol.

### 9.5.5 Síntesis de mezcla de azidas alílicas provenientes del farnesol (IA-6, IA-7 e IA-8).

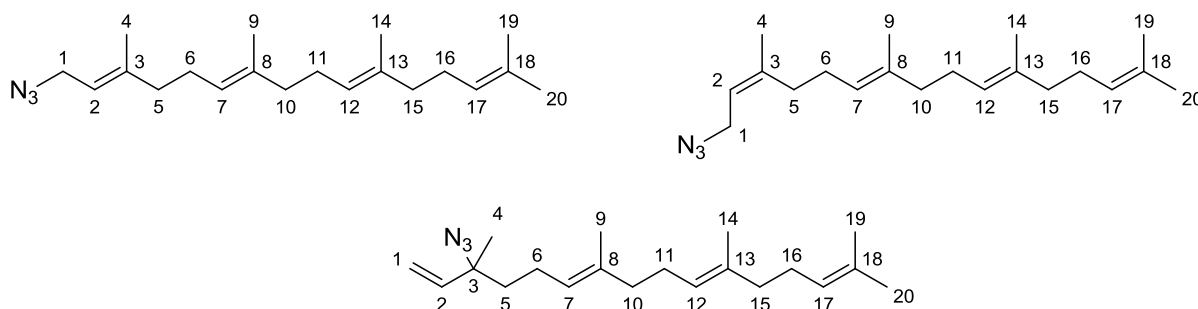
Siguiendo el protocolo general descripto para la síntesis de azidas alílicas, se disolvió geraniol (300 mg; 1,35 mmoles) en tolueno seco (4 mL). Se adiciona 1,3 equivalentes de DPPA (355 mg; 1,75 mmoles) y a continuación, luego del enfriado a 0°C, se añade 1,3 equivalentes de DBU (270 mg, 1,75 mmoles). La reacción cursó en atmósfera inerte durante 2 horas a 0°C y luego 8 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se obtuvo 284 mg de la mezcla de productos como un líquido incoloro con un 85% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,79$  ppm (dd, Integra 0,14, 1H,  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1\text{trans}} = 17,3$  Hz y  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1\text{cis}} = 10,7$  Hz,  $\text{C}2_{\text{T}}-\text{H}$ ); 5,36 (t, 1 H,  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1} = 7,3$  Hz,  $\text{C}2_{\text{E}}-\text{H}$  y  $\text{C}2_{\text{Z}}-\text{H}$ ); 5,23 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}1\text{trans}-\text{H}2} = 17,3$  Hz,  $\text{C}1_{\text{T}}-\text{H}$ ); 5,20 (d, integra 0,14, 1H,  $^3J_{\text{H}1\text{trans}-\text{H}2} = 10,7$  Hz,  $\text{C}1_{\text{T}}-\text{H}$ ); 5,10 (m, 2H,  $\text{C}7-\text{H}$  y  $\text{C}12-\text{H}$ ); 3,77 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}1-\text{H}2} = 7,3$  Hz,  $\text{C}1_{\text{E}}-\text{H}$ ); 3,76 (d, 2 H,  $^3J_{\text{H}1-\text{H}2} = 7,3$  Hz,  $\text{C}1_{\text{Z}}-\text{H}$ ); 2,10 (m, 8H,  $\text{C}5-\text{H}$ ,  $\text{C}6-\text{H}$ ,  $\text{C}10-\text{H}$ ,  $\text{C}11-\text{H}$ ); 1,80 (s, integra 1,20, 3H,  $\text{C}4_{\text{Z}}-\text{H}$ ); 1,71 (s, integra 2,01, 3H,  $\text{C}4_{\text{E}}-\text{H}$ ); 1,68 (s, 3H,  $\text{C}15-\text{H}$ ); 1,61 (s, 6H,  $\text{C}9-\text{H}$  y  $\text{C}14-\text{H}$ ); 1,55 (s, integra 0,45, 3H,  $\text{C}9_{\text{T}}-\text{H}$ ) y 1,35 (s, integra 0,45, 3H,  $\text{C}4_{\text{T}}-\text{H}$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 143,1$  ( $\text{C}_{\text{E}3}$ , cuaternario); 143,0 ( $\text{C}_{\text{Z}3}$ , cuaternario); 140,1 ( $\text{C}_{\text{T}2}$ , cuaternario); 135,9 ( $\text{C}_{\text{Z}8}$ , cuaternario); 135,7 ( $\text{C}_{\text{T}8}$ , cuaternario); 135,6 ( $\text{C}_{\text{E}8}$ , cuaternario); 131,3 y 131,2 ( $\text{C}_{\text{E}13}$ ,  $\text{C}_{\text{Z}13}$  y  $\text{C}_{\text{T}13}$ , cuaternario); 124,3 ( $\text{C}_{\text{E}12}$ ,  $\text{C}_{\text{Z}12}$  y  $\text{C}_{\text{T}12}$ , CH); 123,5 ( $\text{C}_{\text{E}7}$ , CH); 123,4 ( $\text{C}_{\text{T}7}$ , CH); 123,3 ( $\text{C}_{\text{Z}7}$ , CH); 117,9 ( $\text{C}_{\text{Z}2}$ , CH); 117,1 ( $\text{C}_{\text{E}2}$ , CH); 114,6 ( $\text{C}_{\text{T}1}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 64,9 ( $\text{C}_{\text{T}3}$ , cuaternario); 48,0 ( $\text{C}_{\text{E}1}$  y  $\text{C}_{\text{Z}1}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 40,1 ( $\text{C}_{\text{T}5}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 39,7 ( $\text{C}_{\text{T}10}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 39,5 ( $\text{C}_{\text{E}5}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 32,1 ( $\text{C}_{\text{Z}5}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 ( $\text{C}_{\text{E}6}$ ,  $\text{C}_{\text{Z}6}$ ,  $\text{C}_{\text{Z}10}$ ,  $\text{C}_{\text{E}10}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 25,6 ( $\text{C}14$ ,  $\text{CH}_3$ ); 23,3 ( $\text{C}_{\text{T}4}$ ,  $\text{CH}_3$ ); 23,1 ( $\text{C}_{\text{E}4}$ ,  $\text{CH}_3$ ); 22,7 ( $\text{C}_{\text{T}6}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 17,6 ( $\text{C}15$ ,  $\text{CH}_3$ ); 16,4 ( $\text{C}_{\text{E}4}$ ,  $\text{CH}_3$ ); 16,0 ( $\text{C}9$ ,  $\text{CH}_3$ ) y 15,9 ( $\text{C}_{\text{Z}4}$ ,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR** (APCI): Masa calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}^-$  220,20707, masa encontrada 220,21291. **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2968 (=CH-), 2926 (-CH<sub>2</sub>-), 2856 (-CH<sub>2</sub>-C-N-), 2097 (-N<sub>3</sub>), 1665 (-C=C-).

### 9.5.6 Síntesis de mezcla de azidas alílicas provenientes del geraniogeraniol (IA-9, IA-10 e IA-11).

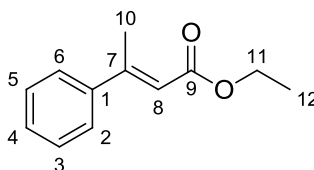
Siguiendo el protocolo general descripto para la síntesis de azidas alílicas, se disolvió geraniol (50 mg; 0,17 mmoles) en tolueno seco (1 mL). Se adiciona 1,3 equivalentes de DPPA (58 mg; 0,22 mmoles) y a continuación, luego del enfriado a 0°C, se añade 1,3 equivalentes de DBU (34 mg, 0,22 mmoles). La reacción cursó en atmósfera inerte durante 2 horas a 0°C y luego 8 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se obtuvo 49 mg de la mezcla de productos como un líquido incoloro con un 92% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,79$  ppm (dd, Integra 0,14, 1H,  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1\text{trans}} = 17,3$  Hz y  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1\text{cis}} = 10,7$  Hz,  $\text{C}2_{\text{T}}\text{-H}$ ); 5,33 (t, 1 H,  $^3J_{\text{H}2-\text{H}1} = 7,3$  Hz,  $\text{C}2_{\text{E}}\text{-H}$  y  $\text{C}2_{\text{Z}}\text{-H}$ ); 5,23 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}1\text{trans}-\text{H}2} = 17,3$  Hz,  $\text{C}1_{\text{T}}\text{-H}$ ); 5,20 (d, integra 0,14, 1H,  $^3J_{\text{H}1\text{trans}-\text{H}2} = 10,7$  Hz,  $\text{C}1_{\text{T}}\text{-H}$ ); 5,10 (m, 3H,  $\text{C}7\text{-H}$ ,  $\text{C}12\text{-H}$  y  $\text{C}17\text{-H}$ ); 3,78 (d, 2 H,  $^3J_{\text{H}1-\text{H}2} = 7,3$  Hz,  $\text{C}1_{\text{E}}\text{-H}$ ); 3,76 (d, 2 H,  $^3J_{\text{H}1-\text{H}2} = 7,3$  Hz,  $\text{C}1_{\text{Z}}\text{-H}$ ); 2,05 (m, 12H,  $\text{C}5\text{-H}$ ,  $\text{C}6\text{-H}$ ,  $\text{C}10\text{-H}$ ,  $\text{C}11\text{-H}$ ,  $\text{C}15\text{-H}$  y  $\text{C}16\text{-H}$ ); 1,80 (s, integra 1,29, 3H,  $\text{C}4_{\text{Z}}\text{-H}$ ); 1,71 (s, integra 1,91, 3H,  $\text{C}4_{\text{E}}\text{-H}$ ); 1,68 (s, 3H,  $\text{C}15\text{-H}$ ); 1,61 (s, 9H,  $\text{C}9\text{-H}$ ,  $\text{C}14\text{-H}$  y  $\text{C}19\text{-H}$ ); 1,55 (s, 3H,  $\text{C}20\text{-H}$ ) y 1,35 (s, integra 0,49, 3H,  $\text{C}4_{\text{T}}\text{-H}$ ). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 143,2$  ppm ( $\text{C}_{\text{E}3}$ , cuaternario); 143,1 ( $\text{C}_{\text{Z}3}$ , cuaternario); ( $\text{C}_{\text{T}2}$ , cuaternario); 140,1 ( $\text{C}_{\text{T}2}$ , cuaternario); 136,0 ( $\text{C}_{\text{Z}8}$ , cuaternario y  $\text{C}_{\text{T}8}$ , cuaternario); 135,6 ( $\text{C}_{\text{E}8}$ , cuaternario); 135,0 ( $\text{C}_{13}$ , cuaternario); 131,3 ( $\text{C}_{18}$ , cuaternario); 124,4 ( $\text{C}_{17}$ , CH); 124,2 ( $\text{C}_{\text{Z}12}$ , CH); 124,2 ( $\text{C}_{\text{T}12}$ , CH); 124,1 ( $\text{C}_{\text{E}12}$ , CH); 123,5 ( $\text{C}_{\text{E}7}$ , CH); 123,5 ( $\text{C}_{\text{T}7}$ , CH); 123,3 ( $\text{C}_{\text{Z}7}$ , CH); 117,9 ( $\text{C}_{\text{Z}2}$ , CH); 117,0 ( $\text{C}_{\text{E}2}$ , CH); 117,0 ( $\text{C}_{\text{T}1}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 48,1 ( $\text{C}_{\text{E}1}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 48,0 ( $\text{C}_{\text{Z}1}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 40,1 ( $\text{C}_{\text{T}5}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 39,7 ( $\text{C}_{11}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 39,7 ( $\text{C}_{16}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 39,5 ( $\text{C}_{\text{E}5}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 32,1 ( $\text{C}_{\text{Z}5}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 29,6 ( $\text{C}_{\text{T}5}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 26,8 ( $\text{C}_{16}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 26,6 ( $\text{C}_{10}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 26,4 ( $\text{C}_{\text{E}6}$  y  $\text{C}_{\text{Z}6}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 ( $\text{C}_{20}$ ,  $\text{CH}_3$ ); 25,2 ( $\text{C}_{\text{T}4}$ ,  $\text{CH}_3$ ); 23,4 ( $\text{C}_{\text{E}4}$ ,  $\text{CH}_3$ ); 22,7 ( $\text{C}_{\text{T}6}$ ,  $\text{CH}_2$ ); 17,7 ( $\text{C}_{19}$ ,  $\text{CH}_3$ ); 16,5 ( $\text{C}_{14}$ ,  $\text{CH}_3$ ); 16,0 ( $\text{C}_{\text{Z}4}$ ,  $\text{CH}_3$ ) y 16,0 ( $\text{C}_9$ ,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2967 (=CH-), 2928 (-CH<sub>2</sub>-), 2882 (-CH<sub>2</sub>-C-N-), 2096 (-N<sub>3</sub>), 1660 (-C=C-).

## 9.6 Síntesis del (E)-etil 3-fenilbut-2-enoato (IA-18)

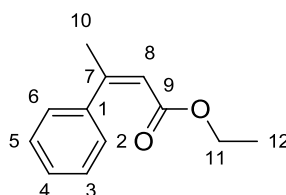
Se prepara una solución de 1,1 equivalentes de NaH (55,2 mg; 2,3 mmoles) en dimetoxietano anhidro (DME, 2 mL/mmol) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Se añade en forma secuencial una solución de 1,1 equivalentes de trietilfosfonoacetato (TEPA, 517 mg; 2,3 mmoles) y de 1 equivalente de acetofenona (250 mg; 2,1 mmoles) en DME (2 mL/mmol) gota a gota. Luego de 3 horas de reacción se adiciona agua a la mezcla de reacción (20 mL) para darle fin. Se extrae con éter etílico (25 mL) y se hacen 3 lavados a la fase orgánica con una solución saturada de NaCl (3 x 15 mL). Se seca la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$  y se retira el solvente en evaporador rotatorio, seguido de bomba de vacío. Se purificó el producto por cromatografía en columna de sílica gel en polaridad creciente de Hexano:Acetato de etilo, obteniendo 205 mg de un líquido incoloro con un 60% de rendimiento. La razón de isómeros E/Z es 92:8.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,47$  ppm (m, 2H, protones aromáticos en posición *meta*,  $\text{C}3\text{-H}$  y  $\text{C}5\text{-H}$ ); 7,37 (m, 3H, protones aromáticos en posiciones *orto* y *para*,  $\text{C}2\text{-H}$ ,  $\text{C}4\text{-H}$  y  $\text{C}6\text{-H}$ ); 6,14

(dd, 1H, protón olefínico, C8–H); 4,22 (c, 2H,  $^3J_{H11-H12} = 7,1$  Hz, C11–H); 2,58 (d, 3H,  $^4J_{H10-H8} = 1,2$  Hz, C10–H) y 1,32 (t, 3H,  $^3J_{H12-H11} = 7,1$  Hz, C12–H). **RMN de  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 166,9$  (C9, carbonilo); 155,5 (C7, olefínico cuaternario); 142,3 (C1, aromático *ipso*); 129,0 (C4, aromático *para*); 128,5 (C3 y C5, aromático *meta*); 126,3 (C2 y C6, aromático *orto*); 117,2 (C8, CH, olefínico); 59,8 (C11, O–CH<sub>2</sub>–); 17,9 (C10, CH<sub>3</sub>) y 14,3 (C12, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** masa calculada para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>), 191,10666; encontrada, 191,10670. **IR (film):**  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 2978 (=CH-), 2926 (-CH<sub>2</sub>-), 1713 (C=O), 1628 (C=C).

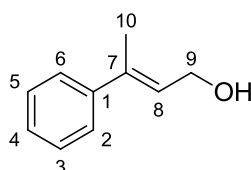
### 9.6.1 (Z)-etil 3-fenilbut-2-enoato (IA-19)



**RMN de  $^1H$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7,47$  ppm (m, 2H, protones aromáticos en posición *meta*, C3–H y C5–H); 7,37 (m, 3H, protones aromáticos en posiciones *orto* y *para*, C2–H, C4–H y C6–H); 5,91 (dd, 1H, protón olefínico, C8–H); 4,00 (c, 2H,  $^3J_{H11-H12} = 7,1$  Hz, C11–H); 2,18 (d, 3H,  $^4J_{H10-H8} = 1,2$  Hz, C10–H) y 1,08 (t, 3H,  $^3J_{H12-H11} = 7,1$  Hz, C12–H). **RMN de  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 166,9$  ppm (C9, carbonilo); 155,3 (C7, olefínico cuaternario); 142,3 (C1, aromático *ipso*); 128,0 (C3 y C5, aromático *meta*); 127,8 (C4, aromático *para*); 126,9 (C2 y C6, aromático *orto*); 117,9 (C8, CH, olefínico); 59,8 (C11, O–CH<sub>2</sub>–); 29,6 (C10, CH<sub>3</sub>) y 14, (C12, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** masa calculada para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>), 191,10666; encontrada, 191,10670. **IR (film):**  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 2978 (=CH-), 2926 (-CH<sub>2</sub>-), 1713 (C=O), 1628 (C=C).

### 9.7 Síntesis del (E)-3-fenilbut-2-en-1-ol (IA-20)

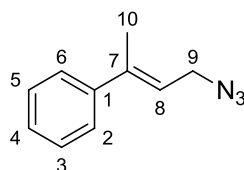
Se disuelve 1 equivalente del éster  $\alpha,\beta$ -insaturado (50 mg, 0,21 mmoles) en THF (5 mL/mmol) y se adiciona lentamente 2,5 equivalentes de LiAlH<sub>4</sub> (20 mg, 0,50 mmoles) a la mezcla de reacción en atmósfera inerte, a temperatura ambiente y con agitación vigorosa. A la hora de reacción se agrega 10 mL de una mezcla metanol:agua (90:10), seguido de 5 mL de una solución de NH<sub>4</sub>Cl al 10%, enfriando el sistema si es necesario. A continuación se realiza una evaporación parcial de la mezcla para eliminar los solventes interferentes. Se extrae con éter (3 x 15 mL) y se lava la fase orgánica con agua destilada (30 mL). Se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evapora en evaporador rotatorio, seguido en bomba de vacío. Se purifica en cromatografía en columna de sílica gel en polaridad creciente de Hexano: AcOEt, obteniendo en un 80% el compuesto de interés, que presenta la característica de un líquido incoloro.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,42$  ppm (m, 2H, protones aromáticos en posición *meta*, C3–H y C5–H); 7,37 (t, 2H, protones aromáticos en posiciones *orto*, C2–H y C6–H); 7,21 (d, 1H, protones aromáticos en posiciones *para*, C4–H); 5,98 (dt, 1 H,  $^3J_{\text{H8-H9}} = 6,7$  Hz,  $^4J_{\text{H8-H10TRANS}} = 1,3$  Hz, C8–H); 4,37 (c, 2H,  $^3J_{\text{H9-H8}} = 6,7$  Hz, C9–H) y 2,09 (d, 3H,  $^4J_{\text{H10-H8}} = 1,3$  Hz, C10–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 142,9$  ppm (C1, aromático *ipso*); 128,5 (C7, olefínico cuaternario); 128,3 (C3 y C5, aromático *meta*); 127,0 (C4, aromático *para*); 125,8 (C2 y C6, aromático *orto*); 60,0 (C9, O–CH<sub>2</sub>–) y 16,0 (C10, CH<sub>3</sub>). **EMAR**: masa calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}^+$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 149,09609; encontrada, 149,09610. **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3402 (O–H), 2969 (=CH–), 2921 (–CH<sub>2</sub>–).

### 9.8 Síntesis del (*E*)-(4-azidobut-2-en-2-il) benceno (IA-12).

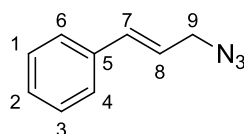
Siguiendo el protocolo general descrito para la síntesis de azidas alílicas, se disolvió alcohol  $\alpha,\beta$ -insaturado (34 mg; 0,23 mmoles) en tolueno seco (1 mL). Se adiciona 1,3 equivalentes de DPPA (79 mg; 0,30 mmoles) y a continuación, luego del enfriado a 0°C, se añade 1,3 equivalentes de DBU (46 mg, 0,30 mmoles). La reacción cursó en atmósfera inerte durante 2 horas a 0°C y luego 8 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se obtuvo 36 mg de la azida como un líquido incoloro con un 91% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,42$  ppm (m, 2H, protones aromáticos en posición *meta*, C3–H y C5–H); 7,32 (m, 3H, protones aromáticos en posiciones *orto* y *para*, C2–H, C4–H y C6–H); 5,88 (dt, 1 H,  $^3J_{\text{H8-H9}} = 6,7$  Hz y  $^4J_{\text{H8-H10TRANS}} = 1,3$  Hz, C8–H); 3,99 (c, 2H,  $^3J_{\text{H9-H8}} = 6,7$  Hz, C9–H) y 2,12 (d, 3H,  $^4J_{\text{H10-H8}} = 1,3$  Hz, C10–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 142,4$  ppm (C1, aromático *ipso*); 142,0 (C7, olefínico cuaternario); 128,3 (C3 y C5, aromático *meta*); 126,0 (C4, aromático *para*); 125,9 (C2 y C6, aromático *orto*); 120,2 (C8, olefínico CH); 48,6 (C9, N–CH<sub>2</sub>–) y 16,3 (C10, CH<sub>3</sub>). **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2976 (=CH–), 2928 (–CH<sub>2</sub>–), 2095 (–N<sub>3</sub>), 1623 (C=C).

#### 9.8.1 Síntesis de cinamilazida (IA-15).

Siguiendo el protocolo general descrito para la síntesis de azidas alílicas, se disolvió cinamol (50 mg; 0,37 mmoles) en tolueno seco (1 mL). Se adiciona 1,3 equivalentes de DPPA (126 mg; 0,48 mmoles) y a continuación, luego del enfriado a 0°C, se añade 1,3 equivalentes de DBU (74 mg, 0,48 mmoles). La reacción cursó en atmósfera inerte durante 2 horas a 0°C y luego 8 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se obtuvo 47 mg de la cinamilazida como un líquido incoloro con un 78% de rendimiento.



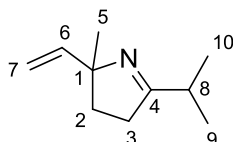
**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,35$  ppm (m, 5H, protones aromáticos); 6,66 (d ancho,  $^3J_{\text{H}7-\text{H}8\text{trans}} = 15,8$  Hz, C7-H); 6,25 (dt,  $^3J_{\text{H}8-\text{H}7\text{trans}} = 15,7$  Hz,  $^3J_{\text{H}8-\text{H}9} = 6,6$  Hz, C8-H) y 3,95 (d ancho; 2H,  $^3J_{\text{H}9-\text{H}8} = 6,5$  Hz, C9-H). Espectro concuerda con reportado en literatura.<sup>[9.1]</sup>

## 9.9 Método general para la preparación de iminas cíclicas por ciclación térmica intramolecular

Se diluye la mezcla de azidas alílicas en tolueno hasta una concentración final de 1 mM y se lleva el sistema a reflujo. La reacción se completa a 12 horas. Una vez finalizada, se evapora el solvente y se purifica por cromatografía en columna de sílica gel corrida en polaridad creciente. Finalmente se evapora el solvente en evaporador rotatorio y se seca en bomba de vacío.

### 9.9.1 Síntesis del 5-isopropil-2-metil-2-vinil-3,4-dihidro-2H-pirrol (Imina-IA-5)

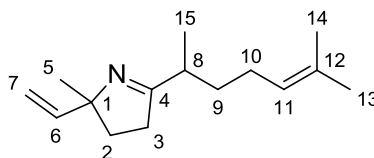
Siguiendo el protocolo descrito para la preparación de iminas cíclicas, se diluye 100 mg de geranilazida (0,56 mmoles) en 5,6 mL de tolueno. Completa la reacción, y luego de la etapa de purificación, se obtiene 52 mg de un aceite incoloro con un 61% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,01$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{HHtrans}} = 17,1$  Hz y  $^3J_{\text{HHcis}} = 10,9$  Hz, C6-H); 5,09 (dt; 1H,  $J = 6,6$  Hz, C11-H); 5,04 (ddd, 1H,  $^3J_{\text{HHtrans}} = 17,2$  Hz, C7<sub>trans</sub>-H); 4,95 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HHcis}} = 11,0$  Hz, C7<sub>cis</sub>-H); 2,57 (h, 1H,  $^3J = 7,2$  Hz, C8-H); 2,48 (m, 2H, C3-H); 2,00 a 1,80 (m, 2H, C2-H); 1,30 (s, 3H, C5-H) y 1,10 (d, 3H,  $^3J = 6,9$  Hz, C15-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 180,1$  (C4, cuaternario); 144,7 (C6, CH olefínico); 111,0 (C7, CH<sub>2</sub> vinílico); 75,2 (C1, cuaternario); 37,8 (C8, CH); 34,8 (C2, CH<sub>2</sub>); 33,6 (C3, CH<sub>2</sub>); 26,9 (C9 y C10, CH<sub>2</sub>) y 26,2 (C5, CH<sub>3</sub>). **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2926 (-CH<sub>2</sub>-), 2854, 1639 (C=N).

### 9.9.2 Síntesis del 2-metil-5-(6-metilhept-5-en-2-il)-2-vinil-3,4-dihidro-2H-pirrol (Imina-IA-8)

Siguiendo el protocolo descrito para la preparación de iminas cíclicas, se diluye 100 mg de farnesilazida (0,40 mmoles) en 5 mL de tolueno. Completa la reacción, y luego de la etapa de purificación, se obtiene 70 mg de un aceite incoloro con un 80% de rendimiento.

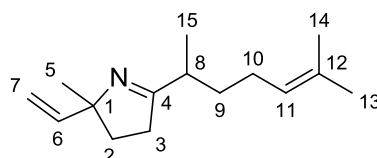


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,96$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{HHtrans}} = 17,3$  Hz y  $^3J_{\text{HHcis}} = 10,7$  Hz, C6-H); 5,10 (dt; 1H,  $J = 6,6$  Hz, C11-H); 5,04 (ddd, 1H,  $^3J_{\text{HHtrans}} = 17,0$  Hz, C7<sub>trans</sub>-H); 4,95 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HHcis}} = 11,0$  Hz, C7<sub>cis</sub>-H); 2,57 (h, 1H,  $^3J = 7,4$  Hz, C8-H); 2,48 (m, 1H, C3-H); 2,00 a 1,80 (m, 4H, C2-H y C10-H); 1,66 (s, 3H, C13-H intercambiable); 1,57 (s, 3H, C14-H intercambiable); 1,51 (m, 2H,

C9–H); 1,30 (d, 3H,  $^4J= 1,4$  Hz, C5–H); y 1,11 (d, 3H,  $^3J= 6,9$  Hz, C15–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 180,5$  (C4, cuaternario); 144,5 (C6, CH olefínico); 131,7 (C12, olefínico cuaternario); 124,1 (C11, CH olefínico); 110,8 (C7,  $\text{CH}_2$  vinílico); 75,5 (C1, cuaternario); 37,8 (C8, CH); 35,1 (C9,  $\text{CH}_2$ ); 34,8 (C2,  $\text{CH}_2$ ); 33,6 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 26,9 (C10,  $\text{CH}_2$ ); 26,0 (C5,  $\text{CH}_3$ ); 25,9 (C13,  $\text{CH}_3$ ); 18,3 (C14,  $\text{CH}_3$ ) y 17,6 (C15,  $\text{CH}_3$ ). **GC-MS**: Tiempo de retención, 12,85 min. **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2970 (=CH-), 2929 (-CH<sub>2</sub>-), 1591 (C=N),

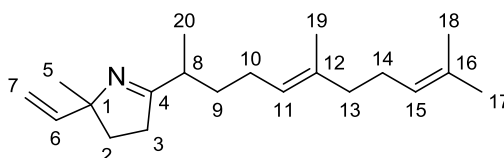
### 9.9.3 Síntesis del 2-metil-5-(6-metilhept-5-en-2-il)-2-vinil-3,4-dihidro-2H-pirrol asistido por microondas.

Siguiendo el protocolo descrito para la preparación de iminas cíclicas, se diluye 100 mg de farnesilazida (0,40 mmoles) en 5 mL de tolueno. La solución reacciona asistida por el microondas, obteniendo el producto en 20 minutos a temperatura constante de 150 °C. Completa la reacción, y luego de la etapa de purificación, se obtiene 88 mg de un aceite incoloro con un 100% de rendimiento.



### 9.9.4 Síntesis del (E)-5-(6,10-dimetilundeca-5,9-dien-2-il)-2-metil-2-vinil-3,4-dihidro-2H-pirrol (Imina-IA-11)

Siguiendo el protocolo descrito para la preparación de iminas cíclicas, se diluye 25 mg de geranilgeranilazida (0,08 mmoles) en 5 mL de tolueno. Completa la reacción, y luego de la etapa de purificación, se obtiene 18 mg de un aceite incoloro con un 78% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,97$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{HHtrans}}= 17,1$  Hz y  $^3J_{\text{HHcis}}= 10,5$  Hz, C6–H); 5,08 (m; 2H, C11–H y C15–H); 5,03 (m, 1H, C7<sub>trans</sub>–H); 4,94 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HHcis}}= 10,8$  Hz, C7<sub>cis</sub>–H); 2,58 (m, 1H, C8–H); 2,50 (m, 1H, C3–H); 2,00 a 1,80 (m, 8H, C2–H, C10–H, C13–H y C14–H); 1,67 (s, 3H, C17–H intercambiable); 1,59 (s, 3H, C18–H intercambiable); 1,57 (s, 3H, C19–H); 1,51 (m, 2H, C9–H); 1,31 (d, 3H,  $^4J= 1,4$  Hz, C5–H); y 1,12 (d, 3H,  $^3J= 6,9$  Hz, C20–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 181,1$  ppm (C4, cuaternario); 144,5 (C6, CH olefínico); 135,4 (C16, olefínico cuaternario); 131,3 (C12, olefínico cuaternario); 124,3 (C11, CH olefínico); 123,9 (C15, CH olefínico); 111,0 (C7,  $\text{CH}_2$  vinílico); 75,3 (C1, cuaternario); 39,7 (C14,  $\text{CH}_2$ ); 37,8 (C8, CH); 35,1 (C9,  $\text{CH}_2$ ); 34,8 (C2,  $\text{CH}_2$ ); 33,7 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 32,8 (C14,  $\text{CH}_2$ ); 27,0 (C10,  $\text{CH}_2$ ); 25,8 (C17,  $\text{CH}_3$ ); 22,1 (C5,  $\text{CH}_3$ ); 18,2 (C18,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C20,  $\text{CH}_3$ ) y 16,0 (C19,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2960 (=CH-), 2924 (-CH<sub>2</sub>-), 1580 (C=N).

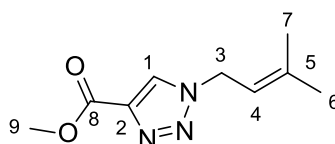
## 9.10 Método general para la preparación de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos utilizando “Click Chemistry”.

Se disuelve un equivalente de alquino en H<sub>2</sub>O:t-BuOH (1:1, 10 mL por mmol de alquino) bajo agitación magnética constante. A esta solución se le agrega en forma secuencial 1,1 equivalentes de azida, 0,05 equivalentes de CuSO<sub>4</sub> y 0,2 equivalentes de ascorbato de sodio. La reacción se deja agitando a temperatura ambiente por 24 horas. Una vez finalizada, se diluye la mezcla de reacción en H<sub>2</sub>O destilada y se extrae la fase acuosa con 3 agregados de AcOEt. Los extractos orgánicos combinados se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y se evapora el solvente a presión reducida utilizando el evaporador rotatorio en primer lugar y finalmente bomba de vacío.

Los triazoles obtenidos se purificaron en cromatografía en columna de sílica gel, corrido en gradiente de polaridad creciente y utilizando AcOEt y MeOH como solventes.

### 9.10.1 Síntesis del Metil 1-(3-metilbut-2-enil)-4,5-dihidro-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato (IT-1).

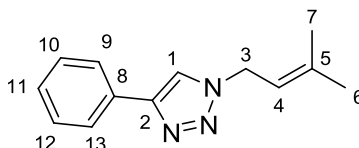
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el propiolato de metilo (178 mg; 2,03 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (4 mL). Luego se adiciona prenilazida (75 µL; 0,68 mmoles) como una solución al 6% en tolueno, CuSO<sub>4</sub> 1M (34 µL; 0,034 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (135 µL; 0,135 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se aislaron 109 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 83%.



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,04 ppm (s, 1H, protón triazol, C1-H); 5,45 (tq, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H3</sub> = 7,4 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H4-H7</sub> = 1,4 Hz, C4-H); 5,00 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub> = 7,3 Hz, C3-H); 3,95 (s, 3H, OMe, O-C9-H); 1,83 (s, 3H, metilo, C6-H) y 1,80 (s, 3H, metilo, C7-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 161,2 (C8, carbonilo); 141,2 (C2, triazol cuaternario); 139,8 (C5, olefínico cuaternario); 126,8 (C1, CH triazol); 116,2 (C4, CH olefínico); 52,1 (C9, OCH<sub>3</sub>); 48,1 (C3, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C6, CH<sub>3</sub>) y 18,1 (C7, CH<sub>3</sub>). **EMAR** calculado para C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 196,1081, encontrado m/z 196,1084.

### 9.10.2 Síntesis del 1-(3-metilbut-2-enil)-4-fenil-4,5-dihidro-1H-1,2,3-triazol (IT-2).

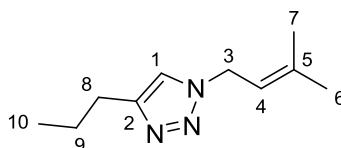
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el etinilbenceno (138 mg; 1,35 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (4 mL). Luego se adiciona prenilazida (75 µL; 0,68 mmoles) como una solución al 6% en tolueno, CuSO<sub>4</sub> 1M (34 µL; 0,034 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (135 µL; 0,135 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 133 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 93%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7,83 ppm (m, 2H, protones aromáticos en posición *orto*, Ar9–H y Ar13–H); 7,71 (s, 1H, protón triazol, C1–H); 7,42 (m, 2H, protones aromáticos en posición *meta* Ar10–H y Ar12–H); 7,32 (m, 1H, protón aromático en posición *para* Ar11–H); 5,48 (tq, 1H,  $^3J = 7,3$  Hz,  $H_4$ - $H_3$ ,  $^4J = 1,4$  Hz,  $H_4$ - $H_7$ , 7,3 Hz, C4–H); 5,00 (d, 2H,  $^3J = 7,3$  Hz,  $H_3$ - $H_4$ , C3–H) y 1,83 (s, 6H, metilos, C7–H y C6–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 147,7 (C2, triazol cuaternario); 139,7 (C5, olefínico cuaternario); 130,8 (C8, *ipso* aromático); 128,7 (C10 y C12, aromático *meta*); 128,0 (C11, aromático *para*); 125,6 (C9 y C13, aromático *orto*); 119,2 (C1, CH triazol); 117,3 (C4, CH olefínico); 48,1 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C6,  $\text{CH}_3$ ), y 18,1 (C7,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3$  214,1336, encontrado m/z 214,1344.

### 9.10.3 Síntesis del 1-(3-metilbut-2-enil)-4-propil-4,5-dihidro-1H-1,2,3-triazol (IT-3).

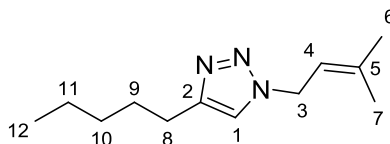
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el pentino (138 mg; 2,03 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (4 mL). Luego se adiciona prenilazida (75  $\mu\text{L}$ ; 0,68 mmoles) como una solución al 6% en tolueno,  $\text{CuSO}_4$  1M (34  $\mu\text{L}$ ; 0,034 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (135  $\mu\text{L}$ ; 0,135 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se aislaron 89 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 74%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7,21 ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (tq, 1H,  $^3J_{H_4-H_3} = 7,4$  Hz y  $^4J_{H_4-H_7} = 1,4$  Hz, C4–H); 4,90 (d, 2H,  $^3J_{H_3-H_4} = 7,3$  Hz, C3–H); 2,67 (t, 2H,  $^3J_{H_8-H_9} = 7,6$  Hz, C8–H); 1,79 (s, 3H, metilo, C6–H); 1,78 (s, 3H, metilo, C7–H); 1,68 (h, 2H,  $^3J = 7,6$  Hz, C9–H) y 0,96 (t, 3H,  $^3J = 7,5$  Hz, metilo C10–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 148,2 ppm (C2, triazol cuaternario); 139,2 (C5, olefínico cuaternario); 119,9 (C1, CH triazol); 117,6 (C4, CH olefínico); 47,8 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 27,7 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 25,6 (C6,  $\text{CH}_3$ ); 22,7 (C9,  $\text{CH}_2$ ); 18,0 (C7,  $\text{CH}_3$ ) y 13,8 (C10,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3$  180,1494, encontrado m/z 180,1501.

### 9.10.4 Síntesis del 1-(3-metilbut-2-enil)-4-pentil-4,5-dihidro-1H-1,2,3-triazol (IT-4).

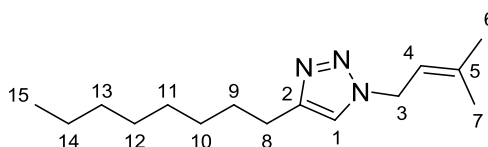
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el heptino (130 mg; 1,35 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (4 mL). Luego se adiciona prenilazida (75  $\mu\text{L}$ ; 0,68 mmoles) como una solución al 6% en tolueno,  $\text{CuSO}_4$  1M (34  $\mu\text{L}$ ; 0,034 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (135  $\mu\text{L}$ ; 0,135 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se aislaron 116 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 83%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,22$  ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,42 (tq, 1H,  $^3J_{\text{H}_4\text{-H}_3} = 7,4$  Hz y  $^4J_{\text{H}_4\text{-H}_7} = 1,4$  Hz, C4–H); 4,90 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_3\text{-H}_4} = 7,3$  Hz, C3–H); 2,68 (t, 2H,  $^3J_{\text{H}_8\text{-H}_9} = 7,6$  Hz, C8–H); 1,80 (s, 3H, metilo, C6–H); 1,79 (s, 3H, metilo, C7–H); 1,66 (m, 2H, C9–H); 1,33 (m, 4H, C10–H y C11–H) y 0,96 (t,  $^3J = 7,4$  Hz, metilo, C12–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 148,5$  (C2, triazol cuaternario); 139,2 (C5, olefínico cuaternario); 119,9 (C1, CH triazol); 117,6 (C4, CH olefínico); 47,8 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 31,4 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 29,2 a 25,7 (C10 a C11,  $\text{CH}_2$ ); 25,6 (C6,  $\text{CH}_3$ ); 22,4 (C9,  $\text{CH}_2$ ); 18,0 (C7,  $\text{CH}_3$ ) y 14,0 (C12,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_3$  208,1808; encontrado m/z 208,1808.

### 9.10.5 Síntesis del 4,5-dihidro-1-(3-metilbut-2-enil)-4-octil-1H-1,2,3-triazol (IT-5).

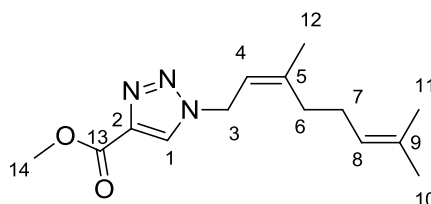
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el decino (95 mg; 0,75 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (4 mL). Luego se adiciona prenilazida (75  $\mu\text{L}$ ; 0,68 mmoles) como una solución al 6% en tolueno,  $\text{CuSO}_4$  1M (34  $\mu\text{L}$ ; 0,034 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (135  $\mu\text{L}$ ; 0,135 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la etapa de purificación se aislaron 134 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 80%.



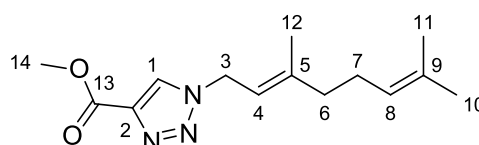
**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,21$  ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (tq, 1H,  $^3J = 7,4$  Hz y  $^4J_{\text{H}_4\text{-H}_7} = 1,4$  Hz, C4–H); 4,90 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_3\text{-H}_4} = 7,3$  Hz, C3–H); 2,68 (t, 2H,  $^3J_{\text{H}_8\text{-H}_9} = 7,6$  Hz, C8–H); 1,80 (s, 3H, metilo, C6–H); 1,79 (s, 3H, metilo, C7–H); 1,65 (m, 2H, C9–H); 1,29 (m, 10H, C10–H a C14–H) y 0,87 (t,  $^3J_{\text{H}_{15}\text{-H}_{14}} = 7,4$  Hz, metilo, C15–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 148,4$  ppm (C2, triazol cuaternario); 139,0 (C5, olefínico cuaternario); 119,8 (C1, CH triazol); 117,6 (C4, CH olefínico); 47,7 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 31,8 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 29,5 a 29,2 (C10 a C14,  $\text{CH}_2$ ); 25,6 (C6,  $\text{CH}_3$ ); 22,6 (C9,  $\text{CH}_2$ ); 17,9 (C7,  $\text{CH}_3$ ) y 14,0 (C15,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_3$  250,2278; encontrado m/z 250,2285.

### 9.10.6 Síntesis del metil 1-((Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato (IT-6) (ITy del metil 1-((E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato (IT-11)).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el propiolato de metilo (24 mg; 0,28 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (2 mL). Luego se adiciona la mezcla de geranilazida (50 mg; 0,28 mmoles),  $\text{CuSO}_4$  1M (12  $\mu\text{L}$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (50  $\mu\text{L}$ ; 0,06 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 63 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 86% (razón E:Z de 6:4).



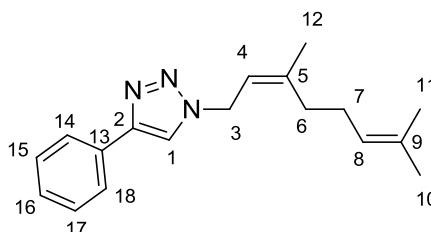
**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,01$  ppm (s, 1H, protón triazol, C1-H); 5,44 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4\text{-H}_3} = 7,4$  Hz, C4-H); 5,05 (m, 1H, C8-H); 5,00 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_3\text{-H}_4} = 7,1$  Hz, C3-H); 3,95 (s, 3H, OMe, O-C14-H); 2,15 (m, 4H, C6-H y C7-H); 1,83 (s, 3H, metilo, C12-H); 1,68 (s, 3H, metilo, C11-H) y 1,60 (s, 3H, metilo, C10-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 161,2$  ppm (C13, carbonilo); 144,4 (C2, triazol cuaternario); 139,8 (C9, olefínico cuaternario); 132,2 (C5, olefínico cuaternario); 126,8 (C1, CH triazol); 123,2 (C8, CH olefínico); 116,2 (C4, CH olefínico); 52,1 (C14,  $\text{OCH}_3$ ); 47,9 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 32,1 (C6,  $\text{CH}_2$ ); 26,1 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C10,  $\text{CH}_3$ ); 23,4 (C12,  $\text{CH}_3$ ) y 17,7 (C11,  $\text{CH}_3$ ).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,04$  ppm (s, 1H, protón triazol, C1-H); 5,44 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4\text{-H}_3} = 7,4$  Hz, C4-H); 5,05 (m, 1H, C8-H); 5,00 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_3\text{-H}_4} = 7,1$  Hz, C3-H); 3,95 (s, 3H, OMe, O-C14-H); 2,15 (m, 4H, C6-H y C7-H); 1,78 (s, 3H, metilo, C12-H); 1,69 (s, 3H, metilo, C11-H) y 1,60 (s, 3H, metilo, C10-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 161,2$  ppm (C13, carbonilo); 147,7 (C2, triazol cuaternario); 139,8 (C9, olefínico cuaternario); 132,9 (C5, olefínico cuaternario); 126,7 (C1, CH triazol); 123,3 (C8, CH olefínico); 116,0 (C4, CH olefínico); 52,1 (C14,  $\text{OCH}_3$ ); 48,1 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 39,3 (C6,  $\text{CH}_2$ ); 26,0 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,6 (C10,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C11,  $\text{CH}_3$ ) y 16,5 (C12,  $\text{CH}_3$ ).

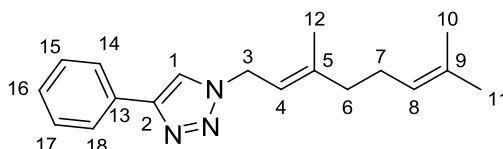
### 9.10.7 Síntesis del 1-((Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (IT-7) y del 1-((E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (IT-12).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el fenilacetileno (29 mg; 0,28 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (2 mL). Luego se adiciona la mezcla de geranilazida (50 mg; 0,28 mmoles),  $\text{CuSO}_4$  1M (12  $\mu\text{L}$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (50  $\mu\text{L}$ ; 0,06 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 59 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 75% (razón E:Z de 6:4).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,82$  ppm (m, 2H, protones aromáticos en posición *orto*, Ar14-H y Ar18-H); 7,71 (s, 1H, protón triazol, C1-H); 7,42 (m, 2H, protones aromáticos en posición *meta* Ar15-H y Ar17-H); 7,32 (m, 1H, protón aromático en posición *para* Ar16-H); 5,48 (t,

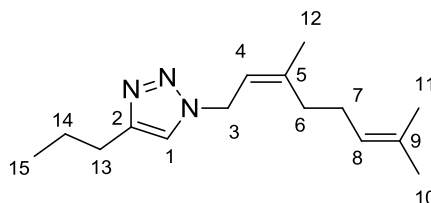
1H,  $^3J_{H4-H3}=7,3$  Hz, C4–H); 5,08 (m, 1H, C8–H); 5,00 (d, 2H,  $^3J_{H3-H4}=7,3$  Hz, C3–H); 2,20 (m, 2H, C6–H); 2,13 (m, 2H, C7–H); 1,83 (s, 3H, metilo, C12–H); 1,68 (s, 3H, metilo, C10–H) y 1,61 (s, 3H, metilo, C11–H). **RMN de  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 147,7 ppm (C2, triazol cuaternario); 143,2 (C9, olefínico cuaternario); 132,6 (C5, olefínico cuaternario); 130,8 (C13, aromático *ipso*); 128,8 (C15 y C17, aromático *meta*); 128,0 (C16, aromático *para*); 125,7 (C14 y C18, aromático *orto*); 123,2 (C8, CH olefínico); 117,9 (C4, CH olefínico); 117,1 (C1, CH triazol); 47,7 (C3, CH<sub>2</sub>); 32,1 (C6, CH<sub>2</sub>); 26,2 (C7, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C10, CH<sub>3</sub>); 23,4 (C12, CH<sub>3</sub>) y 17,7 (C11, CH<sub>3</sub>). **EMAR** calculado para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub> 282,1970; encontrado m/z 282,1961.



**RMN de  $^1H$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,82 ppm (m, 2H, protones aromáticos en posición *orto*, Ar14–H y Ar18–H); 7,70 (s, 1H, protón triazol, C1–H); 7,42 (m, 2H, protones aromáticos en posición *meta* Ar15–H y Ar17–H); 7,32 (m, 1H, protón aromático en posición *para* Ar16–H); 5,48 (t, 1H,  $^3J_{H4-H3}=7,3$  Hz, C4–H); 5,08 (m, 1H, C8–H); 5,00 (d, 2H,  $^3J_{H3-H4}=7,0$  Hz, C3–H); 2,20 (m, 2H, C6–H); 2,13 (m, 2H, C7–H); 1,81 (s, 3H, metilo, C12–H); 1,68 (s, 3H, metilo, C11–H) y 1,62 (s, 3H, metilo, C10–H). **RMN de  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 147,7 ppm (C2, triazol cuaternario); 143,2 (C9, olefínico cuaternario); 132,1 (C5, olefínico cuaternario); 130,8 (C13, aromático *ipso*); 128,8 (C15 y C17, aromático *meta*); 128,0 (C16, aromático *para*); 125,6 (C14 y C18, aromático *orto*); 123,4 (C8, CH olefínico); 119,2 (C4, CH olefínico); 117,1 (C1, CH triazol); 47,9 (C3, CH<sub>2</sub>); 39,4 (C6, CH<sub>2</sub>); 26,1 (C7, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C10, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C11, CH<sub>3</sub>) y 16,5 (C12, CH<sub>3</sub>). **EMAR** calculado para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub> 282,1970; encontrado m/z 282,1957.

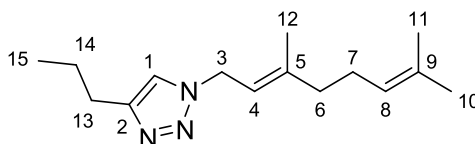
### 9.10.8 Síntesis del 1-((Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-4-propil-1H-1,2,3-triazol (IT-8) y del 1-((E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-4-propil-1H-1,2,3-triazol (IT-13).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el pentino (19 mg; 0,28 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (2 mL). Luego se adiciona mezcla de geranilazida (50 mg; 0,28 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (12  $\mu$ L; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (50  $\mu$ L; 0,06 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 59 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 87% (razón *E*:*Z* de 6:4).



**RMN de  $^1H$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,21 ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (dt, 1H,  $^3J_{H4-H3}=7,4$  Hz y  $^4J_{H4-H7}=1,4$  Hz, C4–H); 5,09 (dt, 1H,  $^3J_{H8-H7}=7,2$  Hz y  $^4J_{H8-H10}=1,4$  Hz, C8–H); 4,90 (d, 2H,  $^3J_{H3-H4}=7,2$  Hz, C3–H); 2,63 (t, 2H,  $^3J_{H13-H14}=7,6$  Hz, C13–H); 2,16 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,80 (s, 3H, metilo, C12–H); 1,68 (s, 3H, metilo, C11–H); 1,68 (h, 2H,  $^3J_{H14-H}=7,5$  Hz, C14–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C10–H) y 0,96 (t, 3H,  $^3J_{H15-H14}=7,3$  Hz, metilo, C15–H). **RMN de  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  =

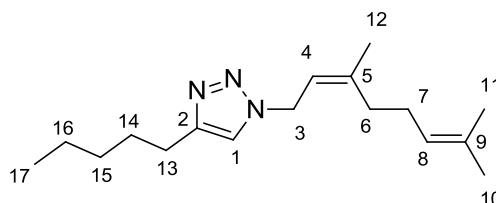
148,3 ppm (C2, triazol cuaternario); 142,6 (C9, olefínico cuaternario); 132,6 (C5, olefínico cuaternario); 123,2 (C8, CH olefínico); 119,9 (C1, CH triazol); 118,2 (C4, CH olefínico); 47,6 (C3, CH<sub>2</sub>); 32,0 (C6, CH<sub>2</sub>); 27,8 (C13, CH<sub>2</sub>); 26,3 (C7, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C10, CH<sub>3</sub>); 23,4 (C12, CH<sub>3</sub>); 22,8 (C14, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C11, CH<sub>3</sub>) y 13,8 (C15, CH<sub>3</sub>). **EMAR** calculada para C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub> 248,2127; encontrada m/z 248,2134.



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,21 (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H3</sub> = 7,4 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H4-H7</sub> = 1,4 Hz, C4–H); 5,09 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H8-H7</sub> = 7,2 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H8-H10</sub> = 1,4 Hz, C8–H); 4,90 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub> = 7,2 Hz, C3–H); 2,67 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H13-H14</sub> = 7,6 Hz, C13–H); 2,16 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,76 (s, 3H, metilo, C12–H); 1,68 (s, 3H, metilo, C11–H); 1,68 (h, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H14-H15</sub> = 7,5 Hz, C14–H); 1,59 (s, 3H, metilo, C10–H) y 0,96 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H15-H14</sub> = 7,3 Hz, metilo, C15–H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 148,2 (C2, triazol cuaternario); 142,7 (C9, olefínico cuaternario); 132,6 (C5, olefínico cuaternario); 123,2 (C8, CH olefínico); 119,9 (C1, CH triazol); 117,4 (C4, CH olefínico); 47,7 (C3, CH<sub>2</sub>); 39,4 (C6, CH<sub>2</sub>); 27,8 (C13, CH<sub>2</sub>); 26,1 (C7, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C10, CH<sub>3</sub>); 22,8 (C14, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C11, CH<sub>3</sub>); 16,4 (C12, CH<sub>3</sub> y 13,8 (C15, CH<sub>3</sub>). **EMAR** calculada para C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub> 248,2127; encontrada m/z 248,2131.

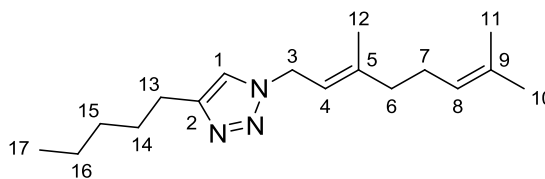
#### 9.10.9 Síntesis del 1-((Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-4-pentil-1H-1,2,3-triazol (IT-9) y del 1-((E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-4-pentil-1H-1,2,3-triazol (IT-14).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el heptino (27 mg; 0,28 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (2 mL). Luego se adiciona la mezcla de geranilazida (50 mg; 0,28 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (12 μL; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (50 μL; 0,06 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 65 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 85% (razón E:Z de 6:4).



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,21 (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H3</sub> = 7,3 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H4-H7</sub> = 1,4 Hz, C4–H); 5,01 (tt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H8-H7</sub> = 7,2 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H8-H10</sub> = 1,4 Hz, C8–H); 4,89 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub> = 7,3 Hz, C3–H); 2,67 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H13-H14</sub> = 7,6 Hz, C13–H); 2,15 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,80 (s, 3H, metilo, C12–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C11–H); 1,65 (m, 2H, C14–H); 1,60 (s, 3H, metilo, C10–H); 1,32 (m, 4H, C15–H y C16–H) y 0,88 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H17-H16</sub> = 7,3 Hz, metilo, C17–H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 148,5 (C2, triazol cuaternario); 142,5 (C9, olefínico cuaternario); 132,6 (C5, olefínico cuaternario); 123,2 (C8, CH olefínico); 119,8 (C1, CH triazol); 118,2 (C4, CH olefínico); 47,6 (C3, CH<sub>2</sub>); 32,1 (C6, CH<sub>2</sub>); 31,4 (C15, CH<sub>2</sub>); 29,6 (C14, CH<sub>2</sub>); 26,2 (C7, CH<sub>2</sub>); 25,7

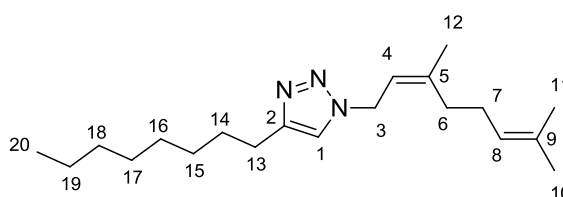
(C10, CH<sub>3</sub>); 25,7 (C13, CH<sub>2</sub>); 23,4 (C12, CH<sub>3</sub>); 22,4 (C16, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C11, CH<sub>3</sub>) y 14,0 (C17, CH<sub>3</sub>).



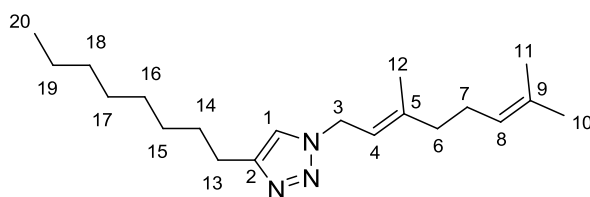
**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,20 (s, 1H, protón triazol, C1-H); 5,42 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H3</sub> = 7,3 Hz, C4-H); 5,06 (s ancho, 1H, C8-H); 4,92 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub> = 7,2 Hz, C3-H); 2,68 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H13-H14</sub> = 7,6 Hz, C13-H); 2,10 (m, 4H, C6-H y C7-H); 1,77 (s, 3H, metilo, C12-H); 1,68 (s, 3H, metilo, C11-H); 1,65 (m, 2H, C14-H); 1,59 (s, 3H, metilo, C10-H); 1,32 (m, 4H, C15-H y C16-H) y 0,88 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H17-H16</sub> = 7,3 Hz, metilo, C17-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 148,4 (C2, triazol cuaternario); 142,6 (C9, olefínico cuaternario); 132,0 (C5, olefínico cuaternario); 123,5 (C8, CH olefínico); 119,8 (C1, CH triazol); 117,4 (C4, CH olefínico); 47,7 (C3, CH<sub>2</sub>); 39,4 (C6, CH<sub>2</sub>); 31,4 (C15, CH<sub>2</sub>); 29,2 (C14, CH<sub>2</sub>); 26,1 (C7, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C10, CH<sub>3</sub>); 25,7 (C13, CH<sub>2</sub>); 22,4 (C16, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C11, CH<sub>3</sub>); 16,4 (C12, CH<sub>3</sub>) y 14,0 (C17, CH<sub>3</sub>).

#### 9.10.10 Síntesis del 1-((Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-4-octil-1H-1,2,3-triazol (IT-10) y del 1-((E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-4-octil-1H-1,2,3-triazol (IT-15).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el decino (39 mg; 0,28 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (2 mL). Luego se adiciona la mezcla de geranilazida (50 mg; 0,28 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (12 μL; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (50 μL; 0,06 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 73 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 82% (razón E:Z de 6:4).



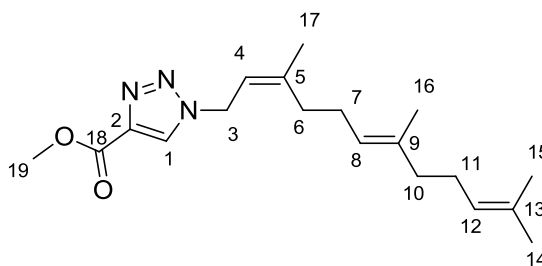
**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,21 (s, 1H, protón triazol, C1-H); 5,42 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H3</sub> = 7,2 Hz, C4-H); 5,09 (m, 1H, C8-H); 4,90 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub> = 7,2 Hz, C3-H); 2,69 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H13-H14</sub> = 7,7 Hz, C13-H); 2,16 (m, 4H, C6-H y C7-H); 1,80 (s, 3H, metilo, C12-H); 1,69 (s, 3H, metilo, C11-H); 1,66 (m, 2H, C14-H); 1,61 (s, 3H, metilo, C10-H); 1,26 (m, 10H, C15-H a C19-H) y 0,87 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H20-H19</sub> = 6,8 Hz, metilo, C20-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 148,5 (C2, triazol cuaternario); 142,5 (C9, olefínico cuaternario); 132,6 (C5, olefínico cuaternario); 123,2 (C8, CH olefínico); 119,8 (C1, CH triazol); 118,2 (C4, CH olefínico); 47,5 (C3, CH<sub>2</sub>); 32,0 (C6, CH<sub>2</sub>); 31,8 (C18, CH<sub>2</sub>); 29,5 a 29,2 (C14 a C17, CH<sub>2</sub>); 26,3 (C7, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C10, CH<sub>3</sub>); 25,7 (C13, CH<sub>2</sub>); 23,3 (C12, CH<sub>3</sub>); 22,6 (C19, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C11, CH<sub>3</sub>) y 14,0 (C20, CH<sub>3</sub>). **EMAR** calculado para C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub> 318,2909, encontrado m/z 318,2923.



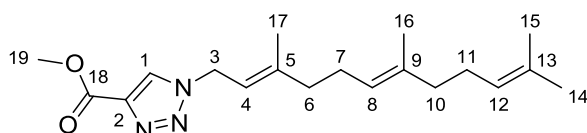
**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7,20 (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (t, 1H,  $^3J_{\text{H4-H3}} = 7,1$  Hz, C4–H); 5,05 (m, 1H, C8–H); 4,92 (d, 2H,  $^3J_{\text{H3-H4}} = 7,1$  Hz, C3–H); 2,69 (t, 2H,  $^3J_{\text{H13-H14}} = 7,7$  Hz, C13–H); 2,10 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,76 (s, 3H, metilo, C12–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C11–H); 1,66 (m, 2H, C14–H); 1,60 (s, 3H, metilo, C10–H); 1,26 (m, 10H, C15–H a C19–H) y 0,87 (t, 3H,  $^3J_{\text{H20-H19}} = 6,8$  Hz, metilo, C20–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 148,5 (C2, triazol cuaternario); 142,6 (C9, olefínico cuaternario); 132,0 (C5, olefínico cuaternario); 123,5 (C8, CH olefínico); 119,8 (C1, CH triazol); 117,4 (C4, CH olefínico); 47,7 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 32,9 (C6,  $\text{CH}_2$ ); 31,8 (C18,  $\text{CH}_2$ ); 29,5 a 29,2 (C14 a C17,  $\text{CH}_2$ ); 26,1 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,8 (C10,  $\text{CH}_3$ ); 25,7 (C13,  $\text{CH}_2$ ); 22,6 (C19,  $\text{CH}_2$ ); 17,7 (C11,  $\text{CH}_3$ ); 16,4 (C12,  $\text{CH}_3$ ); y 14,1 (C20,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}_3$  318,2909, encontrado m/z 318,2924.

#### 9.10.11 Síntesis del metil 1-((2Z,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato (IT-16) y del metil 1-((E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato (IT-21).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el propiolato de metilo (36 mg; 0,20 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (2 mL). Luego se adiciona la mezcla de farnesilazida (50 mg; 0,20 mmoles),  $\text{CuSO}_4$  1M (10  $\mu\text{L}$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (40  $\mu\text{L}$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 48 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 72% (razón E:Z de 6:4).



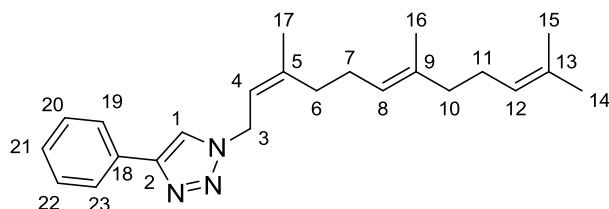
**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8,04 ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,43 (t, 1H,  $^3J_{\text{H4-H3}} = 7,3$  Hz, C4–H); 5,08 (m, 1H, C8–H); 5,06 (m, 1H, C12–H); 4,99 (d, 2H,  $^3J_{\text{H3-H4}} = 7,1$  Hz, C3–H); 3,93 (s, 3H, metilo, C19–H); 2,20 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,99 (m, 4H, C10–H y C11–H); 1,83 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C16–H); 1,60 (s, 3H, metilo, C15–H) y 1,59 (s, 3H, metilo, C14–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 161,3 ppm (C18, carbonilo); 144,7 (C2, triazol cuaternario); 139,9 (C9, olefínico cuaternario); 136,6 (C5, olefínico cuaternario); 131,5 (C13, olefínico cuaternario); 126,8 (C1, CH triazol); 124,1 (C12, CH olefínico); 122,7 (C8, CH olefínico); 116,0 (C4, CH olefínico); 52,1 (C19,  $\text{CH}_3$ ); 48,0 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 39,7 (C10,  $\text{CH}_2$ ); 32,1 (C6,  $\text{CH}_2$ ); 26,6 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,2 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C14,  $\text{CH}_3$ ); 23,5 (C17,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C15,  $\text{CH}_3$ ). y 16,0 (C16,  $\text{CH}_2$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_2$  332,2338; encontrado m/z 332,2343.



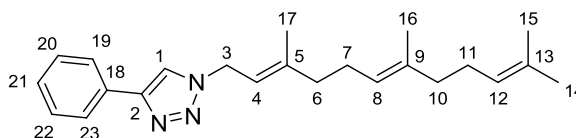
**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,01$  ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,44 (dt, 1H,  $^3J_{\text{H}_4\text{-H}_3}=7,3$  Hz y  $^4J_{\text{H}_4\text{-H}_{17}}=1,0$  Hz, C4–H); 5,06 (m, 1H, C8–H); 5,06 (m, 1H, C12–H); 4,99 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_3\text{-H}_4}=7,4$  Hz, C3–H); 3,93 (s, 3H, metilo, C19–H); 2,12 (m, 4H, C6–H y C7–H); 2,00 (m, 4H, C10–H y C11–H); 1,78 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,66 (s, 3H, metilo, C16–H); 1,58 (s, 3H, metilo, C15–H) y 1,58 (s, 3H, metilo, C14–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 161,2$  ppm (C18, carbonilo); 144,8 (C2, triazol cuaternario); 139,9 (C9, olefínico cuaternario); 136,0 (C5, olefínico cuaternario); 131,4 (C13, olefínico cuaternario); 126,7 (C1, CH triazol); 124,2 (C12, CH olefínico); 123,1 (C8, CH olefínico); 116,0 (C4, CH olefínico); 52,1 (C19,  $\text{CH}_3$ ); 48,1 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 39,7 (C10,  $\text{CH}_2$ ); 39,4 (C6,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,2 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C14,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C15,  $\text{CH}_3$ ); 16,6 (C17,  $\text{CH}_3$ ) y 16,0 (C16,  $\text{CH}_2$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_2$  332,2338; encontrado m/z 332,2343.

#### 9.10.12 Síntesis del 1-((2Z,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (IT-17) y del 1-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-4-fenil-1H-1,2,3-triazol (IT-22).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el fenilacetileno (21 mg; 0,20 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (2 mL). Luego se adiciona la mezcla de farnesilazida (50 mg; 0,20 mmoles),  $\text{CuSO}_4$  1M (10  $\mu\text{L}$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (40  $\mu\text{L}$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 57 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 81% (razón *E:Z* de 6:4).



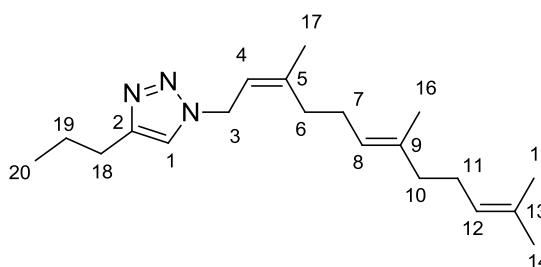
**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,82$  ppm (dt, 2H, protones aromáticos en posición *orto*, Ar19–H y Ar23–H); 7,71 (s, 1H, protón triazol, C1–H); 7,41 (tt, 2H, protones aromáticos en posición *meta* Ar20–H y Ar22–H); 7,31 (tt, 1H, protón aromático en posición *para* Ar21–H); 5,49 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4\text{-H}_3}=7,3$  Hz, C4–H); 5,31 (m, 1H, C12–H); 5,08 (m, 1H, C8–H); 5,00 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_3\text{-H}_4}=7,3$  Hz, C3–H); 2,22 (m, 2H, C6–H); 2,18 (m, 2H, C7–H); 2,05 (m, 2H, C10–H); 2,00 (m, 2H, C11–H); 1,84 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C16–H); 1,62 (s, 3H, metilo, C15–H) y 1,61 (s, 3H, metilo, C14–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 147,8$  ppm (C2, triazol cuaternario); 143,3 (C9, olefínico cuaternario); 136,5 (C5, olefínico cuaternario); 131,5 (C13, olefínico cuaternario); 130,8 (C18, aromático *ipso*); 128,8 (C20 y C22, aromático *meta*); 128,0 (C21, aromático *para*); 125,7 (C19 y C23, aromático *orto*); 124,1 (C8, CH olefínico); 123,0 (C12, CH olefínico); 118,9 (C1, CH triazol); 117,9 (C4, CH olefínico); 47,8 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 39,7 (C10,  $\text{CH}_2$ ); 32,1 (C6,  $\text{CH}_2$ ); 26,6 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,3 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C14,  $\text{CH}_3$ ); 23,4 (C17,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C15,  $\text{CH}_3$ ) y 16,0 (C16,  $\text{CH}_2$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_3$  350,2596; encontrado m/z 350,2595.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,82$  ppm (dt, 2H, protones aromáticos en posición *orto*, Ar19–H y Ar23–H); 7,70 (s, 1H, protón triazol, C1–H); 7,40 (tt, 2H, protones aromáticos en posición *meta* Ar20–H y Ar22–H); 7,31 (tt, 1H, protón aromático en posición *para* Ar21–H); 5,48 (t, 1H,  $^3J_{\text{H4-H3}}=7,3$  Hz, C4–H); 5,10 (m, 1H, C12–H); 5,07 (m, 1H, C8–H); 5,01 (d, 2H,  $^3J_{\text{H3-H4}}=7,3$  Hz, C3–H); 2,13 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,99 (m, 4H, C10–H y C11–H); 1,81 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C16–H); 1,60 (s, 3H, metilo, C15–H) y 1,58 (s, 3H, metilo, C14–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 147,8$  ppm (C2, triazol cuaternario); 143,4 (C9, olefínico cuaternario); 135,8 (C5, olefínico cuaternario); 131,4 (C13, olefínico cuaternario); 130,8 (C18, aromático *ipso*); 128,8 (C20 y C22, aromático *meta*); 128,0 (C21, aromático *para*); 125,7 (C19 y C23, aromático *orto*); 124,2 (C12, CH olefínico); 124,2 (C8, CH olefínico); 118,9 (C1, CH triazol); 117,0 (C4, CH olefínico); 48,0 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 39,7 (C6,  $\text{CH}_2$ ); 39,4 (C10,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,0 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C14,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C15,  $\text{CH}_3$ ); 16,5 (C17,  $\text{CH}_3$ ); y 16,1 (C16,  $\text{CH}_2$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_3$  350,2596; encontrado  $m/z$  350,2595.

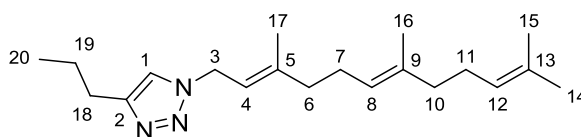
### 9.10.13 Síntesis del 1-((2Z,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-4-propil-1H-1,2,3-triazol (IT-18) y del 1-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-4-propil-1H-1,2,3-triazol (IT-23).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el pentino (40 mg; 0,40 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (2 mL). Luego se adiciona la mezcla de farnesilazida (50 mg; 0,20 mmoles),  $\text{CuSO}_4$  1M (10  $\mu\text{L}$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (40  $\mu\text{L}$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 53 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 83% (razón *E:Z* de 6:4).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,21$  ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,44 (dt, 1H,  $^3J_{\text{H4-H3}}=7,2$  Hz y  $^4J_{\text{H4-H17}}=1,1$  Hz, C4–H); 5,08 (m, 2H, C8–H y C12–H); 4,93 (d, 2H,  $^3J_{\text{H3-H4}}=7,3$  Hz, C3–H); 2,65 (t, 2H,  $^3J_{\text{H18-H19}}=7,4$  Hz, C18–H); 2,12 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,99 (m, 4H, C10–H y C11–H); 1,78 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,68 (s, 3H, metilo, C16–H); 1,68 (c, 2H,  $^3J_{\text{H19-H20}}=7,4$  Hz, C19–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C15–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C14–H) y 0,96 (t, 3H,  $^3J_{\text{H20-H19}}=7,3$  Hz, metilo, C20–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 148,1$  ppm (C2, triazol cuaternario); 142,7 (C9, olefínico cuaternario); 136,2 (C5, olefínico cuaternario); 131,5 (C13, olefínico cuaternario); 124,1 (C12, CH olefínico); 123,0 (C8, CH olefínico); 119,9 (C1, CH triazol); 118,1 (C4, CH olefínico); 47,6 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 39,7 (C10,  $\text{CH}_2$ ); 32,1 (C6,  $\text{CH}_2$ ); 27,8 (C18,  $\text{CH}_2$ ); 26,6 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,3 (C7,  $\text{CH}_2$ );

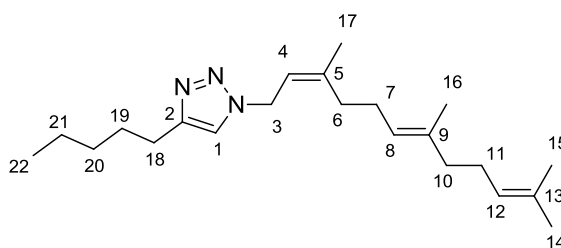
25,7 (C14, CH<sub>3</sub>); 23,4 (C17, CH<sub>3</sub>); 22,7 (C19, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C15, CH<sub>3</sub>); 16,0 (C16, CH<sub>2</sub>) y 13,8 (C20, CH<sub>3</sub>).



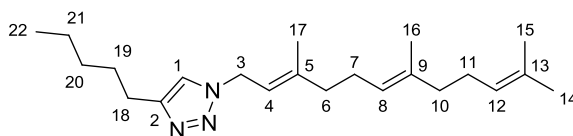
**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,21 ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H3</sub>=7,2 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H4-H17</sub>=1,1 Hz, C4–H); 5,08 (m, 2H, C8–H y C12–H); 4,93 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub>=7,3 Hz, C3–H); 2,65 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H18-H19</sub>=7,4 Hz, C18–H); 2,12 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,99 (m, 4H, C10–H y C11–H); 1,78 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,68 (c, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H19-H20</sub>=7,4 Hz, C19–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C16–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C15–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C14–H) y 0,96 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H20-H19</sub>=7,3 Hz, metilo, C20–H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 148,2 ppm (C2, triazol cuaternario); 142,7 (C9, olefínico cuaternario); 135,8 (C5, olefínico cuaternario); 131,4 (C13, olefínico cuaternario); 124,2 (C12, CH olefínico); 123,3 (C8, CH olefínico); 119,9 (C1, CH triazol); 117,4 (C4, CH olefínico); 47,7 (C3, CH<sub>2</sub>); 39,4 (C10, CH<sub>2</sub>); 27,8 (C18, CH<sub>2</sub>); 26,7 (C11, CH<sub>2</sub>); 26,0 (C7, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C14, CH<sub>3</sub>); 22,8 (C19, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C15, CH<sub>3</sub>); 16,4 (C17, CH<sub>3</sub>); 16,0 (C16, CH<sub>2</sub>) y 13,8 (C20, CH<sub>3</sub>).

#### 9.10.14 Síntesis de 1-((2Z,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-4-pentil-1H-1,2,3-triazol (IT-19) y del 1-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-4-pentil-1H-1,2,3-triazol (IT-24).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el heptino (50 mg; 0,40 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (2 mL). Luego se adiciona la mezcla de farnesilazida (50 mg; 0,20 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (10 μL; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (40 μL; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 63 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 89% (razón E:Z de 6:4).



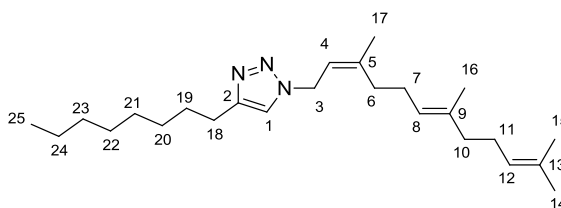
**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,21 ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H3</sub>=7,2 Hz, C4–H); 5,01 (m, 2H, C8–H y C12–H); 4,89 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub>=7,3 Hz, C3–H); 2,67 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H18-H19</sub>=7,6 Hz, C18–H); 2,15 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,99 (m, 4H, C10–H y C11–H); 1,80 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C16–H); 1,65 (m, 2H, C19–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C15–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C14–H); 1,32 (m, 4H, C20–H y C21–H) y 0,96 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H20-H19</sub>=7,3 Hz, metilo, C22–H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 148,3 ppm (C2, triazol cuaternario); 142,6 (C5, olefínico cuaternario); 135,8 (C9, olefínico cuaternario); 132,6 (C13, olefínico cuaternario); 124,2 (C12, CH olefínico); 123,4 (C8, CH olefínico); 119,9 (C1, CH triazol); 118,2 (C4, CH olefínico); 47,6 (C3, CH<sub>2</sub>); 32,4 (C6, CH<sub>2</sub>); 27,8 (C18, CH<sub>2</sub>); 26,2 (C11, CH<sub>2</sub>); 26,0 (C7, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C14, CH<sub>3</sub>); 22,8 a 22,0 (C19 a C21, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C17, CH<sub>3</sub>); 16,4 y 16,0 (C15 y C16, CH<sub>3</sub>); y 13,8 (C22, CH<sub>3</sub>).



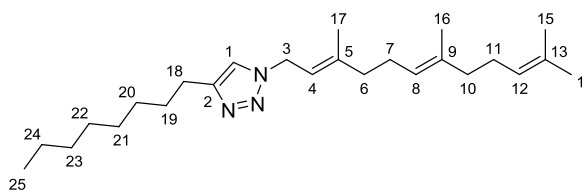
**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,20$  ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (t, 1H,  $^3J_{\text{H8-H7}}=7,3\text{Hz}$ , C8–H); 5,01 (m, 2H, C8–H y C12–H); 4,92 (d, 2H,  $^3J_{\text{H3-H4}}=7,3\text{ Hz}$ , C3–H); 2,67 (t, 2H,  $^3J_{\text{H18-H19}}=7,6\text{ Hz}$ , C18–H); 2,10 (m, 4H, C6–H y C7–H); 1,99 (m, 4H, C10–H y C11–H); 1,76 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,70 (s, 3H, metilo, C16–H); 1,65 (m, 2H, C19–H); 1,59 (s, 3H, metilo, C15–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C14–H); 1,32 (m, 4H, C20–H y C21–H) y 0,96 (t, 3H,  $^3J_{\text{H20-H19}}=7,3\text{ Hz}$ , metilo, C22–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 148,2$  ppm (C2, triazol cuaternario); 142,7 (C5, olefínico cuaternario); 135,8 (C9, olefínico cuaternario); 131,4 (C13, olefínico cuaternario); 124,2 (C12, CH olefínico); 123,4 (C8, CH olefínico); 119,9 (C1, CH triazol); 117,4 (C4, CH olefínico); 47,7 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 39,4 (C6 y C10,  $\text{CH}_2$ ); 27,8 (C18,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,0 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C14,  $\text{CH}_3$ ); 22,8 a 22,0 (C19 a C21,  $\text{CH}_2$ ); 17,7 (C17,  $\text{CH}_3$ ); 16,4 y 16,0 (C15 y C16,  $\text{CH}_3$ ); y 13,8 (C22,  $\text{CH}_3$ ).

#### 9.10.15 Síntesis del 1-((2Z,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-4-octil-1H-1,2,3-triazol (IT-20) y del 1-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-4-octil-1H-1,2,3-triazol (IT-25).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el decino (28 mg; 0,20 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (2 mL). Luego se adiciona la mezcla de farnesilazida (50 mg; 0,20 mmoles),  $\text{CuSO}_4$  1M (10  $\mu\text{L}$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (40  $\mu\text{L}$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 54 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 69% (razón E:Z de 6:4).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,21$  ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (t, 1H,  $^3J_{\text{H4-H3}}=6,8\text{ Hz}$ , C4–H); 5,01 (m, 2H, C8–H y C12–H); 4,91 (d, 2H,  $^3J_{\text{H3-H4}}=7,3\text{ Hz}$ , C3–H); 2,68 (t, 2H,  $^3J_{\text{H18-H19}}=7,8\text{ Hz}$ , C18–H); 2,15 a 1,90 (m, 8H, C6–H, C7–H, C10–H y C11–H); 1,80 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C14–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C15–H); 1,61 (s, 3H, metilo, C16–H); 1,25 (m, 12H, C19–H a C24–H) y 0,87 (t, 3H,  $^3J_{\text{H20-H19}}=6,7\text{ Hz}$ , metilo, C22–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 148,5$  ppm (C2, triazol cuaternario); 142,7 (C5, olefínico cuaternario); 136,2 (C9, olefínico cuaternario); 131,5 (C13, olefínico cuaternario); 124,1 (C12, CH olefínico); 123,0 (C8, CH olefínico); 119,8 (C1, CH triazol); 118,1 (C4, CH olefínico); 47,6 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 32,1 (C6,  $\text{CH}_2$ ); 31,8 a 22,7 (C18 a C24); 26,3 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,0 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C14,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C17,  $\text{CH}_3$ ); 16,0 (C15 y C16,  $\text{CH}_3$ ); y 14,1 (C25,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}_3$  318,2909; encontrada m/z 318,2923.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,20$  ppm (s, 1H, protón triazol, C1–H); 5,41 (t, 1H,  $^3J_{\text{H4-H3}}=7,2$  Hz, C4–H); 5,41 (t, 1H,  $^3J_{\text{H8-H7}}=7,3$ Hz, C8–H); 5,07 (m, 2H, C8–H y C12–H); 4,91 (d, 2H,  $^3J_{\text{H3-H4}}=7,2$  Hz, C3–H); 2,68 (t, 2H,  $^3J_{\text{H18-H19}}=7,8$  Hz, C18–H); 2,10 (m, 8H, C6–H, C7–H, C10–H y C11–H); 1,77 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C14–H); 1,58 (s, 6H, metilo, C15–H y C16–H) 1,25 (m, 12H, C19–H a C24–H) y 0,87 (t, 3H,  $^3J_{\text{H20-H19}}=6,7$  Hz, metilo, C22–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 148,5$  ppm (C2, triazol cuaternario); 142,7 (C5, olefínico cuaternario); 135,7 (C9, olefínico cuaternario); 131,4 (C13, olefínico cuaternario); 124,2 (C12, CH olefínico); 123,3 (C8, CH olefínico); 119,8 (C1, CH triazol); 117,4 (C4, CH olefínico); 47,7 (C3,  $\text{CH}_2$ ); 39,7 y 39,4 (C6 y C10,  $\text{CH}_2$ ); 31,9 a 22,7 (C18 a C24,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,0 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C14,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C17,  $\text{CH}_3$ ); 16,4 y 16,0 (C15 y C16,  $\text{CH}_3$ ); y 14,1 (C22,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR** calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}_3$  318,2909, encontrada m/z 318,2924

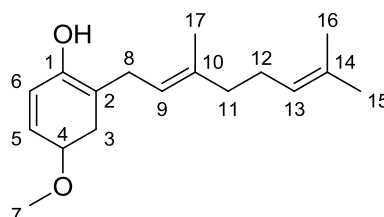
### 9.11 Método general para preparar Fenoles *Orto*-Isoprenilados (FOI) en condiciones de alquilación.

Se disuelve 1,1 equivalentes del compuesto fenólico en tolueno y se lleva la solución a  $0^\circ\text{C}$ . A continuación se adiciona lentamente primero 0,3 equivalentes  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  y luego 1 equivalente del isoprenol correspondiente. La reacción transcurre durante 12 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Una vez finalizada, se agrega una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y se extraen los productos de interés con  $\text{AcOEt}$  (3 extracciones). Los extractos orgánicos combinados se secan con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y finalmente se elimina el solvente en destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio, seguido de bomba de vacío.

La purificación de los compuestos se realiza por cromatografía en columna de sílica gel, corrida en polaridad creciente por combinación del solvente Hexano con el  $\text{AcOEt}$ . Los análisis estructurales se realizan combinando técnicas espectrométricas.

#### 9.11.1 Síntesis de (*E*)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-4-metoxifenol (FI-1).

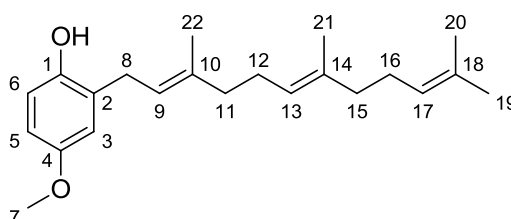
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 37 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 45%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,74$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}}=8,3$  Hz, C6-H); 6,68 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}}=2,4$  Hz, C3-H); 6,65 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}}=8,2$  Hz y  $^4J_{\text{HH}}=2,5$  Hz, C5-H); 5,30 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}}=6,5$  Hz, C9-H); 5,07 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}}=7,1$  Hz, C13-H); 4,74 (s, 1H, OH); 3,75 (s, 3H, C7-H); 3,33 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}}=7,0$  Hz, C8-H); 2,25 a 2,05 (m, 4H, C11-H y C12-H); 1,76 (s, 3H, C17-H); 1,68 (s, 3H, C16-H) y 1,59 (s, 3H, C15-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 153,6$  ppm (Ar4, cuaternario aromático); 148,3 (Ar1, cuaternario aromático); 138,4 (C10, olefínico cuaternario); 131,9 (C14, olefínico cuaternario); 123,9 (C9, CH olefínico); 121,5 (C13, CH olefínico); 116,3 (Ar6, CH aromático); 115,7 (Ar3, CH aromático); 112,0 (Ar5, CH aromático); 55,7 (C7, O-Me); 39,7 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 29,7 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,5 (C12,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C15,  $\text{CH}_3$ ); 17,8 (C17,  $\text{CH}_3$ ) y 16,2 (C16,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 283,16685; encontrada 283,16537. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2969 (=CH-); 2928 ( $-\text{CH}_2-$ ); 1664 ( $-\text{C}=\text{C}-$ ).

### 9.11.2 Síntesis de 4-methoxy-2-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)fenol (FI-3).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 53 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 50%.

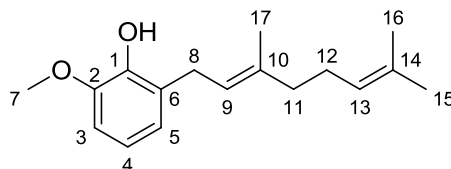


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,74$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}}=8,5$  Hz, C6-H); 6,70 a 6,62 (m, 2H, C3-H y C5-H); 5,31 (t, 1H,  $^3J_{\text{H9-H8}}=7,2$  Hz, C9-H); 5,09 (m, 2H, C13-H y C17-H); 4,77 (s, 1H, OH); 3,75 (s, 3H, C7-H); 3,33 (d, 2H,  $^3J_{\text{H8-H9}}=7,3$  Hz, C8-H); 2,21 a 1,94 (m, 8H, C11-H, C12-H, C15-H y C16-H); 1,77 (s, 3H, C22-H); 1,68 (s, 3H, C19-H) y 1,60 (s, 6H, C20-H y C21-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 153,6$  ppm (C4, cuaternario aromático); 148,3 (C1, cuaternario aromático); 138,5 (C10, olefínico cuaternario); 131,3 (C14, olefínico cuaternario); 128,2 (C2, aromático cuaternario); 124,4 (C17, CH olefínico); 123,7 (C13, CH olefínico); 121,5 (C9, CH olefínico); 116,3 (C6, CH aromático); 115,7 (C3, CH aromático); 112,0 (C5, CH aromático); 55,7 (C7, O-Me); 39,7 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 29,9 (C11 y C15,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 a 26,5 (C12 y C16,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C19,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C22,  $\text{CH}_3$ ); 16,2 a 16,1 (C20 y C21,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 351,22945; encontrada 351,22960. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3437 (O-H); 2959 (=CH-); 2928 ( $-\text{CH}_2-$ ); 1660 ( $-\text{C}=\text{C}-$ ).

### 9.11.3 Síntesis de (E)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-6-metoxi fenol (FI-5).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el o-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y

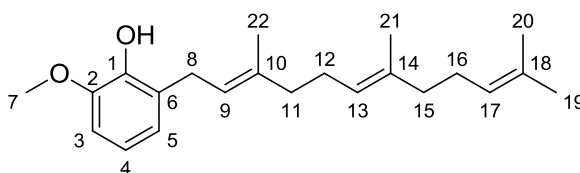
posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 41 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 48%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,84$  ppm (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5} = 8,2$  Hz, Ar4-H); 6,48 ppm (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 8,1$  Hz, Ar3-H y Ar5-H); 5,37 (s, 1H; OH); 5,30 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_\text{H}} = 7,1$  Hz, C9-H); 5,08 (m, 1H, C13-H y C17-H); 3,86 (s, 3H, C7-H); 3,27 (d,  $^3J_{\text{H}_\text{H}} = 7,2$  Hz, C8-H); 2,10 a 1,90 (m, 4H, C11-H y C12-H); 1,76 (s, 3H, C17-H); 1,68 (s, 3H, C16-H) y 1,60 (s, 3H, C15-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 146,1$  (C2, aromático cuaternario); 143,8 (C1, aromático cuaternario); 135,9 (C10, olefínico cuaternario); 135,1 (C14, olefínico cuaternario); 131,0 (C6, olefínico cuaternario); 124,0 (C4, CH aromático); 123,4 (C9, CH olefínico); 123,2 (C13, CH olefínico); 114,2 (C5, CH aromático); 110,9 (C3, CH aromático); 55,6 (C7,  $\text{CH}_3$ ); 39,7 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 29,2 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 26,4 (C12,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C15,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C16,  $\text{CH}_3$ ) y 16,1 (C17,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 261,18491; encontrada 261,18502. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3445 (O-H); 2958 (=CH-); 2926 ( $-\text{CH}_2-$ ); 1606 ( $-\text{C}=\text{C}-$ ).

#### 9.11.4 Síntesis de 2-metoxi-6-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)fenol (FI-6).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el o-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 57 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 54%.

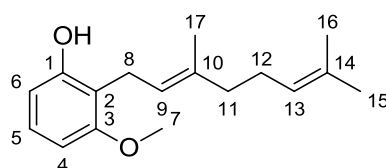


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,85$  ppm (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5} = 8,3$  Hz, Ar4-H); 6,48 ppm (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 8,4$  Hz, Ar3-H y Ar5-H); 5,45 (s, 1H; OH); 5,33 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_\text{H}} = 7,1$  Hz, C9-H); 5,11 (m, 2H, C13-H y C17-H); 3,87 (s, 3H, C7-H); 3,29 (d,  $^3J_{\text{H}_\text{H}} = 7,4$  Hz, C8-H); 2,18 a 1,93 (m, 8H, C11-H, C12-H, C15-H y C16-H); 1,71 (s, 3H, C22-H); 1,69 (s, 3H, C15-H) y 1,60 (s, 6H, C20-H y C21-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 146,4$  (C2, aromático cuaternario); 143,6 (C1, aromático cuaternario); 136,1 (C10, olefínico cuaternario); 135,1 (C14, olefínico cuaternario); 133,7 (C18, olefínico cuaternario); 131,3 (C6, olefínico cuaternario); 124,4 (C17, CH olefínico); 124,0 (C4, CH aromático); 123,4 (C9, CH olefínico); 123,2 (C13, CH olefínico); 114,2 (C5, CH aromático); 110,9 (C3, CH aromático); 55,8 (C7,  $\text{CH}_3$ ); 39,7 (C11 y C15,  $\text{CH}_2$ ); 33,8 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 a 26,6 (C12 y C16,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C19,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C22,  $\text{CH}_3$ ) y 16,2 a 16,0 (C20 y C21,  $\text{CH}_3$ ).

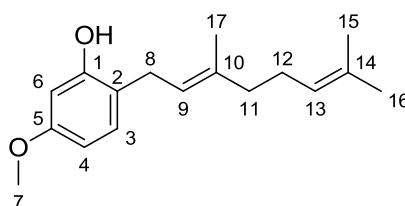
**EMAR:** Masa calculada para  $C_{22}H_{33}O_2$  ( $M+H^+$ ) = 329,49567; encontrada 329,49558. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3450 (O-H); 2959 (=CH-); 2930 (-CH<sub>2</sub>-); 1603 (-C=C-).

### 9.11.5 Síntesis de (*E*)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-3-metoxi fenol (FI-9) y de 2-((2*E*,6*E*)-3,7-dimetilnona-2,6-dien-1-il)-5-metoxi fenol (FI-10)

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el *m*-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $BF_3 \cdot Et_2O$  (12  $\mu$ L, 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 64 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 77% (relación FI-9/FI-10 de 1:1,1).



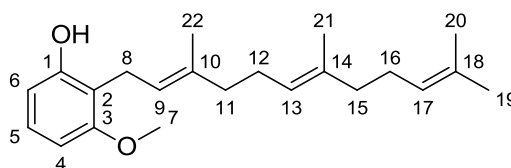
**RMN de <sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 7,05 ppm (t, 1H,  $^3J_{HH} = 8,2$  Hz, Ar5-H); 6,48 (d, 2H,  $^3J_{HH} = 8,2$  Hz, Ar4-H y Ar6-H); 5,24 (t, 1H,  $^3J_{HH} = 6,9$  Hz, C9-H); 5,06 (m, 1H, C13-H); 3,80 (s, 3H, C7-H); 3,42 (d,  $^3J_{HH} = 6,9$  Hz, C8-H); 2,05 (m, 4H, C11-H y C12-H); 1,80 (s, 3H, C17-H); 1,67 (s, 3H, C16-H) y 1,58 (s, 3H, C15-H). **RMN de <sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 158,0 (C1, aromático cuaternario); 155,7 (C3, aromático cuaternario); 138,1 (C10, olefínico cuaternario); 131,9 (C14, olefínico cuaternario); 127,1 (C5, CH aromático); 123,9 (C9, CH olefínico); 121,9 (C13, CH olefínico); 115,2 (C2, aromático cuaternario); 109,0 (C4, CH aromático); 103,1 (C6, CH aromático); 55,8 (C7, CH<sub>3</sub>); 39,7 (C11, CH<sub>2</sub>); 26,5 (C12, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C16, CH<sub>3</sub>); 22,2 (C8, CH<sub>2</sub>); 17,7 (C15, CH<sub>3</sub>) y 16,2 (C17, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para  $C_{17}H_{24}O_2Na$  ( $M+Na^+$ ) = 283,16685; encontrada 283,16688. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3506 (O-H); 2966 (=CH-); 2924 (-CH<sub>2</sub>-);



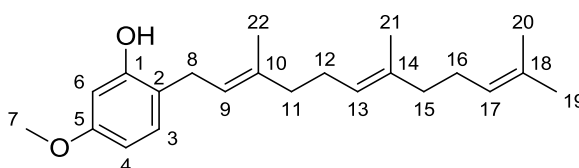
**RMN de <sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 6,98 ppm (d, 1H,  $^3J_{H3-H4} = 8,4$  Hz, C3-H); 6,42 ppm (dd, 1H,  $^3J_{H4-H3} = 8,4$  Hz,  $^4J_{H4-H6} = 2,6$  Hz, C4-H); 6,41 ppm (s, 1H, C6-H); 5,30 (t, 1H,  $^3J_{H9-H10} = 7,1$  Hz); 5,24 (s, 1H, OH); 5,07 (m, 1H, C13-H); 3,76 (s, 3H, C7-H); 3,30 (d, 2H,  $^3J_{H8-H9} = 7,1$  Hz); 2,09 (m, 4H, C11-H y C12-H); 1,76 (s, 3H, C17-H); 1,68 (s, 3H, C16-H) y 1,60 (s, 3H, C15-H). **RMN de <sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 159,4 (C1, aromático cuaternario); 155,4 (C5, aromático cuaternario); 138,4 (C10, olefínico cuaternario); 132,0 (C14, olefínico cuaternario); 130,3 (C3, CH aromático); 123,8 (C9, CH olefínico); 122,1 (C13, CH olefínico); 118,9 (C2, aromático cuaternario); 106,2 (C4, CH aromático); 102,0 (C6, CH aromático); 55,3 (C7, CH<sub>3</sub>); 39,7 (C11, CH<sub>2</sub>); 29,2 (C8, CH<sub>2</sub>); 26,4 (C12, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C15, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C16, CH<sub>3</sub>) y 16,1 (C17, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para  $C_{17}H_{24}O_2Na$  ( $M+Na^+$ ) = 283,16685; encontrada 283,16679. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3450 (O-H); 2959 (=CH-); 2930 (-CH<sub>2</sub>-); 1603 (-C=C-).

### 9.11.6 Síntesis de 3-metoxi-2-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)fenol (FI-13) y de 5-metoxi-2-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)fenol (FI-14)

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el m-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 80 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 76% (relación FI-13/FI-14 de 1:1,2).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,05$  ppm (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,2$  Hz, Ar5-H); 6,47 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,2$  Hz, Ar4-H y Ar6-H); 5,31 (s, 1H, OH); 5,24 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz, C9-H); 5,08 (m, 2H, C13-H y C17-H); 3,80 (s, 3H, C7-H); 3,42 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz, C8-H); 2,14 a 1,90 (m, 8H, C11-H, C12-H, C15-H y C16-H); 1,81 (s, 3H, C22-H); 1,67 (s, 3H, C15-H) y 1,59 (s, 6H, C20-H y C21-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 158,0$  (C1, aromático cuaternario); 155,6 (C3, aromático cuaternario); 138,1 (C10, olefínico cuaternario); 135,4 (C18, olefínico cuaternario); 131,3 (C14, olefínico cuaternario); 127,1 (C5, CH aromático); 124,4 (C17, CH olefínico); 123,8 (C9, CH olefínico); 121,9 (C13, CH olefínico); 115,2 (C2, aromático cuaternario); 109,0 (C4, CH aromático); 103,1 (C6, CH aromático); 55,8 (C7,  $\text{CH}_3$ ); 39,7 (C11 y C15,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 a 26,4 (C12 y C16,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C19,  $\text{CH}_3$ ); 22,2 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 17,7 (C22,  $\text{CH}_3$ ) y 16,2 a 16,0 (C20 y C21,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 329,24751; encontrada 329,24772. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3520 (O-H); 2964 (=CH-); 1605 (-C=C-).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,98$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H3-H4}} = 8,3$  Hz, C3-H); 6,42 ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H4-H3}} = 8,4$  Hz,  $^4J_{\text{H4-H6}} = 2,6$  Hz, C4-H); 6,41 ppm (s, 1H, C6-H); 5,31 (t, 1H,  $^3J_{\text{H9-H10}} = 7,1$  Hz); 5,25 (s, 1H, OH); 5,09 (m, 2H, C13-H y C17-H); 3,76 (s, 3H, C7-H); 3,30 (d, 2H,  $^3J_{\text{H8-H9}} = 6,9$  Hz); 2,18 a 1,91 (m, 8H, C11-H, C12-H, C15-H y C16-H); 1,77 (s, 3H, C22-H); 1,67 (s, 3H, C19-H) y 1,60 (s, 6H, C20-H y C21-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 159,4$  (C1, aromático cuaternario); 155,4 (C5, aromático cuaternario); 138,4 (C10, olefínico cuaternario); 135,6 (C18, olefínico cuaternario); 131,3 (C14, olefínico cuaternario); 130,4 (C3, CH aromático); 124,4 (C17, CH olefínico); 123,6 (C9, CH olefínico); 122,1 (C13, CH olefínico); 118,9 (C2, aromático cuaternario); 106,1 (C4, CH aromático); 102,0 (C6, CH aromático); 55,3 (C7,  $\text{CH}_3$ ); 39,7 (C11 y C15,  $\text{CH}_2$ ); 29,2 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 a 26,4 (C12 y C16,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C19,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C22,  $\text{CH}_3$ ) y 16,2

a 16,1 (C20 y C21, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) = 329,24751; encontrada 329,24763. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3520 (O-H); 2964 (=CH-); 1605 (-C=C-).

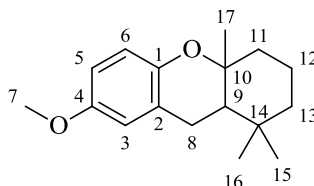
### 9.12 Método general para preparar Fenoles *Orto*-Isoprenilados (FOI) en condiciones de ciclación.

Se disuelve 1,1 equivalentes del compuesto fenólico en tolueno y se lleva la solución a 0°C. A continuación se adiciona lentamente primero 1,2 equivalentes BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O y luego 1 equivalente del isoprenol correspondiente. La reacción transcurre durante 12 horas a 4°C. Una vez finalizada, se agrega una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se extraen los productos de interés con AcOEt (3 extracciones). Los extractos orgánicos combinados se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y finalmente se elimina el solvente en destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio, seguido de bomba de vacío.

La purificación de los compuestos se realiza por cromatografía en columna de sílica gel, corrida en polaridad creciente por combinación del solvente Hexano con el AcOEt. Los análisis estructurales se realizan combinando técnicas espectrométricas.

#### 9.12.1 Síntesis de 7-metoxi-1,1,4a-trimetil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H-xanteno (FI-2).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (12  $\mu$ L, 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 43 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 52%.

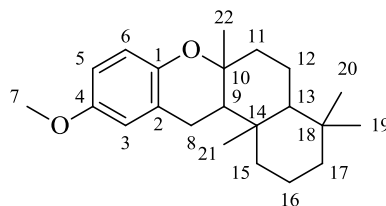


**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,73 a 6,36 ppm (m, 3H, Ar3-H, Ar5-H y Ar6-H, protones aromáticos); 3,75 (s, 3H, C7-H); 2,80 a 2,45 (m, 2H, C8-H); 2,20 a 1,40 (m, 7H, C9-H a C13-H, protones de anillos); 1,20 (s, 3H, C17-H); 1,01 (s, 3H, C15-H\*) y 0,91 (s, 3H, 16-H\*). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 152,7 ppm (C4, aromático cuaternario); 147,3 (C1, cuaternario aromático); 123,2 (C2, aromático cuaternario); 117,5 (C6, CH aromático); 114,2 (C5, CH aromático); 113,2 (C3, CH aromático); 76,2 (C10, cuaternario); 55,5 (C7, CH<sub>3</sub>); 41,7 y 40,0 (C11 y C13 intercambiables, CH<sub>2</sub>); 32,1 y 20,6 (C15 y C16 intercambiables, CH<sub>3</sub>); 23,7 (C8; CH<sub>2</sub>); 19,8 (C12, CH<sub>2</sub>) y 19,7 (C17, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** masa calculada para C<sub>34</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>Na (2M+Na<sup>+</sup>) = 543,34448; encontrada 543,34300. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 2969 (=CH-); 2928 (-CH<sub>2</sub>-).

#### 9.12.2 Síntesis de 10-metoxi-4,4,6a,12b-tetrametil-2,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-decahidro-1H-benzo[ $\alpha$ ]xanteno (FI-4).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso,

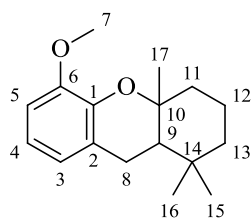
sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 50 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 48%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,75$  a  $6,35$  ppm (m, 3H, Ar3-H, Ar5-H y Ar6-H, protones aromáticos);  $3,75$  (s, 3H, C7-H);  $2,80$  a  $2,45$  (m, 2H, C8-H);  $2,20$  a  $1,40$  (m, 24H, C9-H a C22-H, protones de anillos). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 152,7$  ppm (C4, aromático cuaternario);  $147,3$  (C1, cuaternario aromático);  $123,2$  (C2, aromático cuaternario);  $117,5$  (C6, CH aromático);  $114,2$  (C5, CH aromático);  $113,2$  (C3, CH aromático);  $76,2$  (C10, cuaternario);  $55,5$  (C7,  $\text{CH}_3$ );  $41,7$  a  $19,7$  (C8 a C22, carbonos del anillo, mezcla de diastereoisómeros). **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 351,22945; encontrada 351,22948. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2967 (=CH-); 2931 ( $-\text{CH}_2-$ ); 1460 (C=C aromáticos).

### 9.12.3 Síntesis de 5-metoxi-1,1,4a-trimetil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H-xanteno (FI-7)

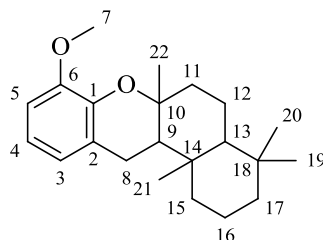
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 42mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 51%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,90$  a  $6,50$  ppm (m, 3H, Ar3-H, Ar4-H y Ar5-H);  $3,85$  (s, 3H, C7-H);  $2,78$  a  $2,45$  (m, 2H, C8-H);  $2,20$  a  $1,40$  (m, 7H, C9-H a C13-H, protones de anillos);  $1,21$  (s, 3H, C17-H);  $1,00$  (s, 3H, C15-H\*) y  $0,91$  (s, 3H, 16-H\*). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 146,1$  (C2, aromático cuaternario);  $141,2$  (C1, aromático cuaternario);  $124,0$  (C4, CH aromático);  $114,2$  (C5, CH aromático);  $110,9$  (C3, CH aromático);  $76,2$  (C10, carbono cuaternario);  $55,6$  (C7,  $\text{CH}_3$ );  $41,7$  y  $39,0$  (C11 y C13 intercambiables,  $\text{CH}_2$ );  $32,1$  y  $20,6$  (C15 y C16 intercambiables,  $\text{CH}_3$ );  $23,7$  (C8;  $\text{CH}_2$ );  $19,8$  (C12,  $\text{CH}_2$ ) y  $19,7$  (C17,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 283,16685; encontrada 283,16641. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2974 (=CH-); 2932 ( $-\text{CH}_2-$ ).

#### 9.12.4 Síntesis de 8-metoxi-4,4,6a,12b-tetrametil-2,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-decahidro-1H-benzo[ $\alpha$ ]xanteno (FI-8).

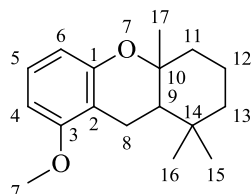
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 61 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 58%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,90$  a  $6,50$  ppm (m, 3H, Ar3-H, Ar4-H y Ar5-H); 3,85 (s, 3H, C7-H); 2,78 a 2,45 (m, 2H, C8-H); 2,20 a 1,40 (m, 24H, C9-H a C22-H, protones de anillos). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 146,2$  (C2, aromático cuaternario); 141,2 (C1, aromático cuaternario); 123,9 (C4, CH aromático); 114,2 (C5, CH aromático); 110,9 (C3, CH aromático); 76,2 (C10, carbono cuaternario); 55,6 (C7,  $\text{CH}_3$ ); 41,7 a 19,7 (C8 a C22). **EMAR:** masa calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 351,22945; encontrada 351,22932. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2966 (=CH-); 2942 (- $\text{CH}_2$ -); 1484 (-C=C- aromáticos).

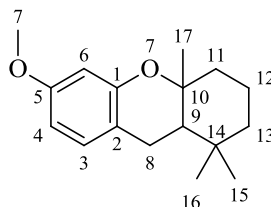
#### 9.12.5 Síntesis de 5-metoxi-1,1,4a-trimetil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H-xanteno (FI- 11) y de 6-methoxy-1,1,4a-trimetil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H-xanteno (FI- 12).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 58 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 70% (relación 1:1,2).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,05$  ppm (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0$  Hz, Ar5-H); 6,46 (m, 2H, Ar4-H y Ar6-H); 3,83 (s, 3H, C7-H); 2,78 a 2,45 (m, 2H, C8-H); 2,20 a 1,40 (m, 7H, C9-H a C13-H, protones de anillos); 1,21 (s, 3H, C17-H); 0,99 (s, 3H, C15-H\*) y 0,90 (s, 3H, 16-H\*). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 157,1$  (C1, aromático cuaternario); 155,5 (C3, aromático cuaternario); 127,1 (C5, CH aromático); 115,2 (C2, aromático cuaternario); 109,0 (C4, CH aromático); 105,2 (C6, CH

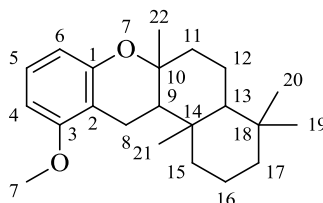
aromático); 76,2 (C10, carbono cuaternario); 55,7 (C7, CH<sub>3</sub>); 41,7 y 39,3 (C11 y C13 intercambiables, CH<sub>2</sub>); 32,4 y 20,5 (C15 y C16 intercambiables, CH<sub>3</sub>); 23,7 (C8; CH<sub>2</sub>); 19,8 (C12, CH<sub>2</sub>) y 19,7 (C17, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** masa calculada para C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>Na (M+Na<sup>+</sup>) = 283,16685; encontrada 283,16671. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 2975 (=CH-); 2932 (-CH<sub>2</sub>-).



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,96 ppm (m, 1H, , C3-H); 6,42 ppm (m, 2H, C4-H y C6-H); 3,84 (s, 3H, C7-H); 2,78 a 2,45 (m, 2H, C8-H); 2,20 a 1,40 (m, 7H, C9-H a C13-H, protones de anillos); 1,20 (s, 3H, C17-H); 0,99 (s, 3H, C15-H\*) y 0,90 (s, 3H, 16-H\*). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 159,4 (C1, aromático cuaternario); 155,4 (C5, aromático cuaternario); 130,4 (C3, CH aromático); 123,6 (C9, CH olefínico); 118,9 (C2, aromático cuaternario); 106,1 (C4, CH aromático); 102,0 (C6, CH aromático); 76,2 (C10, carbono cuaternario); 55,6 (C7, CH<sub>3</sub>); 41,7 y 39,0 (C11 y C13 intercambiables, CH<sub>2</sub>); 32,1 y 20,6 (C15 y C16 intercambiables, CH<sub>3</sub>); 23,7 (C8; CH<sub>2</sub>); 19,8 (C12, CH<sub>2</sub>) y 19,7 (C17, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** masa calculada para C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>Na (M+Na<sup>+</sup>) = 283,16685; encontrada 283,16692. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 2974 (=CH-); 2932 (-CH<sub>2</sub>-).

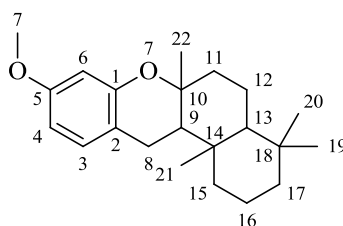
### 9.12.6 Síntesis de 11-metoxi-4,4,6a,12b-tetrametil-2,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-decahidro-1H-benzo[ $\alpha$ ]xanteno (FI- 15) y de 9-metoxi-4,4,6a,12b-tetrametil-2,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-decahidro-1H-benzo[ $\alpha$ ]xanteno (FI-16).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (12  $\mu$ L, 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 75 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 72% (relación 1:1,1).



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,04 ppm (m, 1H, , Ar5-H); 6,47 (m, 2H, Ar4-H y Ar6-H); 3,84 (s, 3H, C7-H); 2,74 a 2,52 (m, 2H, C8-H); 2,15 (s, 3H, C7-H) y 2,25 a 0,80 (m, 23H, C9-H a C22-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 157,3 (C1, aromático cuaternario); 155,4 (C3, aromático cuaternario); 127,1 (C5, CH aromático); 115,4 (C2, aromático cuaternario); 109,0 (C4, CH aromático); 104,9 (C6, CH aromático); 76,7 (C14, carbono cuaternario); 49,5 (C9, CH<sub>3</sub>); 48,5 a 16,1 (carbonos del anillo, mezcla de diastereoisómeros) y 14,1 (C7, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** masa

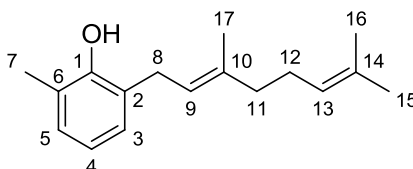
calculada para  $C_{22}H_{32}O_2Na$  ( $M+Na^+$ ) = 351,22945; encontrada 351,22954. **IR (film):**  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 2966 (=CH-); 2942 (-CH<sub>2</sub>-); 1484 (-C=C- aromáticos).



**RMN de <sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 6,98 ppm (m, 1H, , C3-H); 6,44 ppm (m, 2H, C4-H y C6-H); 3,85 (s, 3H, C7-H); 2,75 a 2,50 (m, 2H, C8-H); 2,14 (s, 3H, C7-H) y 2,25 a 0,80 (m, 23H, C9-H a C22-H). **RMN de <sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 159,1 (C1, aromático cuaternario); 155,5 (C5, aromático cuaternario); 130,1 (C3, CH aromático); 123,6 (C9, CH olefínico); 118,9 (C2, aromático cuaternario); 106,1 (C4, CH aromático); 101,9 (C6, CH aromático); 76,7 (C14, carbono cuaternario); 49,5 (C9, CH<sub>3</sub>); 48,8 a 16,1 (carbonos del anillo, mezcla de diastereoisómeros) y 14,2 (C7, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** masa calculada para  $C_{22}H_{32}O_2Na$  ( $M+Na^+$ ) = 351,22945; encontrada 351,22944. **IR (film):**  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 2969 (=CH-); 2938 (-CH<sub>2</sub>-); 1483 (-C=C- aromáticos).

#### 9.12.7 Síntesis de (*E*)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-6-metilfenol (FI-17).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $BF_3 \cdot Et_2O$  (12  $\mu$ L, 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 32 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 41%.

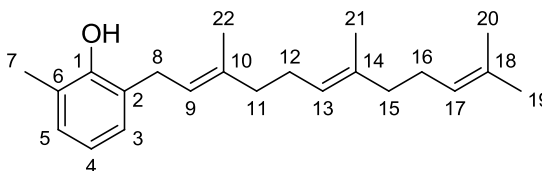


**RMN de <sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 6,89 ppm (m, 2H, Ar3-H y Ar4-H); 6,69 (d, 1H, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 8,0 Hz, Ar5-H); 5,30 (m, 1H, C9-H); 5,11 (m, 1H, C13-H); 4,74 (s, 1H, OH); 3,25 (d, 1H, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 7,3 Hz, C8-H); 2,22 (s, 3H, C7-H); 2,20 a 1,80 (m, 4H, C11-H y C12-H); 1,70 (s, 3H, C17-H); 1,68 (s, 3H, C16-H) y 1,60 (s, 3H, C15-H). **RMN de <sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 151,8 ppm (C1, aromático cuaternario); 135,7 (C10, olefínico cuaternario); 133,9 (C14, olefínico cuaternario); 130,8 (C5, CH aromático); 126,7 (C3, CH aromático); 124,4 (C9, CH olefínico); 123,7 (C13, CH olefínico); 123,5 (C6, aromático cuaternario); 39,7 (C8, CH<sub>2</sub>); 29,9 (C11, CH<sub>2</sub>); 26,7 (C12, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C15, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C17, CH<sub>3</sub>); 16,2 (C15, CH<sub>3</sub>) y 15,7 (C7, CH<sub>3</sub>). **IR (film):**  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3551 (O-H); 2964 (=CH-); 1602 (-C=C-).

#### 9.12.8 Síntesis de 2-metil-6-((2*E*,6*E*)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il) fenol (FI-18).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso,

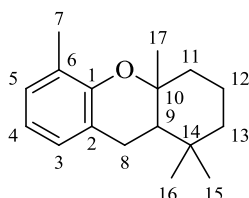
sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 32 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 32%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,90 ppm (m, 2H, Ar3-H y Ar4-H); 6,70 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0$  Hz, Ar5-H); 5,31 (m, 1H, C9-H); 5,05 (m, 2H, C13-H y C17-H); 4,75 (s, 1H, OH); 3,25 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,3$  Hz, C8-H); 2,20 (s, 3H, C7-H); 2,20 a 1,80 (m, 8H, C11-H, C12-H, C15-H y C16-H); 1,73 (s, 3H, C19-H); 1,67 (s, 3H, C22-H) y 1,60 (s, 6H, C20-H y C21-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 151,6 ppm (C1, aromático cuaternario); 137,2 (C10, olefínico cuaternario); 135,9 (C14, olefínico cuaternario); 133,4 (C18, olefínico cuaternario); 130,8 (C5, CH aromático); 126,7 (C3, CH aromático); 124,4 (C17, CH olefínico); 123,7 (C13, CH olefínico); 123,5 (C6, aromático cuaternario); 123,3 (C9, CH olefínico); 39,7 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 29,9 y 29,8 (C11 y C15,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 (C12 y C16,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C19,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C22,  $\text{CH}_3$ ); 16,2 y 16,1 (C20 y C21,  $\text{CH}_3$ ) y 15,7 (C7,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3535 (O-H); 2960 (=CH-); 1608 (-C=C-).

### 9.12.9 Síntesis de 1,1,4a,5-tetrametil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H-xanteno (FI-19)

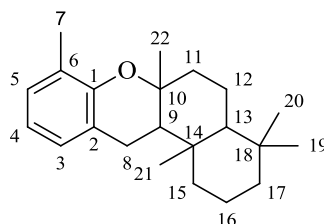
Seguendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 31 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 39%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,93 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0$  Hz, C5-H\*); 6,90 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,5$  Hz, C3-H\*); 6,71 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,4$  Hz, C4-H); 2,73 a 2,52 (m, 2H, C8-H); 2,14 (s, 3H, C7-H); 2,20 a 1,40 (m, 7H, C9-H a C13-H, protones de anillos); 1,19 (s, 3H, C17-H); 0,99 (s, 3H, C15-H\*) y 0,90 (s, 3H, 16-H\*). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 151,6 (C1, aromático cuaternario); 128,1 (C5, CH aromático); 127,1 (C3, CH aromático); 126,1 (C6, aromático cuaternario); 121,9 (C2, aromático cuaternario); 118,9 (C4, CH aromático); 76,9 (C10, carbono cuaternario); 48,1 (C9, CH); 41,6 a 19,8 ( $\text{CH}_2$  anillos); 32,1 y 20,6 (C15 y C16\*); 19,7 (C17,  $\text{CH}_3$ ) y 14,1 (C7,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2966 (=CH-); 2941 (-C-C-); 1483 (-C=C- aromáticos).

### 9.12.10 Síntesis de 4,4,6a,8,12b-pentametil-2,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-decahidro-1H-benzo[ $\alpha$ ]xanteno (FI-20)

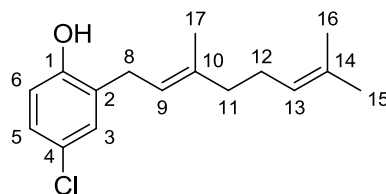
Seguindo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 41 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 41%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,98 (m, 2H C5-H y C3-H); 6,71 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,4$  Hz, C4-H); 2,74 a 2,52 (m, 2H, C8-H); 2,72 (m, 2H C8-H); 2,15 (s, 3H, C7-H) y 2,25 a 0,80 (m, 23H, C9-H a C22-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 151,6 (C1, aromático cuaternario); 128,1 (C5, CH aromático); 127,1 (C3, CH aromático); 126,1 (C6, aromático cuaternario); 121,9 (C2, aromático cuaternario); 118,9 (C4, CH aromático); 76,5 (C14, carbono cuaternario); 49,5 (C9,  $\text{CH}_3$ ); 48,5 a 16,1 (carbonos del anillo, mezcla de diastereoisómeros) y 14,2 (C7,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2961 (=CH-); 2940 (-C-C-); 1464 (-C=C- aromáticos).

### 9.12.11 Síntesis de (*E*)-4-cloro-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)fenol (FI-21)

Seguindo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-clorofenol (42 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 36 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 42%.

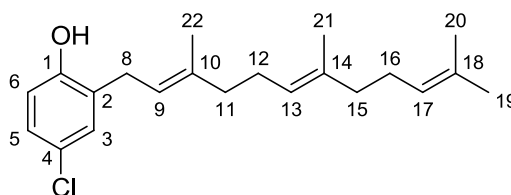


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,74 ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,9$  Hz, C5-H); 6,68 (s, 1H, C3-H); 6,66 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,9$  Hz C6-H); 5,30 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6,5$  Hz, C9-H); 5,02 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz, C13-H); 4,75 (s, 1H, OH); 3,30 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,0$  Hz, C8-H); 2,25 a 2,05 (m, 4H, C11-H y C12-H); 1,76 (s, 3H, C17-H); 1,68 (s, 3H, C16-H) y 1,59 (s, 3H, C15-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 152,7 ppm (Ar1, cuaternario aromático); 138,4 (C10, olefínico cuaternario); 131,9 (C14, olefínico cuaternario); 129,3 (Ar5, CH aromático); 128,3 (Ar3, CH aromático); 127,3 (Ar2, cuaternario aromático); 124,5 (Ar4, cuaternario aromático); 123,9 (C9, CH olefínico); 121,5 (C13, CH olefínico); 118,3 (Ar6, CH aromático); 39,7 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 29,6 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,5 (C12,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C15,  $\text{CH}_3$ ); 17,7

(C17, CH<sub>3</sub>) y 16,1 (C16, CH<sub>3</sub>). **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3505 (O-H); 2961 (=CH-); 2940 (-C-C-); 1464 (-C=C- aromáticos).

### 9.12.12 Síntesis de 4-cloro-2-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)fenol (FI-22).

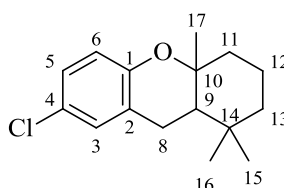
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-clorofenol (42 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (12  $\mu$ L, 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 40 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 38%.



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,75 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=8,0 Hz, C5-H); 6,68 (s, 1H, C3-H); 6,66 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,9 Hz C6-H); 5,31 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H9-H8</sub> = 7,1 Hz, C9-H); 5,09 (m, 2H, C13-H y C17-H); 4,77 (s, 1H, OH); 3,32 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H8-H9</sub> = 7,1 Hz, C8-H); 2,21 a 1,94 (m, 8H, C11-H, C12-H, C15-H y C16-H); 1,77 (s, 3H, C22-H); 1,68 (s, 3H, C19-H) y 1,61 (s, 6H, C20-H y C21-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 152,8 ppm (Ar1, cuaternario aromático); 138,5 (C10, olefínico cuaternario); 135,4 (C15, olefínico cuaternario); 131,9 (C18, olefínico cuaternario); 129,3 (Ar5, CH aromático); 128,3 (Ar3, CH aromático); 124,4 (C17, CH olefínico); 127,3 (Ar2, cuaternario aromático); 124,5 (Ar4, cuaternario aromático); 123,9 (C9, CH olefínico); 121,5 (C13, CH olefínico); 118,3 (Ar6, CH aromático); 39,7 (C8, CH<sub>2</sub>); 29,9 (C11 y C15, CH<sub>2</sub>); 26,7 a 26,5 (C12 y C16, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C19, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C22, CH<sub>3</sub>); 16,2 a 16,1 (C20 y C21, CH<sub>3</sub>). **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3535 (O-H); 2961 (=CH-); 1609 (-C=C-); 1464 (-C=C- aromáticos).

### 9.12.13 Síntesis de 1,1,4a,7-tetrametil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H-xanteno (FI-23).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (12  $\mu$ L, 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 38 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 45%.

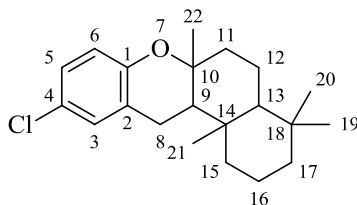


**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,02 (s, 1H, Ar3-H); 7,00 (m, 1H, Ar-5); 6,66 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,9 Hz Ar6-H); 2,75 a 2,50 (m, 2H, C8-H); 2,20 a 1,40 (m, 7H, C9-H a C13-H, protones de anillos); 1,20

(s, 3H, C17–H); 1,01 (s, 3H, C15–H\*) y 0,91 (s, 3H, 16–H\*). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 151,9$  ppm (C1, aromático cuaternario); 129,4 (C5, CH aromático); 127,1 (C2, aromático cuaternario); 124,2 (C4, CH aromático); 118,3 (C3, CH aromático); 117,2 (C6, CH aromático); 77,6 (C10, cuaternario); 47,8 (C9, CH); 41,4 y 39,8 (C11 y C13 intercambiables,  $\text{CH}_2$ ); 32,1 y 20,6 (C15 y C16 intercambiables,  $\text{CH}_3$ ); 23,2 (C8;  $\text{CH}_2$ ); 19,8 (C12,  $\text{CH}_2$ ) y 19,7 (C17,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2966 (=CH-); 1484 (-C=C- aromáticos).

#### 9.12.14 Síntesis de 10-cloro-4,4,6a,12b-tetrametil-2,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-decahidro-1H-benzo[ $\alpha$ ]xanteno (FI-24).

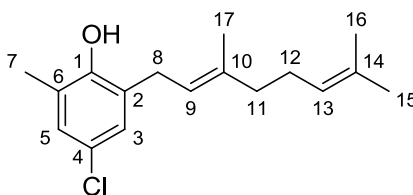
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 53 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 50%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,02$  (s, 1H, Ar3–H); 7,00 (m, 1H, Ar–5); 6,66 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,9$  Hz Ar6–H); 2,72 (m, 2H C8–H); 2,25 a 0,80 (m, 24H, C9–H a C22–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 151,9$  ppm (C1, aromático cuaternario); 129,4 (C5, CH aromático); 127,1 (C2, aromático cuaternario); 124,2 (C4, CH aromático); 118,3 (C3, CH aromático); 117,2 (C6, CH aromático); 77,5 (C14, carbono cuaternario); 49,3 (C9,  $\text{CH}_3$ ); 48,5 a 16,0 (mezcla de diastereoisómeros). **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2962 (=CH-); 2926 ( $-\text{CH}_2-$ ); 1484 (-C=C- aromáticos).

#### 9.12.15 Síntesis de (E)-4-cloro-2-(3,7-dimethilocta-2,6-dien-1-il)-6-metilfenol (FI-25)

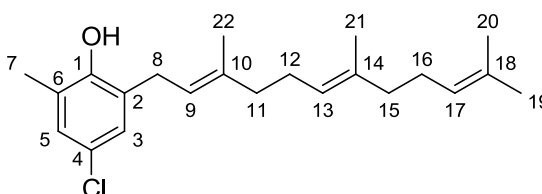
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el p-metoxifenol (47 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 22 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 25%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,98$  ppm (d, H,  $^4J_{\text{H}_5-\text{H}_3} = 2,4$  Hz, C5-H);  $6,92$  (d, 1H,  $^4J_{\text{H}_3-\text{H}_5} = 2,4$  Hz, C3-H);  $5,27$  (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_8} = 7,2$  Hz, C9-H);  $5,15$  (s, 1H, OH);  $5,06$  (m, 1H, C13-H);  $3,31$  (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9} = 7,1$  Hz);  $2,20$  (s, 3H, C7-H);  $2,19$  (m, 4H, C11-H y C12-H);  $1,77$  (s, 3H, C15-H);  $1,69$  (s, 3H, C17-H) y  $1,61$  (s, 3H, C15-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 151,5$  (C1, aromático cuaternario);  $139,6$  (C10, olefínico cuaternario);  $132,2$  (C14, olefínico cuaternario);  $128,5$  y  $127,1$  (C3 y C5, CH aromático);  $127,7$  (C2, aromático cuaternario);  $126,2$  (C4, aromático cuaternario);  $124,6$  (C6, aromático cuaternario);  $123,6$  (C13, CH olefínico); y  $121,0$  (C9, CH olefínico);  $39,6$  (C11,  $\text{CH}_2$ );  $30,1$  (C8,  $\text{CH}_2$ );  $26,2$  (C12,  $\text{CH}_2$ );  $25,7$  (C15,  $\text{CH}_3$ );  $17,7$  (C16,  $\text{CH}_3$ );  $16,2$  (C17,  $\text{CH}_3$ ) y  $15,8$  (C7,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) =  $3542$  (O-H);  $2960$  (=CH-);  $2945$  (-C-C-);  $1487$  (-C=C- aromáticos).

#### 9.12.16 Síntesis de 4-cloro-2-metil-6-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il) fenol (FI-26)

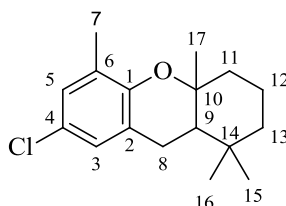
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 32 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 29%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,98$  ppm (d, 1H,  $^4J_{\text{H}_5-\text{H}_3} = 2,3$  Hz, C5-H);  $6,92$  (d, 1H,  $^4J_{\text{H}_3-\text{H}_5} = 2,1$  Hz, C3-H);  $5,25$  (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_8} = 7,2$  Hz, C9-H);  $5,14$  (s, 1H, OH);  $5,01$  (m, 2H, C13-H);  $3,31$  (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9} = 7,1$  Hz);  $2,20$  (s, 3H, C7-H);  $2,19$  (m, 8H, C11-H, C12-H, C15-H y C16-H);  $1,77$  (s, 3H, C19-H);  $1,69$  (s, 3H, C22-H) y  $1,61$  (s, 6H, C20-H y C21-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 151,5$  (C1, aromático cuaternario);  $139,6$  (C10, olefínico cuaternario);  $135,5$  (C14, olefínico cuaternario);  $132,2$  (C18, olefínico cuaternario);  $128,5$  y  $127,1$  (C3 y C5, CH aromático);  $127,6$  (C2, aromático cuaternario);  $126,2$  (C4, aromático cuaternario);  $124,6$  (C17, CH olefínico);  $123,6$  (C13, CH olefínico); y  $121,0$  (C9, CH olefínico);  $39,6$  (C11 y C15,  $\text{CH}_2$ );  $30,1$  (C8,  $\text{CH}_2$ );  $26,2$  y  $26,1$  (C12 y C16,  $\text{CH}_2$ );  $25,7$  (C19,  $\text{CH}_3$ );  $17,7$  (C22,  $\text{CH}_3$ );  $16,2$  a  $16,1$  (C20 y C21,  $\text{CH}_3$ ) y  $15,8$  (C7,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) =  $3548$  (O-H);  $2961$  (=CH-);  $2940$  (-C-C-);  $1488$  (-C=C- aromáticos).

#### 9.12.17 Síntesis de 7-cloro-1,1,4a,5-tetrametil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H-xanteno (FI-27)

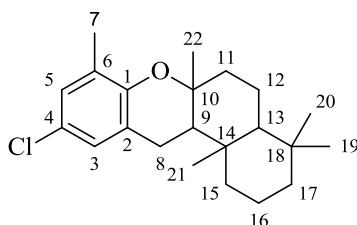
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 20 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 23%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,08$  ppm (m, 1H, C5–H); 6,90 (m, 1H, C3–H); 2,75 a 2,50 (m, 2H, C8–H); 2,09 (s, 3H, C7–H); 2,30 a 1,40 (m, 7H, C9–H a C13–H, protones de anillos); 1,18 (s, 3H, C17–H); 0,99 (s, 3H, C15–H\*) y 0,89 (s, 3H, 16–H\*). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 150,9$  (C1, aromático cuaternario); 128,5 y 127,1 (C3 y C5, CH aromático); 127,6 (C2, aromático cuaternario); 126,2 (C4, aromático cuaternario); 77,6 (C10, carbono cuaternario); 48,0 (C9, CH) 41,4 y 39,8 (C11 y C13 intercambiables,  $\text{CH}_2$ ); 32,1 y 20,6 (C15 y C16 intercambiables,  $\text{CH}_3$ ); 23,2 (C8;  $\text{CH}_2$ ); 19,8 (C12,  $\text{CH}_2$ ); 19,7 (C17,  $\text{CH}_3$ ). y 15,7 (C7,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2940 (-C-C-); 1464 (-C=C- aromáticos).

#### 9.12.18 Síntesis de 10-cloro-4,4,6a,8,12b-pentametil-2,3,4,4a,5,6,6a,12,12a,12b-decahydro-1H-benzo[ $\alpha$ ]xanteno (FI-28).

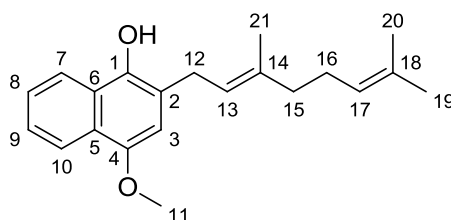
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente farnesol (71 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 31 mg de un aceite amarillo con un rendimiento del 28%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,07$  ppm (m, 1H, C5–H); 6,91 (m, 1H, C3–H); 2,72 (m, 2H C8–H); 2,25 a 0,80 (m, 24H, C9–H a C22–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 150,9$  (C1, aromático cuaternario); 128,5 y 127,1 (C3 y C5, CH aromático); 127,6 (C2, aromático cuaternario); 126,2 (C4, aromático cuaternario); 76,5 (C14, carbono cuaternario); 49,5 (C9,  $\text{CH}_3$ ); 48,5 a 16,1 (mezcla de diastereoisómeros) y 15,7 (C7,  $\text{CH}_3$ ). **IR (film)**:  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2962 (=CH-); 2924 (- $\text{CH}_2$ -); 1460 (-C=C- aromáticos).

#### 9.12.19 Síntesis de (E)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-4-metoxinaftalen-1-ol (FI-29)

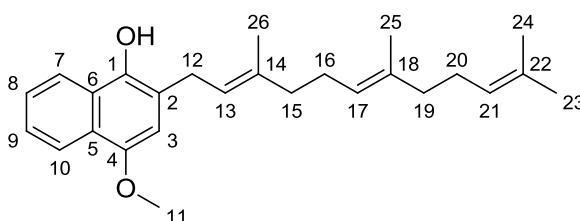
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 61 mg de un aceite naranja con un rendimiento del 61%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,17$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_{10}\text{-H}_9}=7,8$  Hz, C10-H); 8,11 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_7\text{-H}_8}=7,87$  Hz, C7-H); 7,45 (q, 2H,  $^3J=7,2$  Hz, C8-H y C9-H); 6,57 (s, 1H, C3-H); 5,41 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_{13}\text{-H}_{12}}=7,3$  Hz; C13-H); 5,36 (s, 1H, OH); 5,15 (m, 1H, C17-H); 3,97 (s, 3H, C11-H); 3,51 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_{12}\text{-H}_{13}}=7,2$  Hz, C12-H); 2,21 a 1,90 (m, 2H, C15-H y C16-H); 1,86 (s, 3H, C21-H); 1,67 (s, 3H, C19-H) y 1,60 (s, 6H, C20-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 149,3$  (C4, aromático cuaternario); 143,3 (C1, aromático cuaternario); 139,2 (C14, olefínico cuaternario); 131,3 (C18, olefínico cuaternario); 125,9 a 119,2 (C5 a C10, CH aromáticos); 125,1 (C2, aromático cuaternario); 124,4 (C13, CH olefínico); 121,7 (C17, CH olefínico); 106,4 (C3, olefínico aromático); 55,8 (C11,  $\text{CH}_3$ ); 39,7 (C15,  $\text{CH}_2$ ); 31,0 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 26,4 (C16,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C19,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C21,  $\text{CH}_3$ ) y 16,0 (C20,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 311,20056; encontrada 311,20042. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3535 (O-H); 2961 (=CH-); 2924 ( $-\text{CH}_2-$ ); 1484 ( $-\text{C}=\text{C}-$  aromáticos).

### 9.12.20 Síntesis de 4-methoxy-2-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-yl)naftalen-1-ol (FI-30)

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el p-metoxinaftol (100 mg; 0,58 mmoles) en tolueno anhidro (10 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (25  $\mu\text{L}$ , 0,18 mmoles) y posteriormente farnesol (127 mg; 0,58 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 132 mg de un aceite naranja con un rendimiento del 60%.

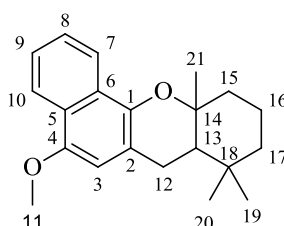


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,17$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_{10}\text{-H}_9}=7,6$  Hz, C10-H); 8,11 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_7\text{-H}_8}=7,8$  Hz, C7-H); 7,46 (q, 2H,  $^3J=7,5$  Hz, C8-H y C9-H); 6,57 (s, 1H, C3-H); 5,42 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_{13}\text{-H}_{12}}=7,2$  Hz; C13-H); 5,36 (s, 1H, OH); 5,09 (m, 2H, C17-H y C21-H); 3,96 (s, 3H, C11-H); 3,51 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_{12}\text{-H}_{13}}=7,1$  Hz, C12-H); 2,21 a 1,92 (m, 8H, C15-H, C16-H, C19-H y C20-H); 1,86 (s, 3H, C26-H); 1,67 (s, 3H, C23-H); 1,61 a 1,58 (s, 6H, C24-H y C25-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 149,3$  (C4, aromático cuaternario); 143,3 (C1, aromático cuaternario); 139,2 (C14, olefínico cuaternario); 135,8 (C18, olefínico cuaternario); 131,3 (C22, olefínico cuaternario); 125,9 (C5 y C6, aromático cuaternario); 125,9 a 119,2 (C7 a C10, CH aromáticos); 125,1 (C2, aromático cuaternario); 124,3 (C21, CH olefínico); 123,5 (C13, CH olefínico); 121,2 (C17, CH olefínico); 106,4 (C3, olefínico aromático); 55,8 (C11,  $\text{CH}_3$ ); 39,7 (C15 y C19,  $\text{CH}_2$ ); 31,0 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 a 26,3 (C16 y C20,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C23,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C26,  $\text{CH}_3$ ) y 16,4 a 16,1 (C24 y C25,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:**

Masa calculada para  $C_{26}H_{34}O_2Na$  ( $M+Na^+$ ) = 401,24510; encontrada 401,24521. **IR (film):**  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3520 (O-H); 2963 (=CH-); 2916 (-CH<sub>2</sub>-); 1651 (-C=C-); 1450 (-C=C- aromáticos).

### 9.12.21 Síntesis de 5-metoxi-8,8,11a-trimetil-7a,8,9,10,11,11a-hexahidro-7H-benzo[c]xanteno (FI-31)

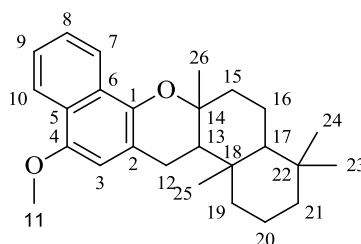
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxinaftol (100 mg; 0,58 mmoles) en tolueno anhidro (10 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $BF_3 \cdot Et_2O$  (110  $\mu$ L, 1,70 mmoles) y posteriormente geraniol (88 mg; 0,58 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 88 mg de un aceite marrón con un rendimiento del 49%.



**RMN de <sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8,14 ppm (m, 2H, C7-H y C10-H); 7,46 (m, 2H, C8-H y C9-H); 6,52 (s, 1H, C3-H); 3,95 (s, 3H, C11-H); 2,75 (m, 2H C12-H); ); 2,20 a 1,40 (m, 7H, C13-H a C17-H, protones de anillos); 1,25 (s, 3H, C17-H\*); 1,05 (s, 3H, C15-H\*) y 0,96 (s, 3H, 16-H\*). **RMN de <sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 148,5 (C4, aromático cuaternario); 141,8 (C1, aromático cuaternario); 125,6 a 125,4 (C5 y C6, aromático cuaternario); 125,1 (C2, aromático cuaternario); 121,4 a 115,0 (C7 a C10, CH aromáticos); 105,6 (C3, olefínico aromático); 55,7 (C11, CH<sub>3</sub>); 48,5 (C13, CH); 41,6 a 19,8 (C14 a C21, carbonos del anillo C y D y metilos) y 24,1 (C12, CH<sub>2</sub>). **EMAR:** Masa calculada para  $C_{21}H_{26}O_2Na$  ( $M+Na^+$ ) = 333,18250; encontrada 333,18250. **IR (film):**  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 2964 (=CH-); 2924 (-CH<sub>2</sub>-); 1643 (-C=C-); 1454 (-C=C- aromáticos).

### 9.12.22 Síntesis de 12-metoxi-4,4,6a,14b-tetrametil-2,3,4,4a,5,6,6a,14,14a,14b-decahidro-1H-dibenzo[a,h]xanteno (FI-32)

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el p-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $BF_3 \cdot Et_2O$  (12  $\mu$ L, 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 66 mg de un aceite marrón con un rendimiento del 55%.

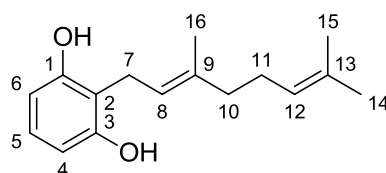


**RMN de <sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8,15 ppm (m, 2H, C7-H y C10-H); 7,45 (m, 2H, C8-H y C9-H); 6,52 (s, 1H, C3-H); 3,95 (s, 3H, C11-H); 2,72 (m, 2H C12-H); ); 2,25 a 0,78 (m, 24H, C13-H a C26-H).

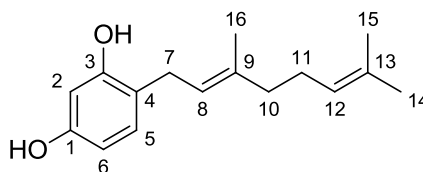
**RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 148,6$  (C4, aromático cuaternario); 142,3 (C1, aromático cuaternario); 125,6 a 125,5 (C5 y C6, aromático cuaternario); 125,1 (C2, aromático cuaternario); 121,4 a 115,2 (C7 a C10, CH aromáticos); 105,6 (C3, olefínico aromático); 76,5 (C14, carbono cuaternario); 55,7 (C11,  $\text{CH}_3$ ); 48,5 a 16,1 (mezcla de diastereoisómeros). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 379,26316; encontrada 379,26301. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2963 (=CH-); 2926 (- $\text{CH}_2$ -); 1641 (-C=C-); 1457 (-C=C- aromáticos).

### 9.12.23 Síntesis de (*E*)-2-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)benceno-1,3-diol (FI-33), de (*E*)-4-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)benceno-1,3-diol (FI-35) y de 2,4-bis((*E*)-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)benceno-1,3-diol (FI-37)

Seguendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el resorcinol (100 mg; 0,91 mmoles) en tolueno anhidro (10 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (33  $\mu\text{L}$ , 0,27 mmoles) y posteriormente geraniol (140 mg; 0,91 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 3 productos con una masa total de 60 mg, siendo aceites amarillos con un rendimiento total del 27%, en relación FI-33/FI-35/FI-37 de 1:1,2:2,1.

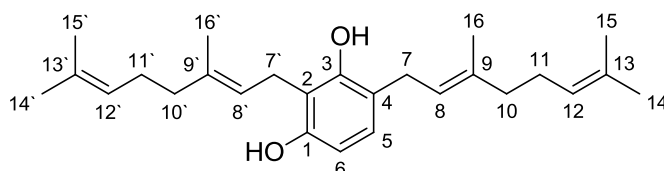


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,94$  ppm (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5-\text{H}_6} = 8,1$  Hz, C5-H); 6,40 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_6} = 8,1$  Hz, C4-H y C6-H); 5,34 y 5,13 (s, 2H, OH), 5,28 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_7} = 7,5$  Hz, C8-H); 5,10 (m, 1H, C12-H); 3,33 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_7-\text{H}_8} = 6,9$  Hz, C7-H); 2,20 a 1,90 (m, 4H, C10-H y C11-H); 1,79 (s, 3H, C16-H); 1,67 (s, 3H, C14-H) y 1,59 (s, 6H, C15-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 155,4$  ppm (C1 y C3, aromático cuaternario); 138,5 (C9, olefínico cuaternario); 131,9 (C13, olefínico cuaternario); 127,1 (C5, CH aromático); 124,0 (C12, CH olefínico); 121,4 (C8, CH olefínico); 113,8 (C2, aromático cuaternario); 108,0 (C4 y C6, CH aromático); 39,7 (C10,  $\text{CH}_2$ ); 26,4 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C16,  $\text{CH}_3$ ); 22,4 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 17,7 (C14,  $\text{CH}_3$ ) y 16,0 (C15,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 269,15120; encontrada 269,15134. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3415 (O-H); 2965 (=CH-); 2930 (- $\text{CH}_2$ -); 1645 (-C=C-); 1487 (-C=C- aromáticos).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,93$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_6} = 7,9$  Hz, C5-H); 6,35 (s, 1H, C2-H); 6,32 (d, 1H, C6-H); 5,48 y 5,39 (s, 2H, OH); 5,31 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_7} = 7,1$  Hz, C8-H); 5,10 (m, 1H, C12-H); 3,34 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_7-\text{H}_8} = 7,0$  Hz, C7-H); 2,20 a 1,90 (m, 4H, C10-H y C11-H); 1,76 (s, 3H, C21-H); 1,67 (s, 3H, C18-H) y 1,60 (s, 6H, C19-H y C20-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 155,5$  y 153,4 ppm (C1 y C3, aromático cuaternario); 138,1 (C9, olefínico cuaternario); 132,1 (C13, olefínico

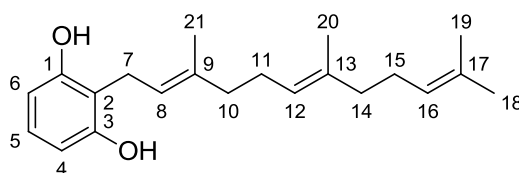
cuaternario); 130,2 (C5, CH aromático); 123,8 (C12, CH olefínico); 122,4 (C8, CH olefínico); 122,2 (C4, aromático cuaternario); 107,4 (C6, CH aromático); 103,2 (C2, CH aromático); 39,7 (C10, CH<sub>2</sub>); 29,0 (C7, CH<sub>2</sub>); 26,5 (C11, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C16, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C14, CH<sub>3</sub>) y 16,2 (C15, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) = 247,16926; encontrada 247,16914. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3377 (O-H); 2964 (=CH-); 2929 (-CH<sub>2</sub>-); 1645 (-C=C-); 1485 (-C=C- aromáticos).



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,80 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H5-H6</sub> = 8,0 Hz, C5-H); 6,36 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H6-H5</sub> = 8,1 Hz, C6-H); 5,39 (s, 2H, OH); 5,30 (m, 2H, C8-H y C8'-H); 5,10 (m, 2H, C12-H, y C12'-H y C16'-H); 3,44 y 3,30 (d, C7-H y C7'-H, int.); 2,20 a 1,90 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 1,78 (s, 6H, C16-H y C16'-H, int.); 1,67 (s, 6H, C14-H y C14'-H) y 1,59 (s, 6H, C15-H y C15'-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 153,7 y 153,4 ppm (C1 y C3, aromático cuaternario intercambiables); 138,7 y 138,5 (C9 y C9', olefínico cuaternario); 131,8 y 131,6 (C13 y C13', olefínico cuaternario); 127,4 (C5, CH aromático); 123,9 y 123,7 (C12 y C12', CH olefínico); 121,6 y 121,0 (C8 y C8', CH olefínico); 119,0 (C2, aromático cuaternario); 114,0 (C4, aromático cuaternario); 107,6 (C6, CH aromático); 39,7 a 39,6 (C10 y C10', CH<sub>2</sub>, int.); 29,6 (C7, CH<sub>2</sub>); 26,7 a 26,3 (C11 y C11', CH<sub>2</sub>, int.); 25,7 (C16 y C16', CH<sub>3</sub>); 22,6 (C7', CH<sub>2</sub>); 17,7 (C14 y C14', CH<sub>3</sub>) y 16,1 (C15 y C15', CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) = 383,29446; encontrada 383,29461. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3377 (O-H); 2964 (=CH-); 2929 (-CH<sub>2</sub>-); 1646 (-C=C-); 1485 (-C=C- aromáticos).

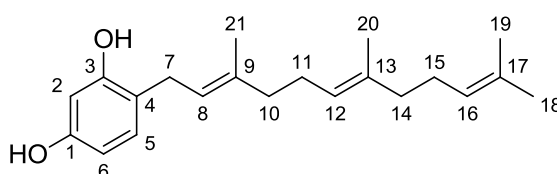
#### 9.12.24 Síntesis de 2-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)benzene-1,3-diol (FI-34), de 4-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)benzene-1,3-diol (FI-36) y de 2,4-bis((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)benzene-1,3-diol (FI-38)

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el resorcinol (100 mg; 0,91 mmoles) en tolueno anhidro (10 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (33  $\mu$ L, 0,27 mmoles) y posteriormente farnesol (202 mg; 0,91 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 3 productos con una masa total de 74 mg, siendo aceites amarillos con un rendimiento conjunto del 35%, en relación FI-34/FI-36/FI-38 de 1: 1,4: 2,7.

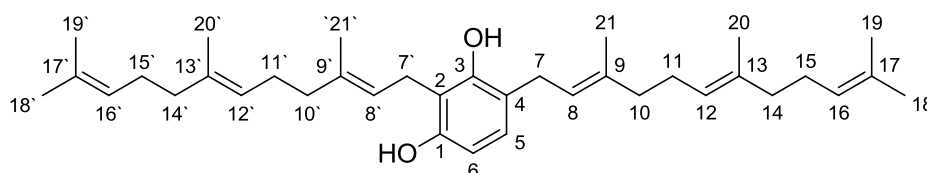


**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,94 ppm (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H5-H6</sub> = 8,1 Hz, C5-H); 6,40 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H5-H6</sub> = 8,1 Hz, C4-H y C6-H); 5,34 y 5,13 (s, 2H, OH), 5,28 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H8-H7</sub> = 7,5 Hz, C8-H); 5,09 (m, 2H, C12-H y C16-H); 3,43 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H7-H8</sub> = 7,1 Hz, C7-H); 2,17 a 1,91 (m, 8H, C10-H, C11-H, C14-H y

C15-H); 1,82 (s, 3H, C21-H); 1,67 (s, 3H, C18-H) y 1,59 (s, 6H, C19-H y C20-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 155,4$  ppm (C1 y C3, aromático cuaternario); 138,6 (C9, olefínico cuaternario); 135,5 (C13, olefínico cuaternario); 131,3 (C17, olefínico cuaternario); 127,1 (C5, CH aromático); 124,4 (C16, CH olefínico); 123,7 (C12, CH olefínico); 121,7 (C8, CH olefínico); 113,7 (C2, aromático cuaternario); 108,0 (C4 y C6, CH aromático); 39,7 (C10 y C14,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 a 26,4 (C11 y C15,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C21,  $\text{CH}_3$ ); 22,4 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 17,7 (C18,  $\text{CH}_3$ ) y 16,2 a 16,0 (C19 y C20,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 315,23186; encontrada 315,23180. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3425 (O-H); 2962 (=CH-); 2931 ( $-\text{CH}_2-$ ); 1645 ( $-\text{C}=\text{C}-$ ); 1483 ( $-\text{C}=\text{C}-$  aromáticos).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,93$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_6} = 8,2$  Hz, C5-H); 6,35 (s, 1H, C2-H); 6,33 (d, 1H, C6-H); 5,30 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_7} = 7,4$  Hz, C8-H); 5,09 (m, 2H, C12-H y C16-H); 3,29 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_7-\text{H}_8} = 7,2$  Hz, C7-H); 2,20 a 1,90 (m, 8H, C10-H, C11-H, C14-H y C15-H); 1,77 (s, 3H, C21-H); 1,67 (s, 3H, C18-H) y 1,59 (s, 6H, C19-H y C20-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 155,4$  y 153,3 ppm (C1 y C3, aromático cuaternario); 137,9 (C9, olefínico cuaternario); 135,4 (C13, olefínico cuaternario); 131,3 (C17, olefínico cuaternario); 130,3 (C5, CH aromático); 124,4 (C16, CH olefínico); 123,8 (C12, CH olefínico); 122,4 (C8, CH olefínico); 122,2 (C4, aromático cuaternario); 107,4 (C6, CH aromático); 103,2 (C2, CH aromático); 39,7 (C10 y C14,  $\text{CH}_2$ ); 28,8 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 a 26,4 (C11 y C15,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C21,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C18,  $\text{CH}_3$ ) y 16,2 a 16,0 (C19 y C20,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 315,23186; encontrada 315,23184. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3451 (O-H); 2961 (=CH-); 2932 ( $-\text{CH}_2-$ ); 1647 ( $-\text{C}=\text{C}-$ ).

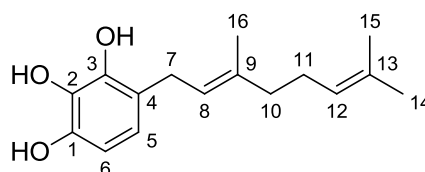


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,82$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_6} = 8,1$  Hz, C5-H); 6,35 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 8,2$  Hz, C6-H); 5,40 (s, 2H, OH); 5,30 (m, 2H, C8-H y C8'-H); 5,09 (m, 4H, C12-H, C16-H, C12'-H y C16'-H); 3,43 y 3,28 (d,  $^3J_{\text{H}_7-\text{H}_8} = 7,1$  Hz, C7-H y C7'-H); 2,18 a 1,93 (m, 16H,  $\text{CH}_2$  de cadena isoprenica); 1,82 y 1,77 (s, 6H, C21-H y C21'-H\*); 1,67 (s, 6H, C18-H y C18'-H) y 1,60 (s, 12H, C19-H, C20-H, C19'-H y C20'-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 153,7$  y 153,4 ppm (C1 y C3, aromático cuaternario intercambiables); 140,1 a 138,2 (C9 y C9', olefínico cuaternario int.); 135,5 y 135,2 (C13 y C13', olefínico cuaternario int.); 131,8 y 131,3 (C17 y C17', olefínico cuaternario); 127,4 (C5, CH aromático); 124,6 y 124,4 (C16 y C16', CH olefínico int.); 123,9 y 123,7 (C12 y C12', CH olefínico); 122,3 y 121,0 (C8 y C8', CH olefínico); 119,0 (C2, aromático cuaternario); 114,0 (C4, aromático cuaternario); 107,6 (C6, CH aromático); 39,7 a 39,6 (C10, C14, C10' y C14',  $\text{CH}_2$  int.); 29,6 (C7,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 a 26,3 (C11, C15, C11' y C15',  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C18 y C18',  $\text{CH}_3$ ); 22,6 (C7',  $\text{CH}_2$ ); 17,7 (C21 y C21',  $\text{CH}_3$ ); 16,5 a 16,0 (C19, C20, C19' y C20',  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_2\text{Na}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 541,40160; encontrada 541,40148. **IR**

(film):  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3384 (O-H); 2965 (=CH-); 2932 (-CH<sub>2</sub>-); 1645 (-C=C-); 1487 (-C=C- aromáticos).

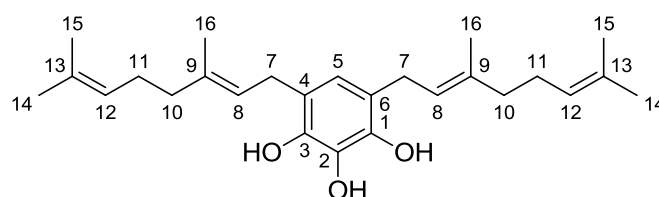
### 9.12.25 Síntesis de (*E*)-4-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il) bencene-1,2,3-triol (FI-39) y de 4,6-bis((*E*)-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il) benceno-1,2,3-triol (FI-41).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el pirogalol (100 mg; 0,80 mmoles) en tolueno anhidro (10 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (30  $\mu$ L, 0,24 mmoles) y posteriormente geraniol (121 mg; 0,80 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 3 productos con una masa total de 55 mg, siendo aceites amarillos con un rendimiento conjunto del 25%, en relación FI-39/FI-41 de 1:1,8.



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,53 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H5-H6</sub> = 8,3 Hz, C5-H); 6,43 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H6-H5</sub> = 8,3 Hz, C6-H); 5,31 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H8-H7</sub> = 7,4 Hz, C8-H); 5,07 (m, 1H, C12-H); 3,30 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H7-H8</sub> = 7,1 Hz, C7-H); 2,16 a 1,94 (m, 4H, C10-H y C11-H); 1,76 (s, 3H, C16-H); 1,67 (s, 3H, C14-H) y 1,59 (s, 3H, C15-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 142,5 y 142,3 ppm (C1 y C3, aromáticos cuaternarios int.); 138,5 (C9, olefínico cuaternario); 132,1 (C13, olefínico cuaternario); 132,1 (C2, aromático cuaternario); 123,8 (C12, CH olefínico); 122,1 (C8, CH olefínico); 120,2 (C5, CH aromático); 119,5 (C4, aromático cuaternario); 107,4 (C6, CH aromático); 39,7 (C10, CH<sub>2</sub>); 29,5 (C7, CH<sub>2</sub>); 26,3 (C11, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C16, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C14, CH<sub>3</sub>) y 16,1 (C15, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>Na (M+Na<sup>+</sup>) = 285,14612; encontrada 285,14615. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3442 (O-H); 2967 (=CH-); 2924 (-CH<sub>2</sub>-); 1666 (-C=C-); 1444 (-C=C- aromáticos).

#### EMAR:

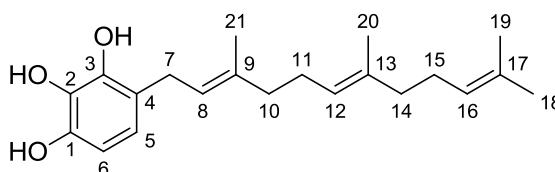


**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,40 (s, 1H, C5-H); 5,31 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H8-H7</sub> = 7,5 Hz, C8-H); 5,08 (m, 2H, C12-H); 3,29 (d, 4H, <sup>3</sup>J<sub>H7-H8</sub> = 7,1 Hz, C7-H); 2,18 a 1,94 (m, 8H, C10-H y C11-H); 1,75 (s, 6H, C16-H); 1,68 (s, 6H, C14-H) y 1,60 (s, 6H, C15-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 140,5 ppm (C1 y C3, aromáticos cuaternarios); 134,6 (C9, olefínico cuaternario); 131,9 (C13, olefínico cuaternario); 124,2 (C2, aromático cuaternario); 124,0 (C12, CH olefínico); 122,5 (C8, CH olefínico); 120,4 (C5, CH aromático); 119,2 (C4 y C6, aromático cuaternario); 39,7 (C10, CH<sub>2</sub>); 29,1 (C7, CH<sub>2</sub>); 26,5 (C11, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C16, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C14, CH<sub>3</sub>) y 16,1 (C15, CH<sub>3</sub>). **EMAR:**

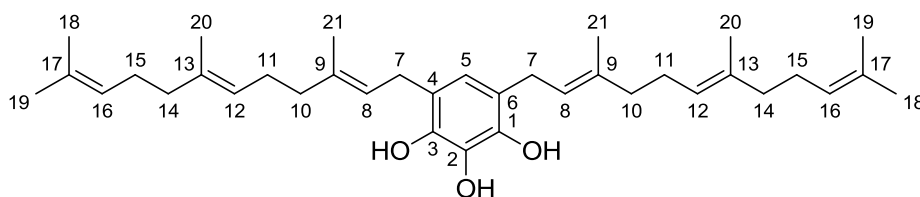
Masa calculada para  $C_{26}H_{38}O_3Na$  ( $M+Na^+$ ) = 421,27132; encontrada 421,27144. **IR (film):**  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3456 (O-H); 2967 (=CH-); 2924 (-CH<sub>2</sub>-); 1646 (-C=C-); 1444 (-C=C- aromáticos).

### 9.12.26 Síntesis de 4-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)benceno-1,2,3-triol (FI-40) y de 4,6-bis((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)benceno-1,2,3-triol (FI-42).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el pirogalol (100 mg; 0,80 mmoles) en tolueno anhidro (10 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente  $BF_3 \cdot Et_2O$  (30  $\mu$ L, 0,24 mmoles) y posteriormente farnesol (176 mg; 0,80 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 3 productos con una masa total de 80 mg, siendo aceites amarillos con un rendimiento conjunto del 29%, en relación FI-40/FI-42 de 1:1,6.



**RMN de <sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 6,53 ppm (d, 1H,  $^3J_{H5-H6}$  = 8,3 Hz, C5-H); 6,43 ppm (d, 1H,  $^3J_{H6-H5}$  = 8,3 Hz, C6-H); 5,32 (t, 1H,  $^3J_{H8-H7}$  = 7,7 Hz, C8-H); 5,09 (m, 2H, C12-H y C16-H); 3,30 (d, 2H,  $^3J_{H7-H8}$  = 7,2 Hz, C7-H); 2,20 a 1,90 (m, 8H, C10-H, C11-H, C14-H y C15-H); 1,77 (s, 3H, C21-H); 1,68 (s, 3H, C18-H) y 1,59 (s, 6H, C19-H y C20-H). **RMN de <sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 142,7 y 142,4 ppm (C1 y C3, aromáticos cuaternarios int.); 138,2 (C9, olefínico cuaternario); 135,4 (C13, olefínico cuaternario); 132,1 (C2, aromático cuaternario); 131,6 (C17, olefínico cuaternario); 123,6 (C12, CH olefínico); 122,1 (C8, CH olefínico); 120,2 (C5, CH aromático); 119,8 (C4, aromático cuaternario); 107,4 (C6, CH aromático); 39,7 (C10, CH<sub>2</sub>); 29,3 (C7, CH<sub>2</sub>); 26,4 (C11 y C15, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C21, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C18, CH<sub>3</sub>) y 16,1 a 16,0 (C19 y C20, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para  $C_{21}H_{30}O_3Na$  ( $M+Na^+$ ) = 353,20872; encontrada 353,20871. **IR (film):**  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3442 (O-H); 2967 (=CH-); 2922 (-CH<sub>2</sub>-); 1645 (-C=C-); 1454 (-C=C- aromáticos).

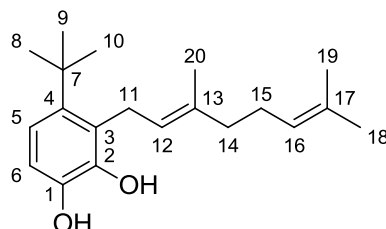


**RMN de <sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 6,39 (s, 1H, C5-H); 5,31 (t, 2H,  $^3J_{H8-H7}$  = 7,5 Hz, C8-H); 5,09 (m, 4H, C12-H y C16-H); 3,28 (d, 4H,  $^3J_{H7-H8}$  = 7,4 Hz, C7-H); 2,15 a 1,92 (m, 16H, C10-H, C11-H, C14-H y C15-H); 1,76 (s, 6H, C21-H); 1,67 (s, 6H, C18-H) y 1,59 (s, 12H, C19-H y C20-H). **RMN de <sup>13</sup>C** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 140,7 ppm (C1 y C3, aromáticos cuaternarios); 137,9 (C9, olefínico cuaternario); 135,4 (C13, olefínico cuaternario); 131,3 (C17, olefínico cuaternario); 124,4 (C16, CH olefínico); 124,3 (C2, aromático cuaternario); 123,8 (C12, CH olefínico); 122,4 (C8, CH olefínico); 120,5 (C5, CH aromático); 119,0 (C4 y C6, aromático cuaternario); 39,7 (C10 y C14, CH<sub>2</sub>); 28,8 (C7, CH<sub>2</sub>); 26,7 a 26,4 (C11 y C15, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C21, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C18, CH<sub>3</sub>) y 16,1 (C19 y C20, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para  $C_{36}H_{54}O_3Na$  ( $M+Na^+$ ) = 557,39652; encontrada

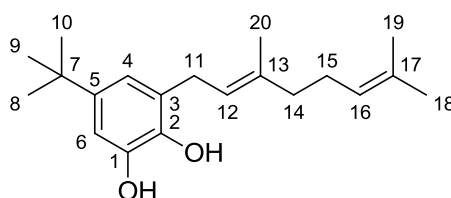
557,39657. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3439 (O-H); 2966 (=CH-); 2922 (-CH<sub>2</sub>-); 1643 (-C=C-); 1454 (-C=C- aromáticos).

**9.12.27 Síntesis de (*E*)-4-(*tert*-butil)-3-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il) benceno-1,2-diol (FI-43), de (*E*)-5-(*tert*-butil)-3-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il) benceno-1,2-diol (FI-45) y 4-(*tert*-butyl)-3,6-bis((*E*)-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il) benceno-1,2-diol (FI-47)**

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el *t*-butilcatecol (100 mg; 0,60 mmoles) en tolueno anhidro (10 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (22  $\mu$ L, 0,18 mmoles) y posteriormente geraniol (93 mg; 0,60 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 3 productos con una masa total de 69 mg, siendo aceites amarillos con un rendimiento conjunto del 36%, en relación FI-43/FI-45/FI-47 de 1: 2,1: 4,5.

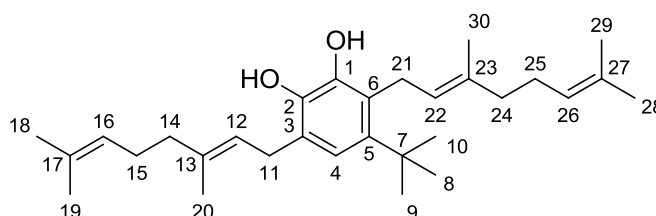


**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,51 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H5-H6</sub> = 8,3 Hz, C5-H); 6,45 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H6-H5</sub> = 8,3 Hz, C6-H); 5,31 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H12-H11</sub> = 7,0 Hz, C12-H); 5,06 (m, 3H, C16-H y OH); 3,32 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H11-H12</sub> = 6,6 Hz, C11-H); 2,16 a 1,93 (m, 4H, C14-H y C15-H); 1,77 (s, 3H, C20-H); 1,67 (s, 3H, C18-H), 1,59 (s, 3H, C19-H) y 1,22 (s, 9H, C8-H a C10-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 144,1; 143,9 y 139,6 ppm (C1, C2 y C4, aromático cuaternario int.); 138,6 (C13, olefínico cuaternario); 132,2 (C17, olefínico cuaternario); 124,3 (C3, aromático cuaternario); 123,8 (C16, CH olefínico); 122,8 (C12, CH olefínico); 123,1 (C3, aromático cuaternario); 118,2 (C5, CH aromático); 110,7 (C6, CH aromático); 39,7 (C14, CH<sub>2</sub>); 34,2 (C7, alifático cuaternario); 31,5 (C8 a C10, CH<sub>3</sub>); 30,4 (C11, CH<sub>2</sub>); 26,4 (C15, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C20, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C18, CH<sub>3</sub>) y 16,1 (C19, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) = 471,29446; encontrada 471,29451. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3520 (O-H); 2965 (=CH-); 2926 (-CH<sub>2</sub>-); 1650 (-C=C-); 1485 y 1454 (-C=C- aromáticos).



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,89 ppm (s, 1H, C4-H); 6,68 (s, 1H, C6-H); 5,65 (s, 2H, OH); 5,23 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H12-H11</sub> = 6,6 Hz, C12-H); 5,10 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H16-H15</sub> = 6,1 Hz, C16-H); 3,47 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H11-H12</sub> = 6,7 Hz, C11-H); 2,16 a 1,98 (m, 4H, C14-H y C15-H); 1,72 (s, 3H, C20-H); 1,68 (s, 3H, C18-H); 1,60 (s, 3H, C19-H) y 1,36 (s, 9H, C8-H a C10-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 144,5 y 143,2 ppm

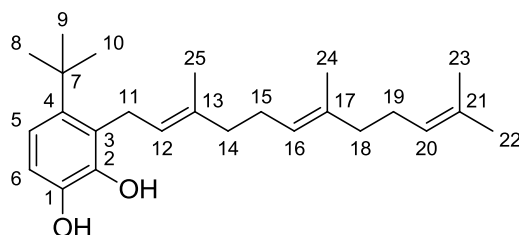
(C1 y C2, aromático cuaternario int.); 141,2 (C5, aromático cuaternario); 140,5 (C13, olefínico cuaternario); 135,1 (C17, olefínico cuaternario); 131,4 (C3, aromático cuaternario); 125,0 (C16, CH olefínico); 124,3 (C12, CH olefínico); 118,5 (C5, aromático cuaternario); 114,8 (C4, aromático cuaternario); 39,7 (C14, CH<sub>2</sub>); 35,1 (C7, alifático cuaternario); 32,3 (C11, CH<sub>2</sub>); 31,7 (C10, CH<sub>3</sub>); 26,7 (C15, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C20, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C18, CH<sub>3</sub>) y 16,3 (C19, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>Na (M+Na<sup>+</sup>) = 325,21380; encontrada 325,21365. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3442 (O-H); 2965 (=CH-); 2926 (-CH<sub>2</sub>-); 1446 (-C=C- aromáticos).



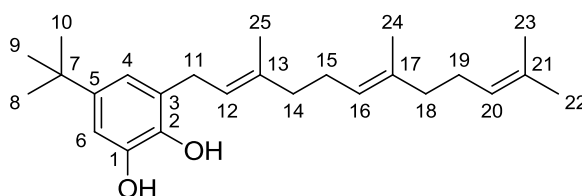
**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,91 ppm (s, 1H, C5-H); 5,38 (m, 2H, C12-H y C22-H); 5,04 (m, 4H, C16-H y C26-H y OH); 3,51 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,2 Hz, C11-H\*) y 3,33 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,4 Hz, C21-H\*); 2,18 a 1,93 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); 1,78 (s, 6H, C20-H y C30-H); 1,68 (s, 6H, C18-H y C28-H); 1,60 (s, 6H, C19-H y, C29-H) y 1,37 (s, 9H, C8-H a C10-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 141,7; 140,9 y 140,4 ppm (C1, C2 y C4 aromático cuaternario int.); 138,1 (C13 y C23, olefínico cuaternario); 134,7 (C17 y C27, olefínico cuaternario); 131,3 (C3, aromático cuaternario); 125,6 (C6, aromático cuaternario) 124,2 (C16 y C26, CH olefínico); 123,8 (C12 y C22, CH olefínico); 111,5 (C5, CH aromático); 39,5 (C14 y C24, CH<sub>2</sub>); 35,5 (C7, alifático cuaternario); 32,2 (C8 a C10, CH<sub>3</sub>); 31,9 y 31,5 (C11 y C21, CH<sub>2</sub>); 26,5 (C15 y C25, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C20 y C30, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C19 y C29, CH<sub>3</sub>) y 16,1 (C18 y C28, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>60</sub>H<sub>47</sub>O<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>) = 439,35706; encontrada 439,35691. **IR (film):**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3439 (O-H); 2965 (=CH-); 2914 (-CH<sub>2</sub>-); 1606 (-C=C-); 1485 (-C=C- aromáticos).

#### 9.12.28 Síntesis de 4-(tert-butil)-3-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il) benceno-1,2-diol (FI-44), de 5-(tert-butil)-3-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il) benceno-1,2-diol (FI-43) y 4-(tert-butil)-3,6-bis((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)benceno-1,2-diol (FI-45).

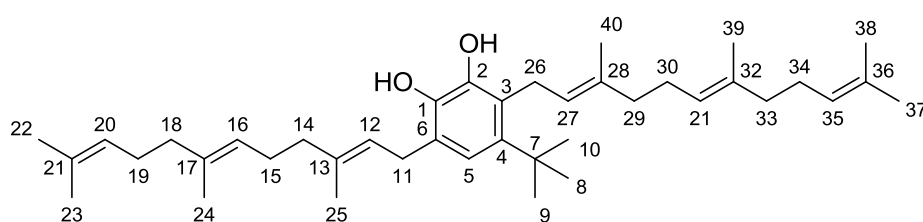
Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de alquilación, se disolvió el *t*-butilcatecol (100 mg; 0,60 mmoles) en tolueno anhidro (10 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (22  $\mu$ L, 0,18 mmoles) y posteriormente farnesol (133 mg; 0,60 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 3 productos con una masa total de 79 mg, siendo aceites amarillos con un rendimiento conjunto del 34%, en relación FI-43/FI-45/FI-47 de 1: 2,4: 6.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,51$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_6} = 8,3$  Hz, C5-H); 6,45 ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 8,3$  Hz, C6-H); 5,36 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_{12}-\text{H}_{11}} = 7,0$  Hz, C12-H); 5,09 (m, 4H, C16-H, C20-H y OH); 3,36 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_{11}-\text{H}_{12}} = 7,1$  Hz, C11-H); 2,20 a 1,90 (m, 8H, C14-H, C15-H, C18-H y C19-H); 1,78 (s, 3H, C25-H); 1,67 (s, 3H, C22-H), 1,60 (s, 6H, C23-H y C24-H) y 1,26 (s, 9H, C8-H a C10-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 143,8$ ; 143,6 y 139,7 ppm (C1, C2 y C4, aromático cuaternario int.); 138,2 (C13, olefínico cuaternario); 135,6 (C17, olefínico cuaternario); 131,3 (C21, olefínico cuaternario); 124,3 (C20, CH olefínico); 123,7 (C16, CH olefínico); 123,1 (C3, aromático cuaternario); 122,1 (C12, CH olefínico); 118,0 (C5, CH aromático); 110,7 (C6, CH aromático); 39,7 (C14 y C18,  $\text{CH}_2$ ); 34,2 (C7, alifático cuaternario); 32,3 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 31,5 (C8 a C10,  $\text{CH}_3$ ); 26,7 y 26,6 (C15 y C19,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C25,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C22,  $\text{CH}_3$ ) y 16,2 y 16,0 (C23 y C24,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 471,29446; encontrada 471,29449. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3458 (O-H); 2962 (=CH-); 2926 (- $\text{CH}_2$ -); 1643 (-C=C-); 1487 (-C=C- aromáticos).



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,90$  ppm (s, 1H, C4-H); 6,68 (s, 1H, C6-H); 5,24 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_{12}-\text{H}_{11}} = 6,4$  Hz, C12-H); 5,10 (m, 2H, C16-H y C20-H); 3,47 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_{11}-\text{H}_{12}} = 6,7$  Hz, C11-H); 2,17 a 1,93 (m, 8H, C14-H, C15-H, C18-H y C19-H); 1,72 (s, 3H, C20-H); 1,68 (s, 3H, C18-H); 1,60 (s, 3H, C19-H) y 1,36 (s, 9H, C8-H a C10-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 141,4$  y 140,9 ppm (C1 y C2, aromático cuaternario int.); 140,3 (C5, aromático cuaternario); 135,0 (C13, olefínico cuaternario); 132,9 (C17, olefínico cuaternario); 131,4 (C3, aromático cuaternario); 125,0 (C20, CH olefínico); 124,4 (C16, CH olefínico); 124,1 (C12, CH olefínico); 118,5 (C5, aromático cuaternario); 113,8 (C4, aromático cuaternario); 39,7 (C14,  $\text{CH}_2$ ); 35,1 (C7, alifático cuaternario); 32,3 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 31,7 (C8 a C10,  $\text{CH}_3$ ); 26,7 y 26,6 (C15 y C19,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C25,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C22,  $\text{CH}_3$ ) y 16,3 y 16,0 (C23 y C24,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 471,29446; encontrada 471,29455. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3439 (O-H); 2963 (=CH-); 2912 (- $\text{CH}_2$ -); 1626 (-C=C-); 1479 (-C=C- aromáticos).



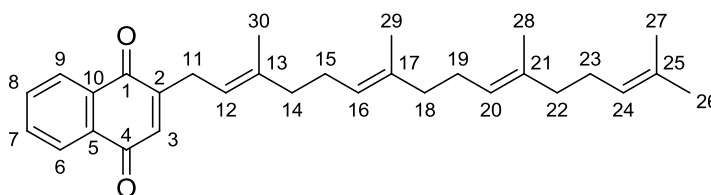
**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,89$  ppm (s, 1 protón, C5-H); 5,38 (m, 2H, C12-H y C27-H); 5,08 (m, 6H, CH olefínicos y OH); 3,50 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6,2$  Hz, C11-H\*) y 3,33 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6,4$  Hz, C26-H\*); 2,20 a 1,85 (m, 16H,  $\text{CH}_2$ ); 1,80 y 1,78 (s, 6H, C25-H y C40-H); 1,68 y 1,66 (s, 6H, C22-H y C37-H); 1,62 a 1,58 (s, 12H, C23-H, C24-H, C38-H y C39-H) y 1,36 (s, 9H, C8-H a C10-H).

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 142,4$  y  $140,4$  ppm (C1, C2 y C4 aromático cuaternario int.); 135,0 (C13 y C28, olefínico cuaternario); 133,9 (C17 y C32, olefínico cuaternario); 131,8 (C3, aromático cuaternario); 131,3 (C21 y C36, olefínico cuaternario); 125,6 (C6, aromático cuaternario) 124,6 a 120,5 (CH olefínicos); 111,5 (C5, CH aromático); 43,3 a 39,4 (C14, C18, C29 y C30,  $\text{CH}_2$ ); 35,5 (C7, alifático cuaternario); 32,2 (C8 a C10,  $\text{CH}_3$ ); 29,4 (C11 y C26,  $\text{CH}_2$ ); 26,9 a 26,2 (C15, C19, C30 y C34,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C25 y C40,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C22 y C37,  $\text{CH}_3$ ) y 16,2 a 16,0 (C23, C24, C38 y C39,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{40}\text{H}_{62}\text{O}_2\text{Na}$  ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ) = 597,46420; encontrada 597,46390. **IR (film):**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3458 (O-H); 2965 (=CH-); 2926 (- $\text{CH}_2$ -); 1644 (-C=C-); 1454 (-C=C- aromáticos).

### 9.12.29 Síntesis de 2-((2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il) naftaleno-1,4-dione (DMK-4).

Se disuelve un equivalente de 2-geranilgeranil-4-metoxifenol (50 mg, 0,12 mmoles) en acetonitrilo y se lleva la solución a  $0^\circ\text{C}$ . Se adiciona lentamente una solución de 3,25 equivalentes de nitrato cérico amónico (66 mg, 0,39 mmoles) preparada en una mezcla de solventes de acetonitrilo: agua (proporción 1:1). Se deja reaccionar hasta completarse (15 minutos). Se agrega agua sobre la reacción para darle fin y se extrae el producto de interés con el agregado de DCM (3 extracciones). Se secan los extractos orgánicos combinados con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se retira el solvente con presión reducida en el evaporador rotatorio, seguido de bomba de vacío.

Se purifica el compuesto de interés por cromatografía en columna de sílica gel, corrida en gradiente creciente de polaridad por medio de mezclas de solventes de elución hexano y AcOEt. El compuesto presenta las características de un líquido amarillo fuerte y se purifican 44 mg con un 88% de rendimiento.

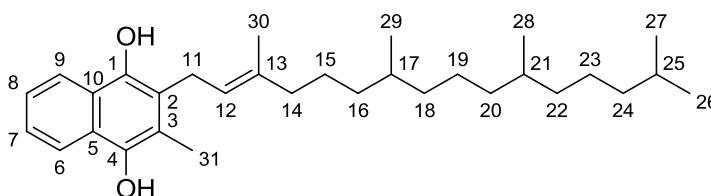


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,08$  (m, 2H, Ar7-H y Ar8-H); 7,72 (m, 2H, Ar6-H y Ar9-H); 6,76 (s, 1H, Ar3-H); 5,23 (t, 1H,  $^3J_{\text{H12-H11}} = 7,2$  Hz, C12-H); 5,10 (m, 3H, C16-H, C20-H y C24-H); 3,29 (d, 2H,  $^3J_{\text{H11-H12}} = 7,2$  Hz, C11-H); 2,04 (m, 12H, C14-H, C15-H, C18-H, C19-H, C22-H y C23-H); 1,67 (s, 6H, C26-H y C30-H); 1,61 (s, 6H, C28-H y C29-H) y 1,57 (s, 3H, C30-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 185,3$  (C1 y C4, aromáticos cuaternarios); 150,8 (C2, aromático cuaternario); 134,9 (C3, CH aromático); 135,5 a 134,9 (C13, C17 y C21, olefínico cuaternario); 133,2 a 126,1 (C5 a C10, aromáticos); 124,4 a 124,2 (C16, C20 y C24, CH olefínico); 118,0 (C12, CH olefínico); 39,7 (C14, C18 y C22,  $\text{CH}_2$ ); 27,9 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 a 26,5 (C15, C19 y C23,  $\text{CH}_2$ ); 25,7

(C26, CH<sub>3</sub>); 16,2 a 16,0 (C27 a C30, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>O<sub>2</sub> (M+Na<sup>+</sup>) = 431,29446; encontrada 431,29445.

### 9.12.30 Síntesis de (*E*)-2-metil-3-(3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-il)naftaleno-1,4-diol (DMK-4).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de FOI en condiciones de ciclación, se disolvió el *p*-metoxifenol (40 mg; 0,32 mmoles) en tolueno anhidro (4 mL). En un segundo paso, sobre la solución se adiciona lentamente BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (12 μL, 0,10 mmoles) y posteriormente geraniol (50 mg; 0,32 mmoles). A las 12 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 61 mg de un aceite naranja con un rendimiento del 61%.



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,08 (m, 2H, Ar7-H y Ar8-H); 7,68 (m, 2H, Ar6-H y Ar9-H); 5,00 (m, 1H, C12-H); 3,37 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H11-H12</sub>=7,2 Hz, C11-H); 2,19 (s, 3H, C31-H); 1,98 (m, 2H, C14-H); 1,50 a 1,00 (m, 18H, C15-H a C25-H); 1,56 (s, 6H, C30) y 0,85 (m, 12H, C26-H a C29-H).  
**RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 185,5 (C1 y C4, aromáticos cuaternarios); 146,2 (C2, aromático cuaternario); 143,3 (C3, aromático cuaternario); 137,9 (C13, olefínico cuaternario); 133,2 a 126,1 (C5 a C10, aromáticos); 119,3 (C12, CH olefínico); 118,0 (C12, CH olefínico); 39,3 (C14, C18 y C22, CH<sub>2</sub>); 28,0 (C11, CH<sub>2</sub>); 37,3 a 19,6 (C15 a C30) y 12,7 (C31, CH<sub>3</sub>).

### 9.13 Método general para la preparación de cloruros de isoprenilos

Se disuelve 1,4 equivalentes de N-cloro succinimida en DCM (5 mL/mmol) y se enfría la solución a -30°C. Se agrega el DMS (1,5 equivalentes) gota a gota. Se lleva la solución a 0°C en baño de hielo por 5 minutos y luego se enfría a -40°C. Se agrega lentamente el alcohol isoprenílico (1 equivalente, disuelto en un volumen mínimo de DCM). La suspensión se lleva a 0°C y se deja agitando bajo agitación y en atmósfera inerte por 2 horas, luego se deja a temperatura ambiente hasta que se complete la reacción. Una vez finalizada la reacción se agrega una solución saturada de NaCl y se extrae con hexano (3 extracciones). Debido a la inestabilidad intrínseca del producto no se realiza separación cromatográfica y debe ser utilizado rápidamente en un siguiente paso de reacción.

### 9.14 Método general para la preparación de compuestos S-alquilados del ácido tiosalicílico.

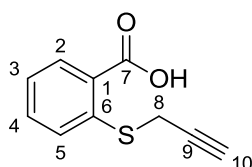
Se disuelve 1 equivalente ácido tiosalicílico en acetona anhidra bajo agitación constante y en atmósfera inerte. Se adiciona 1 equivalente de carbonato de guanidinio y, a continuación, 1 equivalente del compuesto organobromado. Se lleva la mezcla de reacción a temperatura de reflujo de la acetona durante 8 horas. Para finalizar la reacción, se añade

una solución de HCl 1M, prosiguiendo a extraer el compuesto de interés con éter etílico (3 extracciones). Se secan los extractos orgánicos combinados con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se retira el solvente con presión reducida en el evaporador rotatorio, seguido de bomba de vacío.

Se purifica el compuesto de interés por cromatografía en columna de sílica gel, corrida en gradiente creciente de polaridad por medio de mezclas de solventes de elución hexano y AcOEt

#### 9.14.1 Síntesis del ácido 2-(prop-2-ynil) benzoico (Compuesto 1).

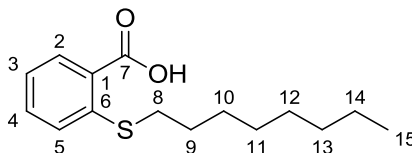
Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alquilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (600 mg, 3,9 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (355 mg, 3,9 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el bromuro de propargilo (500 mg, 3,9 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 490 mg de un sólido amarillo claro con un 70% de rendimiento.



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,14 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H2-H3</sub>=7,2 Hz, Ar2-H); 7,55 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H5</sub>=7,2 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H4-H2</sub>= 0,7 Hz, Ar4-H); 7,50 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H5-H4</sub>= 7,5 Hz, Ar5-H); 7,26 (m, 1H, Ar3-H); 3,68 (d, 2H, <sup>4</sup>J<sub>H8-H10</sub>= 2,6 Hz, C8-H) y 2,24 (t, 1H, <sup>4</sup>J<sub>H10-H8</sub>= 2,6 Hz, C10-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 171,7 ppm (C7, carbonilo); 142,8 (C6, aromático cuaternario); 133,4 (C4, CH aromático); 132,4 (C2, CH aromático); 126,7 (C1, aromático cuaternario); 126,7 (C5, CH aromático); 124,5 (C3, CH aromático); 83,6 (C9, alquino cuaternario); 71,7 (C10, CH alquino) y 31,4 (C8, S-CH<sub>2</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>SNa (M+Na<sup>+</sup>) = 215,01372; encontrada 215,01355. **IR** (KBr): ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) = 3505 (O-H); 3282 (-C≡H); 1712 (C=O); 1484 (C=C aromático).

#### 9.14.2 Síntesis del ácido 2-(octil) benzoico (Compuesto 2).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alquilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (50 mg, 0,39 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (29 mg, 0,39 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el bromuro de octilo (63 mg, 0,39 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 86 mg de un sólido amarillo claro con un 83% de rendimiento.

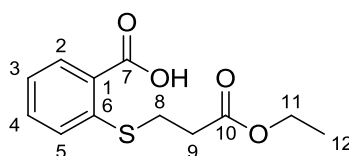


**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,12 ppm (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H2-H3</sub>=7,2 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H2-H4</sub>= 0,7 Hz, Ar2-H); 7,48 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H5</sub>=7,2 Hz y <sup>3</sup>J<sub>H4-H2</sub>= 0,7 Hz, Ar4-H); 7,36 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H5-H4</sub>= 8,0 Hz, Ar5-H); 7,21 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub>= 7,7 Hz, Ar3-H); 2,92 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H8-H9</sub>= 7,5 Hz, C8-H); 1,72 (q, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H9-H10</sub>= 7,5 Hz, C9-H); 1,47 (m, 10H, C9-H a C14-H) y 0,88 (t, 3H, <sup>3</sup>J=6,7 Hz, metilo, C15-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 169,6 ppm (C7, carbonilo); 142,2 (C6, aromático cuaternario); 136,3 (C1, aromático

cuaternario); 133,0 (C4, CH aromático); 132,6 (C2, CH aromático); 126,7 (C5, CH aromático); 124,3 (C3, CH aromático); 32,8 (C8, S-CH<sub>2</sub>); 31,8 (C13, CH<sub>2</sub>); 29,2 (C9 a 12, CH<sub>2</sub>); 22,6 (C14, CH<sub>2</sub>) y 14,1 (C15, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>SNa (M+Na<sup>+</sup>) = 289,12327; encontrada 289,12335. **IR** (KBr):  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3442 (O-H); 2924 (-C-H); 1697 (C=O); 1456 (C=C aromático).

### 9.14.3 Síntesis del ácido 2-((3-etoxi-3-oxopropil)tio) benzoico (Compuesto 3).

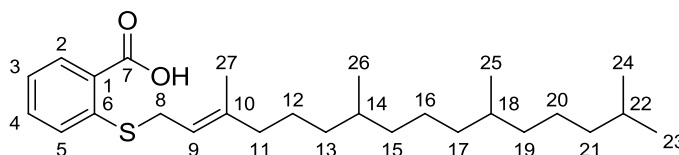
Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alkilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (50 mg, 0,39 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (29 mg, 0,39 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el etil-3-bromo propionato (60 mg, 0,39 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 77 mg de un sólido amarillo claro con un 78% de rendimiento.



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8,13 ppm (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H2-H3</sub>=7,2 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H2-H4</sub>= 0,7 Hz, Ar2-H); 7,52 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H5</sub>=7,2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H4-H2</sub>= 0,7 Hz, Ar4-H); 7,38 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H5-H4</sub>= 8,0 Hz, Ar5-H); 7,22 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub>= 7,7 Hz, Ar3-H); 4,18 (c, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H11-H12</sub>= 7,2 Hz, C11-H); 3,24 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H8-H9</sub>= 7,6 Hz, C8-H); 2,72 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H9-H8</sub>= 7,7 Hz, C9-H) y 1,28 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H12-H11</sub>= 7,3 Hz, C12-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 171,7 ppm (C10, carbonilo); 170,3 (C7, carbonilo); 141,3 (C6, aromático cuaternario); 133,2 (C4, CH aromático); 133,3 (C2, CH aromático); 132,6 (C1, aromático cuaternario); 126,7 (C5, CH aromático); 126,1 (C3, CH aromático); 61,0 (C11, O-CH<sub>2</sub>); 33,3 (C8, CH<sub>2</sub>); 27,2 (C9, CH<sub>2</sub>) y 14,2 (C12, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>S (M+H<sup>+</sup>) = 255,06856; encontrada 255,06851. **IR** (KBr):  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3134 (O-H); 2952 (-C-H); 1732, 1715 y 1697 (C=O); 1444 (C=C aromático).

### 9.14.4 Síntesis del ácido (E)-2-((3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-il)tio) benzoico (Compuesto 4).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alkilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (51 mg, 0,33 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (37 mg, 0,42 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el cloruro de fitol (100 mg, 0,30 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 120 mg de un sólido amarillo claro con un 85% de rendimiento.

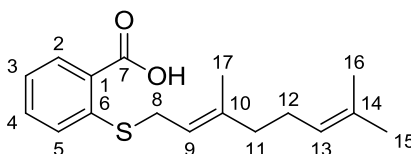


**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8,13 ppm (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H2-H3</sub>=7,2 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H2-H4</sub>= 0,7 Hz, Ar2-H); 7,48 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H4-H5</sub>=7,2 Hz, Ar4-H); 7,36 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H5-H4</sub>= 7,9 Hz, Ar5-H); 7,20 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub>= 7,5 Hz, Ar3-H); 5,32 (t; 1H, <sup>3</sup>J<sub>H9-H8</sub>= 7,6 Hz, olefínico, C9-H); 3,59 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H8-H9</sub>= 7,4 Hz, C8-H); 2,01 (m, 2H,

C11–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C27–H); 1,59 a 0,99 (m, 19H, metilenos C12–H a C22–H) y 0,85 (t, 12H,  $^3J = 6,7$  Hz, metilo, C23–H a C26–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,4$  ppm (C7, carbonilo); 142,0 (C10, olefínico cuaternario); 141,9 (C6, aromático cuaternario); 133,0 (C4, CH aromático); 132,6 (C2, CH aromático); 132,6 (C1, aromático cuaternario); 127,2 (C5, CH aromático); 126,9 (C3, CH aromático); 124,4 (C9, CH olefínico); 117,7 (C9, CH olefínico); 39,3 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 39,4 (C21,  $\text{CH}_2$ ); 37,4 a 36,6 (C13, C15, C17, C19 y C21,  $\text{CH}_2$ ); 32,8 (C18, CH); 32,7 (C14, CH); 31,3 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 28,0 (C22, CH); 25,1 a 24,5 (C12, C16 y C20,  $\text{CH}_2$ ); 22,7 y 22,6 (C23 y C24, metilos,  $\text{CH}_3$ ); 19,7 (C25 y C26, metilos,  $\text{CH}_3$ ) y 16,2 (C27, metilo,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_2\text{SNa}$  ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ) = 455,29542; encontrada 455,29543. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3550 (O–H); 2953 (=CH–); 2926 (–C–H); 1681 (C=O); 1462 (C=C aromático).

#### 9.14.5 Síntesis del ácido (*E*)-2-((3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)tio) benzoico (Compuesto 5).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alquilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (97 mg, 0,63 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (67 mg, 0,63 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el cloruro de geranilo (100 mg, 0,58 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 160 mg de un sólido amarillo claro con un 88% de rendimiento.

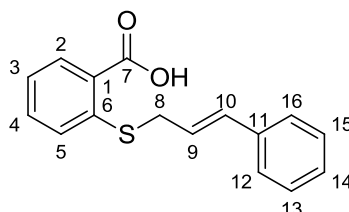


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,13$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3} = 7,2$  Hz y  $^4J_{\text{H}_2-\text{H}_4} = 0,7$  Hz, Ar2–H); 7,48 (dt, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5} = 7,2$  Hz y  $^4J_{\text{H}_4-\text{H}_2} = 0,7$  Hz, Ar4–H); 7,35 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_4} = 8,0$  Hz, Ar5–H); 7,20 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 7,7$  Hz, Ar3–H); 5,34 (t; 1H,  $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_8} = 7,5$  Hz, olefínico, C9–H); 5,07 (m, 1H, olefínico; C13–H); 3,59 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9} = 7,6$  Hz, C8–H); 2,06 (m, 4H, C11–H y C12–H); 1,70 (s, 3H, metilo, C17–H); 1,67 (s, 3H, metilo, C16–H) y 1,60 (s, 3H, metilo, C15–H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,5$  ppm (C7, carbonilo); 142,6 (C10, olefínico cuaternario); 141,4 (C6, aromático cuaternario); 133,2 (C4, CH aromático); 133,3 (C2, CH aromático); 132,6 (C1, aromático cuaternario); 131,8 (C14, olefínico cuaternario); 126,7 (C5, CH aromático); 126,1 (C3, CH aromático); 124,4 (C9, CH olefínico); 117,7 (C9, CH olefínico); 39,3 (C11,  $\text{CH}_2$ ); 31,2 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 26,4 (C12,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C15,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C16,  $\text{CH}_3$ ) y 16,3 (C17,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{SNa}$  ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ) = 313,12327; encontrada 313,12332. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3350 (O–H); 2972 (=CH–); 2912 (–C–H); 1691 (C=O); 1462 (C=C aromático).

#### 9.14.6 Síntesis del ácido 2-(cinamiltio) benzoico (Compuesto 6).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alquilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (50 mg, 0,39 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (29 mg, 0,39 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el bromuro de cinamilo

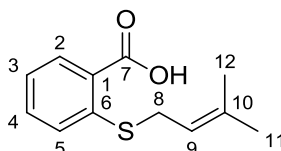
(63 mg, 0,39 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 71 mg de un sólido amarillo claro con un 68% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,14$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,5$  Hz y  $^4J_{\text{H}_2-\text{H}_4}= 0,9$  Hz, Ar2-H); 7,48 a 7,28 (m, 8H, protones aromáticos); 7,22 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4}= 7,9$  Hz, Ar3-H); 6,67 (d, 1H,  $^3J_{\text{HHTrans}}= 15,8$  Hz, C10-H); 6,34 (dt, 1H,  $^3J_{\text{HHTrans}}=15,8$  Hz y  $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_8}= 6,7$  Hz, C9-H) y 3,60 (dd, 2H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9}= 6,7$  Hz y  $^4J_{\text{H}_8-\text{H}_{10}}=1,3$  Hz, C8-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,3$  (C7, carbonilo); 139,3 (C6, aromático cuaternario); 135,6 (C11, aromático cuaternario); 133,3 (C4, CH aromático); 132,6 (C2, CH aromático); 131,0 (C1, aromático cuaternario); 128,8 (C13 y C15, CH aromático); 126,8 (C12 y C16, CH aromático); 124,8 (C5, CH aromático); 124,6 (C3, CH aromático); 121,5 (C14, CH aromático) y 31,5 (C8, S- $\text{CH}_2$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{S}$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 271,07873; encontrada 271,07877. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3562 (O-H); 2962 (=CH-); 2923 (-C-H); 1645 (C=O); 1487 (C=C aromático).

#### 9.14.7 Síntesis del ácido 2-((3-metilbut-2-en-1-il)tio)benzoico (Compuesto 7).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alquilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (50 mg, 0,39 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (29 mg, 0,39 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el bromuro de prenilo (49 mg, 0,39 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 63 mg de un sólido amarillo claro con un 72% de rendimiento.

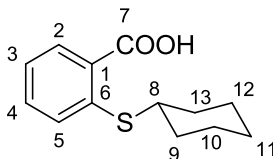


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,14$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,2$  Hz y  $^4J_{\text{H}_2-\text{H}_4}= 0,7$  Hz, Ar2-H); 7,49 (dt, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5}=7,2$  Hz y  $^4J_{\text{H}_4-\text{H}_2}= 0,7$  Hz, Ar4-H); 7,37 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_4}= 8,0$  Hz, Ar5-H); 7,22 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4}= 7,7$  Hz, Ar3-H); 5,33 (t, 2H,  $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_8}= 7,6$  Hz, C9-H); 3,57 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9}=7,6$  Hz, C8-H); 1,74 (s, 3H, metilo, C11-H) y 1,67 (s, 3H, metilo, C12-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (MeOD):  $\delta = 170,0$  ppm (C7, carbonilo); 143,2 (C6, aromático cuaternario); 138,2 (C10, olefínico cuaternario); 133,2 (C4, CH aromático); 132,3 (C2, CH aromático); 129,9 (C1, aromático cuaternario); 127,8 (C5, CH aromático); 125,0 (C3, CH aromático); 119,8 (C9, CH olefínico); 31,5 (C8, S- $\text{CH}_2$ ); 25,8 (C11,  $\text{CH}_3$ ) y 17,9 (C12,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{S}$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 223,07873; encontrada 223,07859. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3361 (O-H); 2953 (=CH-); 2926 (-C-H); 1672 (C=O); 1487 (C=C aromático).

#### 9.14.8 Síntesis del ácido 2-(ciclohexiltio)benzoico (Compuesto 8).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alquilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (51 mg, 0,33 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (37 mg, 0,42 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el bromuro de

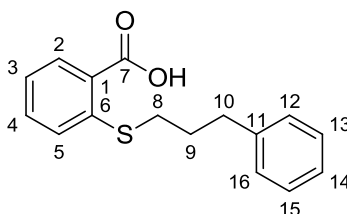
ciclohexilo (63 mg, 0,33 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 65 mg de un sólido amarillo claro con un 87% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,13$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,2$  Hz,  $^4J_{\text{H}_2-\text{H}_4}=1,0$  Hz, Ar2-H); 7,48 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5}=7,2$  Hz, Ar4-H); 7,35 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_4}=8,0$  Hz, Ar5-H); 7,19 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4}=7,5$  Hz, Ar3-H); 2,78 (tt, 1H, C8-H) y 2,27 a 1,18 (m, 9H, C9-H a C13-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,3$  (C7, carbonilo); 139,3 (C6, aromático cuaternario); 133,3 (C4, CH aromático); 132,6 (C2, CH aromático); 131,0 (C1, aromático cuaternario); 124,8 (C5, CH aromático); 124,6 (C3, CH aromático); 48,2 (C8, S-CH); 33,4 (C9 y C13,  $\text{CH}_2$ ); 25,1 (C10 y C12,  $\text{CH}_2$ ) y 25,0 (C11,  $\text{CH}_2$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{SNa}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 259,07632; encontrada 259,07641. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3444 (O-H); 2925 (-C-H); 1675 (C=O).

#### 9.14.9 Síntesis del ácido 2-((3-fenilpropil)tio)benzoico (Compuesto 9).

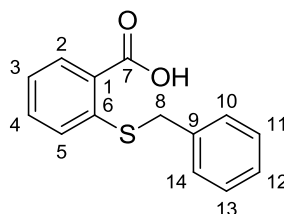
Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alquilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (50 mg, 0,39 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (29 mg, 0,39 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el 3-bromo-1-fenilpropeno (63 mg, 0,39 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 80 mg de un sólido amarillo claro con un 75% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,12$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,8$  Hz, Ar2-H); 7,44 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5}=7,2$  Hz, Ar4-H); 7,33 a 7,16 (m, 7H, ArH aromáticos); 2,94 (t, 2H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9}=7,4$  Hz, C8-H); 2,82 (t, 2H,  $^3J_{\text{H}_{10}-\text{H}_9}=7,4$  Hz, C10-H) y 2,07 (q, 2H,  $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_{10}}=7,3$  Hz, C9-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,4$  ppm (C7, carbonilo); 141,3 (C6, aromático cuaternario); 140,3 (C11, aromático cuaternario); 133,2 (C4, CH aromático); 133,2 (C2, CH aromático); 132,6 (C1, aromático cuaternario); 128,6 (C13 y C15, CH aromático); 128,4 (C12 y C16, CH aromático); 126,7 (C5, CH aromático); 126,3 (C14, CH aromático); 126,0 (C3, CH aromático); 36,4 (C10,  $\text{CH}_2$ ); 32,4 (C8, S- $\text{CH}_2$ ); 31,7 (C9,  $\text{CH}_2$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{SNa}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 295,07632; encontrada 295,07633. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3385 (O-H); 2929 (-C-H); 1677 (C=O); 1483 (C=C aromático).

#### 9.14.10 Síntesis del ácido 2-(benciltio) benzoico (Compuesto 10).

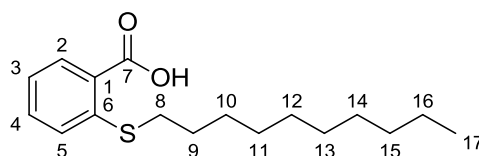
Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alquilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (50 mg, 0,39 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (29 mg, 0,39 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el bromuro de bencilo (50 mg, 0,39 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 69 mg de un sólido amarillo claro con un 73% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,12$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,2$  Hz y  $^4J_{\text{H}_2-\text{H}_4}=0,7$  Hz, Ar2-H); 7,50 a 7,19 (m, 8H, ArH aromáticos) y 4,17 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Ar.). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,3$  (C7, carbonilo); 141,3 (C6, aromático cuaternario); 134,7 (C9, aromático cuaternario); 133,2 (C4, CH aromático); 133,3 (C2, CH aromático); 132,6 (C1, aromático cuaternario); 129,1 (C12, CH aromático); 128,7 (C11 y C13, CH aromático); 128,0 (C10 y C14, CH aromático); 126,7 (C5, CH aromático); 126,1 (C3, CH aromático) y 40,0 (C8,  $\text{CH}_2$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{S}$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 245,06308; encontrada 245,06301. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3423 (O-H); 1681 (C=O); 1451 (C=C aromático).

#### 9.14.11 Síntesis del ácido 2-(deciltio) benzoico (Compuesto 11).

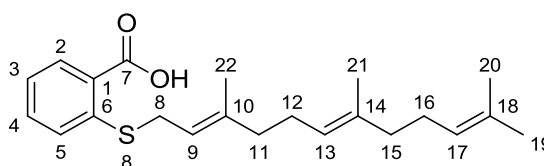
Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alkilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (50 mg, 0,39 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (29 mg, 0,39 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el bromuro de decilo (72 mg, 0,39 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 92 mg de un sólido amarillo claro con un 81% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,13$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,2$  Hz,  $^4J_{\text{H}_2-\text{H}_4}=1,1$  Hz, Ar2-H); 7,48 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5}=7,2$  Hz, Ar4-H); 7,35 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_4}=8,0$  Hz, Ar5-H); 7,19 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4}=7,5$  Hz, Ar3-H); 2,93 (t, 2H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9}=7,4$  Hz, C8-H); 1,73 (q, 2H,  $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_{10}}=7,4$  Hz, C9-H); 1,48 (m, 2H, C10-H); 1,38 a 1,21 (m, 12H, C11-H a C16-H) y 0,88 (t, 3H,  $J=6,7$  Hz, metilo, C17-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,7$  ppm (C7, carbonilo); 142,8 (C6, aromático cuaternario); 133,1 (C4, CH aromático); 132,6 (C2, CH aromático); 126,5 (C1, aromático cuaternario); 126,1 (C5, CH aromático); 124,0 (C3, CH aromático); 32,4 (C8, S- $\text{CH}_2$ ); 31,8 a 28,2 (C9 a 15,  $\text{CH}_2$ ); 22,6 (C16,  $\text{CH}_2$ ) y 14,1 (C17,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{NaS}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 317,15457; encontrada 317,15442. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3385 (O-H); 2929 (-C-H); 1677 (C=O); 1483 (C=C aromático).

#### 9.14.12 Síntesis del ácido 2-(((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-yl)thio) benzoico (Compuesto 12)

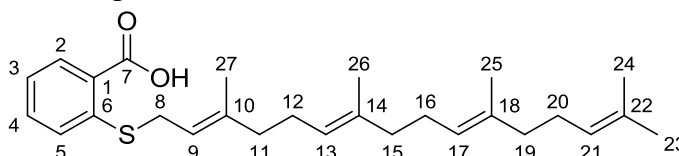
Siguiendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alkilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (40 mg, 0,25 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (27 mg, 0,31 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el cloruro de farnesol (50 mg, 0,22 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 69 mg de un sólido blanco con un 79% de rendimiento.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,14$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,5$  Hz y  $^4J_{\text{H}_2-\text{H}_4}=1,0$  Hz, Ar2-H); 7,48 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5}=7,2$  Hz, Ar4-H); 7,36 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_4}=7,8$  Hz, Ar5-H); 7,22 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4}=7,5$  Hz, Ar3-H); 5,34 (t; 1H,  $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_8}=7,6$  Hz, olefínico, C9-H); 5,08 (m, 2H, C13-H y C17-H); 3,59 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9}=7,6$  Hz, C8-H); 2,15 a 1,92 (m, 10H, C11-H); 1,68 (s, 6H, C19-H y C22-H) y 1,60 (s, 6H, C20-H y C21-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,0$  ppm (C7, carbonilo); 142,0 (C10, olefínico cuaternario); 141,5 (C6, aromático cuaternario); 135,4 (C14, olefínico cuaternario); 133,0 (C4, CH aromático); 133,0 (C2, CH aromático); 132,5 (C1, aromático cuaternario); 131,3 (C14, olefínico cuaternario); 127,5 (C5, CH aromático); 127,2 (C18, olefínico cuaternario); 124,6 (C17, CH olefínico); 124,4 (C9, CH olefínico); 123,7 (C13, CH olefínico); 117,7 (C9, CH olefínico); 39,3 y 39,6 (C11 y C15\*,  $\text{CH}_2$ ); 31,4 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 y 26,3 (C12 y C16\*,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C19,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C20,  $\text{CH}_3$ ); 16,4 (C22,  $\text{CH}_3$ ) y 16,0 (C21,  $\text{CH}_3$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{NaS}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 381,18587; encontrada 381,18582. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3361 (O-H); 2955 (=CH-); 2927 (-C-H); 1680 (C=O); 1487 (C=C aromático).

#### 9.14.13 Síntesis del ácido 2-(((2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-il)tio)benzoico (Compuesto 13).

Seguendo el protocolo para la síntesis de compuestos S-alkilados, se disolvió el ácido tiosalicílico (18 mg, 0,11 mmoles) en acetona anhidra y se agrega la base carbonato de guanidinio (12 mg, 0,12 mmoles). Finalmente se agrega lentamente el cloruro de geranilo (30 mg, 0,10 mmoles). A las 8 horas se completa la reacción y luego de la etapa de purificación se obtiene 36 mg de un sólido blanco con un 85% de rendimiento.

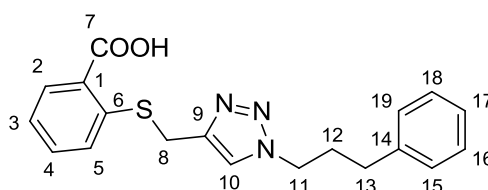


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,12$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,1$  Hz y  $^4J_{\text{H}_2-\text{H}_4}=0,7$  Hz, Ar2-H); 7,47 (dt, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5}=7,2$  Hz y  $^4J_{\text{H}_4-\text{H}_2}=0,7$  Hz, Ar4-H); 7,35 (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_5-\text{H}_4}=8,0$  Hz, Ar5-H); 7,20 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4}=7,7$  Hz, Ar3-H); 5,34 (t; 1H,  $^3J_{\text{H}_9-\text{H}_8}=7,5$  Hz, olefínico, C9-H); 5,09 (m, 3H, olefínico; C13-H, C17-H y C21-H); 3,58 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_8-\text{H}_9}=7,6$  Hz, C8-H); 2,06 (m, 12H, C11-H, C12-H, C15-H, C16-H, C19-H y C20-H); 1,70 (s, 3H, metilo, C23-H); 1,67 (s, 3H, metilo, C27-H) y 1,60 (s, 6H, metilo, C24-H y C25-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171,1$  ppm (C7, carbonilo); 143,0 (C10, olefínico cuaternario); 141,4 (C6, aromático cuaternario); 135,4 (C14, olefínico cuaternario); 134,9 (C18, olefínico cuaternario); 133,0 (C4, CH aromático); 132,5 (C1, aromático cuaternario); 131,3 (C14, olefínico cuaternario); 126,8 (C5, CH aromático); 126,6 (C22, olefínico cuaternario); 124,4 (C17, CH olefínico); 124,2 (C9, CH olefínico); 123,7 (C13, CH olefínico); 117,7 (C9, CH olefínico); 39,7 a 39,6 (C11, C15 y C19\*,  $\text{CH}_2$ ); 31,0 (C8,  $\text{CH}_2$ ); 26,8 a 26,4 (C12, C16 y C20\*,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (C23,  $\text{CH}_3$ ); 17,7 (C24,  $\text{CH}_3$ ) y 16,3 a 16,0 (C25 a C27,  $\text{CH}_3$ ).

**EMAR:** Masa calculada para  $C_{27}H_{38}O_2NaS$  ( $M+H^+$ ) = 449,24847; encontrada 449,24861. **IR** (KBr):  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3451 (O-H); 2948 (=CH-); 2926 (-C-H); 1691 (C=O); 1454 (C=C aromático).

#### 9.14.14 Síntesis del ácido 2-(((1-(3-fenilpropil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)methyl)tio) benzoico (Compuesto 14)

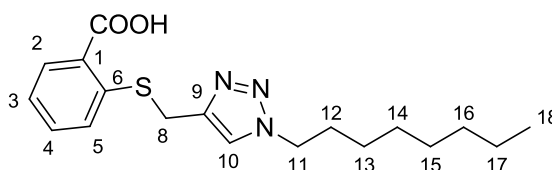
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (33 mg; 0,17 mmoles) en una mezcla de solvente de  $H_2O:tBuOH$  (4 mL). Luego se adiciona 1-azido-3-fenilpropano (40 mg; 0,25 mmoles),  $CuSO_4$  1M (8,5  $\mu L$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (34  $\mu L$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 53 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 88%.



**RMN de  $^1H$**  ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8,12 ppm (dd, 1H,  $^3J_{H2-H3}=7,0$  Hz,  $^4J_{H2-H4}=1,0$  Hz, Ar2-H); 7,53 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,50 a 7,08 (m, 8H, carbonos aromáticos); 4,32 (t, 2H,  $^3J_{H11-H12}=7,3$  Hz, C11-H); 4,29 (s, 2H, C8-H); 2,65 (t, 2H,  $^3J_{H13-H12}=7,5$  Hz, C13-H) y 2,26 (q, 2H,  $^3J_{H12-H13}=7,5$  Hz, C12-H). **RMN de  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 170,2 ppm (C7, carbonilo); 144,3 (C1, aromático cuaternario); 140,2 (C14, aromático cuaternario); 139,2 (C6, aromático cuaternario); 133,3 (C4, CH aromático); 132,6 (C2, CH aromático); 131,0 (C9, triazol cuaternario); 129,9 (C12, aromático cuaternario); 128,7 a 128,0 (C15 a C19, CH aromáticos); 126,1 (C10, CH triazol); 124,8 (C5, CH aromático); 49,6 (C11,  $CH_2$ ); 32,4 (C13,  $CH_2$ ); 31,5 (C12,  $CH_2$ ) y 27,7 (C8,  $CH_2$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $C_{19}H_{19}O_2N_3SNa$  ( $M+Na^+$ ) = 376,10902; encontrada 376,10898. **IR** (KBr):  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3388 (O-H); 2926 (-C-H); 1690 (C=O); 1484 (C=C aromático).

#### 9.14.15 Síntesis del ácido 2-(((1-(3-octil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)methyl)tio)benzoico (Compuesto 15)

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (33 mg; 0,17 mmoles) en una mezcla de solvente de  $H_2O:tBuOH$  (4 mL). Luego se adiciona 1-azido-octano (40 mg; 0,25 mmoles),  $CuSO_4$  1M (8,5  $\mu L$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (34  $\mu L$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 46 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 78%.

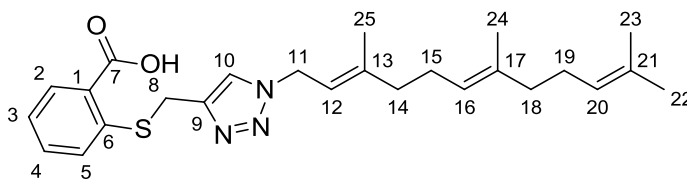


**RMN de  $^1H$**  ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8,09 ppm (d, 1H,  $^3J_{H2-H3}=8,1$  Hz, Ar2-H); 7,49 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,45 a 7,42 (m, 2H, Ar4-H, Ar5-H); 7,18 (m, 1H, Ar3-H); 4,32 (s, 2H, C8-H); 4,27 (t, 2H,  $^3J_{H11-H12}=$

7,3 Hz, C11–H); 1,84 (q,  $^3J_{H12-H13}=6,3$  Hz, C12–H); 1,23 (m, 10H, C13–H a C17–H) y 0,86 (t, 3H,  $^3J_{H18-H17}=6,7$  Hz, C18–H). **RMN de  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170,7$  ppm (C7, carbonilo); 144,4 (C1, aromático cuaternario); 141,1 (C6, aromático cuaternario); 133,2 (C5, CH aromático); 132,3 (C2, CH aromático); 126,9 (C9, triazol cuaternario); 126,1 (C10, CH triazol); 124,4 (C4, CH aromático); 122,3 (C3, CH aromático); 50,6 (C11, CH<sub>2</sub>); 31,7 a 22,6 (C12 a C17, CH<sub>2</sub>) y 14,0 (C18, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Na (M+Na<sup>+</sup>) = 370,15597; encontrada 376,15597. **IR** (KBr):  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3550 (O-H); 2929 (-C-H); 1682 (C=O); 1488 (C=C aromático).

#### 9.14.16 Síntesis del ácido 2-(((1-((2E/2Z,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio) benzoico (Compuesto 16).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (100 mg; 0,52 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (4 mL). Luego se adiciona farnesilazida (130 mg; 0,52 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (26  $\mu$ L; 0,03 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (104  $\mu$ L; 0,11 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 205 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 90%.

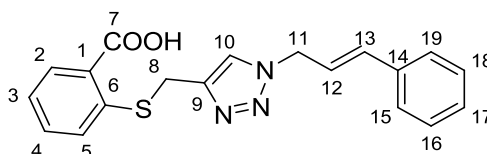


**RMN de  $^1H$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8,08$  ppm (d, 1H,  $^3J_{H2-H3}=7,5$  Hz, Ar2–H); 7,61 y 7,60 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>–H); 7,45 (m, 2H, Ar4–H y Ar5–H); 7,20 (m, 1H, Ar3–H); 5,43 (t, 1H,  $^3J_{H12-H11}=7,3$  Hz, C12–H); 5,08 (m, 2H, C16–H y C16–H); 5,00 (d, 2H,  $^3J_{H11-H12}=7,1$  Hz, C11–H); 4,28 (s, 2H, C8–H); 2,20 a 1,80 (m, 8H, C14–H, C15–H, C18–H y C19–H); 1,83 (s, 3H, C25<sub>Z</sub>–H); 1,78 (s, 3H, C25<sub>E</sub>–H); 1,67 (s, 3H, C22–H); 1,60 (s, 6H, metilo, C23–H y C24–H). **RMN de  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170,4$  ppm (C7, carbonilo); 169,8 (C13, carbonilo); 144,2 (C1, aromático cuaternario); 140,7 (C6, aromático cuaternario); 139,9 (C17, olefínico cuaternario); 136,6 (C13<sub>Z</sub>, olefínico cuaternario); 136,0 (C13<sub>E</sub>, olefínico cuaternario); 133,2 (C5, CH aromático); 132,3 (C2, CH aromático); 131,5 (C17, olefínico cuaternario); 127,1 (C9, triazol cuaternario); 126,6 (C4, CH aromático); 124,7 (C3, CH aromático); 124,1 (C16, CH olefínico); 123,3 (C10, CH triazol); 123,1 (C20, CH olefínico); 116,0 (C12, CH olefínico); 48,1 (C11, CH<sub>2</sub>); 39,7 (C18, CH<sub>2</sub>); 39,4 (C14<sub>E</sub>, CH<sub>2</sub>); 32,1 (C14<sub>Z</sub>, CH<sub>2</sub>); 27,6 (C8, S-CH<sub>2</sub>); 26,2 (C15 y C19, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C22, CH<sub>3</sub>); 23,5 (C25<sub>Z</sub>, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C23, CH<sub>3</sub>); 16,6 (C25<sub>E</sub>, CH<sub>3</sub>); y 16,0 (C24, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Na (M+Na<sup>+</sup>) = 462,21857; encontrada 462,21851. **IR** (KBr):  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3361 (O-H); 2961 (=CH-); 2926 (-C-H); 1693 (C=O); 1487 (C=C aromático).

#### 9.14.17 Síntesis del ácido (E)-2-(((1-cinamil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio) benzoico (Compuesto 17)

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (33 mg; 0,17 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (4 mL). Luego se adiciona cinamilazida (40 mg; 0,25 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (8,5  $\mu$ L;

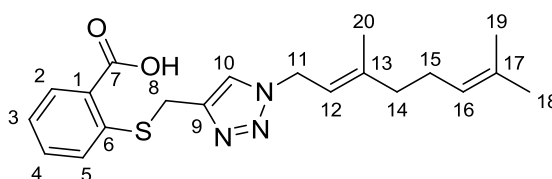
0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (34  $\mu$ L; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 51 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 86%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8,07 ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,7$  Hz, Ar2-H); 7,57 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,47 a 7,10 (m, 8H, protones aromáticos); 6,62 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_{13}-\text{H}_{12}\text{Trans}}=14,9$  Hz, C13-H); 6,26 (m, 1H, C12-H); 5,06 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_{11}-\text{H}_{12}}=6,6$  Hz, C11-H) y 4,31 (s, 2H, C8-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170,6 ppm (C7, carbonilo); 144,5 (C1, aromático cuaternario); 141,0 (C6, aromático cuaternario); 135,5 (C13, CH olefínico); 133,2 (C5, CH aromático); 135,4 (C14, aromático cuaternario); 132,3 a 124,4 (carbonos aromáticos); 132,3 (C9, triazol cuaternario); 122,3 (C10, CH triazol); 121,1 (C12, CH olefínico); 52,4 (C11, CH<sub>2</sub>) y 27,6 (C8, CH<sub>2</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S (M+H<sup>+</sup>) = 352,11142; encontrada 352,11130. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3315 (O-H); 3926 (-C-H); 1672 (C=O); 1487 (C=C aromático).

#### 9.14.18 Síntesis del ácido (*E/Z*)-2-(((1-(3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio) benzoico (Compuesto 18).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (100 mg; 0,52 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (4 mL). Luego se adiciona geranilazida (94 mg; 0,52 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (26  $\mu$ L; 0,03 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (104  $\mu$ L; 0,11 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 162 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 84%.

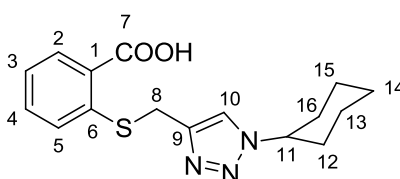


**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8,06 ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,6$  Hz, Ar2-H); 7,60 y 7,59 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,44 (m, 2H, Ar4-H y Ar5-H); 7,20 (m, 1H, Ar3-H); 5,44 (t, 1H,  $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_3}=7,4$  Hz, C12-H); 5,05 (m, 1H, C16-H); 5,00 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_3-\text{H}_4}=7,1$  Hz, C11-H); 4,28 (s, 2H, C8-H); 2,15 (m, 4H, C14-H y C15-H); 1,83 (s, 3H, C20<sub>Z</sub>-H); 1,78 (s, 3H, C20<sub>E</sub>-H); 1,68 (s, 3H, metilo, C19-H) y 1,60 (s, 3H, metilo, C18-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170,5 ppm (C7, carbonilo); 144,1 (C1, aromático cuaternario); 140,7 (C6, aromático cuaternario); 133,0 (C5, CH aromático); 139,8 (C13, olefínico cuaternario); 132,3 (C2, CH aromático); 132,2 (C17, olefínico cuaternario); 127,1 (C9, triazol cuaternario); 126,6 (C4, CH aromático); 124,7 (C3, CH aromático); 123,3 (C16, CH olefínico); 123,3 (C10, CH triazol); 116,2 (C12<sub>Z</sub>, CH olefínico); 116,0 (C12<sub>E</sub>, CH olefínico); 48,1 (C11<sub>E</sub>, CH<sub>2</sub>); 47,9 (C11<sub>Z</sub>, CH<sub>2</sub>); 39,9 (C14<sub>E</sub>, CH<sub>2</sub>); 32,1 (C14<sub>Z</sub>, CH<sub>2</sub>); 27,6 (C8, S-CH<sub>2</sub>); 26,1 (C15, CH<sub>2</sub>); 25,7 (C18, CH<sub>3</sub>); 23,4 (C20<sub>Z</sub>, CH<sub>3</sub>); 17,7 (C19, CH<sub>3</sub>) y 16,5 (C20<sub>E</sub>, CH<sub>3</sub>).

**EMAR:** Masa calculada para  $C_{20}H_{25}O_2N_3SNa$  ( $M+Na^+$ ) = 394,15597; encontrada 394,15607. **IR** (KBr):  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3432 (O-H); 2961 (=CH-); 2926 (-C-H); 1672 (C=O); 1487 (C=C aromático).

#### 9.14.19 Síntesis del ácido 2-(((1-ciclohexil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)benzoico (Compuesto 19)

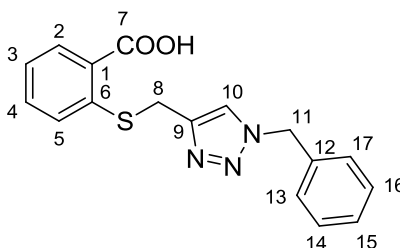
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (33 mg; 0,17 mmoles) en una mezcla de solvente de  $H_2O:tBuOH$  (4 mL). Luego se adiciona 1-azido-ciclohexano (31 mg; 0,25 mmoles),  $CuSO_4$  1M (8,5  $\mu L$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (34  $\mu L$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 45 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 84%.



**RMN de  $^1H$**  ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 8,13 ppm (dd, 1H,  $^3J_{H_2-H_3}=7,3$  Hz,  $^4J_{H_2-H_4}=0,9$  Hz, Ar2-H); 7,48 (m, 3H, Ar4-H, Ar5-H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,19 (m, 1H, Ar3-H); 4,45 (tt, 1H, C11-H); 4,29 (s, 2H, C8-H); y 2,27 a 1,21 (m, 9H, C9-H a C13-H). **RMN de  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 170,3 ppm (C7, carbonilo); 144,3 (C1, aromático cuaternario); 139,3 (C6, aromático cuaternario); 133,3 (C4, CH aromático); 132,6 (C2, CH aromático); 131,0 (C9, triazol cuaternario); 126,1 (C10, CH triazol); 124,8 (C5, CH aromático); 124,6 (C3, CH aromático); 60,3 (C11, CH); 33,4 (C9 y C13,  $CH_2$ ); 25,1 y 25,0 (C10 a C12,  $CH_2$ ). **EMAR:** Masa calculada para  $C_{16}H_{19}O_2N_3SNa$  ( $M+Na^+$ ) = 340,10902; encontrada 340,10898. **IR** (KBr):  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) = 3501 (O-H); 2929 (-C-H); 1691 (C=O); 1454 (C=C aromático).

#### 9.14.20 Síntesis del ácido 2-(((1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)benzoico (Compuesto 20)

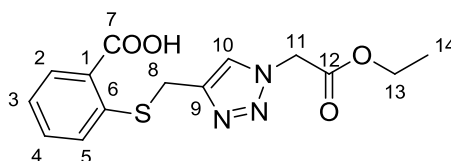
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (33 mg; 0,17 mmoles) en una mezcla de solvente de  $H_2O:tBuOH$  (4 mL). Luego se adiciona bencilazida (33 mg; 0,25 mmoles),  $CuSO_4$  1M (8,5  $\mu L$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (34  $\mu L$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 44 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 80%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,14$  ppm (dd, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,2$  Hz,  $^4J_{\text{H}_2-\text{H}_4}=0,9$  Hz, Ar2-H); 7,55 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,48 a 7,10 (m, 8H, carbonos aromáticos); 5,50 (s, 1H, C11-H) y 4,29 (s, 2H, C8-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,4$  ppm (C7, carbonilo); 144,3 (C1, aromático cuaternario); 139,2 (C6, aromático cuaternario); 133,3 (C4, CH aromático); 132,6 (C2, CH aromático); 131,0 (C9, triazol cuaternario); 129,9 (C12, aromático cuaternario); 128,7 a 128,0 (C13 a C17, CH aromáticos); 126,1 (C10, CH triazol); 124,8 (C5, CH aromático); 54,1 (C11, CH<sub>2</sub>) y 27,7 (C8, CH<sub>2</sub>). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}_3\text{SNa}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 348,07772; encontrada 348,07781. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3450 (O-H); 2924 (-C-H); 1687 (C=O); 1485 (C=C aromático).

#### 9.14.21 Síntesis del ácido 2-(((1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio) benzoico (Compuesto 21)

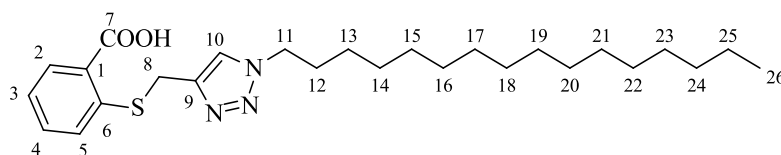
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (33 mg; 0,17 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (4 mL). Luego se adiciona azidoacetato de etilo (31 mg; 0,25 mmoles),  $\text{CuSO}_4$  1M (8,5  $\mu\text{L}$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (34  $\mu\text{L}$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 50 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 92%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,07$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,6$  Hz, Ar2-H); 7,59 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,45 (m, 2H, Ar4-H y Ar5-H); 7,21 (m, 1H, Ar3-H); 5,13 (s, 1H, C11-H); 4,28 (s, 2H, C8-H); 4,12 (c, 2H,  $^3J_{\text{H}_{13}-\text{H}_{14}}=7,1$  Hz, C13-H); y 1,21 (t, 3H,  $^3J_{\text{H}_{14}-\text{H}_{13}}=7,1$  Hz, C14-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,4$  ppm (C7, carbonilo); 169,8 (C13, carbonilo); 144,2 (C1, aromático cuaternario); 140,7 (C6, aromático cuaternario); 133,2 (C5, CH aromático); 132,3 (C2, CH aromático); 127,1 (C9, triazol cuaternario); 126,6 (C3, CH aromático); 124,7 (C4, CH aromático); 123,3 (C10, CH triazol); 63,4 (C13, O-CH<sub>2</sub>); 50,9 (C11, N-CH<sub>2</sub>); 34,6 (C12, CH<sub>2</sub>); 27,5 (C8, S-CH<sub>2</sub>) y 14,1 (C15, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_3\text{SNa}$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) = 344,06755; encontrada 344,06768. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3344 (O-H); 2930 (-C-H); 1732 (C=O); 1693 (C=O), 1444 (C=C aromático).

#### 9.14.22 Síntesis del ácido 2-(((1-hexadecil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio) benzoico (Compuesto 22)

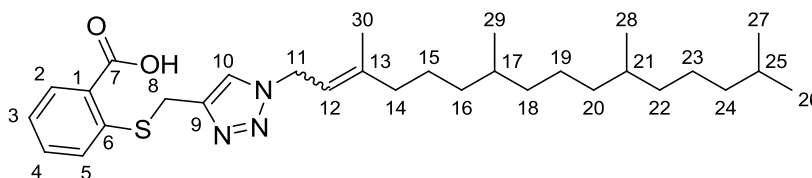
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (33 mg; 0,17 mmoles) en una mezcla de solvente de  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  (4 mL). Luego se adiciona cetilazida (66 mg; 0,25 mmoles),  $\text{CuSO}_4$  1M (8,5  $\mu\text{L}$ ; 0,01 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (34  $\mu\text{L}$ ; 0,04 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 63 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 81%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,07$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=8,2$  Hz, Ar2-H); 7,47 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,45 a 7,42 (m, 2H, Ar4-H, Ar5-H); 7,18 (m, 1H, Ar3-H); 4,32 (s, 2H, C8-H); 4,26 (t, 2H,  $^3J_{\text{H}_{11}-\text{H}_{12}}=7,1$  Hz, C11-H); 1,84 (m, 2H, C12-H); 1,23 (m, 24H, C13-H a C15-H) y 0,85 (t, 3H,  $^3J_{\text{H}_{18}-\text{H}_{17}}=6,5$  Hz, C26-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,5$  ppm (C7, carbonilo); 144,5 (C1, aromático cuaternario); 141,1 (C6, aromático cuaternario); 133,2 (C5, CH aromático); 132,3 (C2, CH aromático); 127,2 (C9, triazol cuaternario); 126,1 (C4, CH aromático); 124,4 (C3, CH aromático); 122,3 (C10, CH triazol); 50,6 (C11, CH<sub>2</sub>); 32,1 a 22,0 (C12 a C25, CH<sub>2</sub>) y 14,1 (C26, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>SNa (M+Na<sup>+</sup>) = 482,28117; encontrada 482,28121. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3443 (O-H); 2924 (-C-H); 1693 (C=O); 1456 (C=C aromático).

#### 9.14.23 Síntesis del ácido (*E/Z*)-2-(((1-(3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)benzoico (Compuesto 23).

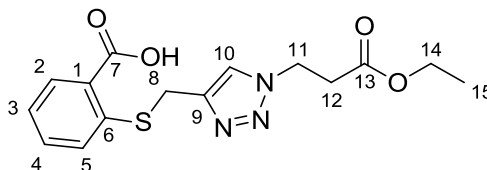
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (100 mg; 0,52 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (4 mL). Luego se adiciona fitilazida (160 mg; 0,52 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (26  $\mu\text{L}$ ; 0,03 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (104  $\mu\text{L}$ ; 0,11 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 230 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 83%.



**RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,07$  ppm (d, 1H,  $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=7,8$  Hz, Ar2-H); 7,48 (m, 3H, Ar4-H, Ar5-H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,20 (m, 1H, Ar3-H); 5,37 (t; 1H,  $^3J_{\text{H}_{12}-\text{H}_{11}}=7,2$  Hz, olefínico, C12-H); 4,91 (d, 2H,  $^3J_{\text{H}_{12}-\text{H}_{11}}=7,2$  Hz, C11-H); 4,29 (s, 2H, C8-H); 2,05 (m, 2H, C14-H); 1,74 (s, 3H, metilo, C30-H); 1,59 a 0,99 (m, 19H, metilenos C12-H a C22-H) y 0,85 (t, 12H,  $^3J=6,7$  Hz, metilo, C23-H a C26-H). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,2$  ppm (C7, carbonilo); 144,3 (C1, aromático cuaternario); 144,1 (C13<sub>Z</sub>, olefínico cuaternario *Z*); 144,0 (C13<sub>E</sub>, olefínico cuaternario *E*); 141,1 (C6, aromático cuaternario); 133,2 (C5, CH aromático); 132,3 (C2, CH aromático); 126,9 (C9, triazol cuaternario); 126,4 (C10, CH triazol); 124,6 (C4, CH aromático); 121,7 (C3, CH aromático); 117,7 (C12<sub>Z</sub>, CH olefínico *Z*); 116,4 (C12<sub>E</sub>, CH olefínico *E*); 48,1 (C11<sub>E</sub>, CH<sub>2</sub>); 47,9 (C11<sub>Z</sub>, CH<sub>2</sub>); 39,8 (C14<sub>Z</sub>, CH<sub>2</sub>); 39,4 (C14<sub>E</sub>, CH<sub>2</sub>); 37,4 (C24, CH<sub>2</sub>); 36,9 a 36,7 (C16, C18, C20, C22 y C24, CH<sub>2</sub>); 32,8 (C21, CH); 32,3 (C17, CH); 27,9 (C25, CH); 27,6 (C8, CH); 25,4 a 24,5 (C15, C19 y C23, CH<sub>2</sub>); 22,7 y 22,6 (C26 y C27, metilos, CH<sub>3</sub>); 19,7 (C28, C29 y C30<sub>Z</sub>, metilos, CH<sub>3</sub>) y 16,2 (C30<sub>E</sub>, metilo, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>SNa (M+Na<sup>+</sup>) = 536,32812; encontrada 536,32801. **IR** (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3402 (O-H); 2958 (=CH-); 2925 (-C-H); 1688 (C=O); 1481 (C=C aromático).

#### 9.14.24 Síntesis del ácido 2-(((1-(3-etoxi-3-oxopropil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)methyl)tio) benzoico (Compuesto 24).

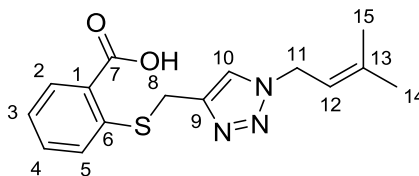
Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (100 mg; 0,52 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (4 mL). Luego se adiciona azidopropanoato de etilo (75 mg; 0,52 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (26 µL; 0,03 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (104 µL; 0,11 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 158 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 91%.



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,07 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H2-H3</sub>=7,6 Hz, Ar2-H); 7,59 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,45 (m, 2H, Ar4-H y Ar5-H); 7,21 (m, 1H, Ar3-H); 4,59 (t; 1H, <sup>3</sup>J<sub>H11-H12</sub>= 7,2 Hz, C11-H); 4,28 (s, 2H, C8-H); 4,12 (c, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H14-H15</sub>= 7,1 Hz, C14-H); 2,92 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H12-H11</sub>= 6,5 Hz, C12-H) y 1,21 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H15-H14</sub>= 7,1 Hz, C15-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 170,4 ppm (C7, carbonilo); 169,8 (C13, carbonilo); 144,2 (C1, aromático cuaternario); 140,7 (C6, aromático cuaternario); 133,2 (C5, CH aromático); 132,3 (C2, CH aromático); 127,1 (C9, triazol cuaternario); 126,6 (C4, CH aromático); 124,7 (C3, CH aromático); 123,3 (C10, CH triazol); 61,3 (C14, O-CH<sub>2</sub>); 45,7 (C11, N-CH<sub>2</sub>); 34,6 (C12, CH<sub>2</sub>); 27,5 (C8, S-CH<sub>2</sub>) y 14,1 (C15, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>SNa (M+Na<sup>+</sup>) = 358,08320; encontrada 358,08324. **IR** (KBr): ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) = 3520 (O-H); 2929 (-C-H); 1715 (C=O); 1691 (C=O), 1454 (C=C aromático).

#### 9.14.25 Síntesis del ácido 2-(((1-(3-metilbut-2-en-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio) benzoico (Compuesto 25).

Siguiendo el protocolo para la síntesis de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos, se disolvió el compuesto **1** de la familia **FTA** (100 mg; 0,52 mmoles) en una mezcla de solvente de H<sub>2</sub>O:tBuOH (4 mL). Luego se adiciona prenilazida (58 mg; 0,52 mmoles), CuSO<sub>4</sub> 1M (26 µL; 0,03 mmoles) y finalmente el ascorbato de sodio 1M (104 µL; 0,11 mmoles). A las 24 horas se da por finalizada la reacción y luego de la purificación se aislaron 140 mg de un sólido amarillo claro con un rendimiento del 89%.



**RMN de <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,07 ppm (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H2-H3</sub>=7,6 Hz, Ar2-H); 7,53 (s, 1H, C10<sub>triazol</sub>-H); 7,45 (m, 2H, Ar4-H y Ar5-H); 7,21 (m, 1H, Ar3-H); 5,45 (tq, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H12-H11</sub>= 7,4 Hz y <sup>4</sup>J<sub>H12-H15</sub>=1,2 Hz, C12-H); 5,00 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H11-H12</sub>=7,2 Hz, C11-H); 4,27 (s, 2H, C8-H); 1,83 (s, 3H, C14-H) y 1,80 (s, 3H, C15-H). **RMN de <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 170,4 ppm (C7, carbonilo); 144,2 (C1, aromático cuaternario); 140,7 (C6, aromático cuaternario); 139,8 (C13, olefínico cuaternario); 133,2

(C5, CH aromático); 132,3 (C2, CH aromático); 127,1 (C9, triazol cuaternario); 126,6 (C4, CH aromático); 124,7 (C3, CH aromático); 123,3 (C10, CH triazol); 116,2 (C12, CH olefínico); 48,1 (C11, CH<sub>2</sub>); 27,5 (C8, S-CH<sub>2</sub>); 25,7 (C14, CH<sub>3</sub>) y 18,1 (C15, CH<sub>3</sub>). **EMAR:** Masa calculada para C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>SNa (M+Na<sup>+</sup>) = 326,09337; encontrada 326,09336. **IR** (KBr):  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3427 (O-H); 2955 (-C-H); 1695 (C=O), 1457 (C=C aromático).

## 9.15 ENSAYOS DE DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTITRIPANOCIDA.

### 9.15.1 Determinacion de IC<sub>50</sub> para cepas de *T. cruzi* (cepa Cl-Brener).

Los epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Cl-Brener) fueron crecidos en medio RPMI-1640 conteniendo suplemento con 10% de suero fetal bovino a 28°C, en policubetas de 24 pocillos. Los cultivos con un inóculo inicial de 4 x 10<sup>6</sup> parásitos/mL fueron incubados con concentraciones crecientes de cada compuestos solubilizados en DMSO. El crecimiento de los parásitos fue monitoreado por el contaje de ellos en cámara de Neubauer. El porcentaje de inhibición fue calculado como la proporción del crecimiento del parásito en presencia y en ausencia del compuesto después de 72 horas de cultivo. Se determina para cada compuesto el IC<sub>50</sub> correspondiente. <sup>[9,3]</sup>

### 9.15.2 Ensayos *in vitro* como 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* (2x10<sup>6</sup> 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.

### **9.15.3 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) a cargo de la Dra. Patricia Doyle, Dr Juan Engel, Dr. Jut Giri, Dr Jair Lage y 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>.
- 3- 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.
- 4- 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).

- 5- 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.
- 6- 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)
- 7- 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 imagenes 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 formula

$$[1-(P/hc_x - P/hc^+) / (P/hc_2 - P/hc^+)] * 100$$

Donde P/hc<sub>x</sub>: recuento de parásitos

P/hc<sup>+</sup>: recuento células en cada celda (control positivo (Benznidazol, posaconazol).)

P/hc<sub>2</sub> : Recuento sobre el control negativo.

#### 9.15.4 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 atmosfera 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  $\mu$ 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 IC<sub>50</sub> 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 acotada 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) y  $P/hc_2$ : Recuento sobre el control negativo.



#### 9.15.5 Determinación de la citotoxicidad en células VERO.

La citotoxicidad es determinada en el mismo momento en el laboratorio de la Universidad de Misipi. El procedimiento se realiza a una única concentración 4,76  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se los incuban por 24 hrs. La actividad se realiza mediante la determinación de LDH (método descrito previamente).

#### 9.16 CÁLCULOS *AB INITIO*

Todos los cálculos *ab initio* fueron realizados con el paquete de programas Gaussian 03.<sup>[9.4]</sup> El funcional híbrido B3LYP<sup>[9.5, 9.6]</sup> en conjunto con la base 6-31G(d)<sup>[9.7]</sup> fue el utilizado para realizar los cálculos para cada conformero (estereoisómeros formados por rotación de enlaces simples) en su punto estacionario en fase gaseosa. La depuración de los conformeros de cada isómero fue resuelta por una búsqueda conformacional a nivel de mecánica molecular (con un campo de fuerza MM+). Los cálculos de frecuencia se utilizaron para

caracterizar los mínimos. Todas las reacciones, las entalpías de formación y las entalpías de activación reportados fueron corregidos a la energía de punto cero (ZPE, por sus siglas en inglés) con frecuencias sin escala. Cálculos de coordenadas de reacción intrínsecos (IRC, por sus siglas en inglés) fueron utilizados para confirmar las conexiones entre los reactantes, los productos y los estados de transición.

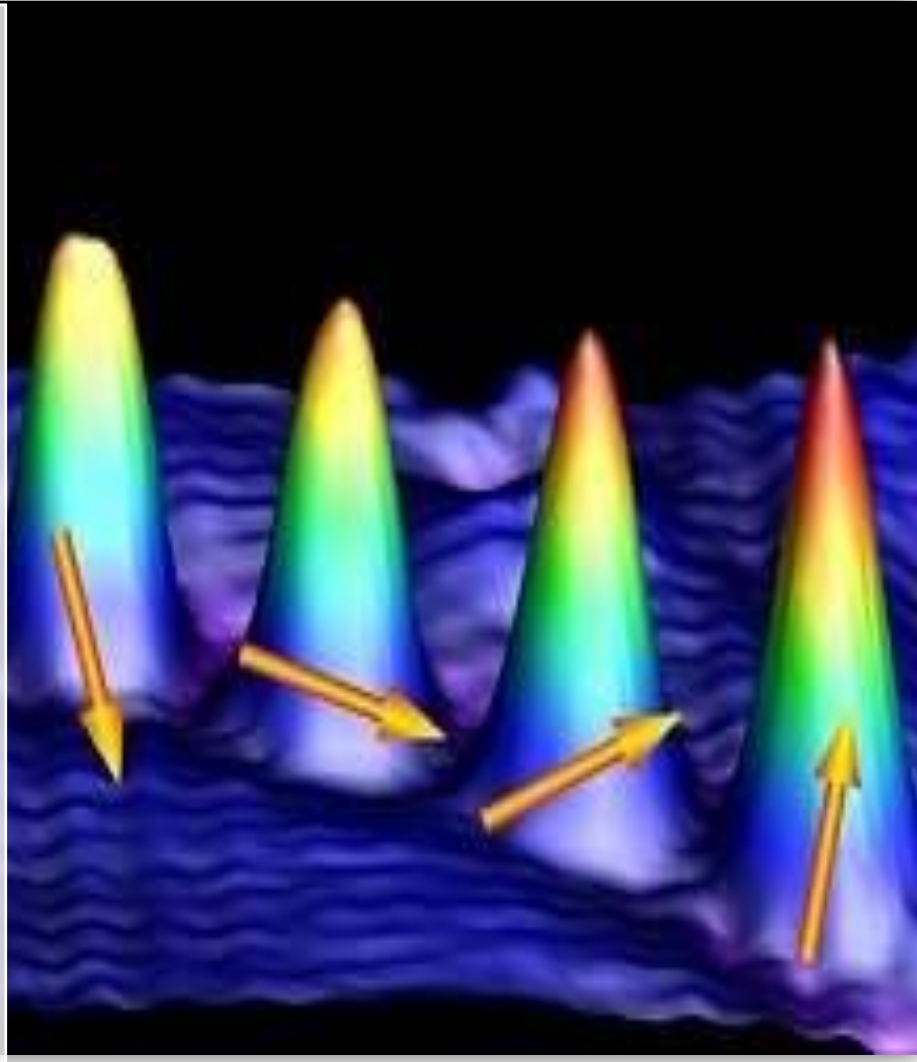
## 9.17 BIBLIOGRAFÍA

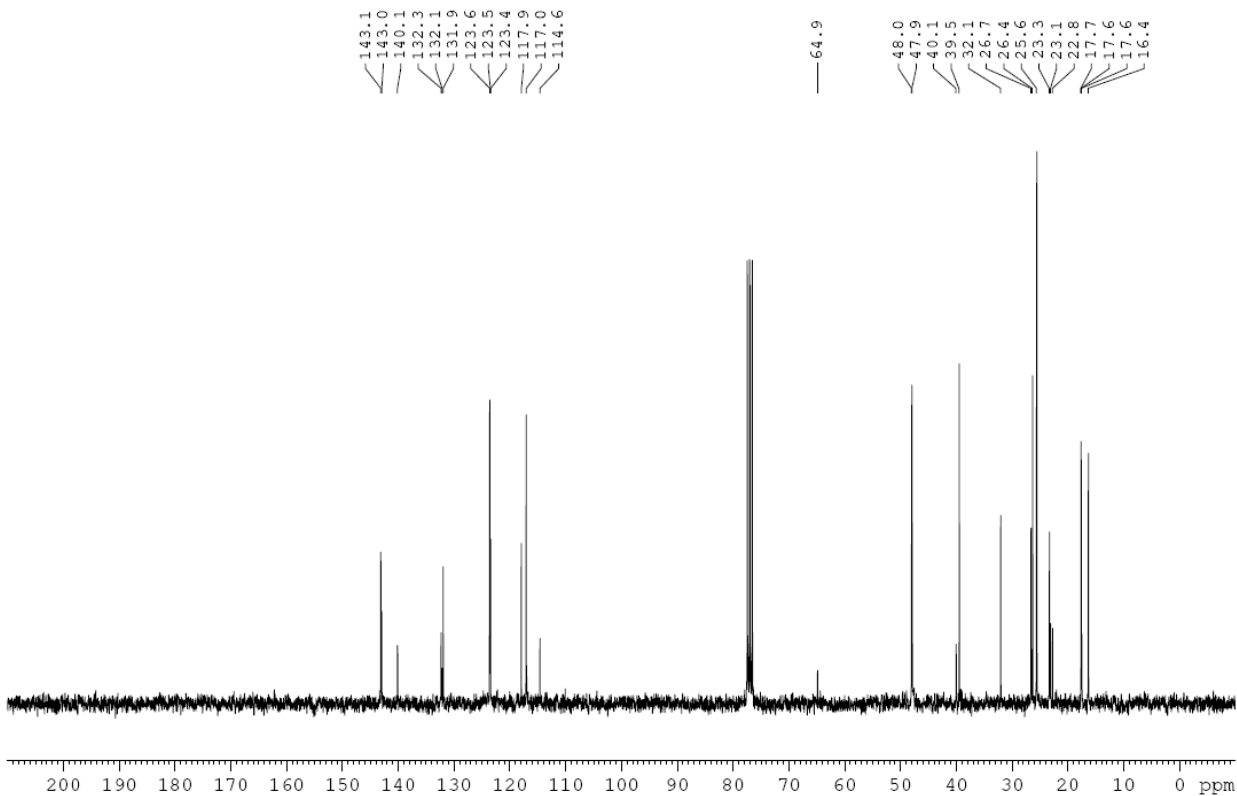
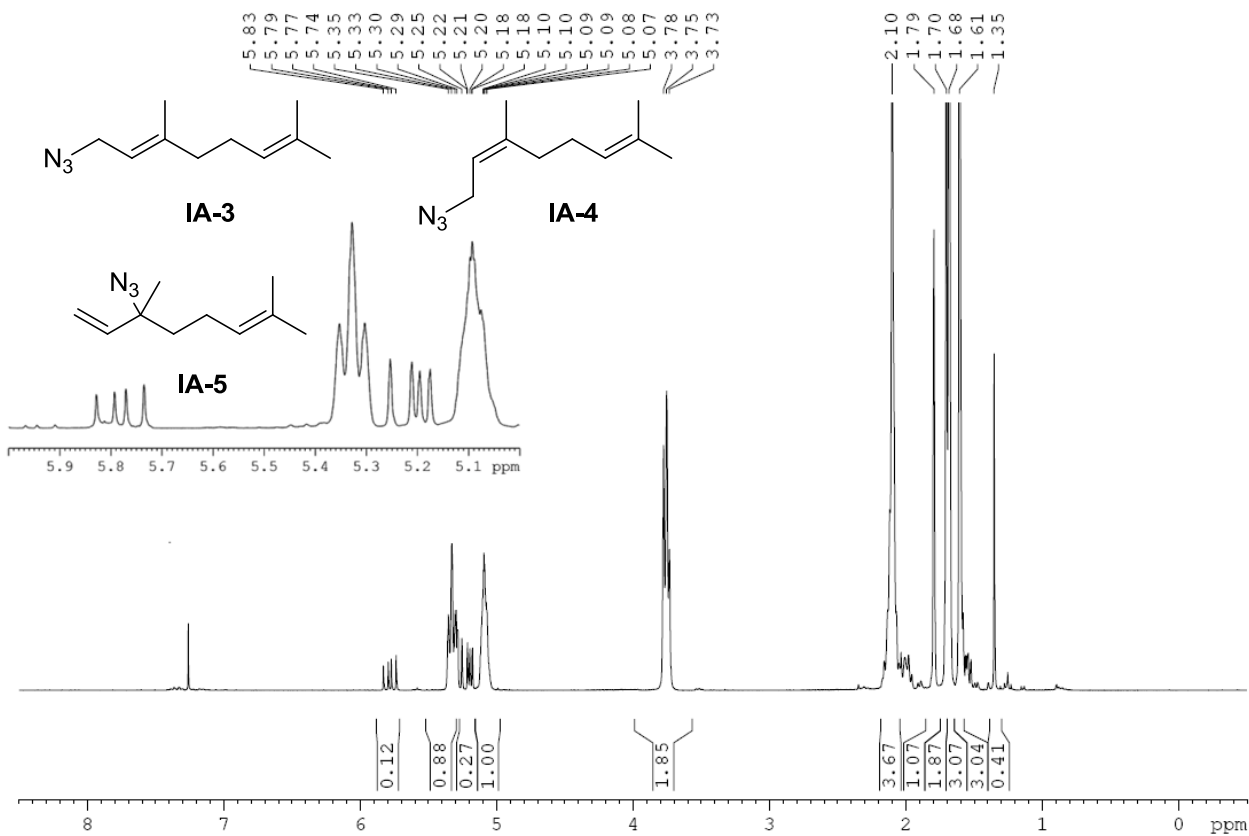
- 9.1. Campbell-Verduyn, L., Elsinga, P. H., Mirfeizi, L., Dierckx, R. A. and Feringa, B. L. (2008). "Copper-free 'click': 1,3-dipolar cycloaddition of azides and arynes." Organic & biomolecular chemistry **6**(19): 3461-3463.
- 9.2. Hirumi, H. and Hirumi, K. (1989). "Continuous cultivation of *Trypanosoma 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.
- 9.3. Bakalara, N., Kendall, G., Michels, P. A. and Opperdoes, F. R. (1992). "*Trypanosoma brucei* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes are stage-regulated at the transcription level." EMBO J. **11**(10): 3808.
- 9.4. Gaussian 09, R. D., Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, M. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- 9.5. Becke, A. D. (1993). "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange." The Journal of chemical physics **98**(7): 5648-5652.
- 9.6. Lee, C. a. Y., Weitao and Parr, Robert (1988). "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density." Phys. Rev. B **37**(2): 5.
- 9.7. Warren J. Hehre, L. R., P. von R. Schleyer, John Pople (1986). "AB INITIO Molecular Orbital Theory." 576.

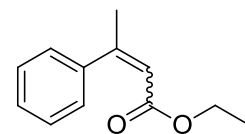
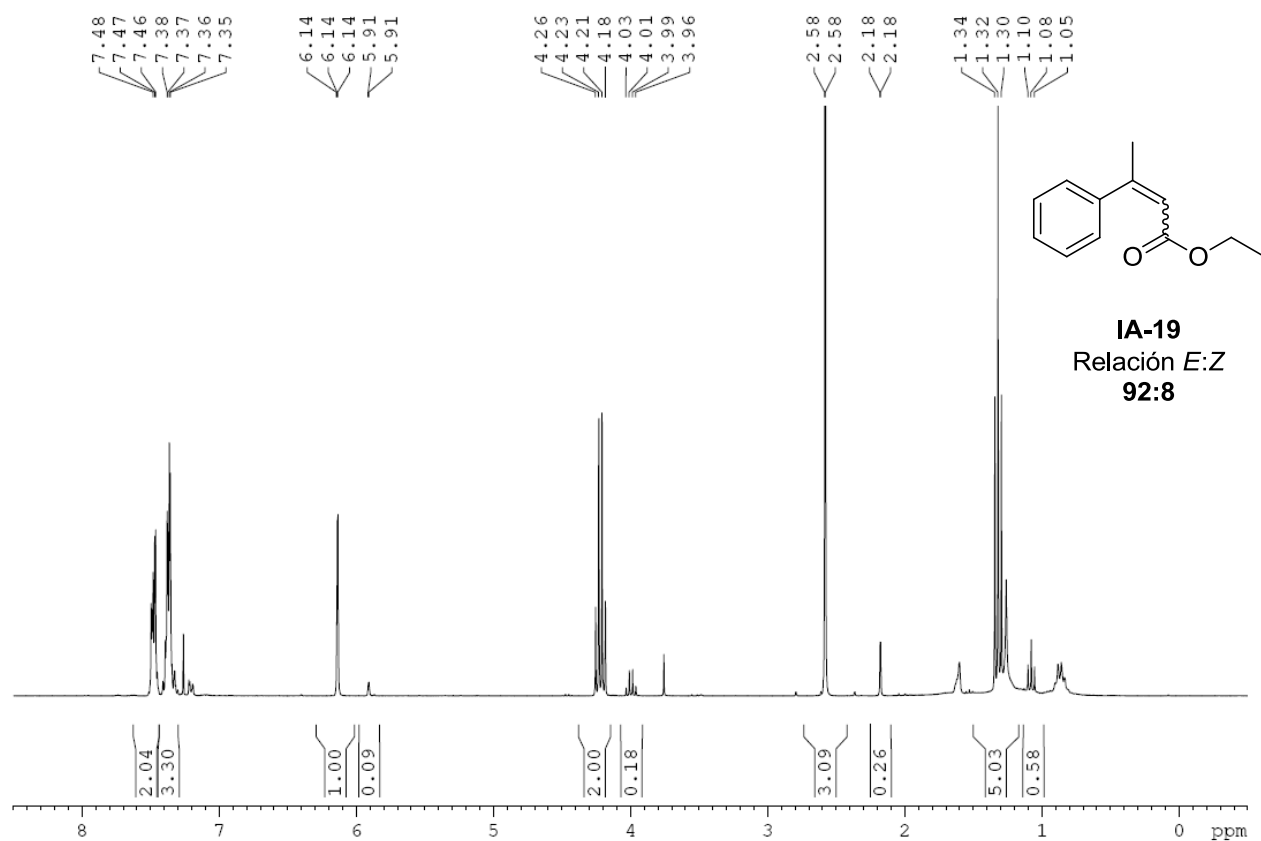
CAPÍTULO 10

ESPECTROS SELECCIONADOS

2015







**IA-19**  
Relación *E:Z*  
**92:8**

