PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
LABORATORIO DE SÍNTESIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ISOSTEROS Y DERIVADOS DE L-BUTIONINA SULFOXIMINA Y NAFTOQUINONAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD TRIPANOSOMICIDA

PABLO IGNACIO THOMAS RIVEROS

Tesis para optar al Grado
Académico de Doctor en Química

Director de Tesis : Dr. Cristian Osvaldo Salas Sánchez.

Santiago, 04 de Enero de 2019

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE QUÍMICA

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

"DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ISOSTEROS Y DERIVADOS DE L-BUTIONINA SULFOXIMINA Y NAFTOQUINONAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD TIPANOSOMICIDA"

Tesis presentada por:

Pablo Ignacio Thomas Riveros

Para optar al Grado Académico de Doctor en Química.

APROBADA POR:

Dr. Mauricio Cuellar
Prof. Examinador .....

Dr. Juan Diego Maya
Prof. Examinador .....

Dra. David Pessoa
Prof. Examinador .....

Dr. Cristian Salas S.
Prof. Director de Tesis .....

DEDICATORIA

A mi Tata Willy, Abuela Maruja

Tata Rolando y Mami Irma

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Cristian Salas y Ramón Estévez, por su dirección, orientación, concejos, apoyo y confianza al permitirme ser parte de sus grupos de investigación.

A los Dres. Mauricio Cuellar, Juan Diego Maya y David Pessoa por sus correcciones a esta tesis doctoral.

Al Dr. Ricardo Tapia, por sus consejos, orientación y acogida en los inicios de esta tesis doctoral y a la Sra. Ángela Bau por su buena disposición, su buen ánimo y siempre recibir con una sonrisa.

Al Dr. Juan Carlos Estévez, por acogerme en los inicios de las estadías realizadas, y por sus concejos, apoyo y experiencia en el laboratorio, que contribuyeron en esta tesis.

Al Departamento de Química Orgánica y a la Facultad de Química de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC), por la enseñanza recibida, y los aportes para la participación en congresos nacionales e internacionales.

Al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química y al Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC).

A Conicyt por las Becas para estudios de postgrado, Apoyo de tesis y de pasantía en el extranjero. Así mismo al proyecto Fondecyt de Iniciación N° 11005827.

A la Vicerrectoría de Investigación (VRI) de la PUC por la Beca para Cotutela en el extranjero y aportes para congresos internacionales.

A mi familia, por permitirme estudiar una “nueva carrera” y soportar todo el tiempo que las distancias nos separaron.

A todos los amigos que conocí y pude compartir, tanto dentro como fuera del laboratorio. A Claudia, Jaime, Romina, Gabriela, David, Karina, Sofía, José Manuel, Marta, Lino, María, Alberto, Marcos, Vicky, Angélica, Christian, Alan. Anita, Nicole, Jeannette, Alondra, gracias por los buenos momentos.

Agradecerle a Amalia, quien me acompaño en mis primeros días en España y me acogió como si nos conociéramos de toda una vida, gracias por tu amistad y cariño. Junto a ella, agradecer a Unai, y ahora con el pequeño Ibai; siempre me trataron muy bien.

Y especialmente quisiera agradecer a mi pareja Aurora, quien me acompaño durante este camino y me dio el ánimo y la fuerza para continuar con esta tarea, y a quien amo con todo el corazón.

Finalmente, quisiera agradecer a la Comisión Nacional de investigación Científica y Tecnológica (Conicyt) por el financiamiento para el desarrollo de esta tesis doctoral mediante la Beca para Estudios de Doctorado en Chile, año académico 2010.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	:	Acetato de etilo.
Ala	:	Alanina.
Arg	:	Arginina.
Asn	:	Asparagina.
Boc_2O	:	Di-*tert*-butil-dicarbonato.
L-BSO	:	L-Butionina sulfoximina.
c.c.f.	:	Cromatografía en capa fina.
°C	:	Grados Celsius.
Cys	:	Cisteína.
δ	:	Desplazamiento químico.
DCA	:	Acido dicloroacético.
DCM	:	Diclorometano.
DIPA	:	Diisopropilamina.
DMSO	:	Dimetilsulfóxido.
Et_2O	:	Dietil éter, éter etílico.
Glu	:	Acido glutámico.
GCL	:	Glutamato cisteína ligasa.
GR	:	Glutatión reductasa.
GSH	:	Glutatión.
Hcys	:	Homocisteína.
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography
λ	:	Longitud de onda.
m-CPBA	:	Acido *m*-cloroperbenzoico
Met	:	Metionina.
MSH	:	*O*-Mesitilensulfonilhidroxilamina.
MSO	:	Metionina sulfoximina.
MTT	:	Bromuro de (3-[4,5-dimetil tiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolin).
MTBE	:	Metil *tert*-butil éter.
nm	:	nanómetros.

NBS	:	*N*-bromosuccinimida.
PPA	:	Acido polifosfórico.
RMN	:	Resonancia magnética nuclear.
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio.
TBAB	:	Bromuro de tetrabutilamonio.
T. cruzi	:	Trypanosoma *cruzi.*
TFA	:	Acido trifluoroacético.
TEA	:	Trietilamina.
TR	:	Tripanotión reductasa.
Trp	:	Triptófano.
$T(SH)_2$	:	Tripanotión.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS xi
INDICE DE ESQUEMAS xiii
INDICE DE TABLAS xiv
INDICE DE GRÁFICOS xv
RESUMEN xvi
ABSTRACT xviii
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. Enfermedad de Chagas: Antecedentes Generales 2
1.2. Quimioterapia Actual de la Enfermedad de Chagas 6
1.3. Nuevos enfoques quimioterapéuticos: Inhibición de enzimas claves del mecanismo oxidante de *T. cruzi*. 10
1.4. L-Butionina Sulfoximina (L-BSO) y derivados como inhibidores de GCL 13
1.5. Sulfoximinas: Estructura y síntesis 15
1.6. Isósteros y Bioisósteros 19
1.7. Quinonas Naturales y Sintéticas con propiedades tripanosomicidas 23
1.8. Hipótesis 28
1.9. Objetivos Generales y Específicos 29
1.9.1. Objetivos Generales 29
1.9.2. Objetivos Específicos 29
PARTE I 30
SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE L-BSO Y EVALUACIONES BIOLÓGICAS 30
2. PARTE EXPERIMENTAL 31
2.1. Técnicas Experimentales 32
2.2. Procedimientos Experimentales 34
2.2.1. Síntesis de análogos alquílicos de L-BSO 34
2.2.1.1. Síntesis de L-homocisteína (1b)[60] 35
2.2.1.2. Procedimiento general de alquilación (3a-g) 36
2.2.1.3. Procedimiento general de alquilación vía reacción de Michael (3i-j) 44
2.2.1.4. Procedimiento general de esterificación y protección del grupo amino (4a-j) 47
2.2.1.5. Procedimiento general para la síntesis de sulfóxidos (5a-j) 58

2.2.1.6. Procedimiento general para la síntesis de sulfoximinas (6a-j) 79
2.2.1.7. Síntesis de *tert*-butil-*N*-hidroxicarbamato (11) 90
2.2.1.8. Síntesis de *N*-Boc-*O*-Mesitilensulfonilhidroxilamina (MSH-Boc, 13) 91
2.2.1.9. Síntesis de *O*-Mesitilensulfonilhidroxilamina (MSH, 14) 92
2.2.2. Síntesis de isósteros de L-BSO 93
2.2.2.1. Síntesis de *N*-(2-(butil)sulfonilmildoil)etil-heterociclos. 93
2.2.2.1.1. Procedimiento general para la síntesis de N-alquil-heterociclos (17a-b). 94
2.2.2.1.2. Procedimiento general para la síntesis de *N*-2-(butiltio)etil-heterociclos (18a-b). 97
2.2.2.1.3. Síntesis de sulfóxidos de *N*-2-(butiltio)etil-heterociclos (19a-b). 100
2.2.2.1.4. Síntesis de sulfoximinas de *N*-2-(butiltio)etil-heterociclos (20a-b). 102
2.2.2.2. Síntesis de 1-(2-(butilsulfonimidoil)etil)-4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol (28). 104
2.2.2.2.1. Síntesis de etil 2-(4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) acetato (23). 105
2.2.2.2.2. Síntesis de 2-(4-(trimetilsilil)-1H-1,2,3-triazol-1-il) etanol (24). 106
2.2.2.2.3. Síntesis de 2-(4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil metanosulfonato (25). 107
2.2.2.2.4. Síntesis de 1-(2-(butiltio)-etil)-4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol (26). 108
2.2.2.2.5. Síntesis de 1-(2-(butiltio)etil)-4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol (27). 109
2.2.2.2.6. Síntesis de 1-(2-butilsulfonimidoil)etil)-4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol (28). 110
2.3. Ensayos Biológicos 111
2.3.1. Material Biológico 111
2.3.2. Cultivos celulares 111
2.3.3. Determinación de tioles. 113
2.3.4. Determinación de proteínas totales. 116
2.3.5. Análisis estadístico 116
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 117
3.1. Aspectos sintéticos 118
3.2. Síntesis de análogos e isósteros de L-BSO. 118
3.2.1. Síntesis de análogos alquilados de L-Hcys y L-Cys. 119
3.2.2. Obtención de sulfóxidos derivados de L-Hcys y L-Cys 131
3.2.3. Preparación de MSH y obtención de análogos de L-Hcys y L-Cys sulfoximinas 134

3.2.4. Síntesis de análogos heterocíclicos de L-BSO 142
3.2.5. Análogos heterocíclicos a partir de pirazol y 1,2,4-triazol 142
3.2.6. Análogo heterocíclico de L-BSO del tipo 1,2,3-triazol 146
3.2.7. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar o de Huisgen 146
3.2.8. Síntesis de 1,2,3-triazol y el análogo sulfoximina respectivo. 148
3.3. Ensayos Biológicos 151
3.3.1. Viabilidad de cultivos de *T. cruzi* en presencia de análogos de L-BSO .. 151
3.3.2. Efectos de los análogos de L-BSO en el contenido de tioles en *T. cruzi* 154
PARTE II 163
SINTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE QUINONAS 163
2-AMINOARILQUINONAS 163
1. PARTE EXPERIMENTAL 164
1.1. Técnicas Experimentales 165
1.2. Síntesis de las fenilaminonaftoquinonas 33a-e y 37a-d, y de las fenilaminoquinolindionas 41a-g 165
1.3. 4,5,6-Tribromo-2,2-dimetil-2,3-dihidrobenzofuran-7-ol (43) 184
1.4. 5,6-Dibromo-2,2-dimetil-dihidrobenzofuran-4,7-diona (44) 185
1.5. Síntesis de arildihidrobenzofurandionas (45, 46a-b) 186
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 190
2.1. Síntesis de 2-fenilaminonaftoquinonas 230
2.2. Evaluación Biológica 247
2.2.1. Actividad tripanosomicida de derivados de 2-aminonaftoquinonas (Serie I) 247
2.2.2. Actividad tripanosomicida de derivados de 2-aminonaftoquinonas (Serie II) 256
4. CONCLUSIONES 261
BIBLIOGRAFIA 264
ANEXO 269
- Análogos e Isósteros de L-BSO. 269
- 2-Aminoarilquinonas 314

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número estimado de inmigrantes infectados con T. cruzi viviendo en países no endémicos. 4
Figura 2. Formas celulares de *T. cruzi*. 4
Figura 3. Ciclo biológico del parásito *T. cruzi*. 5
Figura 4. Estructura de compuestos utilizados en la enfermedad de Chagas. 6
Figura 5. Estructuras químicas de ergosterol y derivados de triazol. 9
Figura 6. L-BSO y derivado fosforilado. 14
Figura 7. Modelo comparativo de *T. cruzi* de *S. cerevisiae* y zonas de unión con L-BSO en el sitio activo 15
Figura 8. Características de las sulfoximinas. 16
Figura 9. Acido carboxílico y tetrazol e isósteros acilsulfonamidas en antagonistas de angiotensina II. 21
Figura 10. Naftoquinonas naturales con actividad tripanosomicida. 23
Figura 11. Estructuras de naftoquinonas con actividad tripanosomicida. 24
Figura 12. Estructuras de compuestos tipo 2 aminonaftoquinonas con actividad biológica. 26
Figura 13. El MTT, es una sal de tetrazolio que es metabolizada por reductasas mitocondriales presentes en células vivas, transformándose en formazán. 113
Figura 14. Cromatograma característico de la cuantificación de GSH y $T(SH)_2$. Aquí se aprecian sus correspondientes picos en los tiempos de retención específicos. 115
Figura 15. Modificaciones para estudiar sobre la estructura de L-BSO para la generación de nuevos análogos e isósteros. 119
Figura 16. Espectro de RMN-^{1}H (D_2O) de **1b** preparado. 120
Figura 17. Compuestos preparados a partir de **1a** y **1b**. 122
Figura 18. Espectro de RMN-^{1}H (arriba) y H-H COSY (abajo) de **3c**, aquí se muestra la correlación de cada una de las señales correspondientes a los protones. 123
Figura 19. Espectros de RMN-^{13}C (arriba), HMQC (medio) y HMBC (abajo) de **3c**. Se aprecia la correlación de cada una de las señales, confirmando la estructura del compuesto. 126
Figura 20. Estructura de hidrocloruro de L-Metionina etil éster (**3h**). 126
Figura 21. Espectro de protones del compuesto **4j** y sus correspondientes asignaciones. 128
Figura 22. Espectros de ^{1}H-COSY (arriba), HMQC (medio) y HMBC (abajo) para el compuesto **4j**. Con esto se pudo determinar la estructura del compuesto. 130
Figura 23. Diasterómeros obtenidos luego de la oxidación de **4a**, **4b** y **4i**. 132
Figura 24. Posibles confórmeros para los compuestos **5a**, **5b** y **5i**. 132
Figura 25. Espectro de RMN-^{1}H para el compuesto **14**. 135
Figura 26. Mecanismo propuesto para la síntesis de sulfoximinas. 137
Figura 27. Análogos de L-BSO sintetizados a partir de L-Hcys y L-Cys. 137
Figura 28. ^{1}H-COSY del compuesto **6d**. 140
Figura 29. Espectros de HMQC (arriba) y HMBC (abajo) para el compuesto **6d**. 141

Figura 30. Reemplazo isostéricos de L-BSO considerados para la obtención de nuevos análogos. 142
Figura 31. Resumen de la síntesis de isósteros heterocíclicos de L-BSO. 144
Figura 32. Comparación entre los espectros de RMN-^{1}H de los compuestos **19b** y **20b**. Aquí se logró apreciar la aparición de la señal de NH que se incorpora. 145
Figura 33. Espectro de RMN-^{1}H del compuesto **23**, donde se aprecia una única señal correspondiente al anillo formado. 148
Figura 34. Señal de NH de la sulfoximina **28** y los CH_2 adyacentes al azufre. 149
Figura 35. Análogos de L-BSO que lograron una mayor disminución en los niveles de GSH en cultivos de *T. cruzi*. 156
Figura 36. Análogos de L-BSO que incrementan los niveles de GSH en cultivos de *T. cruzi*. 157
Figura 37. Biosíntesis, reciclaje y utilización de glutatión y tripanotión. La producción de $T(SH)_2$ se puede dividir en la biosíntesis o captación de cisteína, biosíntesis de GSH, biosíntesis o captación de poliaminas y biosíntesis de $T(SH)_2$.(*78*) 157
Figura 38. Análogos de L-BSO con una inhibición sobre el 65 % en los niveles de $T(SH)_2$. 161
Figura 39. Modificaciones propuestas para la síntesis de quinonas. 230
Figura 40. Espectro de COSY-^{1}H para el compuesto **33c**. 236
Figura 41. Espectros de HMQC y HMBC del compuesto **33c**. 237
Figura 42. Espectro de HMBC del compuesto **37b**, confirmando la regioselectividad de la sustitución. 239
Figura 43. Espectro de RMN-^{1}H del compuesto **45**. 243
Figura 44. Espectro de HMBC del compuesto **45**. 245
Figura 45. Modificaciones estructurales de derivados de 2-aminonaftoquinonas utilizadas como patrón para los compuestos **33a-d** y **41a**. 247
Figura 46. Representación de los potenciales electrostáticos y orbitales frontera para **41a** y **33b**. 250
Figura 47. Análisis geométrico y electrónico para **33a** vs **33c** y **33b** vs **33d**. 252
Figura 48. Modelo de membrana usado para calcular *in silico* las interacciones con nifurtimox, **33a** y **47**. 253
Figura 49. Modificaciones estructurales de derivados de 2-aminonaftoquinonas utilizadas como patrón para los compuestos **33e**, **37a-d**, **41b-g**, **45** y **46a-b**. 256
Figura 50. Resumen del efecto tripanosomicida y selectividad generado por los derivados de 2-aminonaftoquinonas estudiados. 259

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reducción de nitrofuranos por nitroreductasa de tipo I. 7
Esquema 2. Vía reductora de benznidazol. 8
Esquema 3. Biosíntesis de GSH y $T(SH)_2$. 11
Esquema 4. Ciclo redox del tripanotión. Este ciclo comienza con los factores que participan en el proceso respiratorio y termina con la desintoxicación de los peróxidos.(*33*) 12
Esquema 5. Síntesis original de MSO. 13
Esquema 6. Síntesis de sulfoximinas y alquilación. 17
Esquema 7. Síntesis de suloxifeno. 18
Esquema 8. Síntesis de metil-4-pentafluorosulofanilfenil sulfoximina. 18
Esquema 9. Posible mecanismo de acción tripanosomicida de quinonas. 25
Esquema 10. Esquema general se síntesis de sulfoximinas. 34
Esquema 11. Reacción de Michael para la obtención de los análogos **3i** y **3j**. 36
Esquema 12. Ruta sintética de análogos heterocíclicos de L-BSO. 93
Esquema 13. Ruta sintética para la obtención de 1,2,3-triazol. 104
Esquema 14. Reacción de Tiolite® con GSH. 114
Esquema 15. Síntesis de L-Hcys a partir de L-Met. 120
Esquema 16. Ejemplo de la alquilación del átomo de azufre de **1a**. 121
Esquema 17. Compuestos formados por reacción de Michael. 127
Esquema 18. Esquema general de la formación de sulfóxidos. 131
Esquema 19. Síntesis de **14** a partir de clorhidrato de hidroxilamina. 135
Esquema 20. Retro síntesis de isósteros de L-BSO. 143
Esquema 21. Esquema general de la reacción de Huisgen. 147
Esquema 22. Mecanismo propuesto para la cicloadición 1,3-dipolar. 147
Esquema 23. Nuevas quinonas preparadas con p-hexiloxianilina y naftilaminas 166
Esquema 24.Sintesis de benzofurandionas 186
Esquema 25. Mecanismo de formación de **33a**. 231
Esquema 26. 2-Aminoarilnaftoquinonas preparadas de acuerdo al protocolo utilizado para **33a**. 233
Esquema 27. Mecanismo de la adición de Michael en quinonas dihalogenadas. 234
Esquema 28. Mecanismo de formación de **41a**. 240
Esquema 29. Compuestos preparados a partir de las quinolin-5,8-dionas **38b** y **38c**. ... 241
Esquema 30. Condiciones: i) Br_2, $CHCl_3$, t.a., 1,5 h. ii) CrO_3, H_2O/AcOH, t.a., 2 h. 242
Esquema 31. Condiciones: i) $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, EtOH, t.a., 2 h. 244

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de bioisósteros clásicos. Grupos en cada fila son equivalentes. 20
Tabla 2. Estudio SAR asociado con una serie de inhibidores de GSK3. 22
Tabla 3. Comparación entre las señales de NH de sulfuros **4a-b** y **4i**, y sulfóxidos **5a-b** y **5i**. 133
Tabla 4. Diferencias en la señal de NH entre sulfuros y sulfóxidos derivados de L-Hcys. 134
Tabla 5. Desplazamientos químicos de NH para **6a-j** en sus espectros de RMN-^{1}H. 139
Tabla 6. Señal de NH en isósteros **20a** y **20b**. 144
Tabla 7. Comparación de los CH_2 adyacentes al átomo de azufre en sulfuros, sulfóxidos y sulfoximinas. 145
Tabla 8. Variación de los desplazamientos químicos de los grupos metilenos en los compuestos **26**, **27** y **28**. 150
Tabla 9. Viabilidad de análogos de L-BSO estudiados sobre epimastigote de T. cruzi a concentración fija de 100 μM. 152
Tabla 10, Porcentaje de disminución de GSH en cultivos de T. cruzi en presencia de sulfoximinas. 158
Tabla 11. Porcentaje de disminución de $T(SH)_2$ por parte de los análogos de L-BSO en cultivos de *T. cruzi*. 160
Tabla 12. Efecto de 2-aminonaftoquinonas de la serie I sobre cultivos de crecimiento en *T. cruzi*. 249
Tabla 13. Propiedades estéreo-electrónicas calculadas para los compuestos **31a-d** y **41a**. 251
Tabla 14. Efecto sobre el crecimiento del parásito en cultivo de *T. cruzi*, debido a la acción de las quinonas de la serie II. 257

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Variación del contenido de GSH en el parásito luego de la exposición a los análogos de L-BSO preparados. Valores expresados en μmol de GSH por mg de proteína. 155
Gráfico 2. Efecto de los análogos de L-BSO sobre el contenido de $T(SH)_2$. Variación expresados en μmol de $T(SH)_2$ por mg de proteína. La concentración para L-BSO es 500 μM. 159

RESUMEN

El “mal de Chagas” es una de las tantas enfermedades endémicas presentes en el continente americano que es transmitido por el parasito *Trypanosoma cruzi*. Cada año mueren millones de personas a causa de ésta y otro número no menor, está en riesgo de contraerla. Los tratamientos existentes son escasos y poco eficientes, siendo sólo dos fármacos, nifurtimox y benznidazol, los utilizados. Sin embargo, debido a los efectos adversos y la baja efectividad en la etapa crónica de la enfermedad, se hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas.

Dentro de algunas nuevas estrategias terapéuticas, es interesante reconsiderar el papel que tiene la L-butionina sulfoximina (L-BSO) en mamíferos y parásitos. Este compuesto es capaz de inhibir la síntesis de glutatión y por consecuencia la de tripanotión ($T(SH)_2$), un componente clave dentro de los mecanismos de defensa que posee *T. cruzi* frente al estrés oxidativo. Por esta razón, la combinación de L-BSO con agentes que induzcan formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como nifurtimox y benznidazol, ha sido considerado como un posible tratamiento más eficaz en el manejo de esta patología. En paralelo, en los últimos años, se han reportado un conjunto de quinonas heterocíclicas que poseen efecto tripanosomicida, muchos ellos de mejor potencia que los fármacos de referencia.

En función de lo anterior, esta tesis de doctorado se propuso aportar nuevas moléculas con potencial actividad tripanosomicida, que apunten a dos estrategias farmacológicas. Por un lado, nuevos análogos de L-BSO, que sean más eficaces en la disminución de los niveles de $T(SH)_2$ y, por otra parte, nuevas quinonas heterocíclicas de mayor potencia que las estudiadas en nuestro grupo de investigación.

Los principales resultados de esta tesis indican que, algunos de los análogos de L-BSO sintetizados, lograron preliminarmente una disminución en los niveles de $T(SH)_2$ en epimastigote de *T. cruzi*, principalmente los compuestos **6b** y **20a**. Estos efectos fueron observados a concentraciones cinco veces menor que L-BSO. Por otro lado, los derivados de quinonas **33a** y **33b**, mostraron los mayores efectos tripanosomicidas en epimastigote de *T. cruzi*, (IC_{50} = 1,72 y 6,04 μM, respectivamente), comparados con nifurtimox (IC_{50} = 21,05 μM). Además, ambos compuestos mostraron ser más selectivos hacia *T. cruzi* que células Vero, especialmente **IV** (Índice de selectividad: 32) e igualmente eficaces en la forma tripomastigote del parásito. Finalmente, a partir de la información estructural de los

compuestos más activos, se propusieron algunas modificaciones químicas para obtener una nueva familia de quinonas, de las cuales se destaca la molécula **41b**. Este derivado resultó ser un potente agente tripanosomicida en la forma tripomastigote (IC_{50} = 0,349 ± 0,089 μM) y con una alta selectividad hacia *T. cruzi* comparado con células RAW (IS = 84). Este último, se considera el resultado más significativo de esta tesis, lo cual valida la hipótesis acerca de aquellas características farmacofóricas que debe poseer un compuesto con núcleo de quinonas para poseer actividad tripanosomicida y selectividad. Con estos resultados, es posible plantear que serían muy útiles estudios de potenciación entre nifurtimox o benznidazol con los análogos de L-BSO o las 2-aminoarilquinonas.

ABSTRACT

Chagas disease is one of the many endemic diseases present in the Americas. Every year millions of people die from this disease and treatments are scarce. Currently only two drugs, nifurtimox and benznidazole, are used in their treatment, but the negative side effects and low effectiveness in the chronic stage of the disease justify the search for new chemotherapeutic alternatives.

Within some strategies in the search for new therapeutic alternatives for Chagas disease, it is interesting to consider the role of Butionine Sulfoximine (L-BSO). This compound is capable of inhibiting the synthesis of glutathione, a key component within the defense mechanisms that the parasite has against oxidative stress. For this reason, the combination of L-BSO with agents that induce the formation of reactive oxygen species, such as antichagasic drugs, nifurtimox and benznidazole, has been considered as a possible more effective treatment in the management of this pathology. On the other hand, in our research group, we have generated a set of heterocyclic quinones that have a trypanosomicidal effect, many of them with better potency than the reference drugs.

Based on the above, this PhD thesis was proposed to provide new molecules with potential trypanosomicide activity, which point to two pharmacological strategies. On the one hand, new analogs of L-BSO, in order to achieve a decrease in glutathione levels and, on the other hand, new heterocyclic quinones of greater potency than those reported by our group.

The main results of this thesis indicate that, the analogs of L-BSO prepared achieved a decrease in the levels of T $(SH)_2$, mainly compounds **6b** and **20a**, reaching levels equivalent to L-BSO, but at a much lower concentration . In addition, after evaluating biologically the 2-aminoarilquinones, compounds **33a** and **33c** were the ones that

presented the best results, presenting IC_{50} values much lower than the reference drug nifurtimox, in the epimastigote state of the parasite, and with better index of selectivity (IS) compared to Vero cells, being the chlorinated derivative **33c** with an IS value of 32, compared to nifurtimox, whose IS value is 20. Similarly, by modifying the structure of these quinones, forming a chlorinated derivative at position C-3 and replacing the benzene ring of naphthoquinone by a pyridine ring, as in the case of compound **41b**, was able to improve the effect, now, on the trypomastigote state of the parasite. With these results, it is possible to propose potentiation studies between nifurtimox or benznidazole with the L-BSO analogs or the 2-aminoarilquinones, which will be developed in a later work.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Chagas: Antecedentes Generales

Reconocida por la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) como una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas,(*1*) la enfermedad de Chagas ha sido un flagelo para la humanidad desde la antigüedad, y continúa siendo un problema social y económico relevante en muchos países de América Latina.(*2, 3*) Fue descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas (1879-1934), quien identificó al agente etiológico de la enfermedad, un protozoo hemoflagelado al que denominó *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), en honor a su mentor, el médico sanitarista Osvaldo Cruz. El reporte original de Chagas es único en la historia de la medicina, en el sentido que un solo científico describe en gran detalle tanto como el ciclo de transmisión (vector, huésped y un nuevo organismo infeccioso) como las manifestaciones clínicas agudas del primer caso humano.(*4*)

Si bien el descubrimiento del parásito data desde el siglo XX, existen antecedentes que la enfermedad está presente desde hace más de 9.000 años en el continente americano, lo cual fue demostrado mediante la técnica de PCR de fragmentos del ADN del kinetoplasto, con lo cual se pudo confirmar la presencia de *T. cruzi* en momias disecadas en la costa y el valle de la zona central de Chile y sur de Perú.(*5*)

Charles Darwin (1809-1882) pudo ser uno de los primeros casos de infección con *T. cruzi* que se tenga conocimiento, incluso antes del descubrimiento hecho por Chagas, ya que, durante su expedición a América del Sur en 1835 estudio a la vinchuca en su paso por Chile y Argentina, y las anotaciones de sus síntomas durante los últimos años de su vida, hacen presumir que murió a causa de esta enfermedad.(*6*)

La infección humana es principalmente trasmitida por insectos salvajes y domésticos de la subfamilia Triatiminae (Hemiptera, Reduviidae), la vinchuca, que habita en América desde Estados Unidos y México por el norte hasta Argentina y Chile por el sur.(*7*) La enfermedad de Chagas también puede ser transmitida al hombre por mecanismos no vectoriales, como transfusiones sanguíneas y verticalmente de madre a hijo,(*8*) trasplante de órganos y la ruta oral.(*9*)

El riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas luego de la transfusión de una unidad de sangre desde un donante infectado es menos de 10-20 % y depende de varios factores, incluyendo la concentración del parásito en la sangre del donante, el componente de la sangre transferida y, quizás, de la cepa del parásito. La transmisión congénita y la basada en transfusión son las principales formas de contagio en humanos en zonas urbanas y en países no endémicos.(*8*)

Actualmente, casos de infección por *T. cruzi* no son raros en países con inmigrantes de América Latina y hace un llamado de atención para que la enfermedad de Chagas este en mente en los diagnósticos diferenciales.(*10*) Se estima que aproximadamente 12.000 de 40.000 inmigrantes de América Latina viviendo en España en 2003 estaban infectados con *T. cruzi*.(*11*) Para 2007 el número de inmigrantes desde América Latina aumentó a 1.600.000 y, si la prevalencia de la infección es similar, aproximadamente 40.000 de estos inmigrantes son propensos a estar infectados por *T. cruzi* (**Figura 1**).(*9, 12*)

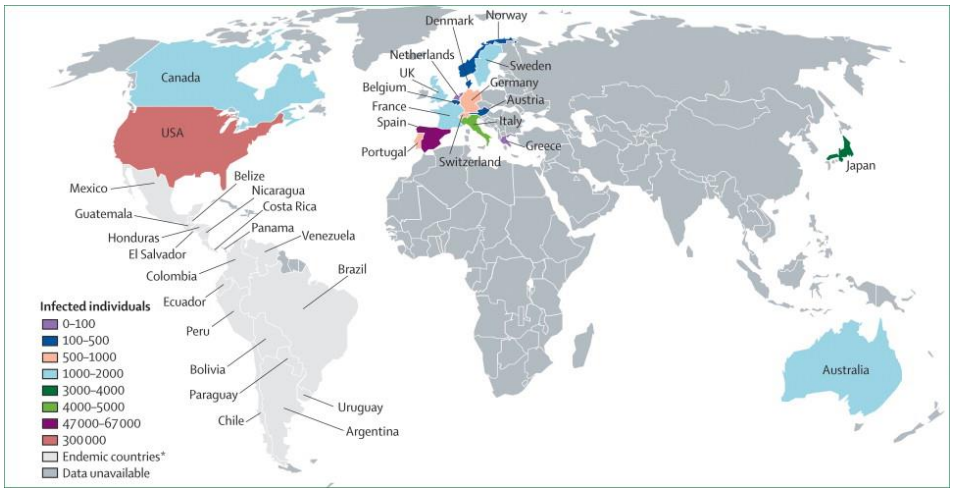


Figura 1. Número estimado de inmigrantes infectados con *T. cruzi* viviendo en países no endémicos.

Dependiendo del hospedero en que se encuentre, el *T. cruzi* adopta diferentes formas celulares: epimastigote, tripomastigote y amastigote (**Figura 2**). El epimastigote es la forma extracelular y replicativa presente en el intestino de los triatominos. El tripomastigote es la forma extracelular, no replicativa e infectiva, que se encuentra en la sangre de los mamíferos, en el intestino posterior de los vectores y en sus deyecciones. Los amastigotes son las formas extracelulares replicativas que se encuentran en las células del mamífero.(*13, 14*)

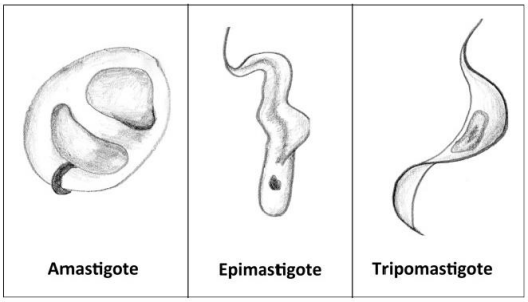


Figura 2. Formas celulares de *T. cruzi*.

Cuando un triatomino portador del parásito se alimenta de un mamífero, ingiere sangre y simultáneamente defeca. En las deyecciones se encuentran las formas tripomastigotes que ingresan por el lugar de la picadura o por erosiones de la piel, y son fagocitados, fundamentalmente por macrófagos. En la célula hospedera, el tripomastigote es incorporado en una vesícula parasitófora, de las que escapa alojándose en el citoplasma, donde se diferencia en amastigote. Esta forma celular inicia numerosos ciclos de división, ocupando el citoplasma de la célula hospedera (**Figura 3**).(*15*)

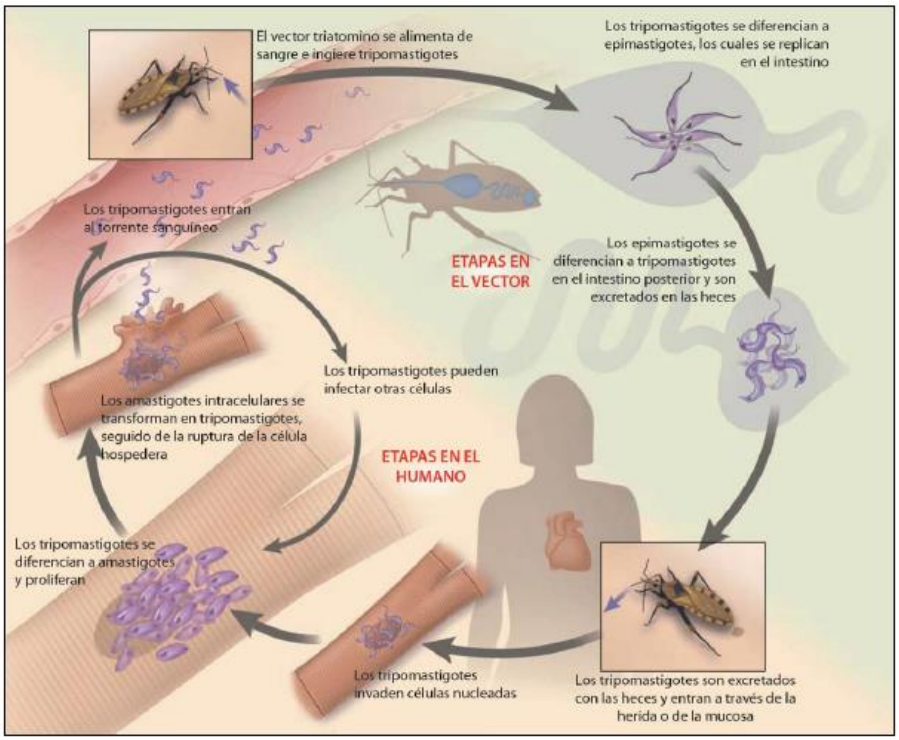


Figura 3. Ciclo biológico del parásito *T. cruzi*.

Posteriormente, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes altamente móviles, que son liberados al torrente sanguíneo desde donde infectan otras células blanco, tales como células ganglionares, y musculares entre otras. Estos tripomastigotes sanguíneos, cuando son ingeridos por otros triatómicos, se diferencian en el

intestino anterior a epimastigote que se dividen y migran hacia el intestino posterior del insecto. Cuando alcanzan el recto se adhieren a la pared mediante su flagelo y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Una vez que se despegan de la pared intestinal, son eliminados por las heces de la vinchuca, cerrando el ciclo de vida.(*15*)

1.2. Quimioterapia Actual de la Enfermedad de Chagas

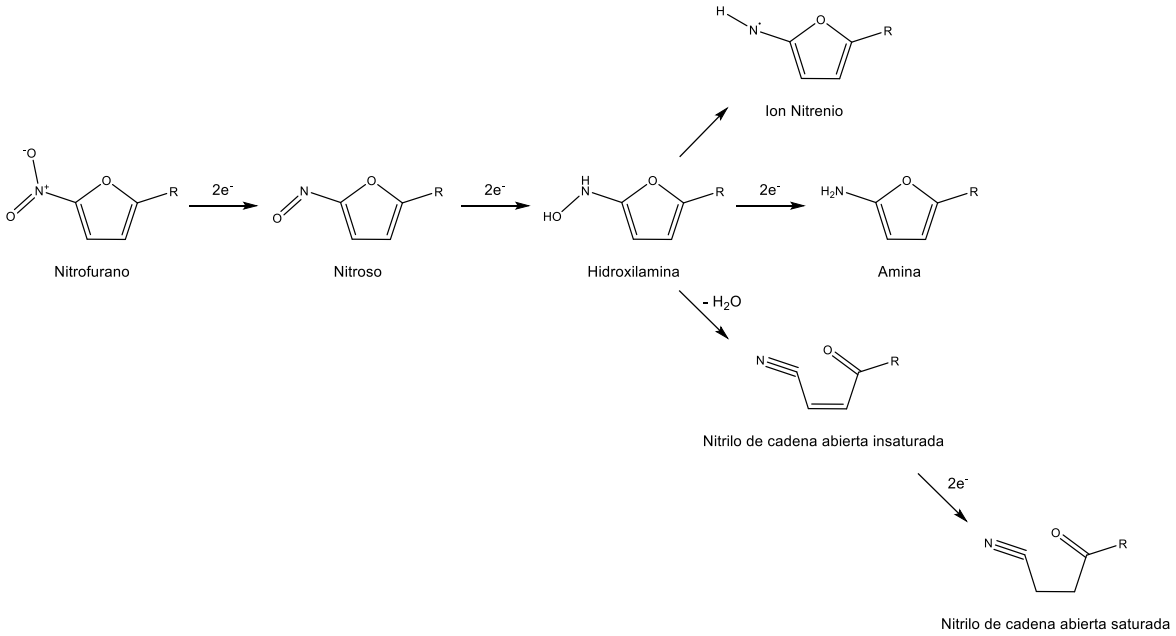
Los únicos fármacos actualmente disponibles con probada eficacia contra *T. cruzi*, aplicadas hace más de cuarenta años, son nifurtimox (**I**) (Lampit®, Bayer, 3-metil-4-(5-nitrofurfurilidenamina)tetrahidro-4*H*-1,4-tiazona-1,1-dióxido) y benznidazol (**II**) (Abarax®, Elea, *N*-bencil-2-nitroimidazol acetamida) (**Figura 4**).

Nifurtimox (I) **Benznidazol (II)**

Figura 4. Estructura de compuestos utilizados en la enfermedad de Chagas.

Estos fármacos fueron desarrollados empíricamente a finales de 1960 y principios de 1970. El benznidazol, un derivado de nitroimidazol, se piensa que actúan a través de la unión covalente de intermediarios de su nitroreducción a moléculas del parásito. El nifurtimox, un compuesto derivado del heterociclo nitrofurano, actuaría mediante la producción de metabolitos reductores de oxígeno (por ejemplo, superóxido y peróxido de hidrogeno), para los que el parásito tiene una menor capacidad de desintoxicación, en comparación con las células de vertebrados.(*16*)

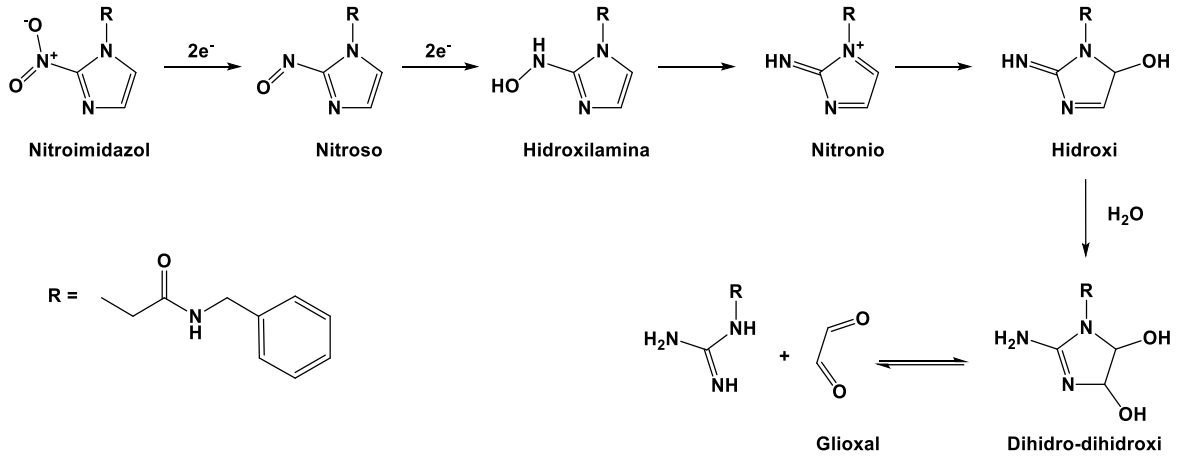
Recientemente, se ha demostrado que en el mecanismo de acción del nifurtimox estaría involucrada la participación de una nitroreductasa de tipo I, presente en el parásito, que catalizaría la reducción de este profármaco a un nitrilo insaturado de cadena abierta. Este producto tiene el potencial para funcionar como aceptor de Michael y podría reaccionar de forma no específica con componentes celulares, lo que explicaría el efecto pleiotrópico de nifurtimox en el parásito, donde se ha reportado que causa daño al ADN, además de inhibir varias actividades enzimáticas, como también modificando los niveles de tioles endógenos (**Esquema 1**).(*17*)



Esquema 1. Reducción de nitrofuranos por nitroreductasa de tipo I.

En el caso de benznidazol, existen diversos antecedentes que confirman que el efecto tripanosomicida ocurre por generación de metabolitos electrofílicos, los cuales causan perjudiciales efectos en el ADN y depletan los tioles de bajo peso molecular como el glutatión (GSH), moléculas antioxidantes que previenen el daño de importantes componentes celulares causados por xenobióticos tóxicos.(*18*)

La nitroreductasa de tipo I formaría, mediante una vía reductiva, el metabolito 4,5-dihidro-4,5-dihidroxiimidazol, el cual puede romperse para formar glioxal, siendo este un agente mutagénico y citotóxico por su capacidad de formar aductos con guanosina (**Esquema 2**).(*19*)



Esquema 2. Vía reductora de benznidazol.

Estos fármacos tienen una significativa actividad tripanosomicida en la fase aguda de la enfermedad, pero en la fase crónica la actividad de ambos disminuye de manera considerable. Además, el nifurtimox posee efectos no deseados como producir anorexia, náuseas y vómitos, con la correspondiente pérdida de peso, insomnio, irritabilidad y polineuropatías severas. En el caso del benznidazol produce alergias, síndromes gastrointestinales, parestesias, mialgias y artralgias.(*20, 21*)

Otros fármacos que se han propuestos como alternativa a nifurtimox y benznidazol, pero que son utilizados en el tratamiento de otras enfermedades, entre los que podemos destacar los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (**III**), ya que han demostrado poseer actividad tripanosomicida tanto *in vivo* como *in vitro*. De estos se destaca el posaconazol (**IV**) (POS, SCH 56592, Noxafil, Schering-Plough Research Institute, SPRI), un compuesto antifúngico, el cual logró ser efectivo en el tratamiento antiparasitario en la fase crónica de un paciente femenino con

tripanosomiasis positiva,(*22*) aunque estudios clínicos han demostrado que es inferior a benznidazol en el tratamiento de esta enfermedad;(*23*) y el ravuconazol (**V**) (ER-30346, Eisai Co.; BMS 207.147; Bristol-Myers Squibb) (**Figura 5**), el cual es altamente activo *in vitro* contra *T. cruzi*, pero tiene una actividad supresora más que curativa en modelos murinos y caninos de la enfermedad de Chagas.(*24*)

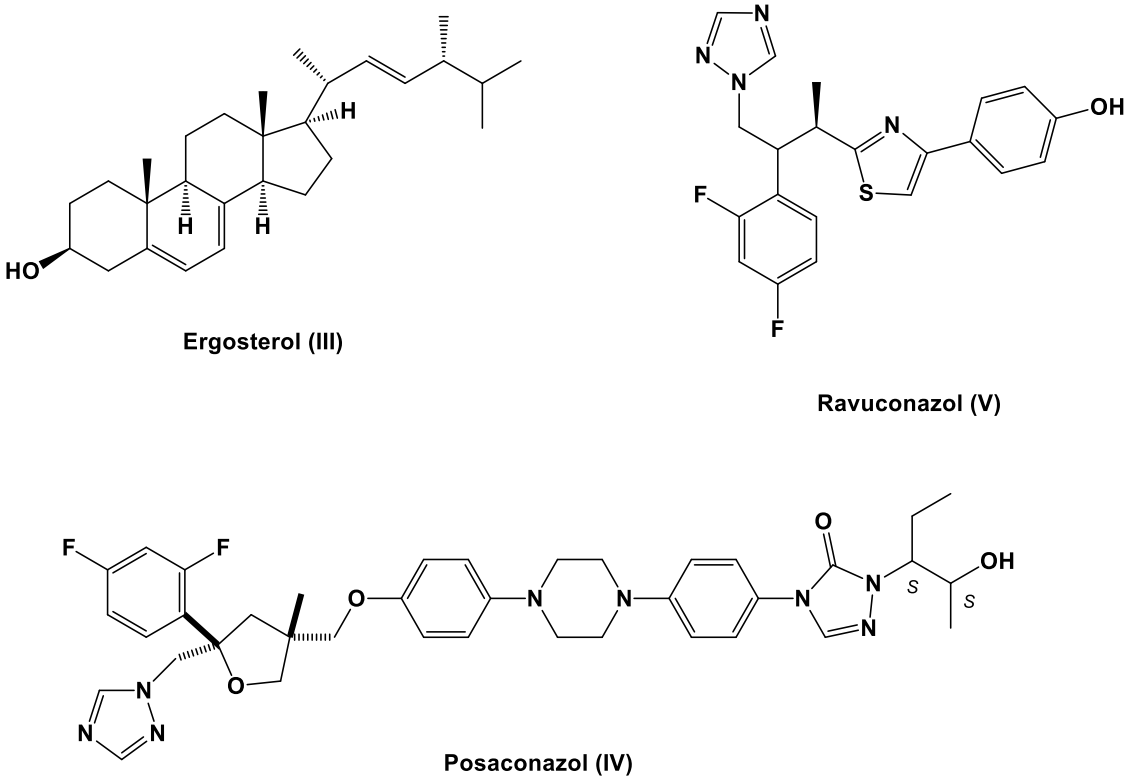


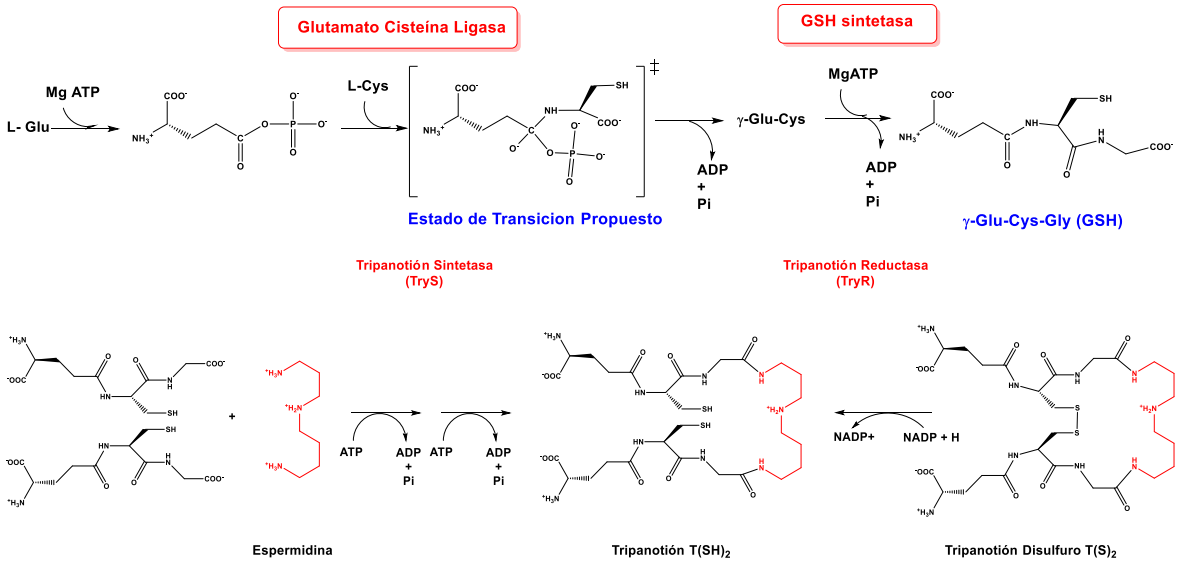
Figura 5. Estructuras químicas de ergosterol y derivados de triazol.

1.3. Nuevos enfoques quimioterapéuticos: Inhibición de enzimas claves del mecanismo oxidante de *T. cruzi*.

El glutatión (GSH) es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos. Está involucrado en la protección de los efectos tóxicos producidos por compuestos altamente electrofílicos, como son ciertos xenobióticos y sus metabolitos, y es un eficaz atrapador no enzimático de peróxido de hidrogeno y radicales libres.(*25*)

En los mamíferos, el GSH oxidado (GSSG) es reducido por la glutatión reductasa (GR), enzima que no está presente en el parásito, y que es responsable de mantener la razón GSH:GSSG muy alta, ya que la homeostasis del GSH es críticamente importante para mantener tanto el balance redox intracelular como la defensa contra agentes oxidantes o estrés oxidativo.(*26*)

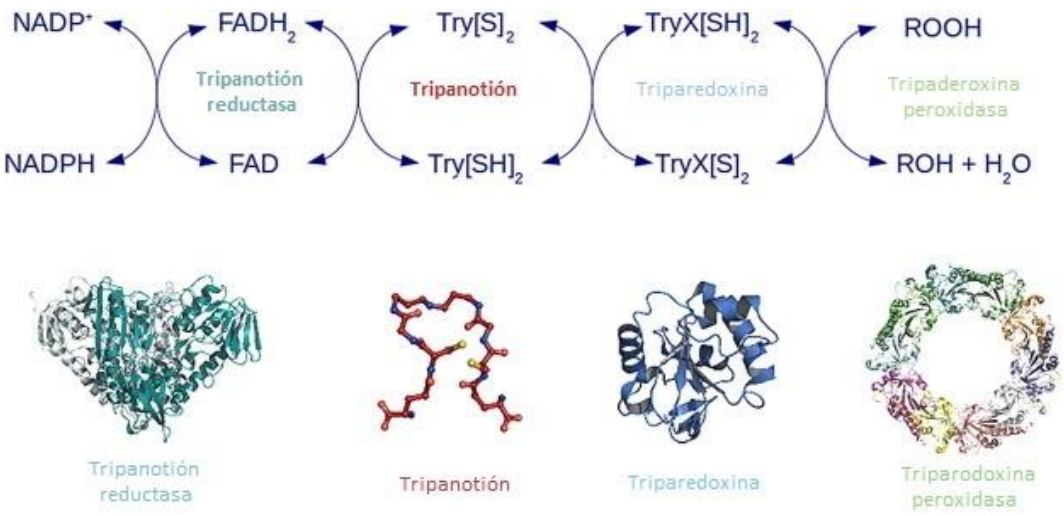
El control del equilibrio redox en *T. cruzi* es dependiente de la vía de biosíntesis de GSH, debido a que se basa principalmente en el tripanotión ($T(SH)_2$, bis-glutationil-espermidina)), característico de los triposomástidos, que protegen al parásito frente a especies oxidativas, agentes electrófilos y xenobióticos (**Esquema 3**).(*27, 28*) El GSH es sintetizado por la acción consecutiva de dos enzimas, la glutamato cisteína ligasa (GCL o GSH1) y GSH sintetasa.(*29*) El mecanismo catalítico de GCL que ha sido propuesto involucra la formación de un estado de transición característico.(*30, 31*)



Esquema 3. Biosíntesis de GSH y $T(SH)_2$.

Las células de los mamíferos son capaces de defenderse de manera muy eficiente contra los radicales libres, mediante diversos mecanismos los que pueden ser tanto enzimáticos como no enzimáticos. En el caso del parásito, los mecanismos de defensa son relativamente deficientes.(*26*)

Es por esto por lo que el tripanotión presenta una gran relevancia para la supervivencia del parásito. Se han podido identificar tres oxidoreductasas dependientes del tripanotión que son clave en el metabolismo reductivo del parásito: Tripanotión reductasa (TR), Tripaderoxina (TXN) y Triparedoxin peroxidasa (TXNPx). Estas enzimas están distribuidas en el citosol (TXN, TXNPx), mitocondria (TR, TXN, TXNPx) y glicosoma (TR) del *T. cruzi* (**Esquema 4**).(*32*)

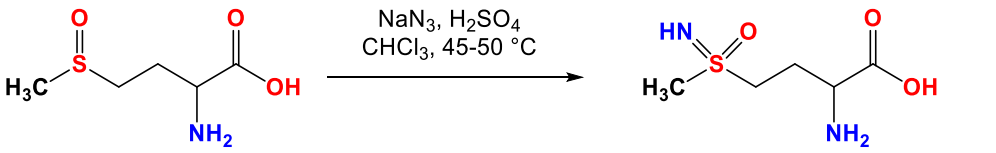


Esquema 4. Ciclo redox del tripanotión. Este ciclo comienza con los factores que participan en el proceso respiratorio y termina con la desintoxicación de los peróxidos.(*33*)

La principal función de la TR es mantener un ambiente reducido dentro del parásito, al mantener al tripanotión en su forma reducida, que es su forma activa.(*34*) Estudios comparativos entre la TR y GR, su homólogo en el ser humano, encontraron que sus estructuras tridimensionales son similares y mecanísticamente semejantes, con un 41 % de homología. Los residuos de aminoácidos que están involucrados en la catálisis de TR y GR son conservados, pero existen cinco cambios no conservativos entre ambas enzimas, estos son Glu18, Trp2 y Met113 en el caso de TR, mientras que en la GR se encuentra Ala34, Arg37 y Asn11, lo que le da la especificidad del sustrato. Estudios realizados demostraron que la deficiencia de TR detiene el crecimiento y aumenta la sensibilidad al peróxido de hidrogeno.(*35*)

1.4. L-Butionina Sulfoximina (L-BSO) y derivados como inhibidores de GCL

A principios del siglo XX se utilizaban diversos métodos para mejorar comercialmente el trigo molido, uno de estos era la adición de tricloruro de nitrógeno ("agene"), pero en 1946 se reportó que perros alimentados con una dieta rica en harina tratada con "agene" sufrieron ataques epilépticos y eventualmente la muerte. Años después se identificó el factor tóxico, la sulfoximina de metionina (**VII**) (**Esquema 5**).(*36*)



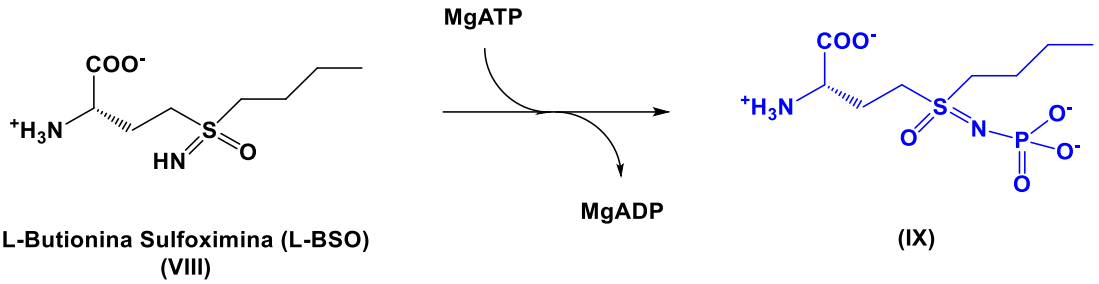
D,L-metionina sulfóxido
VI

D,L-metionina sulfoximina (MSO)
VII

Esquema 5. Síntesis original de MSO.

La metionina sulfoximina (MSO), el primer ejemplo de sulfoximina descrito, es capaz de interactuar con GCL inhibiéndola. Una subsecuente evaluación de análogos de MSO revelaron que la L-butionina sulfoximina (L-BSO) fue al menos 100 veces más efectiva que MSO en inhibir GCL y que era altamente específica, que no muestra afinidad detectable a glutamina sintetasa.(*37*)

El L-BSO, o su derivado fosforilado derivado por ATP (**Figura 6**), forma un análogo al estado de transición en la síntesis del glutatión, el que se une fuertemente pero no covalentemente al sitio activo de GCL inhibiéndola.(*38-40*) De esta forma el parásito se vuelve más susceptible a la acción de especies radicalarias y más indefenso frente al estrés oxidativo.(*39*)



L-Butionina Sulfoximina (L-BSO) (VIII)

(IX)

Figura 6. L-BSO y derivado fosforilado.

La inhibición ocurre de manera dosis-tiempo dependiente. Cuando este fármaco se añade a cultivos de parásitos, las concentraciones de GSH y $T(SH)_2$ intracelular disminuyen considerablemente. Cabe mencionar que una de las principales limitantes en el uso de L-BSO es su baja lipofília, lo que hace necesario usar dosis muy altas para observar efectos significativos a nivel celular (~ 500 μM).(*39*)

Si bien, hasta el momento no se ha podido obtener la estructura cristalina de la enzima, cristalizada con L-BSO, lo que indicaría de manera más precisa el sitio de unión entre ambos, si se ha podido acceder a la estructura cristalina del complejo enzima-BSO-GSH de GCL de *Saccharomyces cerevisiae* (ScGCL). Con esto, y conociendo la secuencia de ambas enzimas es posible hacer, mediante simulación por modelamiento molecular, una aproximación sobre el sitio de unión, las interacciones proteína-ligando además de la generación de un mapa farmacofórico.

En la **Figura 7** se puede ver que hay tres zonas características, una zona de reconocimiento del zwitterión, un sitio de fosforilación que corresponde al nitrógeno de imida y una zona de reconocimiento hidrofóbico.(*41*)

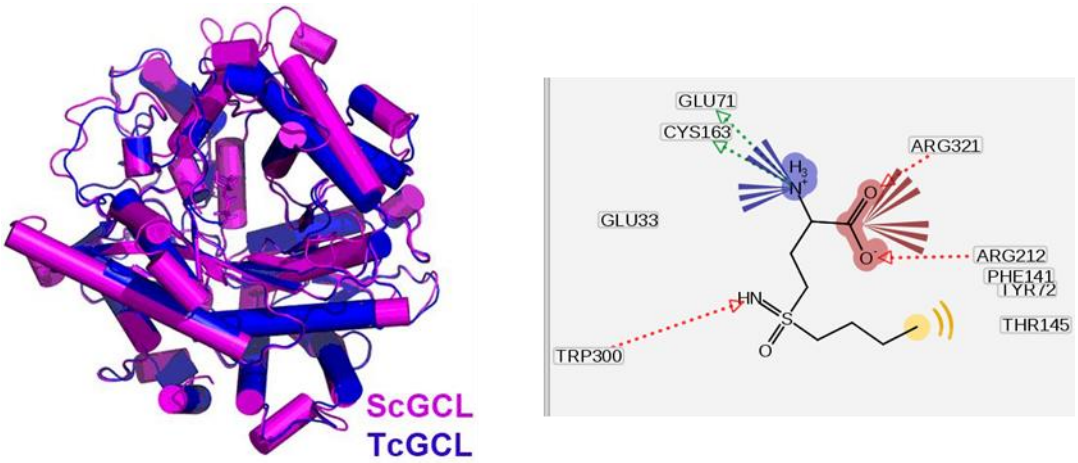


Figura 7. Modelo comparativo de *T. cruzi* de *S. cerevisiae* y zonas de unión con L-BSO en el sitio activo .

1.5. Sulfoximinas: Estructura y síntesis

Las sulfoximinas son isoelectrónicas con las sulfonas, sin embargo, la introducción del átomo de nitrógeno crea asimetría en el átomo de azufre tetraédrico en el caso de que dos sustituyentes de carbono no sean iguales.

En general, las sulfoximinas son compuestos constitucionalmente y configuracional mente que pueden ser manipulados sin cuidados especiales. En contraste con las sulfonas, las sulfoximinas ofrecen un punto adicional de sustitución, el átomo de nitrógeno ligeramente básico para permitir la coordinación metal-ion y formar sales con ácidos minerales (**Figura 8**).

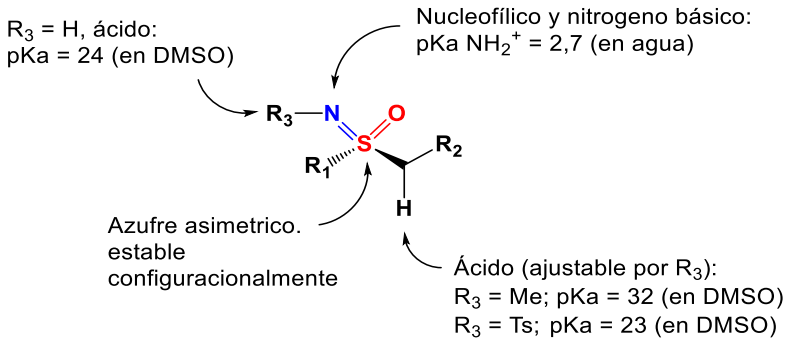


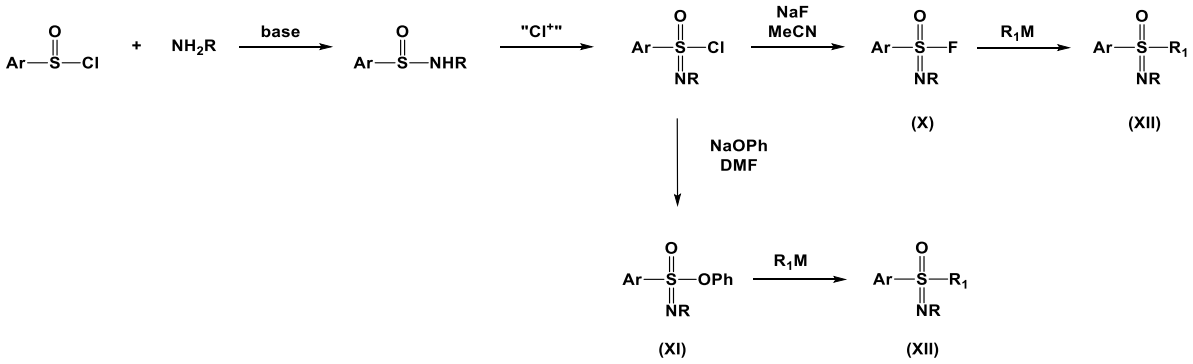
Figura 8. Características de las sulfoximinas.

La naturaleza de los sustituyentes en el átomo de nitrógeno influye de manera determinante en las propiedades ácido/base del compuesto. Los heteroátomos unidos al azufre en la sulfoximina son aceptores de puentes de hidrogeno. Sulfoximinas libres ofrecen una funcionalidad dual como donor de hidrogeno (a través del grupo NH) y como aceptor. Estudios espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) han indicado que el grupo sulfoximina es ligeramente más electro-aceptor que el grupo sulfona.

Además, hay una marcada diferencia entre las sulfoximinas y las correspondientes sulfonas, en que sulfoximinas simples, con bajo peso molecular son solubles en disolventes próticos, como agua o alcoholes. Esto se debe probablemente a la solvatación especial alrededor del grupo sulfoximina. Esta única combinación de propiedades hace al pequeño e hidrofílico grupo sulfoximina muy atractivo para la química médica.(*36*)

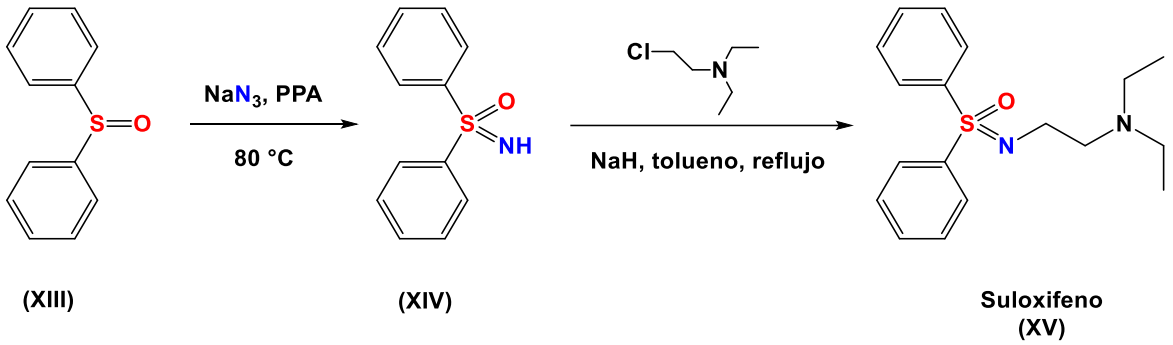
En literatura es posible encontrar rutas sintéticas para la obtención de este grupo funcional. Por lo general son procesos que constan de dos pasos, solo para formar este grupo, pero que pueden variar en el orden en que adiciona el átomo de oxigeno o nitrógeno al átomo de azufre central. Una de las primeras síntesis que se puede encontrar es la formación de sulfonimidoil fluoruro (**X**) o fenil sulfonimidato (**XI**), a partir del cloruro de arensulfonilo.

Desde los compuestos **X** y **XI** es posible generar alquil sulfoximinas. La adición de las porciones alquílicas se lleva a cabo por la reacción de estos compuestos con un reactivo de Grignard u organolitio, los cuales contienen la porción hidrocarbonada a incorporar (**Esquema 6**).(*42, 43*)



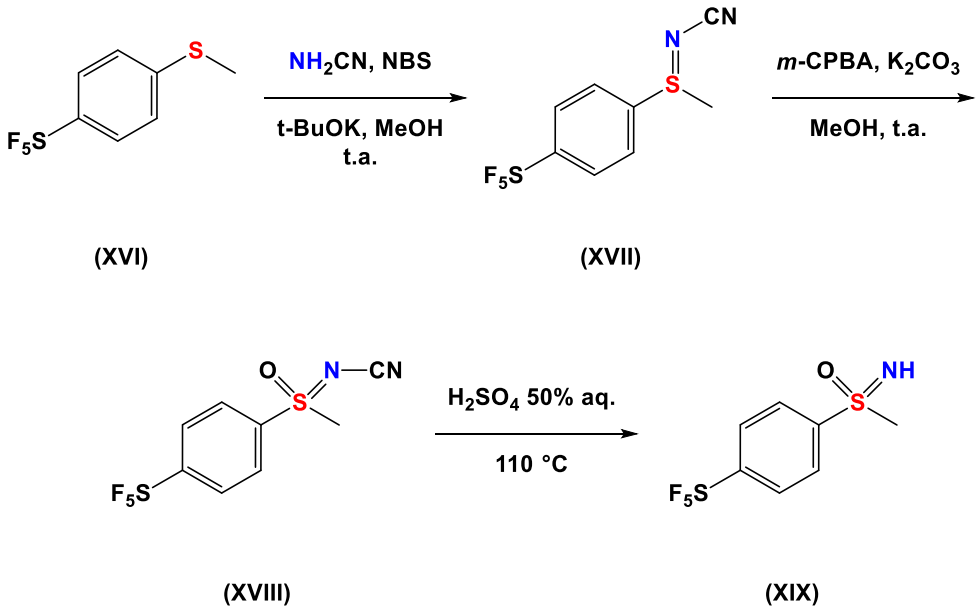
Esquema 6. Síntesis de sulfoximinas y alquilación.

Para realizar la iminación de un sulfóxido se puede utilizar ácido hidrazoico, el cual se forma en el medio de reacción a partir de azida de sodio, tal como, por ejemplo, lo informa Gödecke en la síntesis de (*S*,*S*)-difenil sulfoximina, haciendo reaccionar difenil sulfóxido con azida de sodio en ácido polifósforico (PPA) a 80 °C, en escala de multigramo, puede llevar a una explosión (**Esquema 7**). Esto probablemente propició el desarrollo de una alternativa de síntesis de sulfoximinas. Una de estas alternativas es la *O*-mesitilensulfonilhidroxilamina (MSH), el cual con sulfóxidos ópticamente activos genera sulfoximinas ópticamente activas con retención de configuración, pero al igual que el ácido hidrazoico, el MSH debe manejarse con extrema precaución ya que se puede descomponer con una violencia explosiva.(*36*)



Esquema 7. Síntesis de suloxifeno.

Otro ejemplo de preparar sulfoximinas es la síntesis de metil-4-pentafluorosulfanilfenil sulfoximina (**XIX**), en el cual el primer paso es la reacción con cianamida y *N*-bromosuccinimida (NBS) y posteriormente hacer la oxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA), invirtiendo los pasos que normalmente se utilizaban para la síntesis (**Esquema 8**).(*44*)



Esquema 8. Síntesis de metil-4-pentafluorosulofanilfenil sulfoximina.

1.6. Isósteros y Bioisósteros

El concepto de isosterismo entre entidades químicas relativamente simples fue originalmente contemplado por James Moir en 1909,(*45*) pero fue Irving Langmuir, en 1919, quien acuña el término de "isóstero",(*46*) palabra que fue utilizada para describir la similiridad de moléculas o iones que tienen el mismo número de átomos y electrones de valencia, por ejemplo O^{-2}, F^{-}, Ne.(*46, 47*) En 1925 Grimm enuncia su ley de desplazamiento de hidruro para describir la similiridad entre grupos que tienen el mismo número de electrones de valencia pero diferentes número de átomos, expandiendo la definición de isostérismo de Langmuir.(*47, 48*)

En 1950 Friedman(*49*) introduce el término "bioisóstero" como compuestos que causan efectos biológicos similares, reconociendo que los compuestos pueden ser isostéricos, pero no necesariamente bioisostéricos. Esta noción anticipa que la aplicación que la aplicación de bioisostérismo dependerá del contexto, dependiendo mucho menos en propiedades fisicoquímicas como en el principio subyacente para mimetismo bioquímico. Bioisósteros son típicamente menos miméticos estructurales exactos y a menudo se asemejan más en propiedades biológicas que en propiedades físicas.(*45*)

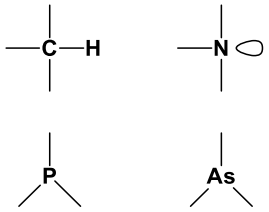
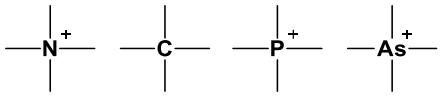
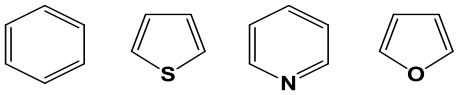
Los bioisósteros se pueden clasificar en dos grupos:

a) Clásicos: de acuerdo con el número de enlaces que afecta, monovalentes, divalentes, trivalentes, tetravalentes y equivalencia de anillos (**Tabla 1**).

b) No Clásicos: Fueron expandidos para incluir el grupo carbonilo, ácidos carboxílicos, hidroxilos, catecol, halógenos, amidas y esteres, tiourea, piridina y cíclicos versus acíclicos.

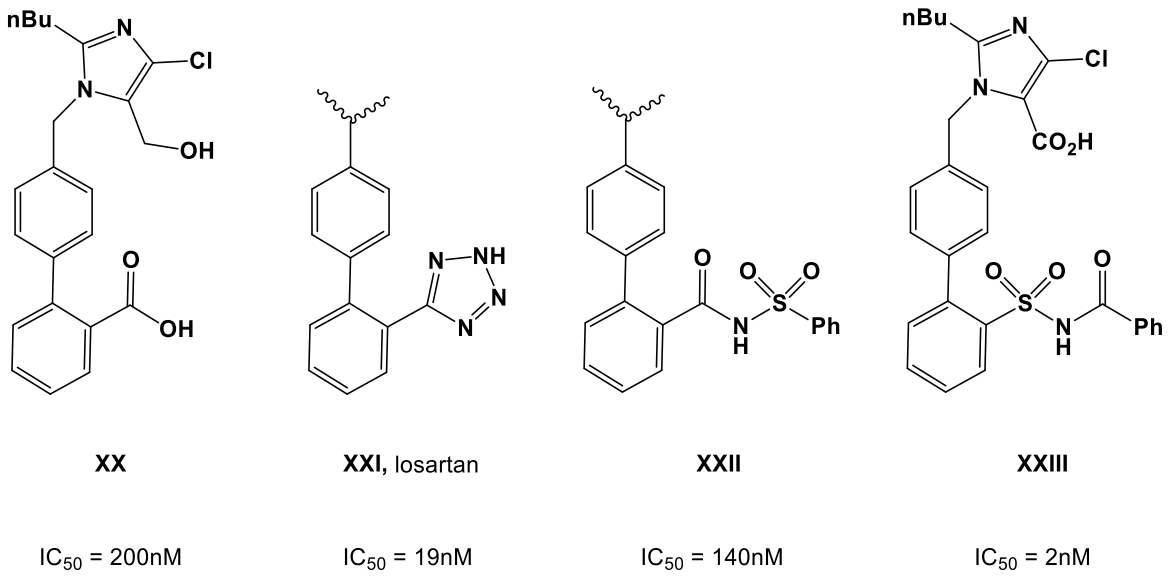
Las principales razones para efectuar un reemplazo bioisostérico son muchas, dentro de las que podemos incluir: mejorar la selectividad, menos efectos secundarios, disminuir la toxicidad, mejorar la farmacocinética, incrementar la estabilidad metabólica, simplificar rutas sintéticas, compuestos líderes patentes.(*48*)

Tabla 1. Ejemplos de bioisósteros clásicos. Grupos en cada fila son equivalentes.

Bioisósteros Monovalentes	**Bioisósteros Divalentes**
OH, NH OH, NH o CH_3 por H SH, OH Cl, Br, CF_3	C=S, C=O, C=NH, C=C
Átomos o grupos trivalentes	**Átomos tetrasustituídos**
	
Anillos equivalentes	
	

Dentro de la literatura es posible encontrar muchos ejemplos de cómo los reemplazos bioisostéricos son utilizados en el diseño de drogas en la modificación de algunas de ellas. Un ejemplo es Losartan (**XXI, Figura 9**), un fármaco antihipertensivo antagonista del receptor de angiotensina II (ARAII). La fracción de tetrazol de losartan (**XXI**) confiere un incremento de 10 veces en la potencia, comparado con el análogo ácido carboxílico (**XX**).

La fracción $CONHSO_2Ph$ incorporada en el compuesto **XXII** exhibe una potencia similar a la de CO_2H. Sin embargo, la acilsulfonamida reversa, $SO_2NHCOPh$, encontrada en el compuesto **XXIII** presenta una potencia mucho mayor, 100 veces más que el ácido original.(*50, 51*)



XX | **XXI,** losartan | **XXII** | **XXIII**

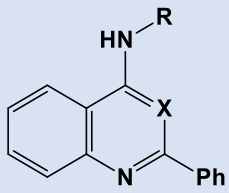
IC_{50} = 200nM | IC_{50} = 19nM | IC_{50} = 140nM | IC_{50} = 2nM

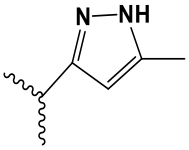
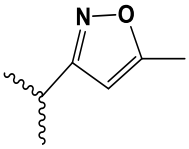
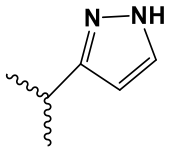
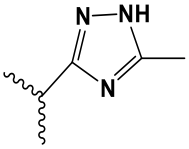
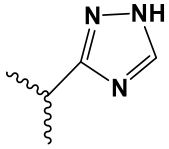
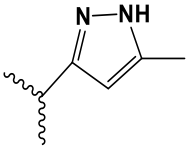
Figura 9. Acido carboxílico y tetrazol e isósteros acilsulfonamidas en antagonistas de angiotensina II.

Otro ejemplo es la inhibición de la quinasa de serina/treonina, la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), la cual está involucrada en varias vías de señalamiento celular y representa un potencial objetivo molecular para la diabetes tipo 2 y la enfermedad de Alzhéimer, donde se ha demostrado que los niveles de GSK3 son elevados.

La 4-aminoquinazolina derivado **XXIV** presenta una potente inhibición de GSK3, pero al modificar el anillo heterocíclico se observa como varia el poder de inhibición, siendo en algunos casos mucho menos que los del compuesto líder original (**Tabla 2**).(*52*)

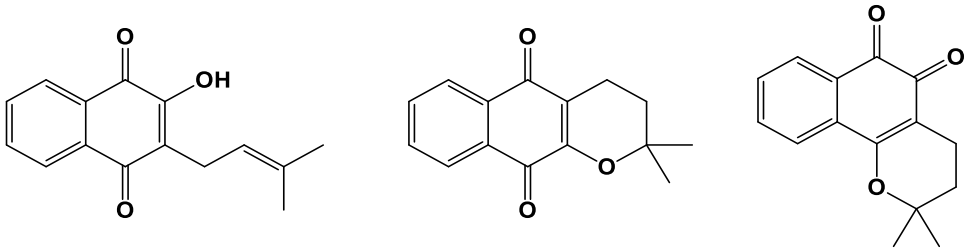
Tabla 2. Estudio SAR asociado con una serie de inhibidores de GSK3.



Compuesto	X	R	Ki GSK3 (μM)
XXIV	N		0,024
XXV	N		>2,0
XXVI	N		0,11
XXVII	N		23
XXVIII	N		0,25
XXIX	CH		2,5

1.7. Quinonas Naturales y Sintéticas con propiedades tripanosomicidas

En la continua búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas, como potenciales agentes antichagásicos, distintos reportes han descrito el efecto de varios compuestos de origen natural o de nuevas moléculas sintéticas contra *T. cruzi*,(*53, 54*) incluyendo diversos tipos de quinonas, en especial las naftoquinonas. Algunos ejemplos de naftoquinonas naturales son el lapachol (**XXX**), la α-lapachona (**XXXI**) y la β-lapachona (**XXXII**) (**Figura 10**), que fueron originalmente aisladas del ***duramen*** de los árboles de la familia *Bignoniceae*. La β-lapachona induce la liberación de radicales superóxido y peróxido de hidrogeno, produciendo alteraciones de las membranas nucleares y citoplasmáticas, así como la inhibición del ADN y del ARN y de la síntesis de proteínas, en amastigotes y tripomastigotes.(*55*)

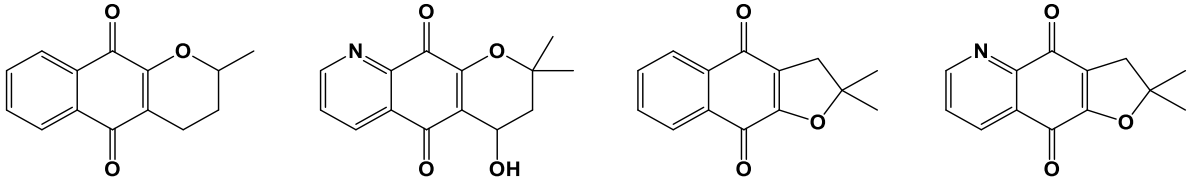


Lapachol (XXX) | **α-Lapachona (XXXI)** | **β-Lapachona (XXXII)**

Figura 10. Naftoquinonas naturales con actividad tripanosomicida.

Con algunas modificaciones estructurales simples, como los sustituyentes del anillo de tipo pirano, o cambiando este anillo por uno de tipo furano, podemos modificar la actividad de α-lapachona. También se logra cambiar la actividad de α-lapachona si la estructura presenta un heterociclo (**Figura 11**). Por ejemplo, el compuesto **XXXIII** posee un valor de IC_{50} = 24,5 μM (en epimastigote), valor similar al de la α-lapachona (24,7 μM, en epimastigote), pero al reemplazar el anillo bencénico por uno de piridina, como en el compuesto **XXXIV**, el valor de IC_{50} de

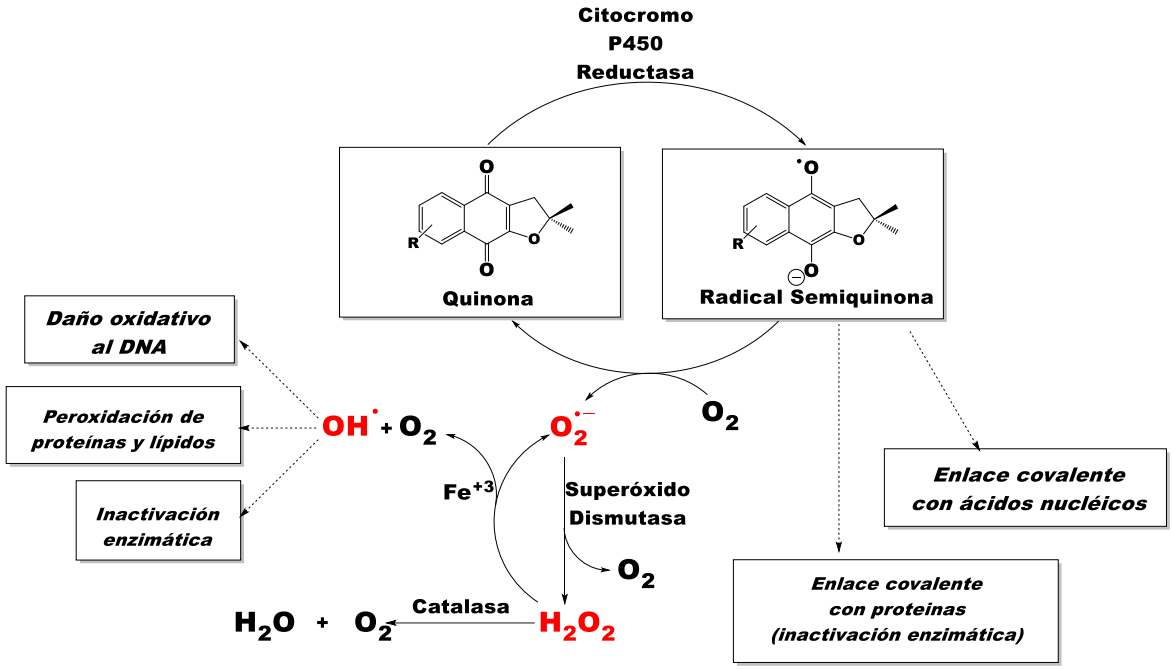
0,19 μM (en epimastigote), claramente indica un aumento en la actividad tripanosomicida.(*56*) Otro caso es el compuesto **XXXV**, que presentó un IC_{50} = 4 μM (en epimastigote). Nuevamente, cuando se reemplazó el anillo bencénico por el de piridina, el compuesto **XXXVI** resultante resultó ser también inferior (IC_{50} = 1,1 μM, en epimastigote).(*57*) De estos resultados se puede apreciar que la introducción de nitrógeno en el anillo bencénico provoca un incremento de la actividad tripanosomicida.(*56*)



(XXXIII) **(XXXIV)** **(XXXV)** **(XXXVI)**

Figura 11. Estructuras de naftoquinonas con actividad tripanosomicida.

El **Esquema 9** presenta el mecanismo de acción que se ha propuesto para las quinonas, que, como se indica, probablemente conlleva la generación de especies radicales de oxígeno (ROS), además de metabolitos electrofílicos.



Esquema 9. Posible mecanismo de acción tripanosomicida de quinonas.

Las quinonas son reducidas por la enzima citocromo P450 reductasa, produciendo un radical semiquinona que se une covalentemente al ADN y otras macromoléculas. En presencia de oxígeno, este radical reacciona regenerándose la quinona y formándose el anión superóxido, que se convierte en peróxido de hidrógeno por la acción de la enzima superóxido dismutasa.

Este peróxido puede convertirse en agua, por acción de la enzima catalasa y de glutatión peroxidasas. Así mismo, por medio de una reacción de Haber-Weiss puede convertirse en $OH^{\bullet}$, causando daño oxidativo.(*58*)

Otros compuestos de naturaleza quinonico han presentado propiedades biológicas interesantes, aunque para otro tipo de enfermedades. Se encuentran entre ellos como agentes antimaláricos (calotrixina A (**XXXVII**) y B (**XXXVIII**)), antibacterianos (cribostatina I (**XXXIX**) y estreptonigrina (**XL**)) y antitumorales (estreptonigrina, calotrixina A y B y griftazanona (**XLI**)) (**Figura 12**).

Estos compuestos incluyen una subunidad de 2-aminonaftoquinona (**XLII**), o 2-aminoquinolina e isoquinolin-5,8-dionas, o un grupo fenilamino sustituido en C-2. En los compuestos **XXXVII**, **XXXVIII** e **XXXIX** podemos apreciar cómo está presente la unidad la isoquinolin-5,8-diona (en color rojo). Además, los compuestos **XXXVII** y **XXXVIII** presentan una sustitución en C-2 que hace recordar a un grupo fenilamina (en azul). Esto mismo ocurre en el caso del **XLI**, en este caso, la forma estructural evoca a una 2-aminonaftoquinona (en verde). En la estructura del **XL** se observa que la porción de tipo quinona tiene una estructura de quinolin-5,8-diona (en café).

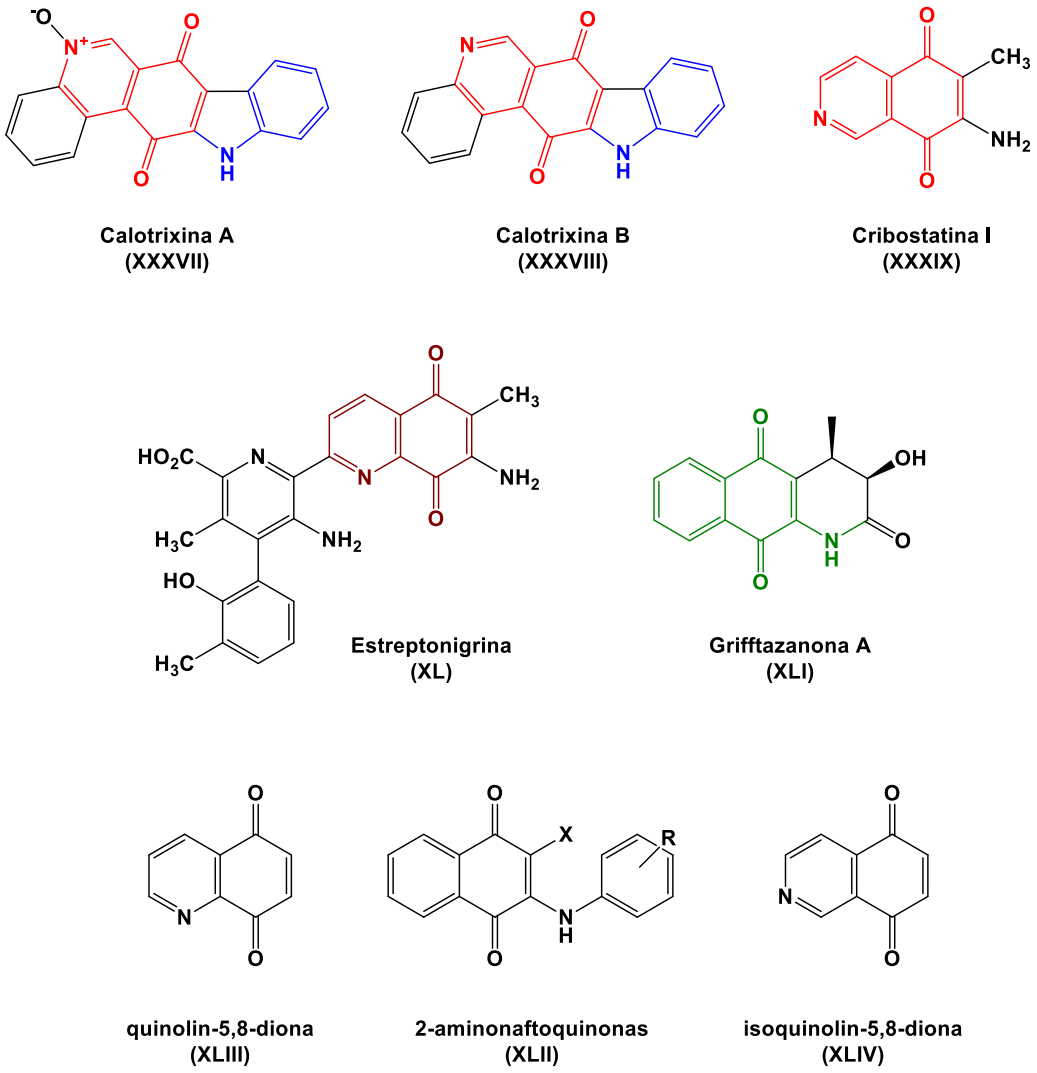


Figura 12. Estructuras de compuestos tipo 2 aminonaftoquinonas con actividad biológica.

Es conocido que la presencia del átomo de nitrógeno de tipo piridina permite la modificación de los efectos de sustituyentes en las posiciones adyacentes al sistema quinónico, en las propiedades electrónicas del sistema quinona, además de la modificación de la geometría y sus intermediarios de reducción.(*53*)

1.8. Hipótesis

Por cuanto al presente no hay ninguna droga de origen que pueda reemplazar las actuales drogas en uso, nifurtimox y benznidazol, pese a su relativa eficacia y diversos efectos colaterales, es razonable la búsqueda de nuevos agentes tripanosomicidas y para ello se están considerando nuevas diferencias bioquímicas entre el parásito y hospedero o el estudio de blancos enzimáticos de importancia metabólica. Por lo tanto, tomando como antecedentes, el papel que juega la L-butionina sulfoximina (L-BSO), en la homeostasis del glutatión y de tripanotión y el conocido efecto generador de ROS de quinonas heterocíclicas, este proyecto propone la siguiente **Hipótesis**:

Análogos sintéticos de L-BSO, tienen mayor actividad inhibitoria de la enzima GCL en el T. cruz que L-BSO y, por lo tanto, son mejores potenciadores de compuestos generadores de radicales libres como: nifurtimox, benznidazol y quinonas heterocíclicas. De esta forma se generaría una nueva estrategia combinada para la quimioterapia del mal de Chagas, la cual consiste en: Por un lado, debilitar al parásito en su principal mecanismo para defenderse del estrés oxidativo y, por otro lado, aumentar la producción de ROS.

1.9. Objetivos Generales y Específicos

1.9.1. Objetivos Generales

Diseñar, sintetizar y evaluar biológicamente, una serie de nuevos análogos alquílicos y heterocíclicos de L-butionina sulfoximina y de derivados de naftoquinonas y para su posterior evaluación del efecto tripanosomicida en cultivos de *Trypanosoma cruzi*.

1.9.2. Objetivos Específicos

1. Desarrollar una metodología sintética que permita obtener los derivados alquílicos de L-BSO.
2. Sintetizar una serie de derivados heterocíclicos de L-BSO.
3. Estudiar vías de síntesis de derivados naftoquinonas carbo- y heterocíclicas.
4. Caracterizar cada uno de los compuestos intermediarios y finales de las rutas sintéticas desarrolladas.
5. Estudiar la viabilidad y efecto en el contenido de tioles de análogos de L-BSO, solos o combinados con fármacos antichagásicos en cultivos de *T. cruzi*.
6. Evaluar el efecto tripanosomicida de los derivados quinónicos sintetizados, en diferentes estados morfológicos de *T. cruzi*.
7. Determinar la citotoxicidad de las quinonas evaluadas en cultivos de *T. cruzi*, en modelo de mamíferos y analizar su selectividad.
8. Analizar posibles relaciones estructura-actividad entre los compuestos sintetizados y sus resultados biológicos.

PARTE I

SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE L-BSO Y EVALUACIONES BIOLÓGICAS

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Técnicas Experimentales

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro RMN Brucker Avance 400 (400 MHz para RMN-^{1}H y 101 MHz para RMN-^{13}C). Para preparar las disoluciones se utilizó cloroformo deuterado ($CDCl_3$) conteniendo tetrametilsilano como referencia interna, dimetisulfóxido deuterado (DMSO-d_6) y agua deuterada (D_2O) en los casos que fue necesario. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm, en la escala δ y las constantes de acoplamiento *J* en Hertz (Hz).

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro Brucker modelo Vector 22. Los espectros de los compuestos solidos fueron realizados usando discos de KBr y los compuestos líquidos mediante film-líquido de KBr. El número de onda se expresa en cm^{-1}.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Kofler Thermogreate.

Los espectros de masas fueron obtenidos en el Exactive Plus Orbitrap MS Scientific HP 5988A, usando el electrón de impacto (EI) o la técnica de ionización química (IQ).

Las cromatografías en columna se hicieron sobre gel de sílice 60 Merck 230-400 mesh (flash, 0.04-0.063) y las cromatografías en capa fina (c.c.f.) se realizaron sobre gel de sílice 60 GF_{254} Merck.

Como reveladores se utilizaron una lámpara de UV (λ: 254 y 360 nm), la mezcla Hanessian y ninhidrina (5 % en MeOH).

Los filtrados sobre Celita se llevaron a cabo utilizando Celita 545 con tamaño de partícula 0.02-0.1 mm (Merck).

Los reactivos y disolventes fueron purificados y secados según los procedimientos estándares descritos en bibliografía.(*59*)

Las reacciones que se llevaron a cabo bajo atmosfera de nitrógeno o argón fueron realizadas en balones que previamente fueron secados a la llama con un mechero repetidas veces, mientras se purgaba con nitrógeno o argón.

Los experimentos de HPLC se llevaron a cabo en un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Series, equipo con una bomba cuaternaria (gradiente) y un detector de fluorescencia. La columna utilizada fue una columna de fase reversa Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 μm) (Merck), con un flujo de 1 mL/min y usando como fase móvil una disolución de camforsulfonato de litio al 0,25 % (p/v), en agua bidestilada y ajustada a pH 2,64 con hidróxido de litio (disolución A) y 1-propanol al 25 % (v/v) en A (disolución B).

El programa de elución fue de la siguiente manera:

- De 0 a 10 minutos : 95 % de solución A y 5 % de solución B.
- De 10 a 30 minutos : 5 % a 50 % de B en gradiente lineal.
- De 30 a 35 minutos : 50 % de B isocrático en A
- De 35 a 45 minutos : Se regresa a condiciones iniciales (95/5).

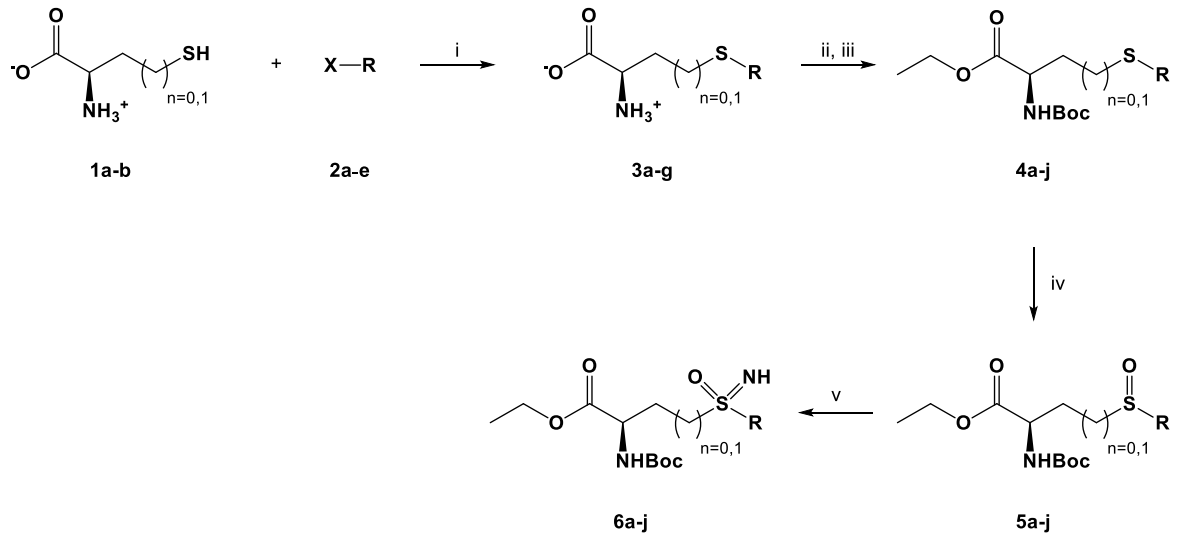
La longitud de onda utilizada para la detección fue 385 nm para la excitación y de 480 nm para la emisión.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, los ensayos biológicos se realizaron por triplicado y se consideran los promedios. Los análisis fueron desarrollados usando el programa Graphpad Prism 5.0.

2.2. Procedimientos Experimentales

2.2.1. Síntesis de análogos alquílicos de L-BSO

Se inició el trabajo sintético de esta tesis con la preparación de los análogos alquílicos de L-BSO, tal como se muestra en el **Esquema 10.**

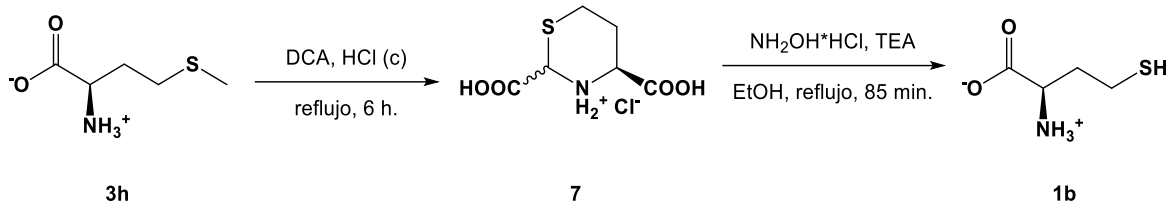


Reactivos y condiciones: i) NaOH 2 N, EtOH, t.a.,2-12 h. ii) HCl (g), EtOH, reflujo, 12 h, iii) Boc_2O, TEA anh., THF anh., t.a., 2 h., i v) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 ahn., N_2 (g), -78 °C, 4 h., v) MSH, CH_3CN anh., N_2 (g), t.a., 72 h.

Esquema 10. Esquema general se síntesis de sulfoximinas.

Como sustratos para obtener los análogos deseados, se utilizaron dos aminoácidos, como la L-cisteína (L-Cys, **1a**), que se encuentra disponible comercialmente, y la L-homocisteína (L-Hcys, **1b**), que fue preparada de acuerdo con la siguiente metodología:

2.2.1.1. Síntesis de L-homocisteína (1b)(*60*)



3h **7** **1b**

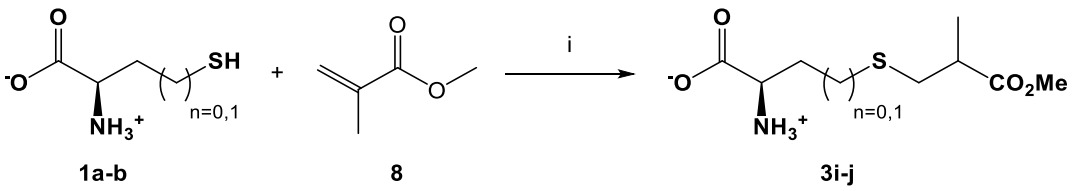
En un balón se disolvieron 7,46 g (50,0 mmol, 1,0 eq) de L-metionina (L-Met, **3h**) en 100 mL de ácido clorhídrico concentrado y se le añadieron 16,5 mL (200,0 mmol, 4,0 eq) de ácido dicloroacético y se calentó a reflujo (104 °C) por 6 horas. Luego de este tiempo la disolución se concentró al vacío, a 60 °C, hasta dejar un volumen de 30 ml y la mezcla se dejó a 5 °C durante la noche. El precipitado, correspondiente al producto **7**, fue filtrado y lavado con THF y secado.

Se disolvieron 4,55 g (20 mmol, 1,0 eq) de **7** en 100 mL de EtOH y se ajusta el pH a 7 con TEA. La mezcla se calentó a reflujo (78 °C) y se le añadió 20 mL de una disolución etanólica de hidrocloruro de hidroxilamina (0,5 mol /L) y se ajusta el pH a 6-7 inmediatamente con TEA. Luego de calentar por 25 minutos se le añadieron 20 ml de la solución etanólica de cloruro de hidroxilamina, se ajusta a pH 6-7 con TEA. Después de una hora a reflujo se deja enfriar por la noche y el precipitado formado se filtró, lavando con metanol y secado.

RMN-^{1}H (400 MHz, D_2O, δ, ppm): 2,07-2,25 (m, 2H, CH_2); 2,59-2,74 (m, 2H, CH_2); 3,89 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, D_2O, δ, ppm): 20,24 (CH_2); 35,00 (CH_2); 53,99 (CH); 174,58 (CO).

De igual manera, se planteó hacer una reacción de Michael a partir de **1a** y **1b**, para lo cual se utilizó metacrilato de metilo (**8**), obteniéndose así los compuestos **3i-j** (**Esquema 11**). Finalmente, ya que posee un esqueleto carbonado similar, se usó la L-metionina (**3h**) como otro precursor de análogos de L-BSO.

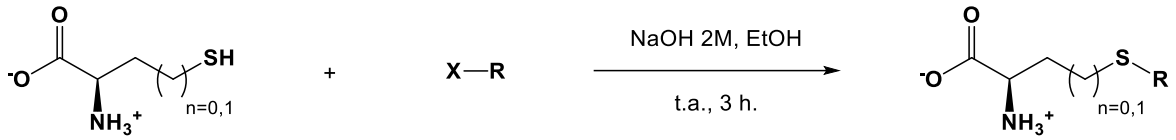


1a-b **8** **3i-j**

Reactivos y condiciones: i) NaOH cat., EtOH/H_2O (1:1), N_2 (g), t.a., 2 h.

Esquema 11. Reacción de Michael para la obtención de los análogos **3i** y **3j**.

2.2.1.2. Procedimiento general de alquilación (3a-g)



1a n = 0
1b n = 1

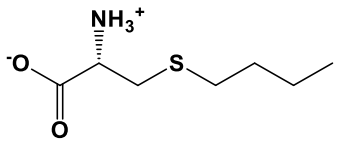
2a X = I, R = Et
2b X = I, R = Pr
2c X = Br, R = Bu
2d X = Br, R = Pent
2e X = Br, R = Hex

3a n = 0, R = Bu
3b n = 0, R = Hex
3c n = 1, R = Et
3d n = 1, R = Pr
3e n = 1, R = Bu
3f n = 1, R = Pent
3g n = 1, R = Hex

En un balón se disolvieron 1,0 g (8,26 mmol, 1,0 eq) de L-cisteína (**1a**) en 6 mL de hidróxido de sodio 2 M y 10 mL de EtOH, agitándose a temperatura ambiente. A esta disolución se le añadió 1,1 mL (9,91 mmol, 1,2 eq) de 1-bromobutano (**2c**) y se continuó agitando por 3 horas. Luego de este tiempo se agrega a la mezcla ácido clorhídrico concentrado hasta pH 6-7 y se enfrió con un baño de hielo, formándose un precipitado blanco, el cual se filtró y se lavó con etanol y éter etílico. Se concentró el éter y se vuelve a ajustar el pH hasta 6-7, se enfrió y nuevamente se filtró, obteniéndose un sólido blanco.

a) Acido (*R*)-2-amino-3-(butillitio)-propanoico (**3a**)

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 272-275 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +13,00 ° (c = 0,05, DMSO).

Rendimiento: 85 %

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 0,88 (dt, *J* = 7,3 Hz, *J'* = 3,6 Hz, 3H, CH_3); 1,35 (m, 2H, CH_2); 1,48 (dd, *J* = 16,0 Hz, *J'* = 6,9 Hz, 1H, C*H*H); 1,60 (dt, *J* = 12,8 Hz, *J'* = 7,3 Hz, 1H, CH*H*); 2,50 (dd, *J* = 7,0 Hz, *J'* = 3,4 Hz, 2H, CH_2); 2,70 (m, 2H, CH_2); 3,08 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H, CH).

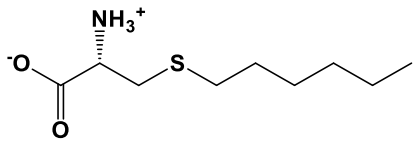
RMN-^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 13,49 (CH_3); 20,88 (CH_2); 21,27 (CH_2); 31,15 (CH_2); 37,34 (CH_2); 53,95 (CH); 173,59 (CO)

IR (KBr, cm^{-1}): 3431 (NH), 2927 (CH_2), 2098 (CH_2), 1619 (CO), 1304 (CH_2SCH_2).

EM (IQ, *m/z*): 178 $[M+H]^+$ (73 %); 161 $[M-NH_3]$ (100 %)

b) Acido (*R*)-2-amino-3-(hexiltio)-propanoico (**3b**)

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 265-269 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +17,56 ° (c = 0,04, DMSO).

Rendimiento: 65 %

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 0,86 (t, *J* = 6,80 Hz, 3H, CH_3); 1,26 (dd, *J* = 9,2 Hz, *J'* = 6,2 Hz, 6H, 3xCH_2); 1,50 (dt, *J* = 15,8 Hz, *J'* = 7,9 Hz, 1H, C*H*H); 1,59 (m, 1H, CH*H*); 2,48 (m, 2H, CH_2); 2,68 (m, 2H, CH_2); 3,05 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H, CH).

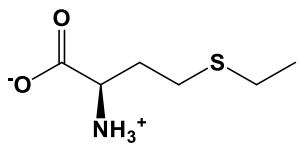
RMN-^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 13,86 (CH_3); 21,33 (CH_2); 21,67 (CH_2); 21,93 (CH_2); 28,33 (CH_2); 30,88 (CH_2); 39,37 (CH_2); 53,75 (CH); 170,18 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3431 (NH), 2958 (CH_2), 2927 (CH_2), 1304 (CH_2SCH_2).

EM (IQ, *m/z*): 206 $[M+H]^+$ (37 %); 189 $[M-NH_3]$ (100 %).

c) Acido (*R*)-2-amino-4-(etiltio)-butanoico (**3c**)

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 261-264 °C

$[\alpha]_D^{20}$: + 8,45° (c = 0,74, H_2O).

Rendimiento: 65 %

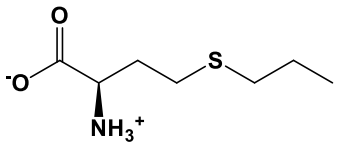
RMN-^{1}H (400 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 1,32 (t, *J* =7,4 Hz, 3H, CH_3); 1,83-1,94 (m, 1H, C*H*H); 1,95-2,05 (m, 1H, CH*H*); 2,64-2,73 (m, 4H, 2xCH_2); 3,40-3,45 (m, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 14,16 (CH_3), 25,16 (CH_2), 27,17 (CH_2), 34,86 (CH_2), 55,60 (CH), 182,81 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3422 (NH), 2967 (CH_2), 1655 (CO), 1412 (CH_2SCH_2)

d) Acido (*R*)-2-amino-4-(propiltio)-butanoico (**3d**)

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 264-267 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +10,26 ° (c = 0,62, H_2O).

Rendimiento: 78 %

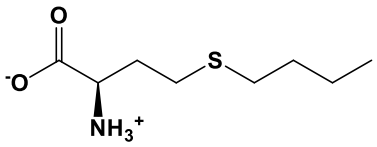
RMN-^{1}H (400 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 1,00-1,06 (m, 3H, CH_3); 1,62-1,73 (m, 2H, CH_2); 1,82-1,92 (m, 1H, C*H*H); 1,93-2,04 (m, 1H, CH*H*); 2,61-2,70 (m, 4H, 2xCH_2); 3,38-3,43 (m, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 12,97 (CH_3); 22,38 (CH_2); 27,63 (CH_2); 33,28 (CH_2); 34,96 (CH_2); 55,58 (CH); 182,84 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3424 (NH), 2959 (CH_2), 1655 (CO), 1413 (CH_2SCH_2).

e) Acido (*R*)-2-amino-4-(butiltio)-butanoico (**3e**)

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 269-272 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +8,14 ° (c = 0,64, H_2O).

Rendimiento: 76 %

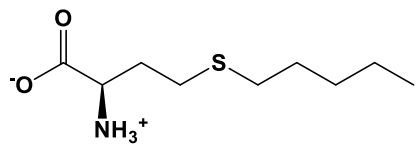
RMN-^{1}H (400 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 0,92 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH_3); 1,35-1,47 (m, 2H, CH_2); 1,55-1,64 (m, 2H, CH_2), 1,76-1,87 (m, 1H, C*H*H); 1,88-1,99 (m, 1H, CH*H*); 2,58-2,65 (m, 4H, 2xCH_2); 3,35 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 12,98 (CH_3); 21,37 (CH_2); 27,59 (CH_2); 30,79 (CH_2); 30,92 (CH_2); 34,80 (CH_2); 55,51 (CH); 182,72 (CO)

IR (KBr, cm^{-1}): 3474 (NH), 2955 (CH_2), 1655 (CO), 1414 (CH_2SCH_2).

f) Acido (*R*)-2-amino-4-(pentiltio)-butanoico (**3f**)

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 265-269 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: + 8,32 ° (c = 0,52, H_2O).

Rendimiento: 81 %

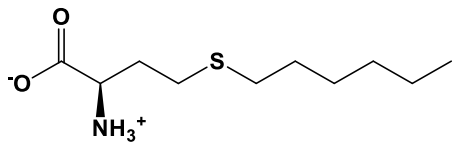
RMN-^{1}H (400 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 0,92 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, CH_3); 1,33-1,43 (m, 4H, 2xCH_2); 1,59-1,68 (m, 2H, CH_2); 1,77-1.88 (m, 1H, C*H*H); 1,90-2,02 (m, 1H, CH*H*); 2,59-2,67 (m, 4H, 2xCH_2); 3,32-3,39 (m, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 13,49 (CH_3); 21,76 (CH_2); 27,78 (CH_2); 28,56 (CH_2); 30,47 (CH_2); 31,24 (CH_2); 34,97 (CH_2); 55,60 (CH); 182,62 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3629 (NH), 2956 (CH_2), 2856 (CH_2), 1655 (CO), 1414 (CH_2SCH_2).

g) Acido (*R*)-2-amino-4-(hexiltio)-butanoico (**3g**)

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 262-265 °C

$[\alpha]_D^{20}$: + 12,15 ° (c = 0,42, H_2O).

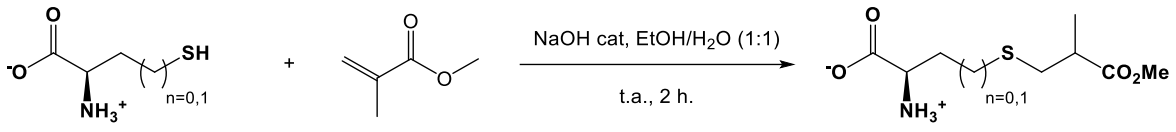
Rendimiento: 76 %

RMN-^{1}H (400 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 0,88-0,96 (m, 3H, CH_3); 1,29-1,39 (m, 4H, 2xCH_2); 1,58-1,69 (m, 2H, CH_2); 1,76-1,87 (m, 1H, C*H*H); 1,94-2,06 (m, 1H, CH*H*); 2,56-2,69 (m, 4H, 2xCH_2); 3,34-3,41 (m, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 13,82 (CH_3); 22,43 (CH_2); 28,34 (CH_2); 29,28 (CH_2), 31,31 (CH_2); 31,60 (CH_2); 31,68 (CH_2); 35,36 (CH_2); 55,73 (CH); 182,24 (CO)

IR (KBr, cm^{-1}): 3422 (NH), 2955 (CH_2), 2855 (CH_2), 1655 (CO), 1414 (CH_2SCH_2).

2.2.1.3. Procedimiento general de alquilación vía reacción de Michael (3i-j)



1a n = 0
1b n = 1

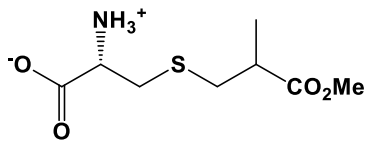
8

3i n = 0
3j n = 1

En un balón, bajo atmosfera de nitrógeno, se disolvieron 1,0 g (8,26 mmol, 1,0 eq) de L-Cys (**1a**) en 20 mL de una mezcla EtOH/H_2O (1:1). A esta mezcla se le añadió una cantidad catalítica de NaOH y 2,1 mL (19,82 mmol, 2,4 eq) de metacrilato de metilo (**8**) y se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. Transcurrido este tiempo se concentró a sequedad, obteniéndose un sólido blanco, que se utilizó en el siguiente paso sin mayor purificación.

a) Acido (*R*)-2-amino-3-(3-metoxi-(*S*,*R*)-2-metil-3-oxopropiltio)-propanoico (**3i**)

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 105-108 °C

$[\alpha]_D^{20}$: -9,85 ° (c = 0,06, H_2O).

Rendimiento: 98 %

RMN-^{1}H (400 MHz, D_2O, δ, ppm): 1,24 (d, *J* = 5,88 Hz, 3H, CH_3); 2,85 (m, 3H, CH + CH_2); 3,02 (m, 2H, CH_2); 3,75 (s, 3H, OCH_3); 3,84 (m, 1H, CH).

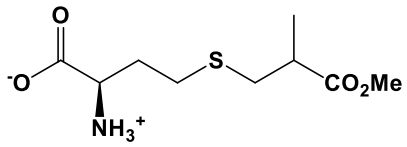
RMN-^{13}C (101 MHz, D_2O, δ, ppm): 16,79 (CH_3); 34,25 (CH_2); 35,32 (CH_2); 40,65 (CH); 53,19 (CH_3); 54,56 (CH); 174,92 (CO); 179, 05 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3433 (NH); 2958 (CH_2); 2927 (CH_2); 1735 (CO); 1619 (NH_3^+); 1304 (CH_2SCH_2).

EM (IQ, *m/z*): 222$[M+H]^+$ (100 %).

b) Acido (*R*)-2-amino-4-(3-metoxi-(*S*,*R*)-2-metil-3-oxopropiltio)-butanoico (**3j**)

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 176-178 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 7,26 ° (c = 0,39, H_2O).

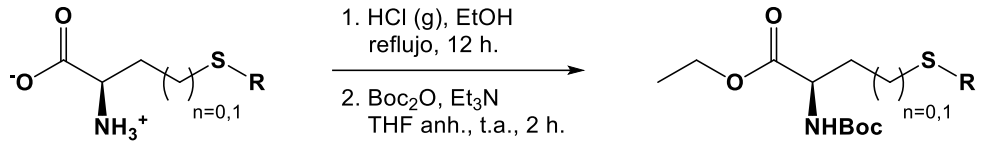
Rendimiento: 89 %

RMN-^{1}H (400 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 0,88-0,96 (m, 3H, CH_3); 1,29-1,39 (m, 4H, 2xCH_2); 1,58-1,69 (m, 2H, CH_2); 1,76-1,87 (m, 1H, C*H*H); 1,94-2,06 (m, 1H, CH*H*); 2,56-2,69 (m, 4H, 2xCH_2); 3,34-3,41 (m, 1H, CH).

RMN-13C (101 MHz, D_2O+H_2O, δ, ppm): 13,82 (CH_3); 22,43 (CH_2); 28,34 (CH_2); 29,28 (CH_2), 31,31 (CH_2); 31,60 (CH_2); 31,68 (CH_2); 35,36 (CH_2); 55,73 (CH); 182,24 (CO)

IR (KBr, cm^{-1}): 3191 (NH), 2919 (CH_2), 2788 (CH_2), 1676 (CO), 1494 (NH_3^+), 1130 (CH_2SCH_2).

2.2.1.4. Procedimiento general de esterificación y protección del grupo amino (4a-j)



3a n = 0, R = Bu
3b n = 0, R = Hex
3c n = 1, R = Et
3d n = 1, R = Pr
3e n = 1, R = Bu
3f n = 1, R = Pent
3g n = 1, R = Hex
3h n = 1, R = Me
3i n = 0, R = isobutirato de metilo
3j n = 1, R = isobutirato de metilo

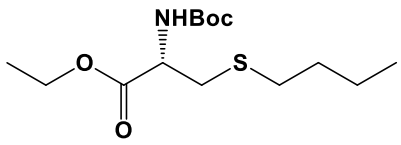
4a n = 0, R = Bu
4b n = 0, R = Hex
4c n = 1, R = Et
4d n = 1, R = Pr
4e n = 1, R = Bu
4f n = 1, R = Pent
4g n = 1, R = Hex
4h n = 1, R = Me
4i n = 0, R = isobutirato de etilo
4j n = 1, R = isobutirato de etilo

En un balón de dos bocas se disolvieron 887,2 mg (5,43 mmol, 1,0 eq) de **3c** en 30 mL de EtOH y se enfrió a 0 °C. Se le conectó un sistema de burbujeo por el cual se le hizo pasar HCl (g), el cual se prepara *in situ* mediante la reacción entre ácido sulfúrico concentrado y cloruro de sodio, por un periodo de 2 horas. Luego de saturada la disolución, se calentó a reflujo por 12 horas. Transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente en el rotavapor y el residuo obtenido se utilizó sin mayor purificación.

En un balón, seco y bajo atmosfera de nitrógeno, se disolvió el residuo anterior en 4,2 mL de THF anhidro y se enfrió a 0 °C. A esta disolución se le añadieron 1,0 mL (7,41 mmol, 2,2 eq) de trietilamina anhidra y 812,0 mg (3,71 mmol, 1,1 eq) de di-*tert*-butil dicarbonato (Boc_2O, **9**) disueltos en 4,2 mL de THF anhidro y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. La reacción se monitorio por c.c.f (AcOEt/hexano 1:7), comprobándose la desaparición del sustrato de partida, se le añadieron 6,7 ml de agua y se extrajo con AcOEt (3 x 8,6 mL), la fase orgánica se lavó con solución saturada de NaCl (2x), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo obtenido se purifico por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt/hexano 1:7).

a) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(butiltio)propanoato de (*R*)-etilo (**4a**).

Apariencia: Aceite amarillo pálido



$[\alpha]_D^{20}$: +14.63 ° (c = 0,02, $CHCl_3$).

Rendimiento: 95 %

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,85 (t, *J* = 7,15 Hz, 3H, CH_3), 1,27 (m, 5H, CH_2 + CH_3), 1,35 (s, 9H, 3xCH_3), 1,49 (m, 2H, CH_2), 2,47 (t, *J* = 7,06 Hz, 2H, CH_2), 2,92 (d, *J* = 5,06 Hz, 2H, CH_2), 4,18 (d, *J* = 6,20 Hz, 2H, OCH_2), 4,46 (s, 1H, CH), 5,39 (d, *J* = 7,79 Hz, 1H, NH).

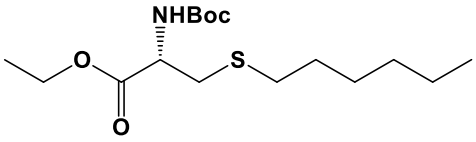
RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,60 (CH_3), 14,10 (CH_2), 21,82 (CH_2), 28,26 (3xCH_3), 31,55 (CH_2), 32,27 (CH_2), 34,36 (CH_2), 53,31 (CH), 61,59 (CH_2), 79,92 (C), 155,12 (CO), 171,11 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3365 (NH), 1751 (CO), 1717 (CO), 1313 (CH_2SCH_2).

EM (IQ, *m/z*): 306 $[M+H]^+$ (35 %), 278 (100 %).

b) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(hexiltio)propanoato de (*R*)-etilo (**4b**).

Apariencia: Aceite amarillo pálido.



$[\alpha]_D^{20}$: +6,25 ° (c = 0,02, $CHCl_3$).

Rendimiento: 85 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,82 (t, *J* = 6,44 Hz, 3H, CH_3), 1,26 (m, 9H, 2xCH_2 + CH_3), 1,39 (s, 9H, 3xCH_3), 1,50 (d, *J* = 5,4 Hz, 2H, CH_2), 2,46 (t, *J* = 7,12 Hz, 2H, CH_2), 2,91 (d, *J* = 4,96 Hz, 2H, CH_2), 4,18 (dd, *J* = 36,4 Hz, *J'* = 8,2 Hz, 2H, OCH_2), 4,44 (s, 1H, CH), 5,39 (d, *J* = 7,75 Hz, 1H, NH).

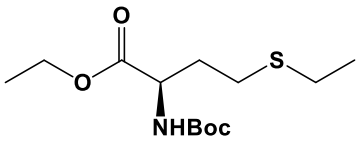
RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,98 (CH_3), 14,10 (CH_3), 22,49 (CH_2), 28,25 (3xCH_3), 28,38 (CH_2), 29,44 (CH_2), 31,33 (CH_2), 32,70 (CH_2), 34,36 (CH_2), 53,31 (CH), 61,57 (CH_2), 79,88 (C), 155,12 (CO), 171,10 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3373 (NH), 1750 (CO), 1717 (CO), 1313 (CH_2SCH_2).

EM (IQ, *m/z*, %): 334 $[M+H]^+$ (78 %), 278 $[M–(CH_3)_3C]$ (88 %), 160 (100%).

c) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino-4-(etilltio)butanoato de etilo (**4c**).

Apariencia: Aceite incoloro.



$[\alpha]_D^{20}$: + 10,51 ° (c = 0,76, $CHCl_3$).

Rendimiento: 61 %.

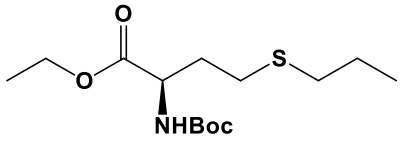
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,21-1,31 (m, 6H, CH_3 + $OCH_2C\underline{H}_3$), 1,43 (s, 9H, 3xCH_3), 1,84-1,96 (m, 1H, C*H*H), 2,04-2,17 (m, 1H, CH*H*), 2,48-2,59 (m, 4H, 2xCH_2), 4,19 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,36 (sa, 1H, CH), 5,13 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,06 (CH_3), 14,55 (CH_3), 25,72 (CH_2), 27,25 (CH_2), 28,20 (3xCH_3), 32,60 (CH_2), 52,88 (CH), 61,28 (CH_2), 79,67 (C), 155,30 (CO), 172,20 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3347 (NH), 2924 (CH_2), 2893 (CH_2), 1772 (CO), 1126 (CH_2SCH_2).

d) Datos espectroscópicos de 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino-4-(propiltio)butanoato de etilo (**4d**).

Apariencia: Aceite incoloro.



$[\alpha]_D^{20}$: + 10,48 ° (c = 0,65, $CHCl_3$).

Rendimiento: 57 %.

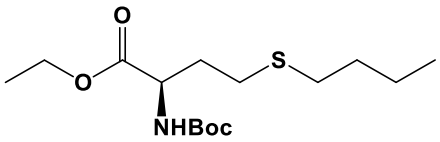
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,96 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,23-1,30 (m, 3H, CH_3), 1,42 (s, 9H, 3xCH_3), 1,53-1,63 (m, 2H, CH_2), 1,83-1,95 (m, 1H, C*H*H), 2,04-2,15 (m, 1H, CH*H*), 2,43-2,56 (m, 4H, 2xCH_2), 4,18 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,36 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, CH), 5,13 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,30 (CH_3), 14,05 (CH_3), 22,72 (CH_2), 27,68 (CH_2), 28,19 (3xCH_3), 32,67 (CH_2), 34,02 (CH_2), 52,88 (CH), 61,24 (CH_2), 79,63 (C), 155,28 (CO), 172,19 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3384 (NH), 2945 (CH_2), 2894 (CH_2), 1763 (CO), 1124 (CH_2SCH_2).

e) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino-4-(butiltio)butanoato de etilo (**4e**).

Apariencia: Aceite amarillento.



$[\alpha]_D^{20}$: + 9,58 ° (c = 0,74, $CHCl_3$).

Rendimiento: 59 %.

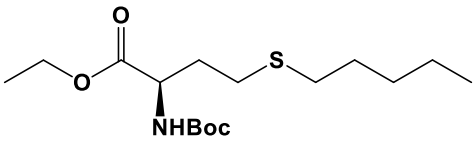
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,86 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,24 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH_3), 1,30-1,38 (m, 2H, CH_2), 1,40 (s, 9H, 3xCH_3), 1,46-1,55 (m, 2H, CH_2), 1,80-1,92 (m, 1H, C*H*H), 2,00-2,12 (m, 1H, CH*H*), 2,43-2,53 (m, 4H, 2xCH_2), 4.16 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,33 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H, CH), 5,15 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,69 (CH_3), 14,21 (CH_3), 21,99 (CH_2), 27,87 (CH_2), 28,35 (3xCH_3), 31,67 (CH_2), 31,83 (CH_2), 32,90 (CH_2), 53,03 (CH), 61,47 (CH_2), 79,90 (C), 155,39 (CO), 172,33 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3358 (NH), 2961 (CH_2), 2872 (CH_2), 1717 (CO), 1165 (CH_2SCH_2).

f) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino-4-(pentiltio)butanoato de etilo (**4f**).

Apariencia: Aceite amarillento.



$[\alpha]_D^{20}$: + 7,16 ° (c = 0,58, $CHCl_3$).

Rendimiento: 60 %.

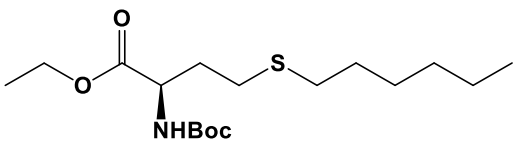
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,87 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, CH_3), 1,26 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH_3), 1,29-1,36 (m, 2H, CH_2), 1,42 (s, 9H, 3xCH_3), 1,50-1,58 (m, 2H, CH_2), 1,82-1,94 (m, 1H, C*H*H), 2,00-2,14 (m, 1H, CH*H*), 2,42-2,57 (m, 6H, 3xCH_2), 4,18 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,35 (sa, 1H, CH), 5,14 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H, NH)

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,03 (CH_3), 14,26 (CH_3), 22,37 (CH_2), 27,93 (CH_2), 28,40 (3xCH_3), 29,33 (CH_2), 31,13 (CH_2), 32,21 (CH_2), 32,99 (CH_2), 53,09 (CH), 61,53 (CH_2), 79,99 (C), 155,43 (CO), 172,39 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3356 (NH), 2929 (CH_2), 2859 (CH_2), 1715 (CO), 1166 (CH_2SCH_2).

g) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino-4-(hexiltio)butanoato de etilo (**4g**).

Apariencia: Aceite amarillento.



$[\alpha]_D^{20}$: + 6,57 ° (c = 0,62, $CHCl_3$).

Rendimiento: 71 %.

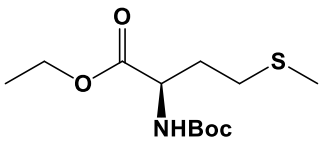
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,85 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, CH_3), 1,25 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1,29-1,37 (m, 3H, CH_2 + C*H*H), 1,41 (s, 9H, 3xCH_3), 1,48-1,58 (m, 3H, CH_2 + CH*H*), 1,80-1,93 (m, 1H, C*H*H), 2,01-2,13 (m, 1H, CH*H*); 2,41-2,55 (m, 6H, 3xCH_2), 4,16 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,30-4,39 (m, 1H, CH), 5,15 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,08 (CH_3), 14,23 (CH_3), 22,60 (CH_2), 27,88 (CH_2), 28,37 (3xCH_3), 28,62 (CH_2), 29,57 (CH_2), 31,49 (CH_2), 32,19 (CH_2), 32,92 (CH_2), 53,03 (CH), 61,51 (CH_2), 79,95 (C), 155,42 (CO), 172,37 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3356 (NH), 2928 (CH_2), 2857 (CH_2), 1715 (CO), 1514 (CH_2SCH_2).

h) Datos espectroscópicos de 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-4-(metiltio)butanoato de (*S*)-etilo (**4h**).

Apariencia: Aceite amarillo pálido.



$[\alpha]_D^{20}$: +7,33 ° (c = 0,075, $CHCl_3$).

Rendimiento: 69 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,15 (m, 3H, CH_3), 1,34 (s, 9H, 3xCH_3), 1,84 (dt, *J* = 14,7 Hz, *J'* = 7,5 Hz, 2H, CH_2), 1,99 (s, 3H, CH_3), 2,44 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, CH_2), 4,01 (m, 2H, OCH_2), 4,27 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, CH), 5,29 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, NH).

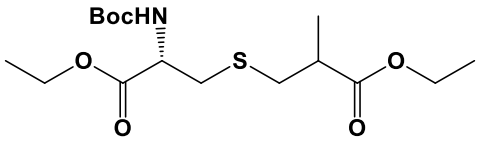
RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,04 (CH_3), 15,25 (CH_3), 28,18 (3xCH_3), 29,91 (CH_2), 32,01 (CH_2), 53,45 (CH), 61,25 (CH_2), 79,61 (C), 155,30 (CO), 171,88 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3373 (NH), 1717 (CO), 1300 (CH_2SCH_2).

EM (IQ, *m/z*): 278 $[M+H]^+$ 87 %), 242 (100 %).

i) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((3-etoxi-(*S*,*R*)-2-metil-oxoproil)tio)propanoato de (2*R*)-etilo (**4i**).

Apariencia: Aceite amarillo pálido.



$[\alpha]_D^{20}$: +8,68 ° (c = 0,04, $CHCl_3$).

Rendimiento: 60 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,16 (m, 9H, 3xCH_3), 1,38 (s, 9H, 3xCH_3), 2,56 (m, 2H, CH_2), 2,76 (dd, *J* = 11,3 Hz, *J'* = 6,1 Hz, 1H, CH), 2,91 (d, *J* = 3,81 Hz, 2H, CH_2), 4,10 (m, 4H, 2xOCH_2), 4,43 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, CH), 5,42 (d, *J* = 7,80 Hz, 1H, NH).

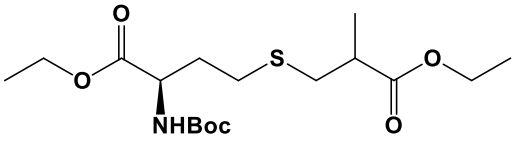
RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,12 (2xCH_3), 16,72 (CH_2), 28,23 (3xCH_3), 35,03 (CH_2), 35,89 (CH_2), 40,12 (CH), 53,04 (CH), 60,62 (CH_2), 61,68 (CH_2), 79,99 (C), 155,13 (CO), 170,89 (CO), 174,84 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3374, 1736, 1503, 1304.

EM (IQ, *m/z*): 363 [M+H]+ (78 %), 277 [M-(CH3)C] (88 %), 159 (100%).

j) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino-4-((3-etoxi-2-metil-3-oxopropil)tio)butanoato de etilo (**4j**).

Apariencia: Aceite amarillento.



[α]$_D^{20}$: +8,12 ° (c = 0,51, $CHCl_3$).

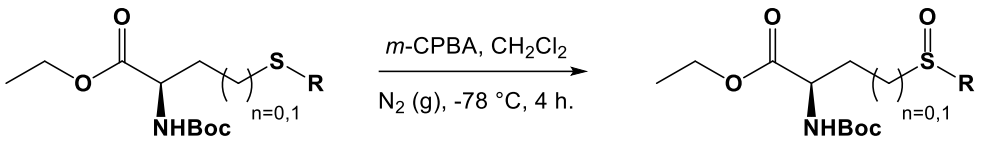
Rendimiento: 63 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,17-1,27 (m, 9H, 3xCH_3), 1,40 (s, 9H, 3xCH_3), 1,80-1,93 (m, 1H, C*H*H), 2,00-2,12 (m, 1H, CH*H*), 2,48-2,65 (m, 4H, CH_2 + CH + C*H*H), 2,75-2,83 (m, 1H, CH*H*), 4,08-4,20 (m, 4H, 2xOCH_2), 4,27-4,37 (m, 1H, CH), 5,14 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,17 (CH_3), 14,22 (CH_3), 16,81 (CH_3), 16,84 (CH_3), 28,31 (3xCH_3), 28,49 (CH_2), 32,74 (CH_2), 32,80 (CH_2), 35,40 (CH_2), 35,53 (CH_2), 40,20 (CH), 52,91 (CH), 60,60 (CH_2), 61,47 (CH_2), 79,89 (C), 155,37 (CO), 172,21 (CO), 175,05 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3366 (NH), 2978 (CH_2), 2934 (CH_2), 1733 (CO), 1515 (CH_2SCH_2), 1166 (SO).

2.2.1.5. Procedimiento general para la síntesis de sulfóxidos (5a-j)

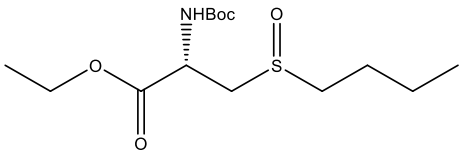


4a n = 0, R = Bu
4b n = 0, R = Hex
4c n = 1, R = Et
4d n = 1, R = Pr
4e n = 1, R = Bu
4f n = 1, R = Pent
4g n = 1, R = Hex
4h n = 1, R = Me
4i n = 0, R = isobutirato de etilo
4j n = 1, R = isobutirato de etilo

5a n = 0, R = Bu
5b n = 0, R = Hex
5c n = 1, R = Et
5d n = 1, R = Pr
5e n = 1, R = Bu
5f n = 1, R = Pent
5g n = 1, R = Hex
5h n = 1, R = Me
5i n = 0, R = isobutirato de etilo
5j n = 1, R = isobutirato de etilo

En un balón, seco y bajo atmosfera de nitrógeno, se disolvieron 483,8 mg (1,66 mmol, 1,0 eq) del sulfuro **4c** en 5,2 mL de diclorometano anhidro, y la mezcla se enfrió a -78 °C en un baño de acetona/CO_2. Luego se añadieron 484,0 mg (2,16 mmol, 1,3 eq) de *m*-CPBA (77 % pureza) sobre esta mezcla y se agitó a -78 °C por 4 horas, monitoreando la reacción por c.c.f (MeOH/CH_2Cl_2 al 3 % v/v), si transcurrido este tiempo aun quedara sulfuro sin reacciones se le añaden 39,7 mg (0,23 mmol, 0,14 eq) de *m*-CPBA y se agitó por 30 minutos más. Una vez finalizada la oxidación se agregó bisulfito de sodio y se eliminó el disolvente en el rotavapor. Al residuo obtenido se le añadió agua y AcOEt, la fase orgánica se lavó con disolución saturada de $NaHCO_3$ (3 x 4,0 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de sílica gel ($CHCl_3$ o MeOH/$CHCl_3$ al 2 % v/v).

a) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((*S*)-butilsulfinil)propanoato de (2*R*)-etilo (**5aa**).



Apariencia: Solido blanco

Punto de fusión: 86-89 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +1,98 ° (c 0,10, $CHCl_3$).

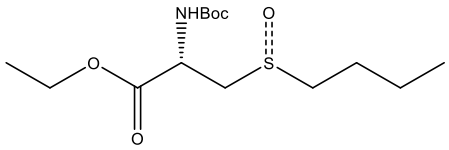
Rendimiento: 9 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,94 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,30 (m, 5H, CH_2 + CH_3), 1,44 (s, 9H, 3xCH_3), 1,79 (m, 2H, CH_2), 3,01 (dd, *J* = 9,7 Hz, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH_2), 3,64 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H, CH_2), 4,26 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,60 (dd, *J* = 11,8 Hz, *J* = 5,0 Hz, 1H, CH), 5,66 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,50 (CH_3), 14,12 (CH_3), 21,68 (CH_2), 28,19 (3xCH_3), 31,31 (CH_2), 50,42 (CH), 53,31 (CH_2), 55,07 (CH_2), 62,57 (CH_2), 80,74 (C), 155,19 (CO), 169,24 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3365 (NH), 1746 (CO), 1698 (CO), 1313 (CH_2SCH_2), 1057 (SO).

b) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((*R*)-butilsulfinil)propanoato de (2*R*)-etilo (**5ab**).



Apariencia: Solido blanco

Punto de fusión: 73-75 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -10,62 ° (c 0,10, $CHCl_3$).

Rendimiento: 66 %

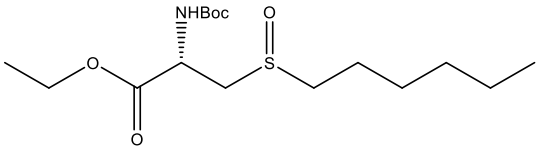
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,89 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1,22 (m, 5H, CH_2 + CH_3), 1,36 (s, 9H, 3xCH_3), 1,67 (m, 2H, CH_2), 2,70 (dd, *J* = 15,4 Hz, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH_2), 3,10 (m, 2H, CH_2), 4,16 (m, 2H, OCH_2), 4,53 (m, 1H, CH), 5,79 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,64 (CH_3), 14,09 (CH_3), 22,65 (CH_2), 28,19 (3xCH_3), 31,59 (CH_2), 49,81 (CH), 52,59 (CH_2), 54,19 (CH_2), 62,13 (CH_2), 80,30 (C), 155,36 (CO), 170,44 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3391 (NH), 1736 (CO), 1703 (CO), 1288 (CH_2SCH_2), 1020 (SO).

c) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((*S*)-hexilsulfinil)propanoato de (2*R*)-etilo (**5ba**).

Apariencia: Solido blanco



Punto de fusión: 84-87 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +0,94 ° (c 0,11, $CHCl_3$)

Rendimiento: 19 %.

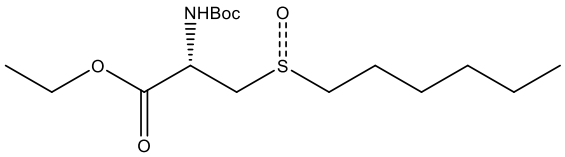
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,94 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,31 (m, 7H, 2XCH_2 + CH_3), 1,46 (s, 9H, 3xCH_3), 1,79 (m, 4H, 2xCH_2), 3,01 (dd, *J* = 9,7 Hz, *J* = 6,4 Hz, 2H, CH_2), 3,64 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H, CH_2), 4,26 (m, 2H, OCH_2), 4,60 (dd, *J* = 11,8 Hz, *J* = 5,0 Hz, 1H, CH), 5,66 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,98 (CH_3), 14,11 (CH_3), 21,80 (CH_2), 22,66 (CH_2), 28,23 (3xCH_3), 31,17 (CH_2), 31,60 (CH_2), 49,96 (CH), 53,31 (CH_2), 55,03 (CH_2), 62,57 (CH_2), 80,74 (C), 155,19 (CO), 169,24 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3369 (NH), 1741 (CO), 1691 (CO), 1301 (CH_2SCH_2), 1130 (SO).

d) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((*R*)-hexilsulfinil)propanoato de (2*R*)-etilo (**5bb**).

Apariencia: Solido blanco.



Punto de fusión: 65-68 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -8,38 ° (c 0,12, $CHCl_3$)

Rendimiento: 67 %.

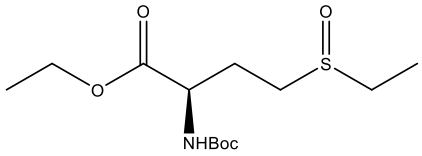
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,71 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H, CH_3), 1,12 (m, 7H, 2XCH_2 + CH_3), 1,27 (s, 9H, 3xCH_3), 1,58 (m, 4H, 2xCH_2), 2,60 (dd, *J* = 15,5 Hz, *J* = 8,1 Hz, 2H, CH_2), 3,09 (m, 2H, CH_2), 4,06 (m, 2H, OCH_2), 4,41 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H, CH), 5,95 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,86 (CH_3), 14,02 (CH_3), 22,33 (CH_2), 22,59 (CH_2), 28,37 (3xCH_3), 31,29 (CH_2), 31,53 (CH_2), 50,13 (CH), 53,09 (CH_2), 54,06 (CH_2), 62,10 (CH_2), 80,25 (C), 155,38 (CO), 170,45 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3373 (NH), 1739 (CO), 1691 (CO), 1314 (CH_2SCH_2), 1027 (SO).

e) 2- ((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(etilsulfinil)butanoato de etilo (**5ca**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 23 %.

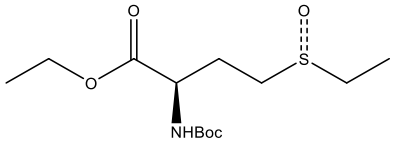
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,22 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH_3), 1,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1,37 (s, 9H, 3xCH_3), 1,98-2,15 (m, 1H, C*H*H), 2,25-2,40 (m, 1H, CH*H*), 2,86-3,09 (m, 4H, 2xCH_2), 4,15 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,22-4,33 (m, 1H, CH), 5,36 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 6,54 (CH_3), 14,09 (CH_3), 25,14 (CH_2), 28,22 (3xCH_3), 47,26 (CH_2), 48,20 (CH_2), 52,22 (CH), 61,89 (CH_2), 80,26 (C), 155,48 (CO), 171,22 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3379 (NH), 2986 (CH_2), 2937 (CH_2), 1750 (CO), 1683 (CO), 1049 (SO).

f) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(etilsulfinil)butanoato de etilo (**5cb**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 66 %.

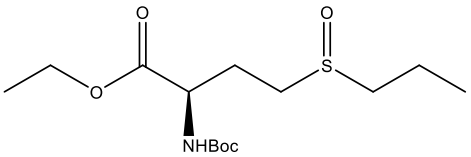
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,06-1,19 (m, 6H, 2xCH_3), 1,23-1,30 (m, 9H, 3xCH_3), 1,95 (s, 1H, C*H*H), 2,16 (s, 1H, CH*H*), 2,48-2,67 (m, 4H, 2xCH_2), 3,99-4,08 (m, 2H, OCH_2), 4,19 (s, 1H, CH), 5,61 (s, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 6,51 (CH_3), 13,92 (CH_3), 25,59 (CH_2), 25,79 (CH_2), 28,07 (3xCH_3), 45,46 (CH_2), 47,36 (CH_2), 52,40 (CH), 52,73 (CH), 61,38 (CH_2), 79,63 (C), 155,41 (CO), 171,49 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3257 (NH), 2977 (CH_2), 2934 (CH_2), 1739 (CO), 1711 (CO), 1020 (SO).

g) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino-4-(propilsulfinil)butanoato de etilo (**5da**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 21 %.

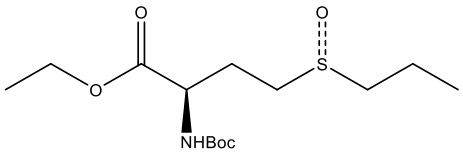
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,07 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH_3), 1,28 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1,43 (s, 9H, 3xCH_3), 1,79-1,93 (m, 2H, CH_2), 2,07-2,19 (m, 1H, C*H*H), 2,32-2,49 (m, 1H, CH*H*); 2,87-3,02 (m, 3H, CH_2 + C*H*H), 3,03-3,14 (m, 1H, CH*H*), 4,21 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,34 (s, 1H, CH), 5,24 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,24 (CH_3), 14,24 (CH_3), 15,93 (CH_2), 25,52 (CH_2), 28,37 (3xCH_3), 49,19 (CH_2), 52,32 (CH), 54,87 (CH_2), 62,17 (CH_2), 80,55 (C), 155,56 (CO), 171,30 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3394 (NH), 2984 (CH_2), 2912 (CH_2), 1734 (CO), 1009 (SO).

h) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino-4-(propilsulfinil)butanoato de etilo (**5db**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 72 %.

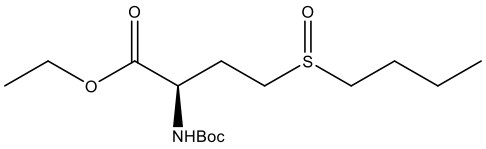
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,97 (d, *J* = 3,2 Hz, 3H, CH_3), 1,11-1,22 (m, 3H, CH_3), 1,32 (d, *J* = 3,0 Hz, 9H, 3xCH_3), 1,69 (s, 2H, CH_2), 2,00 (s, 1H, C*H*H), 2,22 (s, 1H, CH*H*); 2,45-2,55 (m, 1H, C*H*H), 2,57-2,73 (m, 3H, CH_2 + CH*H*), 4,09 (dd, *J* = 6,1 Hz, *J* = 3,7 Hz, 2H, OCH_2), 4,25 (s, 1H, CH), 5,51 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 Hz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,25 (CH_3), 14,02 (CH_3), 16,14 (CH_2), 25,71 (CH_2), 28,18 (3xCH_3), 48,16 (CH_2), 52,49 (CH), 52,82 (CH), 54,27 (CH_2), 61,55 (CH_2), 79,85 (C), 155,47 (CO), 171,55 (CO), 171,58 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3387 (NH), 2965 (CH_2), 2924 (CH_2), 1784 (CO), 1016 (SO).

i) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino-4-(butilsulfinil)butanoato de etilo (**5ea**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 21 %.

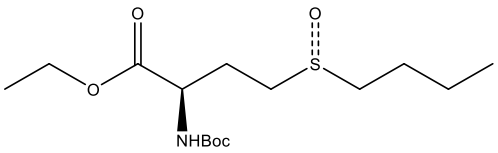
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,92 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH_3), 1,25 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1,37-1,47 (m, 11H, CH_2 + 3xCH_3), 1,70-1,82 (m, 2H, CH_2), 2,03-2,16 (m, 1H, C*H*H), 2,29-2,44 (m, 1H, CH*H*), 2,90-3,12 (m, 4H, 2xCH_2), 4,18 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,32 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H, CH), 5,29 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,54 (CH_3), 14,18 (CH_3), 21,75 (CH_2), 23,97 (CH_2), 25,41 (CH_2), 28,31 (3xCH_3), 49,09 (CH_2), 52,28 (CH), 52,85 (CH_2), 62,03 (CH_2), 80,41 (C), 155,51 (CO), 171,26 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3359 (NH), 2970 (CH_2), 2934 (CH_2), 1715 (CO), 1026 (SO).

j) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino-4-(propilsulfinil)butanoato de etilo (**5eb**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 77 %.

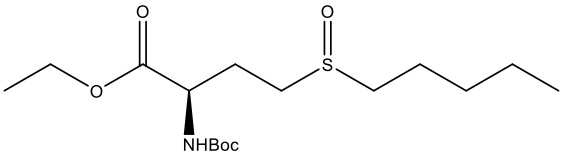
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,77-0,86 (m, 3H, CH_3), 1,09-1,18 (m, 3H, CH_3), 1,27-1,40 (m, 11H, CH_2 + 3xCH_3), 1,53-1,65 (m, 2H, CH_2), 1,89-2,05 (m, 1H, C*H*H), 2,11-2,26 (m, 1H, CH*H*), 2,47-2,70 (m, 4H, 2xCH_2), 4,01-4,11 (m, 2H, OCH_2), 4,22 (s, 1H, CH), 5,48-5,62 (m, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,45 (CH_3), 13,96 (CH_3), 21,83 (CH_2), 24,38 (CH_2), 24,41 (CH_2), 25,61 (CH_2), 25,96 (CH_2), 28,12 (3xCH_3), 48,06 (CH_2), 48,21 (CH_2), 52,00 (CH_2), 52,46 (CH), 52,77 (CH), 61,46 (CH_2), 79,77 (C), 155,44 (CO), 171,49 (CO), 171,53 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3256 (NH), 2964 (CH_2), 2932 (CH_2), 1740 (CO), 1711 (CO), 1023 (SO).

k) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino-4-(pentilsulfinil)butanoato de etilo (**5fa**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 18 %.

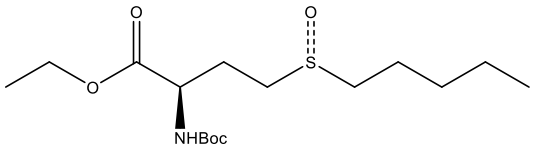
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,91 (t, J = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1.26-1.31 (m, 3H, CH_3), 1.31-1.47 (m, 13H, 2xCH_2 + 3xCH_3), 1.77-1.87 (m, 2H, CH_2), 2.06-2.18 (m, 1H, C*H*H); 2.35-2.46 (m, 1H, CH*H*), 2.91-3.18 (m, 4H, 2xCH_2), 4.22 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4.30-4,40 (m, 1H, CH), 5.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,78 (CH_3), 14,22 (CH_3), 21,72 (CH_2), 22,22 (CH_2), 25,49 (CH_2), 28,34 (3xCH_3), 30,61 (CH_2), 49,10 (CH_2), 52,29 (CH), 53,13 (CH_2), 62,11 (CH_2), 80,54 (C), 155, 54 (CO), 171, 29 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3348 (NH), 1747 (CO), 1684 (CO), 1334 (CH_2SCH_2), 1113 (SO).

l) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino-4-(pentilsulfinil)butanoato de etilo (**5fb**).

Apariencia: Aceite incoloro



Rendimiento: 71 %

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,84 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1,21 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1,25-1,39 (m, 13 H, 2xCH_2 + 3xCH_3), 1,61-1,73 (m, 2H, CH_2), 1,95-2,09 (m, 1H, C*H*H), 2,21-2,32 (m, 1H, CH*H*), 2,51-2,76 (m, 4H, 2xCH_2), 4,14 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,22-4,27 (m, 1H, CH), 5,36-5,48 (m, 1H, NH).

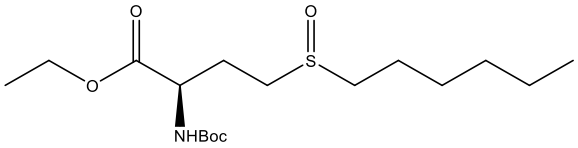
RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,75 (CH_3), 14,12 (CH_3), 22,22 (CH_2), 22,26 (CH_2), 25,93 (CH_2), 28,27 (3xCH_3), 30,91 (CH_2), 48,20 (CH_2), 52,50 (CH_2), 61,73 (CH_2), 80,06 (C), 155, 53 (CO), 171,65 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3376 (NH), 1775 (CO), 1645 (CO), 1314 (CH_2SCH_2), 1009 (SO).

EM (IQ, *m/z*): 350,1 $[M+1]^+$ (52 %).

m) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino-4-(hexilsulfinil)butanoato de etilo (**5ga**).

Apariencia: Aceite incoloro



Rendimiento: 25 %

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,81 (t, J = 6,9 Hz, 3H, CH_3), 1,15-1,18 (m, 3H, CH_3), 1,25-1,34 (m, 2H, CH_2), 1,37 (s, 9H, 3xCH_3), 1,43-1,53 (m, 4H, 2xCH_2), 1,78-1,89 (m, 1H, C*H*H), 1,99-2,09 (m, 1H, CH*H*), 2,39-2,50 (m, 6H, 3xCH_2), 4,12 (c, J = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,24-4,34 (m, 1H, CH), 5,18 (d, J = 7,6 Hz, 1H, NH).

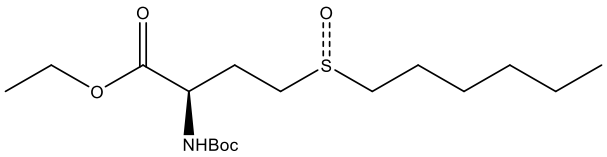
RMN-^{13}C (101, MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,96 (CH_3), 14,15 (CH_3), 22,51 (CH_2), 27,82 (CH_2), 28,27 (3xCH_3), 28,51 (CH_2), 29,50 (CH_2), 31,40 (CH_2), 32,09 (CH_2), 32,79 (CH_2), 52,97 (CH), 61,36 (CH_2), 79,77 (C), 155,36 (CO), 172,28 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3384 (NH), 1762 (CO), 1624 (CO), 1324 (CH_2SCH_2), 1102 (SO).

n) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino-4-(hexilsulfinil)butanoato de etilo (**5gb**).

Apariencia: Aceite incoloro

Rendimiento: 68 %



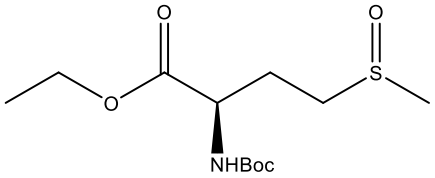
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,83 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, CH_3), 1,19-1,36 (m, 5H, CH_2 + CH_3), 1,39 (s, 9H, 3xCH_3), 1,46-1,56 (m, 4H, 2xCH_2), 1,81-1,98 (m, 1H, C*H*H), 2,00-2,15 (m, 1H, CH*H*), 2,42-2,58 (m, 6H, 3xCH_2), 4,15 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,26 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H, CH), 5,32 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,03 (CH_3), 14,17 (CH_3), 22,56 (CH_2), 27,87 (CH_2), 28,34 (3xCH_3), 28,59 (CH_2), 29,52 (CH_2), 31,45 (CH_2), 31,91 (CH_2), 32,17 (CH_2), 51,78 (CH), 61,61 (CH_2), 80,07 (C), 155,56 (CO), 171,52 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3361 (NH), 1774 (CO), 1648 (CO), 1301 (CH_2SCH_2), 1049 (SO).

o) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-4-(metil(*R*)-sulfinil)butanoato de (*S*)-etilo (**5ha**).

Apariencia: Solido blanco.



Punto de fusión:

$[\alpha]_D^{20}$: +13,22 ° (c 0,038, $CHCl_3$).

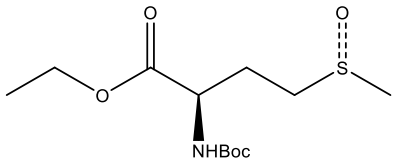
Rendimiento: 28 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,29 (m, 3H, CH_3), 1,45 (s, 9H, 3xCH_3), 2,19 (dd, *J* = 12,3 Hz, *J* = 7,2 Hz, 1H, C*H*H), 2,42 (m, 1H, CH*H*), 2,94 (s, 3H, CH_3), 3,12 (m, 2H, CH_2), 4,22 (m, 2H, OCH_2), 4,37 (dd, *J* = 12,9 Hz, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH), 5,25 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,14 (CH_3), 25,81 (CH_2), 28,26 (3xCH_3), 40,74 (CH_2), 50,69 (CH_2), 51,92 (CH), 62,11 (CH_2), 80,76 (C), 155,63 (CO), 171,16 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3381 (NH), 1732 (CO), 1698 (CO), 1306 (CH_2SCH_2), 1117 (SO).

p) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-4-(metil(*S*)-sulfinil)butanoato de (*S*)-etilo (**5hb**).



Apariencia: Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{20}$: -10,11 ° (c 0.09, $CHCl_3$).

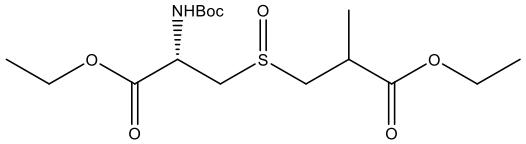
Rendimiento: 18 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1,39 (s, 9H, 3xCH_3), 2,08 (dd, *J* = 12,0 Hz, *J* = 10,0 Hz, 1H, C*H*H), 2,29 (m, 1H, CH*H*), 2,57 (s, 3H, CH_3), 2,77 (m, 2H, CH_2), 4,17 (m, 2H, OCH_2), 4,34 (s, 1H, CH), 5,45 (s, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,10 (CH_3), 25,74 (CH_2), 28,25 (3xCH_3), 38,31 (CH_3), 50,15 (CH_2), 52,77 (CH), 61,84 (CH_2), 80,36 (C), 155,51 (CO), 171,56 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3381 (NH), 1711 (CO), 1368 (CH_2SCH_2), 1167 (SO).

q) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((3-etoxi-(*S*,*R*)-2-metil-(*S*)-oxopropil)sulfinil)propanoato de (2*R*)-etilo (**5ia**).



Apariencia: Solido blanco.

Punto de fusión: 71-72 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +1,06 ° (c 0,1, $CHCl_3$).

Rendimiento: 22 %.

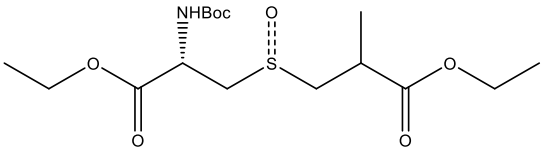
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,29 (m, 9H, 3xCH_3), 1,46 (s, 9H, 3xCH_3), 3,08 (m, 3H, CH_2 + CH), 3,68 (m, 2H, CH_2), 4,10 (m, 4H, 2xOCH_2), 4,65 (m, 1H, CH), 5,65 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,05 (2xCH_3), 17,75 (CH_3), 28.22 (3xCH_3), 33,52 (CH), 50,00 (CH), 55,05 (CH_2), 57,71 (CH_2), 61,45 (CH_2), 62,53 (CH_2), 80,79 (C), 155,22 (CO), 169,25 (CO), 173,69 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3366 (NH), 1740 (CO), 1681 (CO), 1297 CH_2SCH_2), 1054 (SO).

r) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((3-etoxi-(*S*,*R*)-2-metil-(*R*)-oxopropil)sulfinil)propanoato de (2*R*)-etilo (**5ib**).

Apariencia: Solido amarillo pálido.



Punto de fusión: 140-143 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -8,88 ° (c 0,16, $CHCl_3$)

Rendimiento: 50 %.

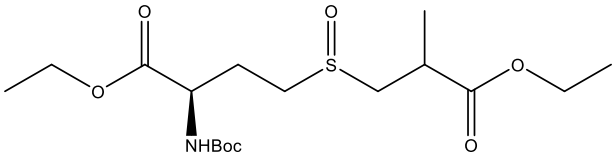
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,27 (m, 9H, 3xCH_3), 1,39 (s, 9H, 3xCH_3), 2,98 (m, 3H, CH_2 + CH), 3,26 (m, 2H, CH_2), 4,10 (m, 4H, 2xOCH_2), 4,58 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H, CH), 5,78 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,06 (2xCH_3), 17,77 (CH_3), 28,23 (3xCH_3), 34,74 (CH), 49,91 (CH), 55,82 (CH_2), 56,34 (CH_2), 61,20 (CH_2), 62,21 (CH_2), 80,39 (C), 155,25 (CO), 169,94 (CO), 174,41 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3364 (NH), 1730 (CO), 1368 (CH_2SCH_2), 1166 (SO).

s) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-4-((3-etoxi-2-metil-3-oxopropil)sulfinil)butanoato de (2*R*)-etilo (**5ja**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 18 %.

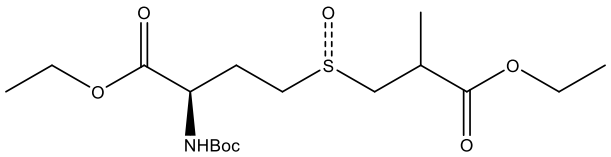
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,22 (dd, *J* = 7,0 Hz, *J* = 11,7 Hz, 6H, 2xCH_3), 1,31 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH_3), 1,38 (s, 9H, 3xCH_3), 1,99-2,15 (m, 1H, C*H*H), 2,28-2,41 (m, 1H, CH*H*), 2,86-3,15 (m, 4H, 2xCH_2), 3,49-3,59 (m, 1H, CH), 4,08-4,20 (m, 4H, 2xOCH_2), 4,28 (s, 1H, CH), 5.32 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,06 (CH_3), 14,11 (CH_3), 17,82 (CH_3), 25,28 (CH_2), 28,25 (3xCH_3), 34,27 (CH), 50,50 (CH_2), 52,18 (CH), 55,37 (CH_2), 61,43 (CH_2), 61,91 (CH_2), 80,29 (C), 155,45 (CO), 171,24 (CO), 173,77 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3364 (NH), 1743 (CO), 1364 (CH_2SCH_2), 1123 (SO).

t) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-4-((3-etoxi-2-metil-3-oxopropil)sulfinil)butanoato de (2*R*)-etilo (**5jb**).

Apariencia: Aceite incoloro.



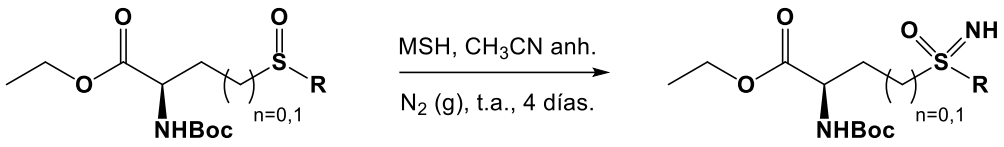
Rendimiento: 81 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): 1,11-1,21 (m, 6H, 2xCH_3), 1,22-1,28 (m, 3H, CH_3), 1,33 (s, 9H, 3xCH_3), 2,01 (s, 1H, C*H*H), 2,23 (s, 1H, CH*H*); 2,53-2,82 (m, 3H, CH_2+CH), 2,88-3,07 (m, 2H, CH_2), 4,00-4,18 (m, 4H, 2xOCH_2), 4,26 (s, 1H, CH), 5,49 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 Hz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,03 (CH_3), 16,37 (CH_3), 17,94 (CH_3), 25,64 (CH_2), 28,20 (3xCH_3), 34,06 (CH), 34,69 (CH), 48,74 (CH_2), 49,05 (CH_2), 52,50 (CH), 52,75 (CH), 55,44 (CH_2), 56,12 (CH_2), 61,03 (CH_2), 61,62 (CH_2), 79,96 (C), 155,45 (CO), 171,53 (CO), 174,13 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3351 (NH), 1728 (CO), 1341 (CH_2SCH_2), 1135 (SO).

2.2.1.6. Procedimiento general para la síntesis de sulfoximinas (6a-j)



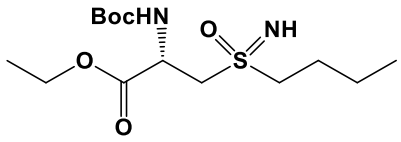
5a n = 0, R = Bu
5b n = 0, R = Hex
5c n = 1, R = Et
5d n = 1, R = Pr
5e n = 1, R = Bu
5f n = 1, R = Pent
5g n = 1, R = Hex
5h n = 1, R = Me
5i n = 0, R = isobutirato de etilo
5j n = 1, R = isobutirato de etilo

6a n = 0, R = Bu
6b n = 0, R = Hex
6c n = 1, R = Et
6d n = 1, R = Pr
6e n = 1, R = Bu
6f n = 1, R = Pent
6g n = 1, R = Hex
6h n = 1, R = Me
6i n = 0, R = isobutirato de etilo
6j n = 1, R = isobutirato de etilo

En un matraz de fondo redondo, bajo atmosfera de nitrógeno, se disolvieron 337,7 mg (1,10 mmol, 1,0 eq) del sulfóxido **5c** en 24 mL de CH_3CN anhidro. A esta disolución se le añadieron 236,8 mg (1,10 mmol, 1,0 eq) de MSH (**14**) y la mezcla se agitó por 24 horas a temperatura ambiente. Luego de este tiempo se agregaron 71,0 mg (0,33 mmol, 0,29 eq) extra de MSH y se agitó por 72 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente en el rotavapor y el residuo obtenido se disolvió en AcOEt y se lavó sucesivamente con disolución saturada de $NaHCO_3$, agua y salmuera. La fase orgánica recolectada se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró, obteniéndose un residuo aceitoso, el cual fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel ($MeOH/CHCl_3$ al 2 % v/v).

a) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((*R*)-butilsulfonimidoil)propanoato de (2*R*)-etilo (**6a**)

Apariencia: Solido amarillo pálido.



Punto de fusión: 91-94 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +6,84 ° (c 0,09, $CHCl_3$)

Rendimiento: 89 %.

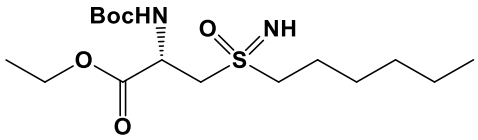
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,94 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,27 (m, 5H, CH_2 + CH_3), 1,43 (s, 9H, 3xCH_3), 1,81 (m, 2H, CH_2), 2,78 (s, 1H, NH), 3,05 (m, 2H, CH_2), 3,62 (m, 2H, CH_2), 4,24 (m, 2H, OCH_2), 4,65 (m, 1H, CH), 5,86 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,02 (CH_3), 14,25 (CH_3), 24,31 (CH_2), 28,01 (3xCH_3), 31,59 (CH_2), 49,84 (CH), 55,65 (CH_2), 56,48 (CH_2), 62,35 (CH_2), 80,39 (C), 155,26 (CO), 169,47 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3341 (NH), 1742 (CO), 1706 (CO), 1288 (CH_2SCH_2), 1020 (SO).

b) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((*S*)-hexilsulfonimidoill)propanoato de (2*R*)-etilo (**6b**)

Apariencia: Solido anaranjado.



Punto de fusión: 70-73 °C.

Rendimiento: 73%.

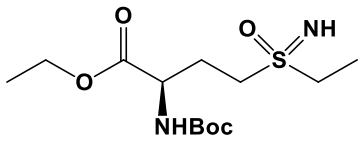
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,84 (t, *J* = 6,0 Hz, 3H, CH_3), 1,31 (m, 7H, $2XCH_2$ + CH_3), 1,41 (s, 9H, $3xCH_3$), 1,75 (m, 4H, $2xCH_2$), 2,64 (s, 1H, NH); 2,98 (t, *J* = 8,2 Hz, 2H, CH_2), 3,61 (d, *J* = 4,6 Hz, 2H, CH_2), 4,20 (m, 2H, OCH_2), 4,57 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, CH), 5,72 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,90 (CH_3), 14,01 (CH_3), 21,75 (CH_2), 22,27 (CH_2), 28,23 ($3xCH_3$), 31,07 (CH_2), 31,13 (CH_2), 49,95 (CH), 53,31 (CH_2), 55,16 (CH_2), 62,47 (CH_2), 80,69 (C), 155,25 (CO), 169,34 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3364 (NH), 1743 (CO), 1687 (CO), 1300 (CH_2SCH_2), 1058 (SO).

c) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(etilsulfonimidoil)butanoato de etilo (**6c**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 56 %.

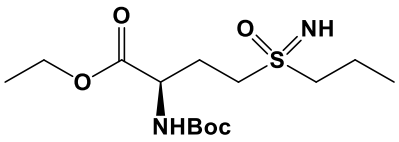
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,17-1,30 (m, 6H, CH_3 + $OCH_2C\underline{H}_3$), 1,37 (s, 9H, 3xCH_3), 1,97-2,12 (m, 1H, C*H*H), 2,20-2,35 (m, CH*H* + NH), 2,57-2,77 (m, 4H, 2xCH_2), 4,15 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,32 (sa, 1H, CH), 5,42 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 6,73 (CH_3), 6,80 (CH_3), 14,14 (CH_3), 25,91 (CH_2), 26,33 (CH_2), 28,28 (3xCH_3), 45,75 (CH_2), 47,48 (CH_2), 47,64 (CH_2), 52,55 (CH), 52,88 (CH), 61,77 (CH_2), 61,80 (CH_2), 80,13 (C), 155,59 (CO), 171,65 (CO), 171,68 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3318 (NH), 1717 (CO), 1621 (CO), 1305 (CH_2SCH_2), 1052 (SO).

d) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(propilsulfonimidoil)butanoato de etilo (**6d**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 62 %.

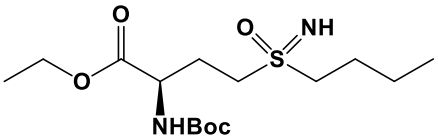
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,01 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH_3), 1,22 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, $OCH_2C\underline{H}_3$), 1,37 (s, 9H, 3xCH_3), 1,74-1,87 (m, 1H, CH_2), 2,03-2,16 (m, C*H*H), 2,27-2,39 (m, 1H, CH*H*), 2,59 (s, 1H, NH), 2,91-2,98 (m, 2H, CH_2), 2,99-3,13 (m, 2H, CH_2), 4,14 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,29 (s, 1H, CH), 5,50 (s, 1H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,06 (CH_3), 14,12 (CH_3), 16,17 (CH_2), 25,72 (CH_2), 28,25 (3xCH_3), 51,02 (CH_2), 52,23 (CH), 56,76 (CH_2), 61,84 (CH_2), 80,19 (C), 155,51 (CO), 171,45 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3384 (NH), 1764(CO), 1624 (CO), 1301 (CH_2SCH_2), 1051 (SO).

e) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(butilsulfonimidoil)butanoato de etilo (**6e**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 82 %.

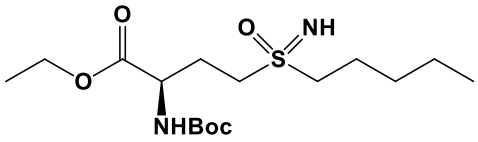
RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,83-0,90 (m, 3H, CH_3), 1,16-1,23 (m, 3H, CH_3), 1,32-1,45 (m, 11H, CH_2 + 3xCH_3), 1,64-1,79 (m, 2H, CH_2), 1,99-2,17 (m, 1H, C*H*H), 2,22-2,38 (m, 1H, CH*H*), 2,58 (s, 1H, NH), 2,89-3,13 (m, 4H, 2xCH_2), 4,07-4,17 (m, 2H, OCH_2), 4,27 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H, CH), 5,55 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,52 (CH_3), 14,07 (CH_3), 21,62 (CH_2), 24,28 (CH_2), 25,60 (CH_2), 28,20 (3xCH_3), 50,92 (CH_2), 52,17 (CH), 54,75 (CH_2), 61,75 (CH_2), 80,09 (C), 155,47 (CO), 171,42 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3299 (NH), 1757(CO), 1613 (CO), 1054 (SO).

f) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(pentilsulfonimidoil)butanoato de etilo (**6f**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 62 %.

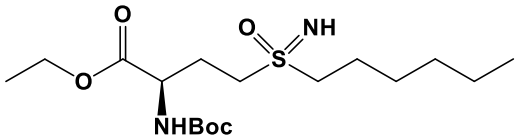
RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,90 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH_3), 1,28 (td, *J* = 0,4 Hz, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 1,35-1,41 (m, 4H, 2xCH_2), 1,43 (s, 9H, 3xCH_3), 1,74-1,89 (m, 2H, CH_2), 2,04-2,23 (m, 1H, C*H*H), 2,25-2,49 (m, 2H, CH*H* + NH), 2,93-3,20 (m, 4H, 2xCH_2), 4,21 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,30-4,43 (m, 1H, CH), 5,29-5,38 (m, 1H, NH).

RMN-^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,69 (CH_3), 14,08 (CH_3), 22,01 (CH_2), 22,13 (CH_2), 25,66 (CH_2), 28,21 (3xCH_3), 30,46 (CH_2), 50,94 (CH_2), 52,20 (CH_2), 55,01 (CH_2), 61,76 (CH_2), 80,09 (C), 155,44 (CO), 171,41 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3361 (NH), 1723(CO), 1671 (CO), 1308 (CH_2SCH_2), 1051 (SO).

g) 2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(hexilsulfonimidoil)butanoato de etilo (**6g**).

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 76 %.

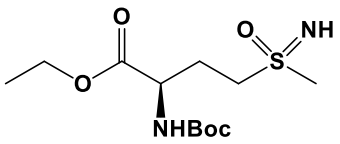
RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,83 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH_3), 1,20-1,30 (m, 9H, 3xCH_2 + CH_3), 1,38 (s, 9H, 3xCH_3), 1,69-1,85 (m, 2H, CH_2), 2,01-2,18 (m, 1H, C*H*H), 2,27-2,43 (m, 1H, CH*H*), 2,55 (s, 1H, NH), 2,89-3,16 (m, 4H, 2xCH_2), 4,16 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 4,31 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H, CH), 5,48 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,92 (CH_3), 14,15 (CH_3), 22,32 (2xCH_2), 25,79 (CH_2), 28,10 (CH_2), 28,28 (3xCH_3), 31,24 (CH_2), 51,00 (CH_2), 52,24 (CH), 55,15 (CH_2), 61,88 (CH_2), 80,24 (C), 155,50 (CO), 171,45 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3384 (NH), 1794 (CO), 1642 (CO), 1301 (CH_2SCH_2), 1049 (SO).

h) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-4-(metil-(*R*)-sulfonimidoil)butanoato de (*S*)-etilo (**6h**).

Apariencia: Solido café pálido.



Rendimiento: 71 %.

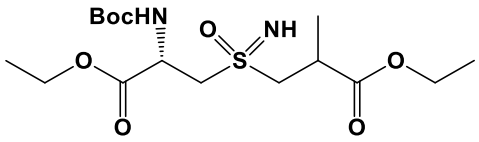
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,29 (m, 3H, CH_3), 1,42 (s, 9H, 3xCH_3), 2,19 (m, 1H, C*H*H), 2,42 (m, 1H, CH*H*), 2,61 (s, 1H, NH), 2,91 (s, 3H, CH_3), 3,12 (m, 2H, CH_2), 4,20 (m, 2H, OCH_2), 4,34 (dd, *J* = 11,5 Hz, *J* = 7,1 Hz, 1H, CH), 5,34 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,11 (CH_3), 25,59 (CH_2), 28,72 (3xCH_3), 40,66 (CH_2), 51,08 (CH_2), 52,12 (CH), 61,97 (CH_2), 80,83 (C), 155,44 (CO), 171,20 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3381 (NH), 1732 (CO), 1698 (CO), 1306 (CH_2SCH_2), 1117 (SO).

i) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((3-etoxi-(*S*,*R*)-2-metil-(*S*)-oxopropil)sulfonimidoil)propanoato de (2*R*)-etilo (**6i**).

Apariencia: Solido amarillo pálido



Punto de fusión: 43-46 °C

Rendimiento: 90 %.

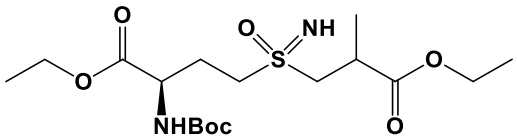
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,29 (m, 9H, 3xCH_3), 1,43 (s, 9H, 3xCH_3), 2,62 (s, 1H, NH), 3,06 (m, 3H, CH_2 + CH), 3,68 (m, 2H, CH_2), 4,20 (m, 4H, 2xOCH_2), 4,60 (m, 1H, CH), 5,65 (m, 1H, NH).

RMN-^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,06 (2xCH_3), 17,76 (CH_3), 28,21 (3xCH_3), 33,89 (CH), 49,36 (CH), 55,24 (CH_2), 57,57 (CH_2), 61,42 (CH_2), 62,53 (CH_2), 80,39 (C), 154,88 (CO), 169,50 (CO), 173,28 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3366 (NH), 1740 (CO), 1686 (CO), 1297 (CH_2SCH_2), 1054 (SO).

j) 2-((*tert*-butoxycarbonil)amino)-3-((3-etoxi-2-metil-oxopropil)sulfonimidoil)propanoato de (2*R*)-etilo (**6j**).

Apariencia: Aceite incoloro



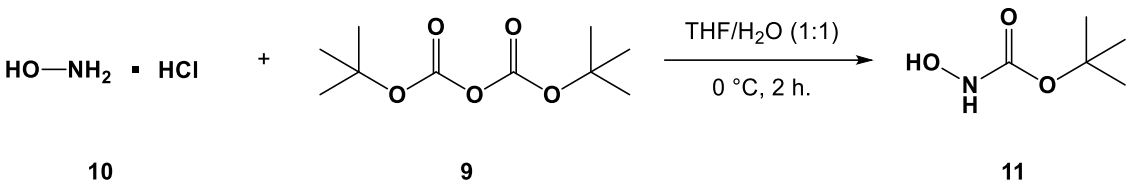
Rendimiento: 38 %.

RMN-^{1}H (400 MHz,$CDCl_3$, δ, ppm): 1,22-1,30 (m, 6H, 2xCH_3), 1,35 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH_3), 1,42 (s, 9H, 3xCH_3), 2,06-2,20 (m, 1H, C*H*H), 2,35-2,46 (m, 1H, CH*H*), 2,88-3,17 (m, 5H, 2xCH_2 + NH), 3,57 (ddd, *J* = 14,1 Hz, J = 7,7 Hz, *J* = 2,9 Hz, 1H, CH), 4,13-4,23 (m, 4H, 2xOCH_2), 4,33 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, CH), 5,25 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H, NH).

RMN-^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,16 (CH_3), 14,20 (CH_3), 17,94 (CH_3), 17,99 (CH_3), 25,49 (CH_2), 28,35 (3xCH_3), 34,38 (CH), 34,46 (CH), 50,60 (CH_2), 52,27 (CH), 55,50 (CH_2), 55,61 (CH_2), 61,56 (CH_2), 61,60 (CH_2), 62,07 (CH_2), 80,49 (C), 155,53 (CO), 171,27 (CO), 171,30 (CO), 173,88 (CO), 173,94 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3356 (NH), 1754 (CO), 1676 (CO), 1299 (CH_2SCH_2), 1051 (SO).

2.2.1.7. Síntesis de *tert*-butil-*N*-hidroxicarbamato (11)



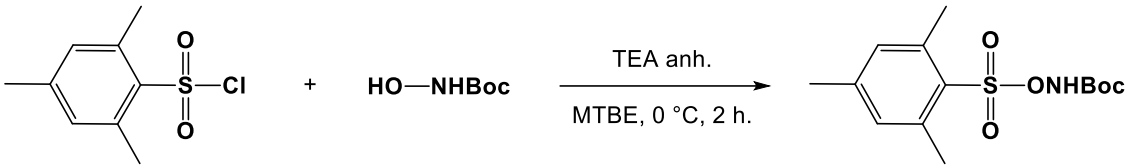
10 **9** **11**

En un balón se disolvieron 5,0 g (72,0 mmol, 1,0 eq) de clorhidrato de hidroxilamina (**10**) y 15,7 g (72,0 mmol, 1,0 eq) de Boc_2O (**9**) en 160 mL de una mezcla THF/H_2O (1:1) y se enfrió a 0 °C. Se le añadieron 12,1 g (144,0 mmol, 2,0 eq) de $NaHCO_3$ y se agitó a 0 °C por dos horas. Luego se este tiempo la disolución se diluyó con AcOEt, se lavó con solución saturada de $NaHCO_3$, agua y salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor obteniéndose un aceite incoloro, al cual se le pasó una corriente de nitrógeno, obteniéndose 7,01 g (52,6 mmol, 73 %) de **11** como un sólido blanco, equivalente a lo encontrado en la literatura.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,43 (s, 9H, 3xCH_3).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm**):** 28,27 (3xCH_3), 82,03 (C), 158,95 (CO).

2.2.1.8. Síntesis de *N*-Boc-*O*-Mesitilensulfonilhidroxilamina (MSH-Boc, 13)



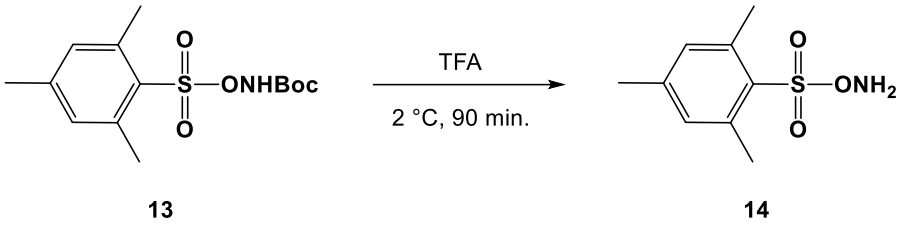
12 **11** **13**

En un matraz de fondo redondo se disolvieron 3,07 g (14,05 mmol, 1,0 eq) de cloruro de 2-mesitilenesulfonilo (**12**) y 1,59 g (14,05 mmol, 1,0 eq) de *t*-butil-*N*-hidroxicarbamato (**11**) en 32 mL de MTBE. La mezcla fue purgada con nitrógeno y se enfrió a 0 °C. Gota a gota se agregaron 2.0 mL (14,33 mmol, 1,02 eq) de TEA anhidra y se agito por dos horas a 0 °C. La reacción se siguió por c.c.f. (hexano/AcOEt 7:3) y luego de comprobar la desaparición del sustrato de partida le mezcla se filtró, para extraer las sales de Et_3NHCl, lavando con MTBE. La fase liquida se concentró al vacío, hasta aproximadamente 5 mL de MTBE. Se agregó 41,2 mL de hexano a 20 °C y se agitó por 5 minutos, formándose un sólido blanco, el cual fue filtrado y lavado con hexano. La fase liquida fue nuevamente concentrada y al residuo obtenido se le añadieron 13,7 mL de hexano. El sólido blanco formado fue nuevamente filtrado y combinado con el anterior, obteniéndose 3,2 g (10,25 mmol, 72 %) del compuesto **13**, siendo sus datos espectroscópicos equivalentes a los encontrados en literatura.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,28 (s, 9H, 3xCH_3), 2,29 (s, 3H, CH_3), 2,64 (s, 6H, 2xCH_3), 6,96 (s, 2H, 2xAr-H), 8,06 (s, 1H, NH).

RMN-^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 21,23 (CH_3), 23,24 (CH_3), 27,83 (3xCH_3), 83,92 (C), 128,60 (C), 131,76 (2xAr-H), 142,05 (2xC), 144,52 (C), 154,38 (CO).

2.2.1.9. Síntesis de *O*-Mesitilensulfonilhidroxilamina (MSH, 14)



13 **14**

Se enfriaron 7,8 mL de TFA a 2 °C y se le añadieron 2,61 g (8,27 mmol, 1,0 eq) de **13**, en porciones, durante una hora. La reacción se agita a 2 °C por 90 minutos y se monitorea por c.c.f (hexano/AcOEt 8:2). Luego de comprobar la desaparición del sustrato de partida se adicionan 3,1 mL de hielo picado seguido de 6,2 mL de agua, aumentando la temperatura interna a 2 °C. Un sólido blanco aparece mientras la temperatura interna sube a 8 °C. Se adiciono 9,4 mL de hielo/agua fría y luego de 15 minutos se filtró el sólido blanco y se lavó con agua hasta pH ≈ 7 y se secó por 15 minutos para eliminar el exceso de agua. Así se obtuvieron 2,09 g de MSH (**14**), el cual posee un 33 % de agua. Por seguridad se almacena en un envase plástico en el congelador. Su caracterización espectroscópica es equivalente con la encontrada en literatura.

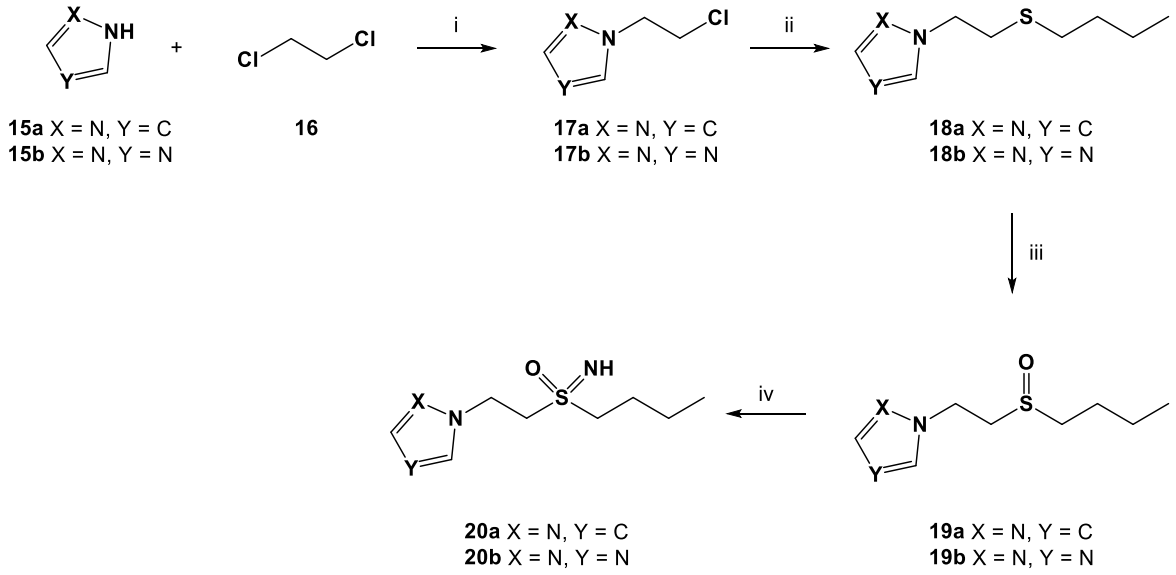
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm):2,30 (s, 3H, CH_3), 2,61 (s, 6H, 2xCH_3), 6,81 (s, 2H, NH_2), 6,96 (s, 2H, 2xAr-H).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 21,14 (CH_3), 22,74 (2xCH_3), 129,10 (C), 131,05 (2xCH), 141,10 (C), 144,03 (C).

2.2.2. Síntesis de isósteros de L-BSO

2.2.2.1. Síntesis de *N*-(2-(butil)sulfonilmildoil)etil-heterociclos.

El paso siguiente correspondió a la preparación de los análogos heterocíclicos de L-BSO, en donde se reemplazó la porción zwitterionica por distintos anillos que contienen nitrógeno en su estructura. Para lograr obtener estos compuestos se utilizó la ruta sintética que se indica en el **Esquema 12**.



15a X = N, Y = C
15b X = N, Y = N

16

17a X = N, Y = C
17b X = N, Y = N

18a X = N, Y = C
18b X = N, Y = N

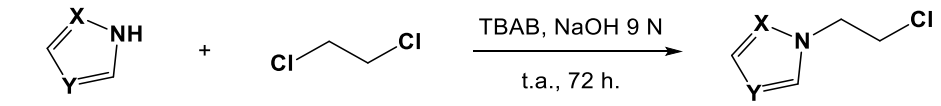
20a X = N, Y = C
20b X = N, Y = N

19a X = N, Y = C
19b X = N, Y = N

Reactivos y condiciones: i) TBAB, NaOH 9 N, t.a., 72 h. ii) 1-BuSH, K_2CO_3, DMF anh., N_2 (g), t.a., 72 h., iii) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 anh., N_2 (g), -78 °C, 4 h., iv) MSH, CH_3CN anh., N_2 (g), t.a., 72 h.

Esquema 12. Ruta sintética de análogos heterocíclicos de L-BSO.

2.2.2.1.1. Procedimiento general para la síntesis de N-alquil-heterociclos (17a-b).



15a X = N, Y = C
15b X = N, Y = N

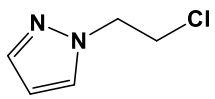
16

17a X = N, Y = C
17b X = N, Y = N

En un balón se preparó una disolución de 1,0 g (14,69 mmol, 1,0 eq) de pirazol (**15a**) en 20 mL de NaOH 9 N. Luego de la completa disolución del solido se añadieron 20 mL de 1,2-dicloro etano (**16**) y 190,0 mg (0,59 mmol, 0,04 eq) de bromuro de tetrabutilamonio (TBAB), se agitó la mezcla a temperatura ambiente por 72 horas. Transcurrido este tiempo se separaron las dos fases, la fase acuosa se extrajo con $CHCl_3$ (3 x 15 mL), las fases orgánicas recolectadas se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y concentraron. El residuo obtenido se purifico por cromatografía en columna de sílica gel con un gradiente de polaridad ($CHCl_3$ → MeOH/$CHCl_3$ al 2 % v/v).

a) Datos espectroscópicos de 1-(2-cloroetil)-1*H*-pirazol (**17a**).

Apariencia: Aceite incoloro



Rendimiento: 73 %

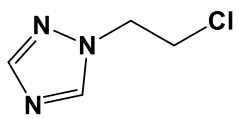
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 3,68 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH_2), 4,22 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH_2), 6,08 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, CH), 7,29 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, CH), 7,38 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 42,81 (CH_2), 53,23 (CH_2), 105,35 (CH), 130,12 (CH), 139,96 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 1397 (CH_2), 617 (C-Cl).

b) Datos espectroscópicos de 1-(2-cloroetil)-1*H*-1,2,4-triazol (**17b**).

Apariencia: Aceite incoloro



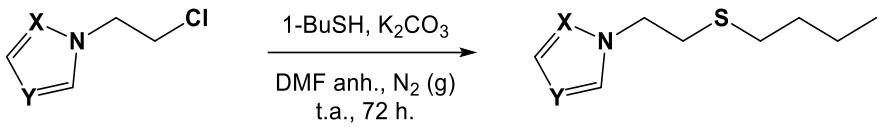
Rendimiento: 77 %

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 3,64 (m, 2H, CH_2), 4,24 (m, 2H, CH_2), 7,73 (s, 1H, CH), 7,99 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 41,84 (CH_2), 50,57 (CH_2), 143,73 (CH), 151,88 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 1434,9 (CH_2), 705,1 (C-Cl).

2.2.2.1.2. Procedimiento general para la síntesis de *N*-2-(butiltio)etil-heterociclos (18a-b).



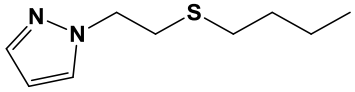
17a X = N, Y = C
17b X = N, Y = N

18a X = N, Y = C
18b X = N, Y = N

En un balón, seco y bajo atmosfera de nitrógeno, se añadieron 1,0 g (7,66 mmol, 1,0 eq) de 1-(2-cloroetil)-1*H*-pirazol (**17a**) y 20 mL de DMF anhidra. Sobre esta suspensión se adiciono 1,38 g (9,96 mmol, 1,3 eq) de K_2CO_3 pulverizado y posteriormente se agregó 1,07 mL (9,96 mmol, 1,3 eq) de 1-butanotiol y se agitó a temperatura ambiente por 3 días. Luego de este tiempo se añadieron 20 mL de agua y se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL). A la fase orgánica recolectada se añadió, en pequeñas porciones, una disolución fría de yodo en AcOEt, hasta que el color café permaneció constante, se añadieron 20 mL de una disolución de $Na_2S_2O_2$ al 5 % en agua. Finalmente se separaron las dos fases y la fase orgánica se lavó con 20 mL de salmuera, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo obtenido se purifico por cromatografía en columna de sílica gel.

a) Datos espectroscópicos de 1-(2-(butiltio)etil)-1*H*-pirazol (**18a)**.

Apariencia: Aceite incoloro.



Rendimiento: 86 %

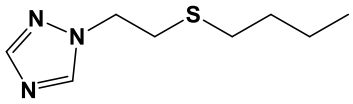
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,82 (t *J* =7.3 Hz, 3H, CH_3), 1,22-1,34 (m, 2H, CH_2), 1,39-1,49 (m, 2H, CH_2), 2,24-2,32 (m,2H, CH_2), 2,84-2,91 (m, 2H, CH_2), 4,11-4,32 (m, 2H, CH_2), 6,15-6,18 (m, 1H, CH), 7,37 (d, *J* =2,1 Hz, 1H, CH), 7,44 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, CH).

RMN-13C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,53 (CH_3), 21,75 (CH_2), 31,58 (CH_2), 31,79 (CH_2), 32,16 (CH_2), 52,26 (CH_2), 105,27 (CH), 129,48 (CH), 139,52 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 2871 (S-CH_2), 1451 (CH_3), 1089 (C-N).

b) Datos espectroscópicos de 1-(2-butiltio)etil-1*H*-1,2,4-triazol (**18b)**.

Apariencia: Aceite incoloro.



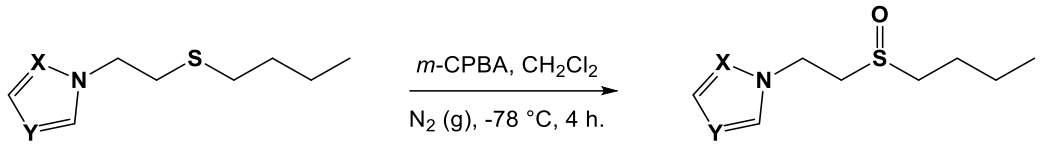
Rendimiento: 73 %

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,73 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,14-1,25 (m, 2H, CH_2), 1,30-1,39 (m, 2H, CH_2), 2,19-2,25 (m, 2H, CH_2), 2,80 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, CH_2), 4,20 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, CH_2), 7,79 (s, 1H, CH), 8,02 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,36 (CH_3), 21,56 (CH_2), 31,39 (CH_2), 31,50 (CH_2), 31,80 (CH_2), 49,62 (CH_2), 143,31 (CH), 151,86 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 2871 (S-CH_2), 1449 (CH_3), 1099 (C-N).

2.2.2.1.3. Síntesis de sulfóxidos de *N*-2-(butiltio)etil-heterociclos (19a-b).

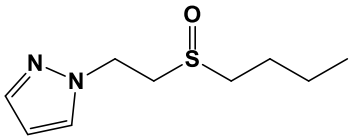


18a X = N, Y = C
18b X = N, Y = N

19a X = N, Y = C
19b X = N, Y = N

Para la síntesis de los sulfóxidos **19a** y **19b** se utilizó el procedimiento descrito en el punto 2.2.1.5 (página 58). Los residuos obtenidos fueron purificados por cromatografía en columna de sílica gel, siendo eluida con un gradiente de polaridad ($CHCl_3$ → MeOH/$CHCl_3$ al 3 % v/v).

a) Datos espectroscópicos de 1-(2-(butilsulfinil)etil-1*H*-pirazol (**19a)**.



Apariencia: Solido Blanco

Punto de fusión: 47-50 °C.

Rendimiento: 66 %

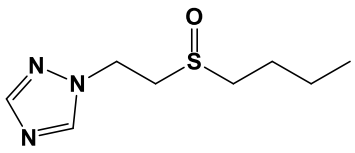
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,28-1,48 (m, 2H, CH_2), 1,57-1,73 (m, 2H, CH_2), 2,45-2,54 (m, 1H, C*H*H), 2,55-2,64 (m, 1H, CH*H*), 2,97-3,06 (m, 1H, C*H*H), 3,23-3,32 (m, 1H, CH*H*), 4,52-4,62 (m, 2H, CH_2), 6,21 (s, 1H, CH), 7,46 (s, 1H, CH), 7,50 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,62 (CH_3), 21,96 (CH_2), 24,62 (CH_2), 44,89 (CH_2), 51,73 (CH_2), 52,33 (CH_2), 105;79 (CH), 130,42 (CH), 140,35 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 2873 (S-CH_2), 1451 (CH3), 1072 (S=O).

b) Datos espectroscópicos de 1-(2-(butilsulfinil)etil-1*H*-1,2,4-triazol (**19b)**.

Apariencia: Solido blanco.



Punto de fusión: 50-54 °C.

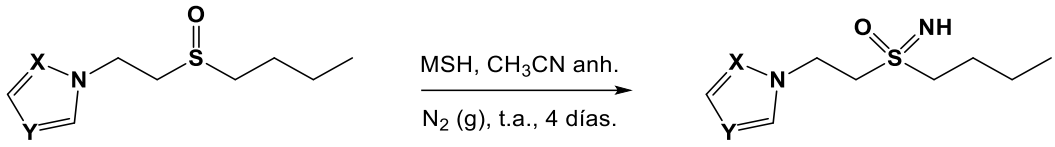
Rendimiento: 57 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,84 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,25-1,45 (m, 2H, CH_2), 1,52-1,69 (m, 2H, CH_2), 2,44-2,69 (m, 2H, CH_2), 2,99-3,05 (m, 2H, CH_2), 3,17-3,27 (m, 1H, CH*H*), 4,51-4,70 (m, 2H, CH_2), 7,88 (s, 1H, CH), 8,17 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,53 (CH_3), 21,86 (CH_2), 24,46 (CH_2), 42,60 (CH_2), 50,70 (CH_2), 52,39 (CH_2), 144,08 (CH), 152,50 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 2922 (S-CH_2), 1466 (CH_2), 1022 S=O).

2.2.2.1.4. Síntesis de sulfoximinas de *N*-2-(butiltio)etil-heterociclos (20a-b).

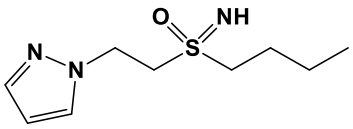


19a X = N, Y = C
19b X = N, Y = N

20a X = N, Y = C
20b X = N, Y = N

Para la obtención de los compuestos **20a** y **20b** se procedió a utilizar el procedimiento ya descrito en el punto 2.2.1.6 (página 79). Los residuos obtenidos tras la elaboración fueron purificados por cromatografía en columna de sílica gel (MeOH/$CHCl_3$ al 2 % v/v).

a) Datos espectroscópicos de 1-(2-(butilsulfonimidoil)etil)-1*H*-pirazol (**20a**).



Apariencia: Aceite incoloro.

Rendimiento: 62%.

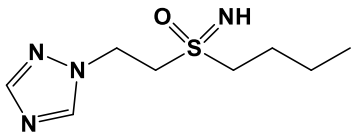
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,81 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,17-1,31 (m, 2H, CH_2), 1,54-1,69 (m, 2H, CH_2), 2;40-2,49 (m, 2H, CH_2), 2,65 (sa, 1H, NH), 3,56 (t, *J* = 5,9Hz, 2H, CH_2), 4,57 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H, CH_2), 6,20 (s, 1H, CH), 7,47 (s, 1H, CH), 7,50 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,48 (CH_3), 21,51 (CH_2), 24,40 (CH_2); 46,57 (CH_2), 51,70 (CH_2), 54,00 (CH_2), 105,88 (CH), 130,76 (CH), 140,53 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 2874 (S-CH_2), 1454 (CH_2), 1211 (C-N), 1009 S=O).

b) Datos espectroscópicos de 1-(2-(butilsulfonimidoil)etil-1*H*-1,2,4-triazol (**20b**).

Apariencia: Solido café.



Punto de fusión: 53-55 °C.

Rendimiento: 75 %

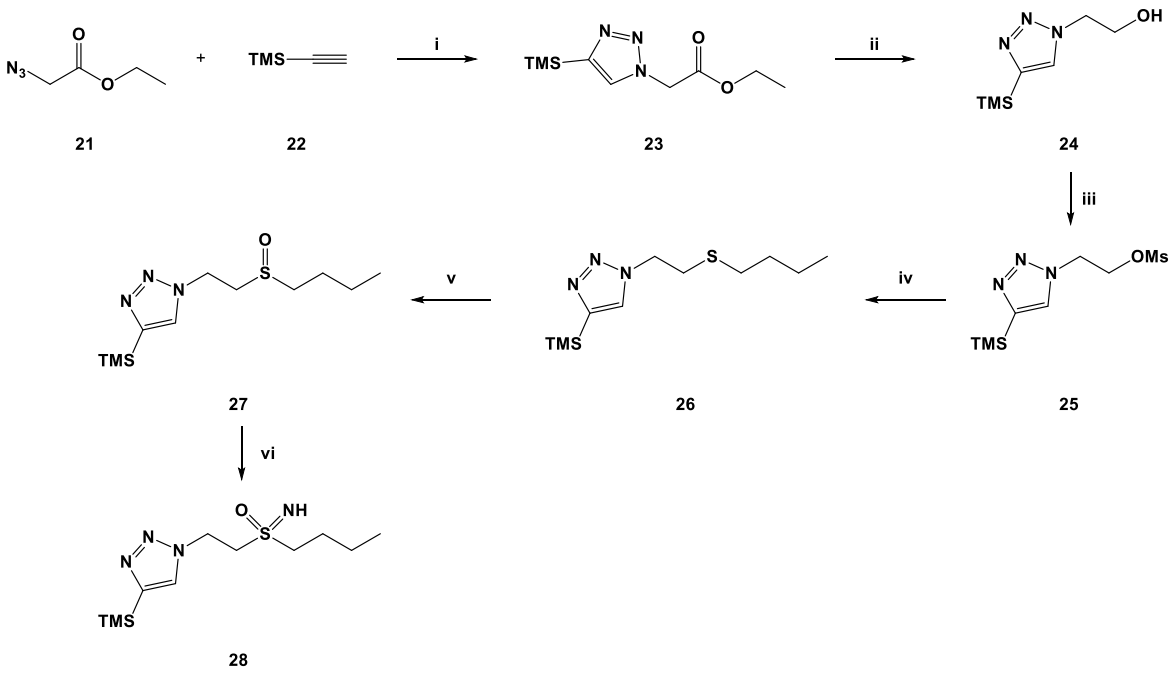
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,87 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,28-1,38 (m, 2H, CH_2), 1,63-1,74 (m, 2H, CH_2), 2,62-2,71 (m, 2H, CH_2), 2,92 (s, 1H, NH), 3,58 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, CH_2), 4,68 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, CH_2), 7,96 (s, 1H, CH), 8,22 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 13,55 (CH_3), 21,60 (CH_2), 24,41 (CH_2), 43,84 (CH_2), 53,12 (CH_2), 56,38 (CH_2), 144,45 (CH), 152,66 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 2874 (S-CH_2), 1458 (CH_2), 1138 (C-N), 1010 (S=O).

2.2.2.2. Síntesis de 1-(2-(butilsulfonimidoil)etil)-4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol (28).

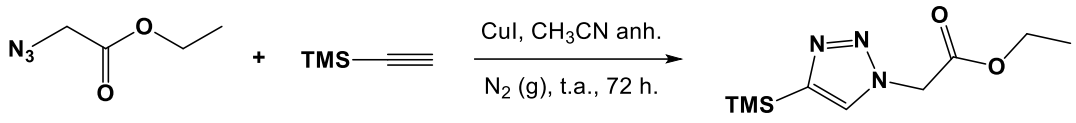
Continuando la síntesis de análogos heterocíclicos de L-BSO nos propusimos una nueva ruta, la cual llevó a la formación de un derivado de tipo 1,2,3-triazol, síntesis que se muestra en el **Esquema 13**.



Reactivos y condiciones: i) CuI, CH_3CN anh., N_2 (g), t.a., 72 h. ii) $LiAlH_4$, THF anh. N_2 (g), 50 °C, 1.5 h. iii) MsCl, piridina anh., N_2 (g), 0 °C, 4 h., iv) 1-BuSH, K_2CO_3, DMF anh., N_2 (g), t.a., 72 h., v) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 ahn., N_2 (g), -78 °C, 4 h., vi) MSH, CH_3CN anh., N_2 (g), t.a., 72 h.

Esquema 13. Ruta sintética para la obtención de 1,2,3-triazol.

2.2.2.2.1. Síntesis de etil 2-(4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) acetato (23).



21 **22** **23**

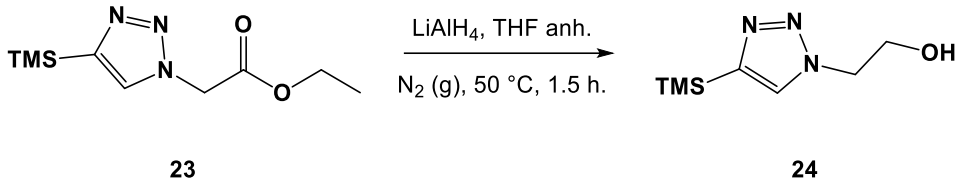
En un balón, seco y bajo atmosfera de nitrógeno, se disolvieron 885,8 mg (6,86 mmol, 1,0 eq) de azidoacetato de etilo (**21)** en 15 mL de CH_3CN anhidro. Luego se añadieron 0,97 mL (6,86 mmol, 1,0 eq) de etiniltrimetilsilano (**22)** y 261,0 mg (1,37 mmol, 0,2 eq) de CuI. La mezcla se agitó por 72 horas. Una vez finalizada la reacción se eliminó el disolvente en el rotavapor, se le añadió agua al residuo y se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL). La fase orgánica se lavó con 10 mL de agua destilada, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. El residuo que se obtuvo se purifico por cromatografía en columna de sílica gel (MeOH/ $CHCl_3$ al 2 % v/v), obteniéndose 842,2 mg (3,70 mmol, 54 %) del compuesto **23**, como un aceite café.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,21 (s, 9H, 3xCH_3), 1,17 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH_3), 4,12 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH_2), 5,09 (s, 2H, CH_2), 7,63 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): -1,31 (3xCH_3), 13,88 (CH_3), 50,07 (CH_2), 62,05 (CH_2), 130,45 (C), 146,73 (CH), 166,50 (CO).

IR (KBR, cm^{-1}): 2899 (S-CH_2), 1752 (C=O), 1249 (Si-CH_3), 840 (Si(CH_3)$_3$).

2.2.2.2.2. Síntesis de 2-(4-(trimetilsilil)-1H-1,2,3-triazol-1-il) etanol (24).



23 **24**

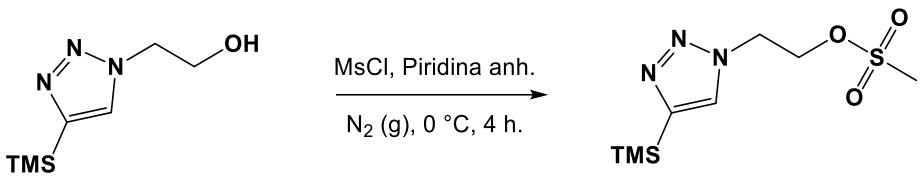
Se preparó una suspensión de 350,7 mg (9,24 mmol, 1,5 eq) de $LiAlH_4$ en 3 mL de THF anhidro, en un balón seco y bajo atmosfera de nitrógeno. Sobre esta suspensión se añadió, gota a gota, una disolución de 1.40 g (6.16 mmol, 1,0 eq) del compuesto **23** en 3 mL de THF anhidro. A la mezcla se le añadieron 5 mL de THF anhidro mientras se mantenía en agitación y luego se calentó a 50 °C por una hora. Transcurrido este tiempo la mezcla se diluyó con 80 mL de dietiléter y se le añadieron 8 mL de AcOEt, 6 g de KH_2PO_4 y posteriormente 3,5 mL de una disolución saturada de $NaHCO_3$. La mezcla se agitó por 30 minutos, se filtró y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El residuo obtenido se purifico por cromatografía en columna de sílica gel (MeOH/$CHCl_3$ al 2 % v/v), con lo cual se obtuvieron 684,9 mg (3,70 mmol, 60 %) del compuesto **24** como un aceite incoloro.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,20 (s, 9H, 3xCH_3), 3,92-4,00 (m, 2H, CH_2), 4,44 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H, CH_2), 5,21 (sa, 1H, OH), 7,69 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, d, ppm): -1,19 (3xCH_3), 52,23 (CH_2), 60,72 (CH_2), 130,68 (C), 146,07 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 3381 (OH), 2898 (S-CH_2), 1251 (Si-CH_3), 843 (Si-$(CH_3)_3$))

2.2.2.2.3. Síntesis de 2-(4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etil metanosulfonato (25).



24 **25**

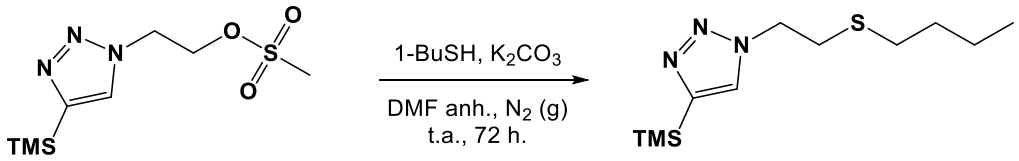
En un balón, seco y bajo atmosfera de nitrógeno, se disolvieron 611,5 mg (3,3 mmol, 1,0 eq) del compuesto **24** en 10 mL de piridina anhidra y la disolución resultante se enfrió a 0 °C. Luego se le añaden 0,25 mL (3,3 mmol, 1,0 eq) de cloruro de mesilo (MsCl), gota a gota, y la mezcla se agitó por 4 horas a 0 °C. Luego se añadieron 20 mL de una solución saturada de $CuSO_4$ en agua destilada y se continuó agitando por unos minutos. La mezcla de reacción se extrajo con AcOEt (4 x 15 mL) y las fases orgánicas recolectadas se lavaron con disolución acuosa satura de $CuSO_4$ (2 x 20 mL) y agua (2 x 20 mL), se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró y el residuo obtenido se purifico por cromatografía en columna de sílica gel (MeOH/$CHCl_3$ al 2 % v/v) obteniéndose 547,6 mg (2,08 mmol, 63 %) de un aceite incoloro correspondiente al compuesto **25**.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,29 (s, 9H, 3xCH_3), 2,88 (s, 3H, CH_3), 4,58-4,65 (m, 2H, CH_2), 4,71 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, CH_2), 7.62 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): -1,10 (3xCH_3), 37,48 (CH_3), 48,72 (CH_2), 67,63 (CH_2), 130,26 (C), 147,15 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 1347 (SO_2), 1250 (Si-CH_3), 847 (CH_2-O), 711 (Si(CH_3)$_3$)).

2.2.2.2.4. Síntesis de 1-(2-(butiltio)-etil)-4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol (26).



25 **26**

Para la síntesis del compuesto **26** se utilizó el procedimiento descrito en el punto 2.2.2.1.2 (página 97). El residuo obtenido de la reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (MeOH/$CHCl_3$ al 2 % v/v).

Apariencia: Aceite café.

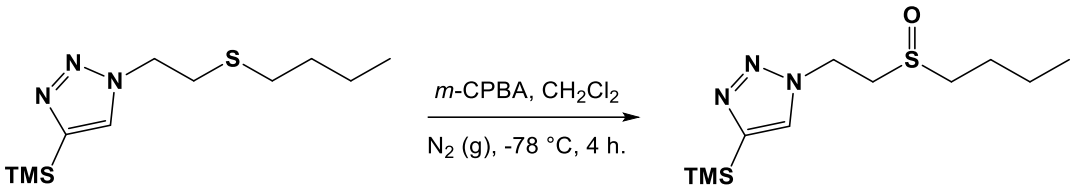
Rendimiento: 74 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,16 (s, 9H, 3xCH_3), 0,72 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,14-1,25 (m, 2H, CH_2), 1,31-1,40 (m, 2H, CH_2), 2,24 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, CH_2), 2,84 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH_2), 4,41 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH_2), 7,55 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): -1,33 (3xCH_3), 13,37 (CH_3), 21,57 (CH_2), 31,33 (CH_2), 31,63 (CH_2), 31,96 (CH_2), 49,54 (CH_2), 129,45 (C), 146,0 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 2872 (S-CH_2), 1249 (Si-CH_3), 844 (Si(CH_3)$_3$).

2.2.2.2.5. Síntesis de 1-(2-(butiltio)etil)-4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol (27).



26 **27**

En la preparación del compuesto **27** se utilizó el procedimiento previamente utilizado, descrito en el punto 2.2.1.5 (página 58). El residuo obtenido luego de su elaboración se purifico mediante cromatografía en columna de sílica gel (MeOH/$CHCl_3$ al 3 % v/v).

Apariencia: Solido blanco

Punto de fusión: 81-85 °C

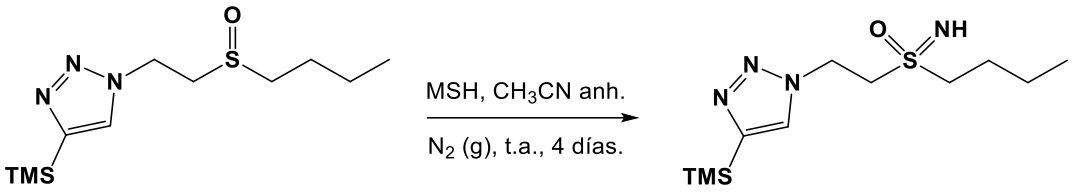
Rendimiento: 65 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,23 (s, 9H, 3xCH_3), 0,85 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH_3), 1,26-1,46 (m, 2H, CH_2), 1,54-1,70 (m, 2H, CH_2), 2,51-2,67 (m, 2H, CH_2), 3,03-3,11 (m, 1H, C*H*H), 3,25-3,34 (m, 1H, CH*H*), 4,72-4,85 (m, 2H, CH_2), 7,61 (s, 1H CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): -1,21 (3xCH_3), 13,54 (CH_3), 21,87 (CH_2), 42,72 (CH_2), 51,38 (CH_2), 52,37 (CH_2), 130,21 (CH), 146,21 (C), 146,78 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 2873 (S-CH_2), 1251 (Si-CH_3), 1051 (S=O), 843 (Si(CH_3)$_3$).

2.2.2.2.6. Síntesis de 1-(2-butilsulfonimidoil)etil)-4-(trimetilsilil)-1*H*-1,2,3-triazol (28).



27 **28**

Para obtener la sulfoximina **28** se utilizó el procedimiento descrito anteriormente en el punto 2.2.1.6 (página 79). El crudo de la elaboración se purifico por cromatografía en columna de sílica gel (MeOH/$CHCl_3$ al 3 % v/v).

Apariencia: Aceite café

Rendimiento: 10 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,21 (s, 9H, 3xCH_3), 0,79 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH_3), 1,19-1,30 (m, 2H, CH_2), 1,54-1,67 (m, 2H, CH_2), 2,56-2,64 (m, 2H, CH_2), 2,83 (sa, 1H, NH), 3,60 (s, 2H, CH_2), 4,79 (s, 2H, CH_2), 7,63 (s, 1H, CH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): -1,27 (3xCH_3), 13,38 (CH_3), 21,39 (CH_2), 24,17 (CH_2), 43;87 (CH_2), 53,96 (CH_2), 55,67 (CH_2), 130,35 (C), 146,76 (CH).

IR (KBR, cm^{-1}): 2875 (S-CH_2), 1250 (Si-CH_3), 1002 (S=O), 845 (Si(CH_3)$_3$)).

2.3. Ensayos Biológicos

2.3.1. Material Biológico

Parásitos: Para medir la actividad tripanosomicida de los compuestos, se utilizó el parásito *T. cruzi*, clon de la cepa Dm28c, en el estado morfológico epimastigote, obtenido del laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a fármacos del Programa de Farmacología Molecular y Clínica del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Células: Para medir la actividad citotóxica de los compuestos, se utilizaron células Vero®, que corresponden a fibroblastos de riñón de mono verde africano, y células RAW 264,7, que corresponden a macrófagos de mamíferos, ambas obtenidas del laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a fármacos del Programa de Farmacología Molecular y Clínica del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

2.3.2. Cultivos celulares

Células Vero y RAW 264,7: Las células Vero ® (fibroblastos de riñón de mono verde africano, ATCC® CCL-81™) fueron sembradas en frascos de cultivo de 25 cm^2 a una densidad de 4.000 células/cm^2, en medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22 %, estreptomicina 100 μg/mL, penicilina 100 μm/mL y suero fetal bovino al 10 % para crecimiento o al 5 % para mantenimiento. Las células fueron cultivadas a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5 % CO_2, substituyendo el medio cada 24 a 48 horas, de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Las células RAW 264,7 (macrófagos murinos), las cuales también fueron obtenidas de la ATCC®, fueron cultivadas de la misma forma descrita anteriormente.

Forma epimastigote de *T. cruzi*: Los parásitos en fase exponencial de crecimiento fueron diluidos en medio de cultivo Diamond suplementado con suero fetal bovino (SFB) (5 %) y hemina (5 %) a una densidad de $3x10^6$ epimastigote/mL.

A una suspensión de $3x10^6$ epimastigote/mL (medio de cultivo Diamond con suero fetal bovino) se añadieron los compuestos disueltos en DMSO a concentración final del 1 % (concentración de DMSO que no afecta la viabilidad de los parásitos) y se incubaron a 28 °C durante 24 horas.

Forma tripomastigote de *T. cruzi*: Para iniciar los cultivos de tripomastigotes, se inoculó cultivos de células Vero en semiconfluencia con tripomastigotes sanguíneos procedentes de ratones infectados. Tras invadir a las células Vero, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes, proliferando intracelularmente. Al cabo de 5 días aproximadamente, se convierten en tripomastigotes, los cuales lisan las células Vero, saliendo al medio de cultivo. Los tripomastigotes liberados fueron cosechados por centrifugación a 500 x g por 5 minutos para separar las células en suspensión. El centrifugado se dejó en reposo durante 30 minutos a 37 °C de modo que los tripomastigotes asciendan hacia el sobrenadante. Este sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos a fin de obtener en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes fueron suspendidos en medio RPMI y el número de parásitos fue determinado en una cámara de Neubauer.

A una suspensión de $12x10^6$ tripomastigotes/mL (medio de cultivo RPMI con suero fetal bovino) se adicionaron los compuestos disueltos en DMSO a concentración final de 1 % (concentración de DMSO que no afecta la viabilidad de los parásitos) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Ensayos de Viabilidad: La viabilidad celular se evaluó mediante la reducción mitocondrial de sales de tetrazolium o MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a formazán (**Figura 13**), que tiene un color purpura y cuya

absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el medio. Se cultivaron $3x10^6$ de epimastigote en 100 μL de medio Diamond, expuestos a cada compuesto (en triplicado) durante 24 horas a 28 °C. Luego se le adicionaron 10 μL de MTT 5 mg/mL en presencia de fenazina metosulfato 0,22 mg/mL (como transportador de electrones) y se incubó durante 4 horas a 28 °C. Posteriormente el precipitado de cristales de formazán fue disuelto en 100 μL de SDS al 10 % en HCl 0,01 M incubándolo a 28 °C durante toda la noche. La intensidad del color se midió a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas Asys Hitech, Austria

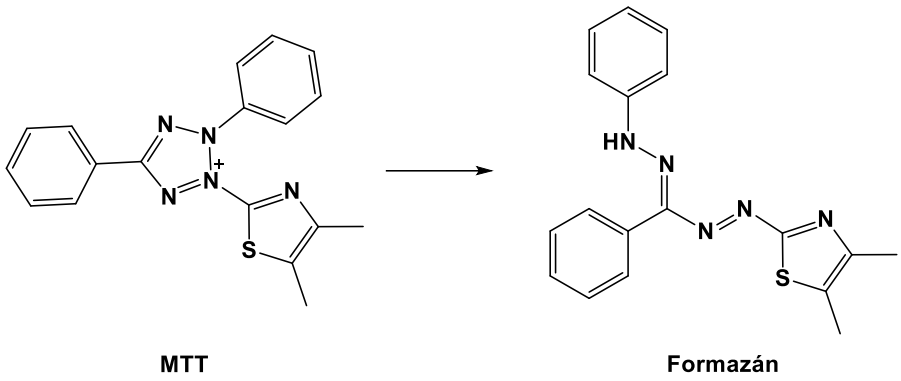
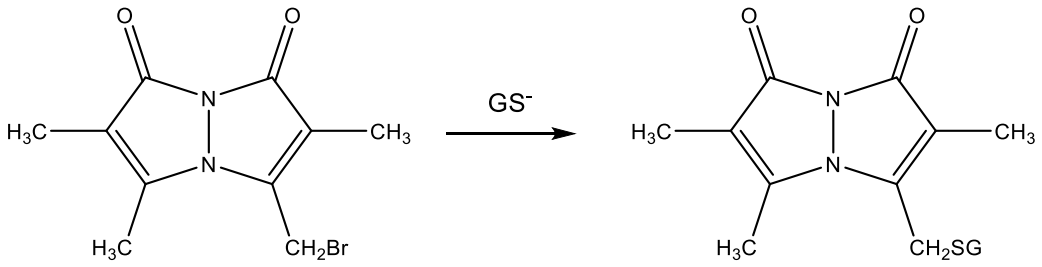


Figura 13. El MTT, es una sal de tetrazolio que es metabolizada por reductasas mitocondriales presentes en células vivas, transformándose en formazán.

2.3.3. Determinación de tioles.

El contenido de glutatión de epimastigote se determinó mediante derivación con monobromobimano (Tiolite®) y separación del aducto fluorescente por HPLC. Este proceso se hace para evitar la oxidación de GSH (GSSG) y poder generar un compuesto que pueda ser detectado en el HPLC, mediante detector de fluorescencia.

El sedimento producido por la centrifugación a 10.000 x g de la respectiva suspensión de parásitos, equivalente a 1 mg de proteína, se suspendió en 25 μL de HEPPS 40 mM, EDTA 2mM a pH 8 y 25 μL monobromobimano 2 mM y se calentó a 70 °C por 3 minutos, para formar los aductos fluorescentes, los cuales al ser excitados por una fuente de luz UV a una longitud de onda de 385 nm, son capaces de emitir una fluorescencia a una longitud de onda de 480 nm detectable espectrofotométricamente (**Esquema 14**). Las proteínas se precipitaron con 200 μL de ácido metano-sulfónico 4 M a 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante resultante de la centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos fue filtrado a través de una membrana de nylon 0,2 μm y 4 mm, y se aplicó a una columna HPLC de fase reversa Purospher®Star RP-18 encapped (5mm), 15 cm, Merck, usando como fase móvil camforsulfonato de litio al 0,25 % (p/v) en agua bidestilada ajustada a pH 2,65 con hidróxido de litio (solución A) y 25 % (p/v) de *n*-propanol en A (solución B). Las moléculas de GSH y $T(SH)_2$ se identificaron por el tiempo de retención característico que presentan en el HPLC, y la concentración de cada tiol se calculó a partir de una curva estándar de picomoles de glutatión reducido versus el área relativa del correspondiente pico del producto fluorescente. El área relativa del producto fluorescente es directamente proporcional a la concentración del tiol empleada.



Monobromobimano

G = γ-glu-NHCH(CH_2)CO-gly

Esquema 14. Reacción de Tiolite® con GSH.

Para identificar los tioles en las muestras estudiadas, se analizaron los cromatogramas entregados por el HPLC. Mediante los tiempos de retención estándar ya conocidos para GSH y $T(SH)_2$, y bajo condiciones experimentales especificas (solventes y tiempos de elución específicos) se puede reconocer estos compuestos, que muestran un pico en el cromatograma (**Figura 14**) en el tiempo correspondiente de retención. Los tiempos de retención respectivos a los tioles ensayados en epimastigote cepa Dm28c son, para el GSH = 23 minutos desde el inicio del paso de la muestra, y para el $T(SH)_2$ = 29 minutos desde el inicio del paso de la muestra, aproximadamente.

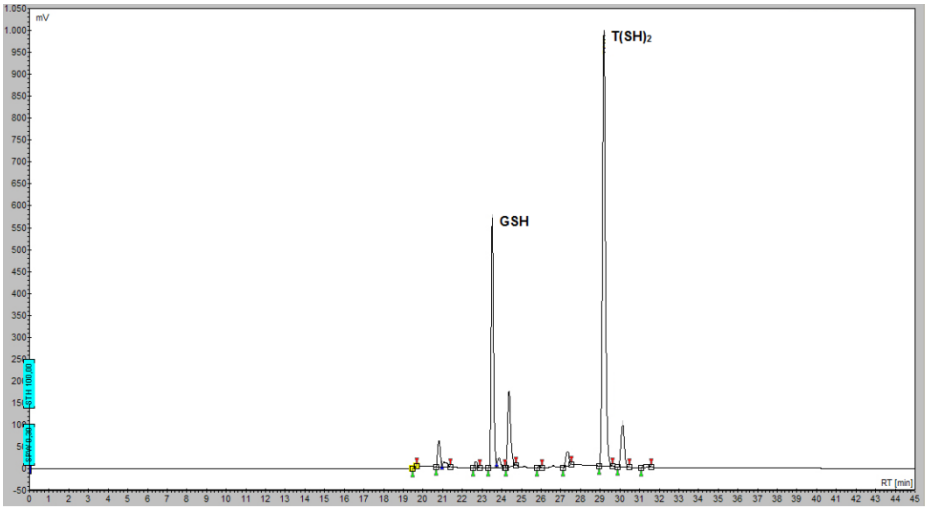


Figura 14. Cromatograma característico de la cuantificación de GSH y $T(SH)_2$. Aquí se aprecian sus correspondientes picos en los tiempos de retención específicos.

Se realizó un proceso de optimización del método utilizado, determinándose que una concentración adecuada de epimastigote cepa Dm28c, era $3x10^6$/mL. Cada ensayo realizado a los compuestos, corresponde al promedio de tres experimentos independientes ± su desviación estándar a concentración 100 μM. Se utilizó L-BSO como control positivo en la disminución de los tioles.

2.3.4. Determinación de proteínas totales.

La cantidad de proteína de los distintos cultivos se determinó mediante el método de Lowry y colaboradores,(*61*) utilizando como estándar albúmina de bovino fracción IV.

2.3.5. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados fueron comparados mediante análisis de varianza de las diferentes muestras entre sí y respecto de los controles considerando que hay dos o más tratamientos que influyen en el resultado final. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aspectos sintéticos

3.2. Síntesis de análogos e isósteros de L-BSO.

Buscando en bibliografía no se encontró demasiada información con respecto a L-BSO y su interacción con *T. cruzi*. Hiratake y cols. llevaron a cabo algunos estudios y plantearon una ruta sintética para la obtención de sulfoximinas para ser probadas sobre la enzima GCL de *E. coli*.(*62*)

Otros grupos de investigación, como el de Hamilton y cols., han desarrollado metodologías de análisis, *screenings* virtuales, tratamientos celulares y modelos 3D para la GCL de humano y sus resultados fueron comparados con GCL de *E. coli*.(*63*) Si bien esta información es muy valiosa y permitió hacernos una idea de posibles modificaciones estructurales de L-BSO para la obtención de nuevos derivados, debido a que no se encontraron estudios de nuevas moléculas con actividad sobre GCL de *T. cruzi*.

Faúndez y cols. fue uno de los primeros grupos de investigación en analizar como el L-BSO tienen un efecto sobre *T. cruzi* y de cómo este compuesto puede potenciar la actividad tripanosomicida de los fármacos comerciales conocidas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.(*39, 64*)

Por esta razón, nuestro grupo de investigación se interesó en desarrollar nuevos análogos e isósteros de L-BSO, conforme se muestran en la **Figura 15**. De esta forma, se pretende evaluar el efecto que tiene el largo de la cadena a ambos lados de la porción sulfoximina (cambio de L-Cys por L-Hcys o de la porción butilo de la izquierda). La importancia de la sustitución en β, es para obtener derivados de L-BSO, que sean análogos al estado de transición de la reacción que ocurre con el sustrato original en la síntesis del glutatión (Esquema 3, de la introducción). Por otro lado, el reemplazo de la porción zwitteriónica existente en L-BSO, por isósteros nitrogenados, es debido a que esta modificación química pudiera generar nuevos

compuestos que presenten una mejor absorción a nivel celular. Este último punto resulta muy atractivo de estudiar conforme a la baja absorción del L-BSO, lo cual se demuestra por las altas concentraciones usadas en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

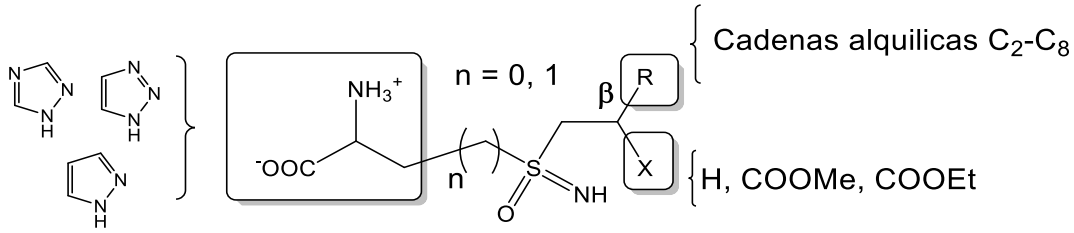
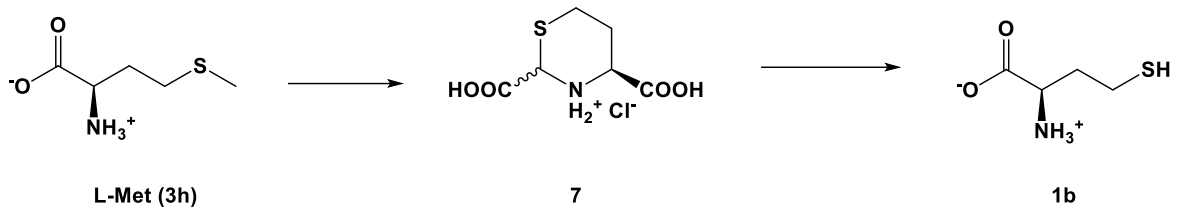


Figura 15. Modificaciones para estudiar sobre la estructura de L-BSO para la generación de nuevos análogos e isósteros.

3.2.1. Síntesis de análogos alquilados de L-Hcys y L-Cys.

Se inició la ruta sintética con la preparación de L-Hcys, (**1b**), debido a que, si bien es posible encontrarlo de manera comercial, los costos son muy altos y en pequeñas cantidades (10 mg). Después de realizar una búsqueda bibliográfica se encontró que es posible preparar **1b** a partir de L-Met (**3h**),(*60*) a través de la reacción de este aminoácido con HCl concentrado y ácido dicloroacético a reflujo (104 °C). Luego del respectivo proceso de aislamiento se obtuvo el compuesto **7**, aunque el rendimiento es bajo, cercano al 40 %, son valores similares a los encontrados en la literatura. En una etapa siguiente, el compuesto **7** se hizo reaccionar con TEA y una disolución etanólica de clorhidrato de hidroxilamina. Esta mezcla se calentó a reflujo y se dejó enfriar, obteniéndose el aminoácido **1b** como un sólido blanco, con rendimiento del 67 % (**Esquema 15).**



Esquema 15. Síntesis de L-Hcys a partir de L-Met.

Utilizando la información entregada por el RMN-^{1}H del compuesto **1b**, fue posible observar que las señales correspondientes a los grupos CH_2 presentes en la molécula (2,07-2,25 y 2,59-2,74 ppm) y la señal del CH (3,89 ppm) son equivalentes a las encontradas en la literatura (**Figura 16**). Con ello, se comprueba la identidad para el aminoácido deseado.

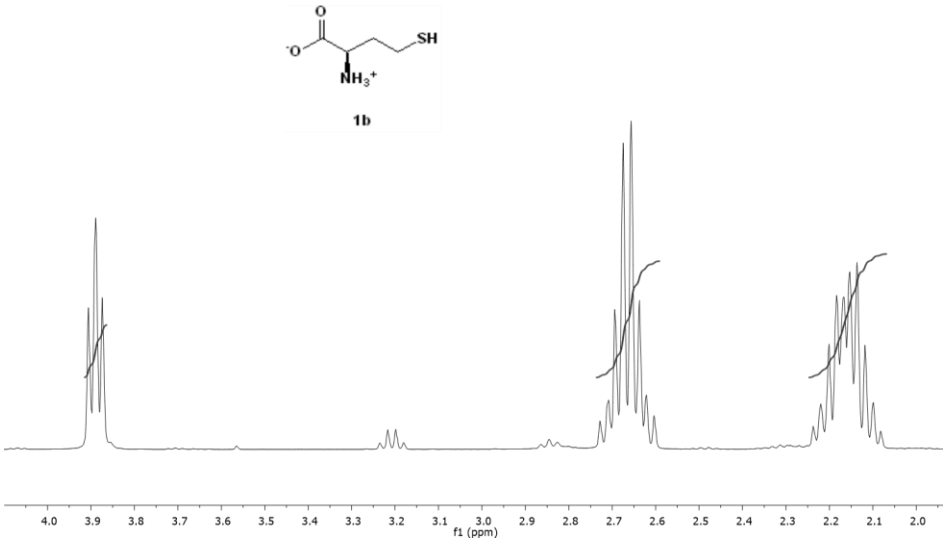
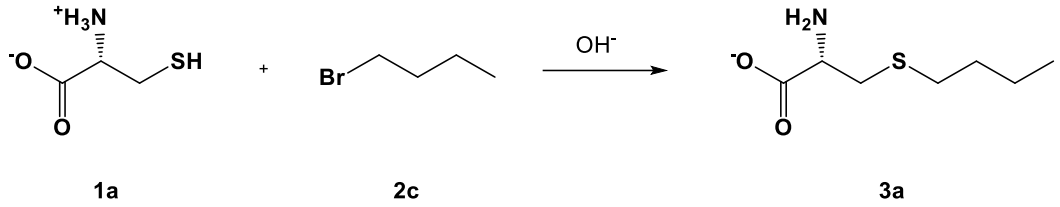


Figura 16. Espectro de RMN-^{1}H (D_2O) de **1b** preparado.

Luego de haber preparado **1b**, se procedió a realizar la alquilación del átomo de azufre de este aminoácido, para la cual se utilizaron diversos halogenuros de alquilo (Et-I, Pr-I, Bu-Br, Pent-Br, Hex-Br). Si bien, luego de revisar la bibliografía (*62*), y de acuerdo con las metodologías tradicionales de síntesis, se planteó iniciar la ruta sintética con la protección de la porción zwitterionica para posteriormente hacer la alquilación del átomo de azufre, pero esto no dio resultados positivos, debido a, posiblemente, la formación de un enlace S-S. Se intentó la ruptura de este enlace utilizando tri-*n*-butilfosfina(*62*), pero no funciono.

La alquilación se hace mediante una reacción de sustitución nucleofílica de tipo S_N2, en condiciones básicas, trabajando con la porción zwitteriónica sin proteger (**Esquema 16**),(*65*) obteniéndose de esta manera los análogos **3a-g** como sólidos blancos (**Figura 17**).



Esquema 16. Ejemplo de la alquilación del átomo de azufre de **1a**.

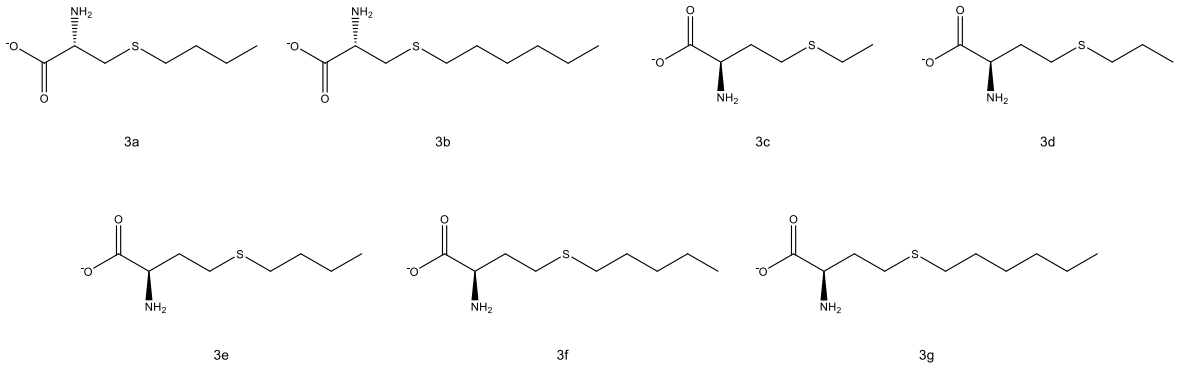


Figura 17. Compuestos preparados a partir de **1a** y **1b**.

Si analizamos sus correspondientes espectros de protones (RMN-^{1}H) y de carbono (RMN-^{13}C), para **3a-g**, se confirma la formación de cada uno de estos análogos alquilados de L-Cys y L-Hcys. Si tomamos como ejemplo el compuesto **3c**, se observa la aparición de una señal a 1,32 ppm, con una multiplicidad triplete (t) correspondiente al CH_3 del grupo etilo incorporado a la L-homocisteína. La señal que corresponde al CH_2 del etilo se encuentra solapada con la señal de otro CH_2 del aminoácido, esto queda reflejado en el multiplete (m) que aparece en aproximadamente 2,70 ppm. Esto situación también se observa al analizar los resultados que entrega el espectro bidimensional H-H COSY, donde se muestra la correlación entre las señales de los metilenos unidos al átomo de azufre, como la del metilo con CH_2 de la porción etílica incorporada al aminoácido (**Figura 18).**

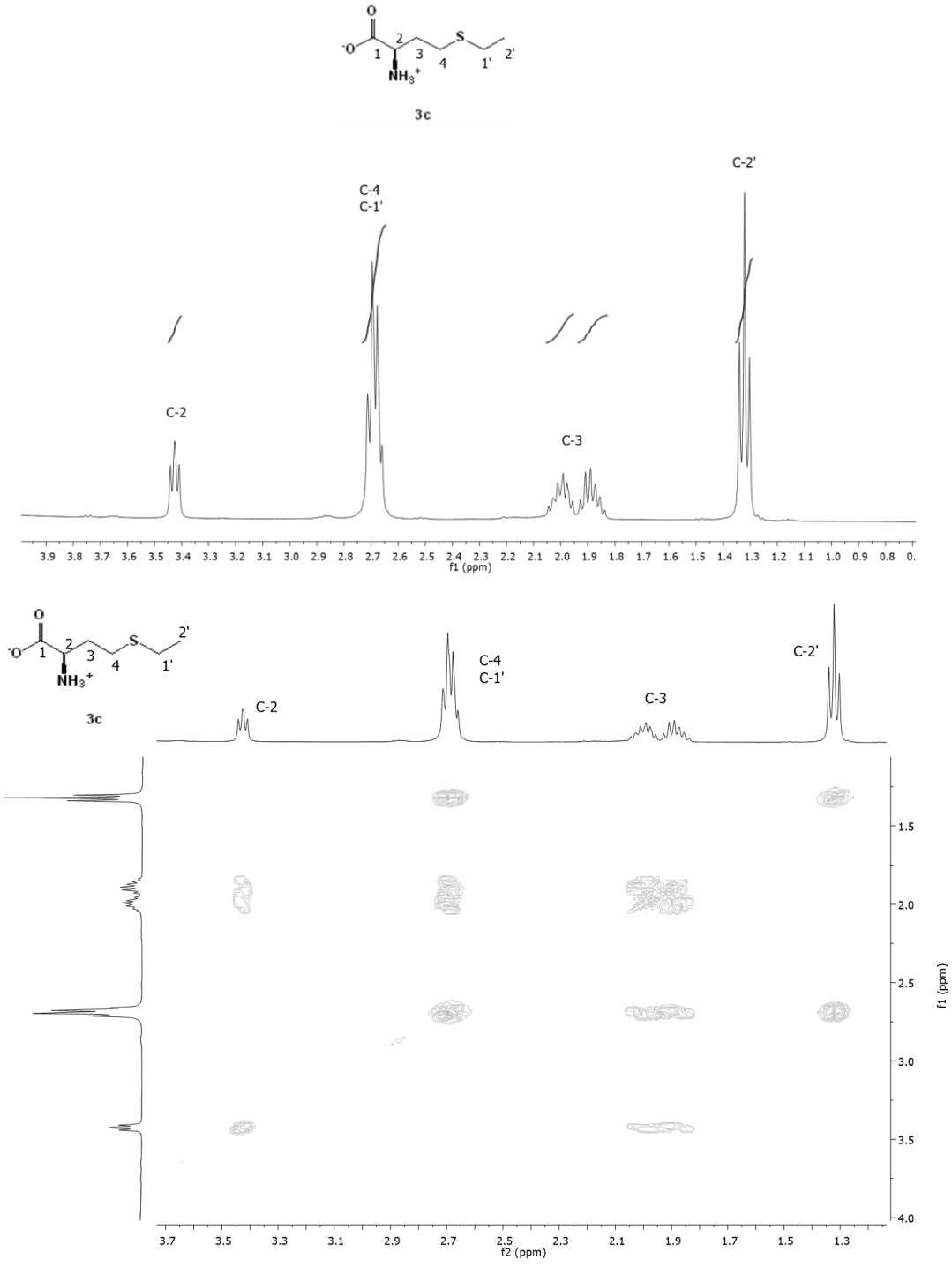
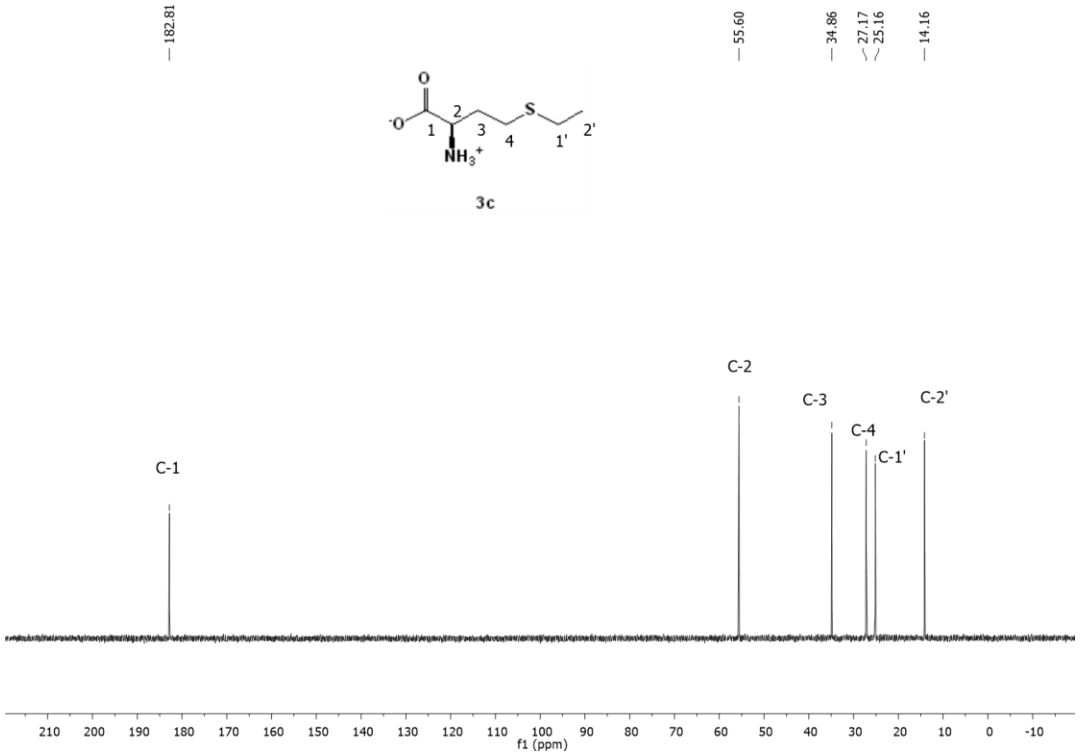
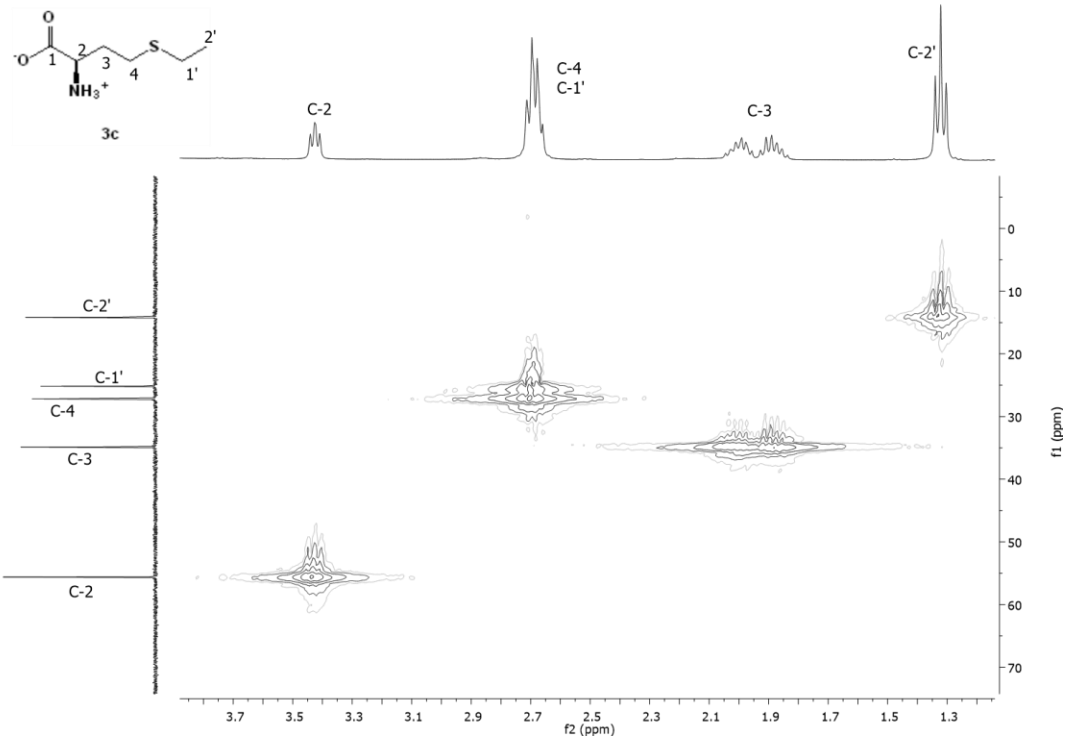


Figura 18. Espectro de RMN-^{1}H (arriba) y H-H COSY (abajo) de **3c**, aquí se muestra la correlación de cada una de las señales correspondientes a los protones.

Del espectro de COSY para **3c**, se observa que el protón de la posición C-2 se acopla con los protones del metileno de la posición C-3, los que equivalen a los multipletes que se encuentran en 1,88 y 2,00 ppm respectivamente. Estos, a su vez, se acoplan con el multiplete cercano a los 2,70 ppm, multiplete en donde se encuentran los protones de la posición C-4 y además los de C-1'. Este mismo multiplete presenta un acoplamiento con el triplete a 1,32 ppm, correspondiendo esta señal a los protones del CH_3. De esta manera, podemos confirmar la obtención del producto deseado.

Lo mismo ocurre con el espectro de RMN-^{13}C para **3c**. Aquí vemos las señales correspondientes a CH_3 (14,16 ppm) y CH_2 (25,16 ppm) del grupo etileno que se incorporó al aminoácido. Con los experimentos de HMQC y HMBC (espectros bidimensionales de RMN) es posible asignar correctamente cada una de las señales y observar la correlación que existen entre las señales de protones con las de carbono. De esta manera vemos como las dos señales en aproximadamente 1,88 y 2,00 ppm corresponde al metileno de la posición C-3 y que, como se mencionó antes, el multiplete en 2,70 ppm corresponde a los metilenos de la posición C-4 y C-1' (**Figura 19**).


182.81
55.60
34.86
27.17
25.16
14.16
3c
C-1
C-2
C-3
C-4
C-1'
C-2'
f1 (ppm)


3c
C-2
C-4
C-1'
C-3
C-2'
C-2'
C-1'
C-4
C-3
C-2
f2 (ppm)
f1 (ppm)

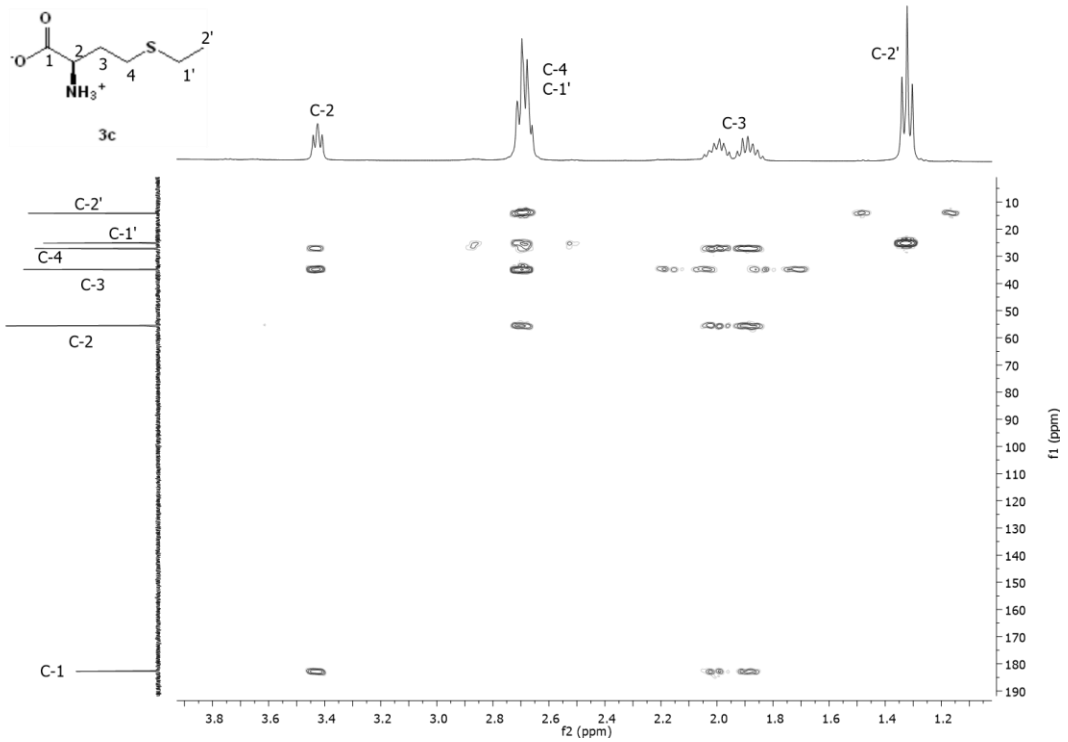


Figura 19. Espectros de RMN-^{13}C (arriba), HMQC (medio) y HMBC (abajo) de **3c**. Se aprecia la correlación de cada una de las señales, confirmando la estructura del compuesto.

Considerando las referencias encontradas en la literatura, y para una posterior comparación con las actividades biológicas que presentaran los análogos alquílicos propuestos, es que se decidió preparar L-metionina sulfoximina (L-MSO, **3h**). Para ello se utiliza como sustrato L-Met en su forma de etil éster hidrocloruro, es decir, que la porción acida del zwitterión ya se encuentra protegida como un éster etílico (**Figura 20**).

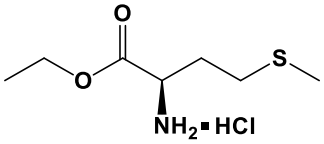
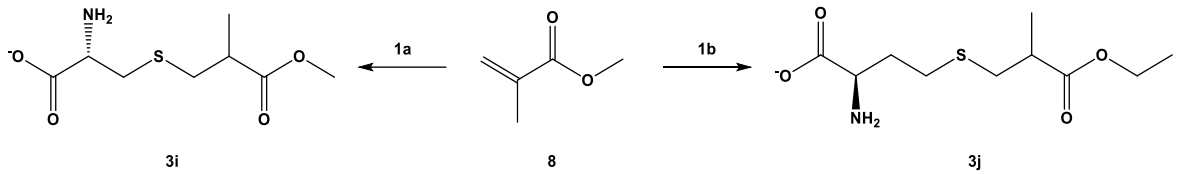


Figura 20. Estructura de hidrocloruro de L-Metionina etil éster (**3h**).

Paralelamente, se prepararon otros dos análogos de L-Cys *S*-alquilados, mediante una adición de tipo Michael entre **1a** (L-Cys) o **1b** con metacrilato de metilo (**8**). Esta reacción se hizo en condiciones básicas, utilizando una mezcla de etanol-agua con hidróxido de sodio, en cantidades catalíticas. De esta forma se obtuvieron los compuestos **3i** y **3j** con rendimientos moderados (98-89 %) (**Esquema 17**).



3i 8 3j

Esquema 17. Compuestos formados por reacción de Michael.

Al igual que en caso de la alquilación del átomo de azufre en L-Hcys y L-Cys, se intentó hacer la reacción de Michael entre estos aminoácidos, con sus porciones zwitterionica protegidas, con algunos compuestos carboxílicos α,β-insaturados, de acuerdo con procedimientos encontrados en bibliografía(*66-68*), lo cuales no tuvieron resultados positivos o mezclas complejas carentes de interés sintético.

El paso siguiente correspondió a la protección de la porción zwitteriónica de **3a-j**, debido a que de esta forma será mucho más fácil para seguir el trabajo sintético. Esto es porque facilita las reacciones siguientes, evita problemas de solubilidad, y por último facilita el proceso de purificación. Las protecciones que se plantearon son una esterificación para la porción acida y la protección con Boc_2O para el grupo amino. Salvo para **3h**, el cual ya se encuentra esterificado, estos pasos se utilizaron para todos los compuestos preparados hasta el momento.

De acuerdo a la bibliografía,(*69*) se hizo una esterificación de Fisher, haciendo parar una corriente de HCl (g), el cual se genera haciendo gotear H_2SO_4 concentrado sobre NaCl, sobre una suspensión de los compuestos **3a-j**. De esta forma, se obtienen los correspondientes ésteres. Luego, para cada uno de los productos anteriores, se protegió el grupo amino con di-*tert*-butil dicarbonato o anhídrido de Boc (Boc_2O, **9**).(*70*) Después de aislar los análogos protegidos y de purificar por cromatografía en columna, se obtuvieron los respectivos sulfuros **4a-j** con rendimientos variables (57–95 %). Mediante RMN-^{1}H y RMN-^{13}C se logró comprobar la efectividad de las reacciones de esterificación y protección de la porción zwitteriónica para cada producto esperado. Como ejemplo podemos analizar el espectro de RMN-^{1}H del compuesto **4j** (**Figura 21**).

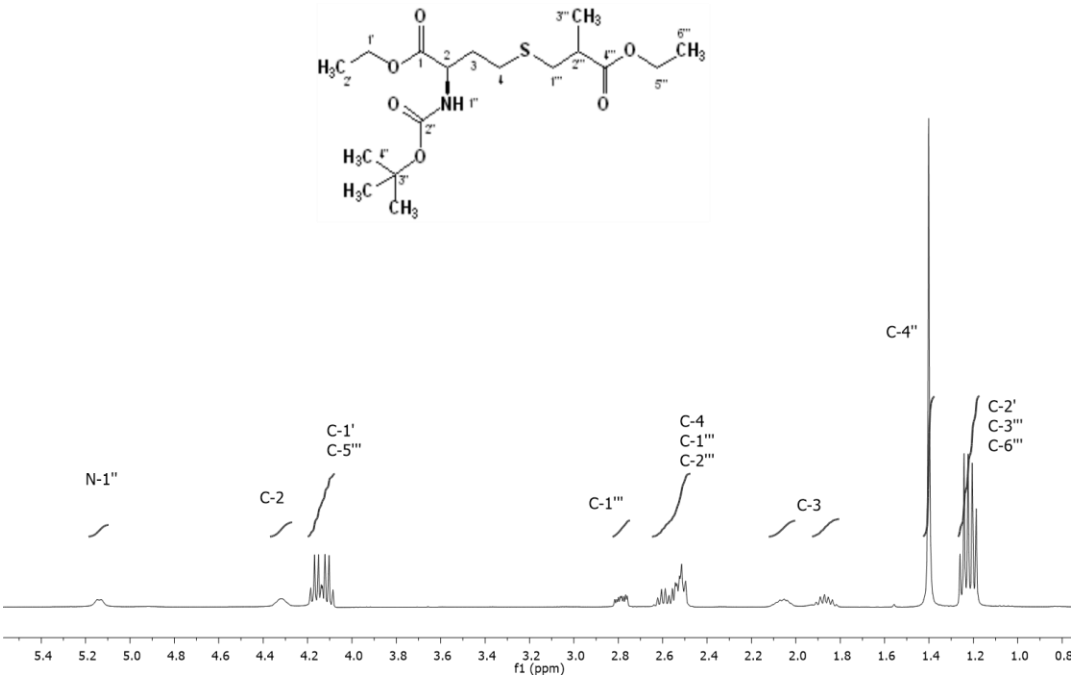
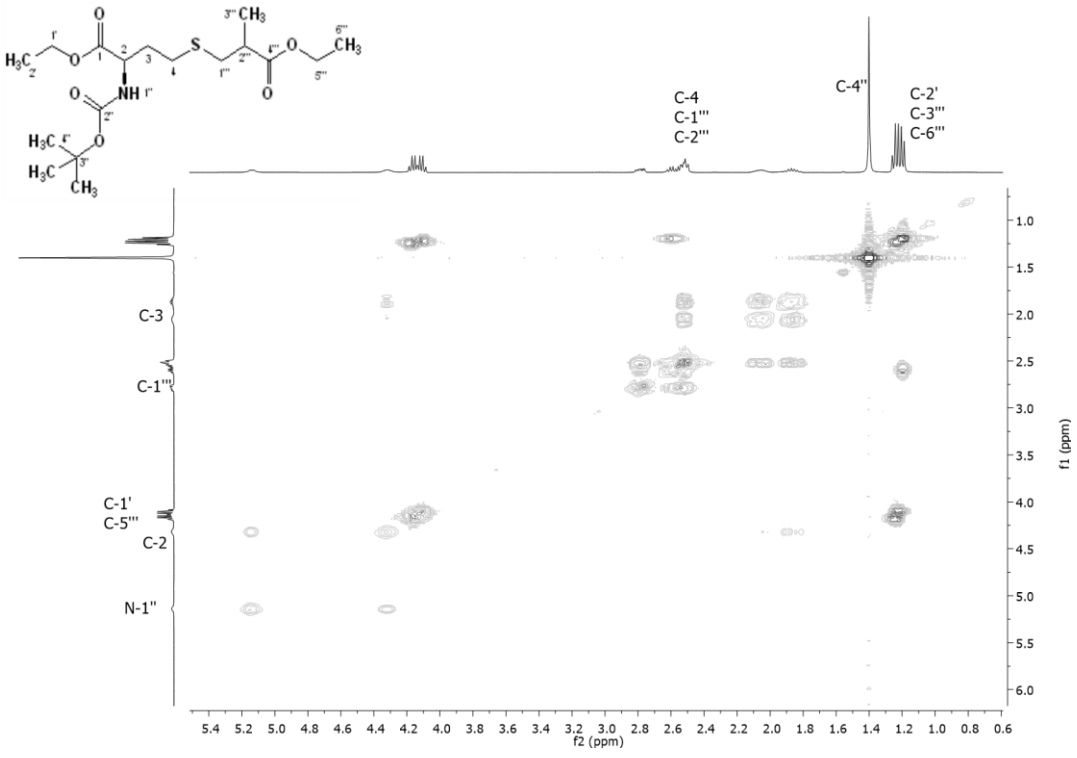


Figura 21. Espectro de protones del compuesto **4j** y sus correspondientes asignaciones.

La principal evidencia de que se logró la protección del amino es la intensidad de la señal que aparece en 1,40 ppm, la cual corresponde a los nueve átomos de hidrogeno de los tres metilos del grupo Boc. Además, se logra ver que aparecen las señales características del grupo etilo de la cadena lateral del éster, que corresponde a un cuadruplete cercano a los 4,2 ppm (C-1') y un triplete alrededor de los 1,2 ppm (C-2'). Cabe destacar que para **4j**, las señales del metilo no se aprecian con claridad ya que, además, en la misma zona, se encuentra la señal del metilo C-3''' y del metilo de un nuevo grupo OEt (C-6'''). Este nuevo grupo etoxilo proviene de una transesterificación que sufre **4j**, reemplazando el grupo OMe (proveniente del metil metacrilato), al utilizar etanol en el proceso de esterificación. También se ve una segunda señal del metileno del nuevo grupo OEt que se incorpora (C-5'''). Esta misma situación ocurrió en el compuesto **4i**. Para lograr una mejor asignación de las señales también se utilizaron las técnicas RMN-2D (**Figura 22**).



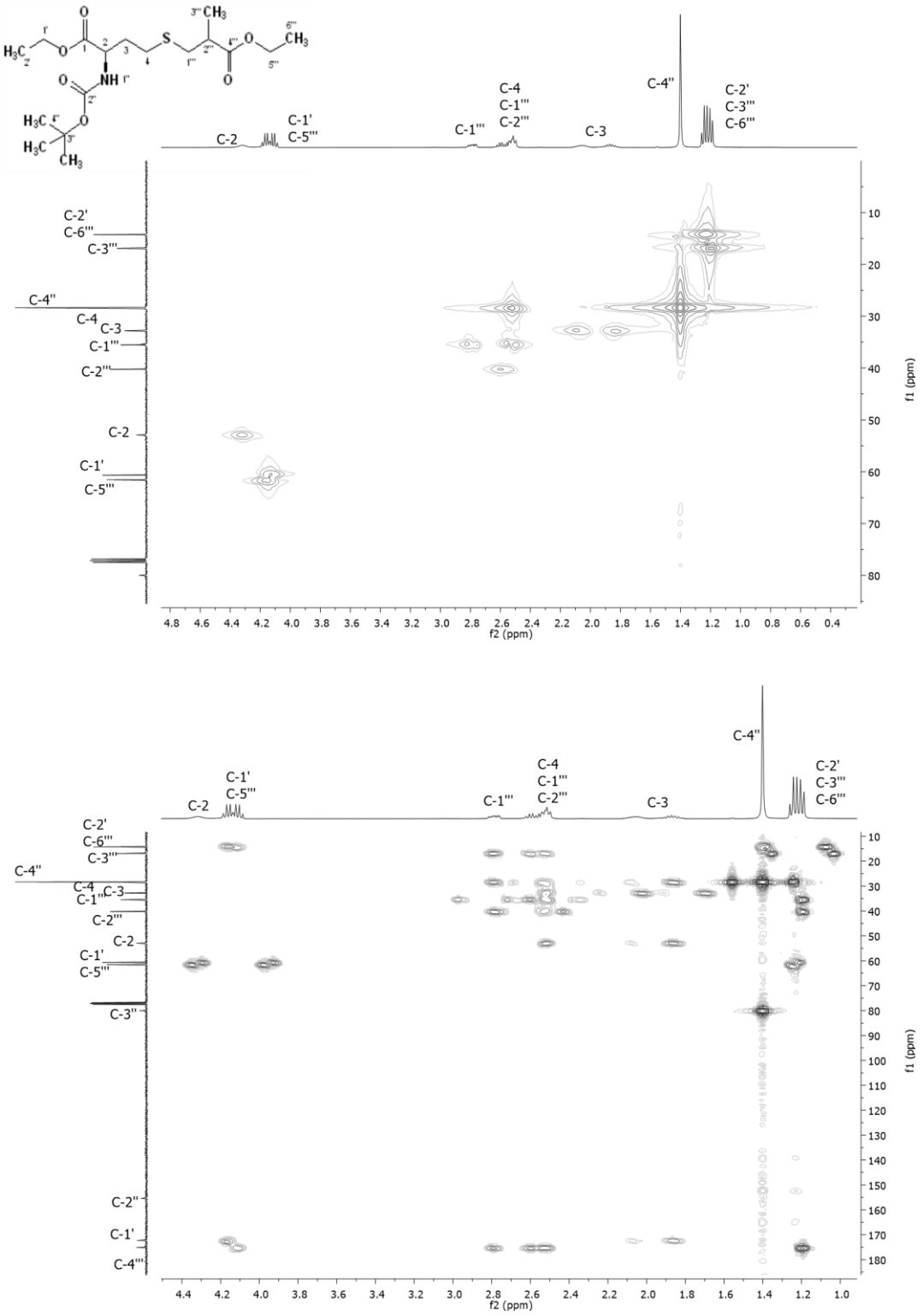
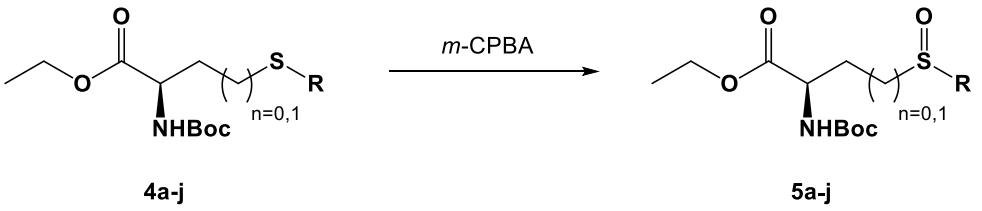


Figura 22. Espectros de ^{1}H-COSY (arriba), HMQC (medio) y HMBC (abajo) para el compuesto **4j**. Con esto se pudo determinar la estructura del compuesto.

En el espectro de ^{1}H-COSY se observa cómo se correlacionan los protones de las posiciones N-1'' y C-2 y de cómo este se correlaciona con los protones de la posición C-3, y de cómo C-3 interacciona con C-4, conformando la parte que corresponde a L-Hcys. También se ve como C-2''' interacciona con C-3''' y con C-1''', todas estas señales son de la sustitución del átomo de azufre. Estas interacciones fueron reafirmadas a través de los espectros de HMQC y HMBC.

3.2.2. Obtención de sulfóxidos derivados de L-Hcys y L-Cys

Una vez que se logró la protección de la porción zwitteriónica de cada análogo *S*-alquilado de L-Hcys y L-Cys, se procedió a la formación de los sulfóxidos, mediante una reacción de oxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA).(*71*) Para ello fue necesario llevar a cabo la reacción a baja temperatura, para evitar que se produzca una sobre oxidación, añadiendo dos unidades de oxígeno a las moléculas, formando sulfonas. De esta manera se obtuvieron los compuestos **5a-j** (**Esquema 18**).



4a-j **5a-j**

Esquema 18. Esquema general de la formación de sulfóxidos.

Cuando se llevó a cabo la reacción con los compuestos **4a**, **4b** y **4i** se apreció la formación de dos compuestos distintos para cada uno de ellos, la que correspondía a una mezcla diastereomérica de los respectivos sulfóxidos. Estos estereoisómeros lograron ser separados mediante cromatografía en columna. En cada uno de los tres casos se obtuvo un isómero mayoritario con respecto al otro (**Figura 23**).

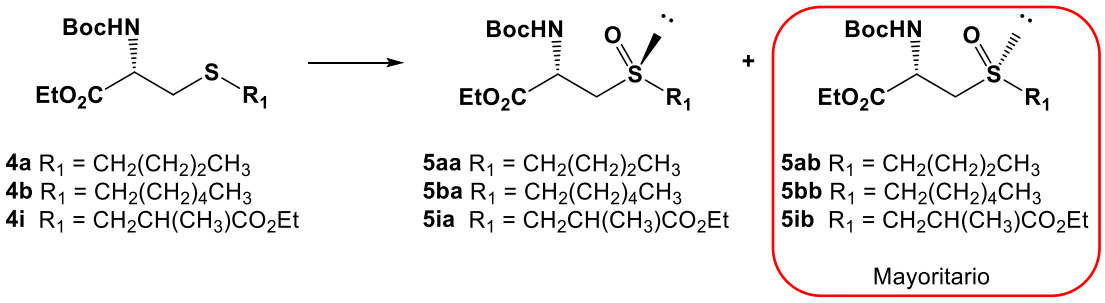


Figura 23. Diasterómeros obtenidos luego de la oxidación de **4a**, **4b** y **4i**.

Una posible explicación para la estereoselectividad observada en la obtención de los sulfóxidos anteriores, puede sugerirse a partir del hecho que estos compuestos adquieran una conformación de tipo silla de manera análoga a la de un ciclohexano. De esta forma se puede establecer una interacción por puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno de la porción sulfóxido (S=O) y el hidrógeno del NH (zwitterión). Con este modelo, propuesto por Schwan y cols., se explica que el estereoisómero mayoritario corresponderá al compuesto que adopte la conformación más estable, es decir, aquel donde uno de los grupos voluminosos se encuentre en posición axial y el otro en posición ecuatorial (**Figura 24**).(*72*) De forma adicional, con este modelo se podría establecer la estereoquímica del centro asimétrico formado con la incorporación del oxígeno sobre el átomo de azufre, adquiriendo una configuración de tipo *S* en el isómero mayoritario y una configuración de tipo *R* para el producto minoritario.

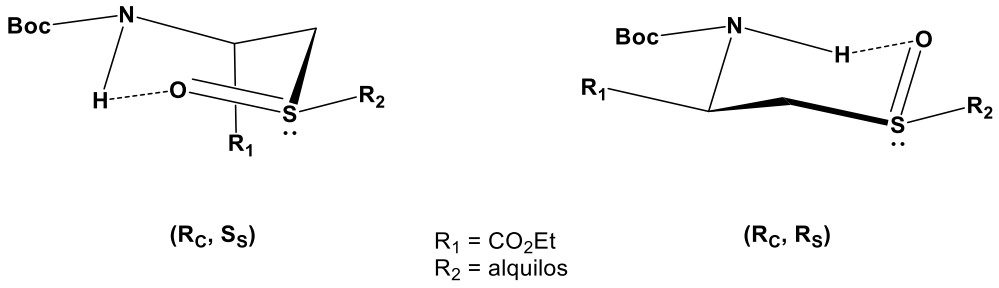
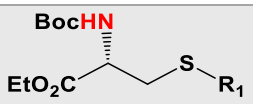
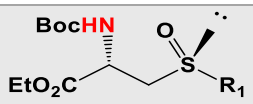
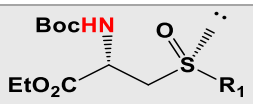


Figura 24. Posibles confórmeros para los compuestos **5a**, **5b** y **5i**.

Si analizamos los correspondientes espectros de RMN-^{1}H, la evidencia espectroscópica nos muestra un desplazamiento hacia más bajo campo de la señal del NH, presumiblemente al enlace de hidrogeno intramolecular que se formaría, gracias a las conformaciones propuestas, además de la variación del entorno electrónico que entrega el átomo de oxigeno que se incorpora. La variación en el desplazamiento químico es más apreciable en el sulfóxido mayoritario con respecto a la misma señal de los sulfuros correspondientes (**Tabla 3**).

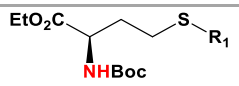
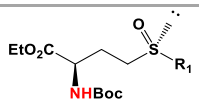
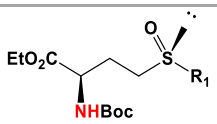
Tabla 3. Comparación entre las señales de NH de sulfuros **4a-b** y **4i**, y sulfóxidos **5a-b** y **5i**.

	δ (ppm) de NH en sulfuros y sulfóxidos		
			
R_1: $CH_2(CH_2)_2CH_3$	5,39	5,66	5,79
R_1: $CH_2(CH_2)_4CH_3$	5,39	5,66	5,95
R_1: $CH_2CH(CH_3)CO_2Et$	5,42	5,65	5,78

En el caso de los sulfóxidos provenientes de **1b**, también se obtuvieron dos compuestos distintos, uno mayoritario con rendimientos moderadamente buenos (66-88 %) y el minoritario con rendimientos mucho más bajos (18-23 %). La obtención de esta mezcla de diasterómeros para estos dos compuestos, no se puede atribuir a que esto sea el resultado de que adopten la conformación tipo silla discutido previamente. Esto porque estos compuestos presentan un carbono más en su esqueleto, impidiendo que adopten dicha conformación y que se genere la interacción por puente de hidrógeno intramolecular.

En estos compuestos, la principal influencia en la modificación de los desplazamientos químicos sería la variación de la densidad electrónica que se genera por la incorporación del átomo de oxígeno a la estructura, modificando el entorno electrónico. En la **Tabla 4** se puede apreciar la influencia que tiene el S=O sobre el NH de los sulfuros.

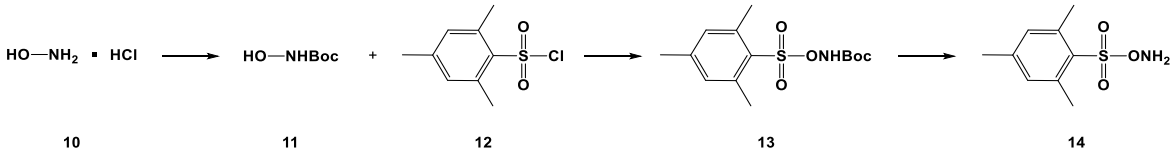
Tabla 4. Diferencias en la señal de NH entre sulfuros y sulfóxidos derivados de L-Hcys.

			
R_1: CH_2CH_3	5,13	5,36	5,61
R_1: $CH_2CH_2CH_3$	5,13	5,24	5,51
R_1: $CH_2(CH_2)_2CH_3$	5,15	5,29	5,48-5,62
R_1: $CH_2(CH_2)_3CH_3$	5,14	5,23	5,36-5,48
R_1: $CH_2(CH_2)_4CH_3$	5,15	5,18	5,32
R_1: CH_3	5,29	5,25	5,45
R_1: $CH_2CH(CH_3)CO_2Et$	5,13	5,32	5,49

3.2.3. Preparación de MSH y obtención de análogos de L-Hcys y L-Cys sulfoximinas

La parte final en la preparación de los análogos de L-BSO del tipo sulfoximinas, corresponde a la incorporación del NH a los sulfóxidos **5a-j**, para lo cual se utilizó MSH (**14**) de acuerdo a lo encontrado en literatura.(*62*) Este compuesto debió ser preparado en el laboratorio, debido a que no es posible encontrarlo comercialmente, y presenta riesgos de explosión, haciendo necesario extremar las precauciones al momento de trabajar con él, además de almacenarlo en recipientes plásticos e, idealmente, no más de seis meses.

Haciendo una revisión bibliográfica fue posible encontrar una manera de preparar MSH (**14)** a partir de clorhidrato de hidroxilamina (**10**) (**Esquema 19**).(*73, 74*) Una vez que se obtuvo **14**, se compararon los datos espectroscópicos experimentales con los encontrados en la literatura, obteniéndose valores equivalentes (**Figura 25**).



Esquema 19. Síntesis de **14** a partir de clorhidrato de hidroxilamina.

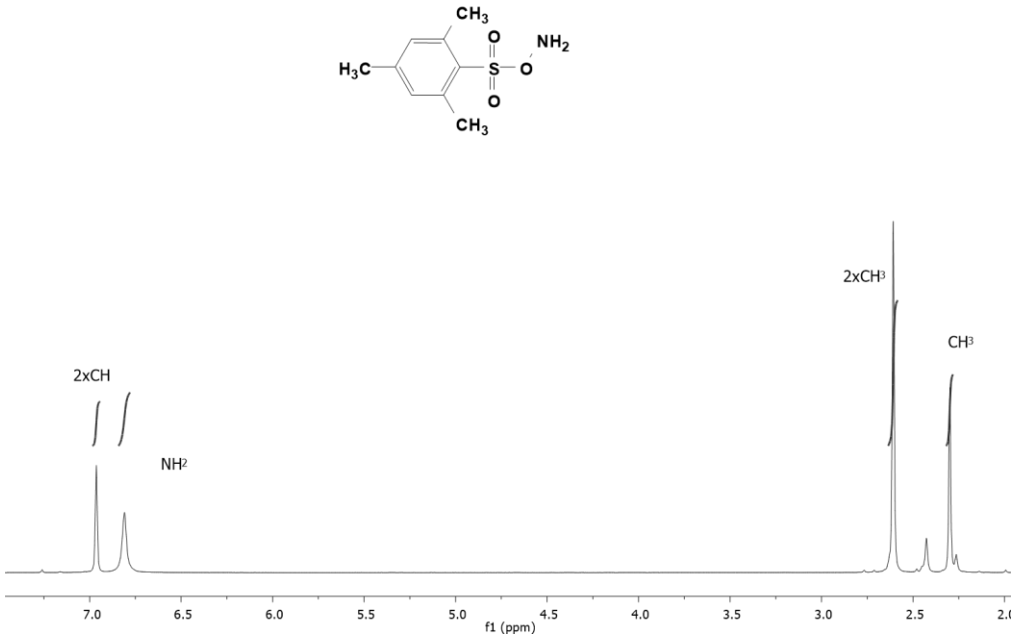


Figura 25. Espectro de RMN-^{1}H para el compuesto **14**.

Si bien en la formación de los sulfóxidos se obtuvieron dos productos, para la obtención de las respectivas sulfoximinas, se decidió trabajar sólo con el sulfóxido que se obtienen de manera mayoritaria.

En bibliografía es posible encontrar la síntesis de sulfoximinas comenzando por la incorporación del grupo amino primero y luego la del oxígeno(*44*), es decir, en el orden contrario a lo planteado en esta tesis. Los intentos de hacer esto en el laboratorio no dieron los resultados esperados, por lo que se abandonó esta idea y se continuó trabajando de la forma antes planteada

Una de las ventajas de utilizar MSH como reactivo para la transformación de sulfóxidos en sulfoximina, es que retiene la configuración absoluta de la molécula precursora. MSH es un nucleófilo suave, gracias a que los electrones presentes en la amina se ven deslocalizados por los átomos de oxígeno, y los electrones del oxígeno a su vez se ven deslocalizados por efecto inductivo e hiperconjugación que provoca el anillo bencénico. Al poseer los grupos metilos en las posiciones *orto* y *para*, bajan las probabilidades de reacciones secundarias, debido al impedimento estérico sobre la molécula objetivo. Si bien el tiempo de reacción se puede considerar largo (24-72 horas), al tener una baja reactividad y la ausencia de catalizadores, favorecería la no formación de reacciones secundarias, y la atmosfera inerte la oxidación y descomposición de **14**. El mecanismo por el cual se adiciona el NH al sulfóxido es el que se propone en la **Figura 26**.

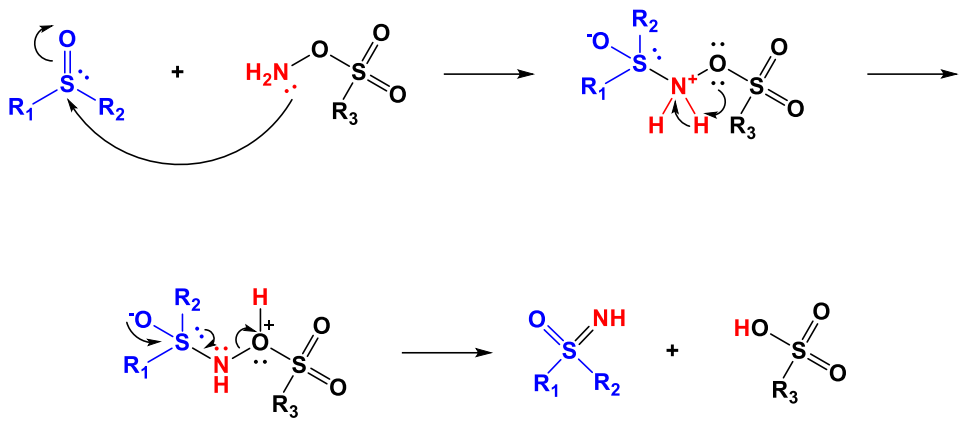


Figura 26. Mecanismo propuesto para la síntesis de sulfoximinas.

De esta manera se logró preparar las distintas sulfoximinas que se muestran en la **Figura 27**.

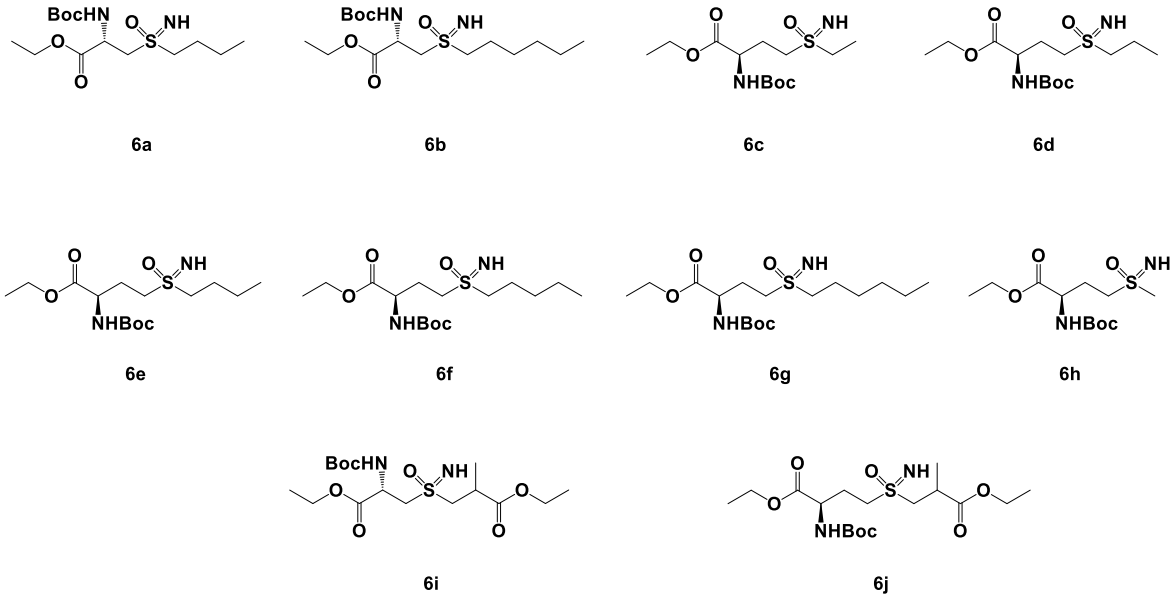
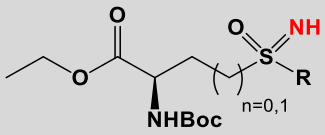


Figura 27. Análogos de L-BSO sintetizados a partir de L-Hcys y L-Cys.

La principal evidencia para asegurar que se lograron los compuestos deseados la entrega los correspondientes espectros de RMN-^{1}H de cada uno de ellos. Aquí se puede apreciar la aparición de una señal, de tipo singlete ancho por lo general, que se mueve entre los 2,30 y 2,80 ppm (**Tabla 5**), correspondiente esta señal la del NH que se incorpora en la molécula.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de NH para **6a-j** en sus espectros de RMN-^{1}H.

δ (ppm) de NH de sulfoximinas	
Compuesto	
6a	2,78
6b	2,64
6c	2,20-2,35
6d	2,59
6e	2,58
6f	2,25-2,49
6g	2,55
6h	2,61
6i	2,62
6j	2,88-3,17

Si tomamos como ejemplo **6d**, mediante un experimento de ^{1}H-COSY, es posible apreciar la correlación entre cada una de las señales (**Figura 28**), como la señal correspondiente al C-2 interactúa con el nitrógeno de amida (N-1'') y con los dos protones de la posición C-3, como se correlacionan las señales del metilo C-1''' con los dos metilenos de la cadena C-1''' y C-2''', y de cómo, salvo la señal de trimetil (C-4''), la única señal que no presenta interacciones con las demás es la de N-4''', de la señal del NH incorporado.

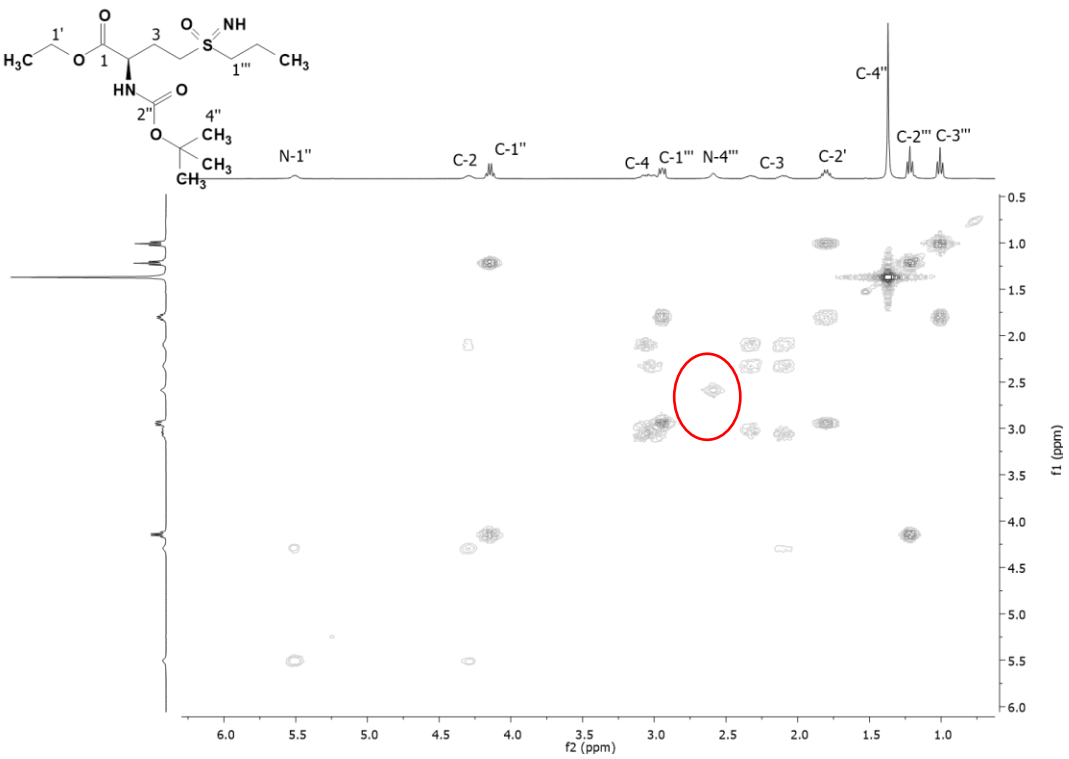


Figura 28. ^{1}H-COSY del compuesto **6d**.

De manera similar, podemos hacer un análisis del espectro de RMN-HMQC y RMN-HMBC, con lo cual se pudo discriminar cada una de las señales y la correlación entre los átomos de carbono y los hidrógenos (**Figura 29**).

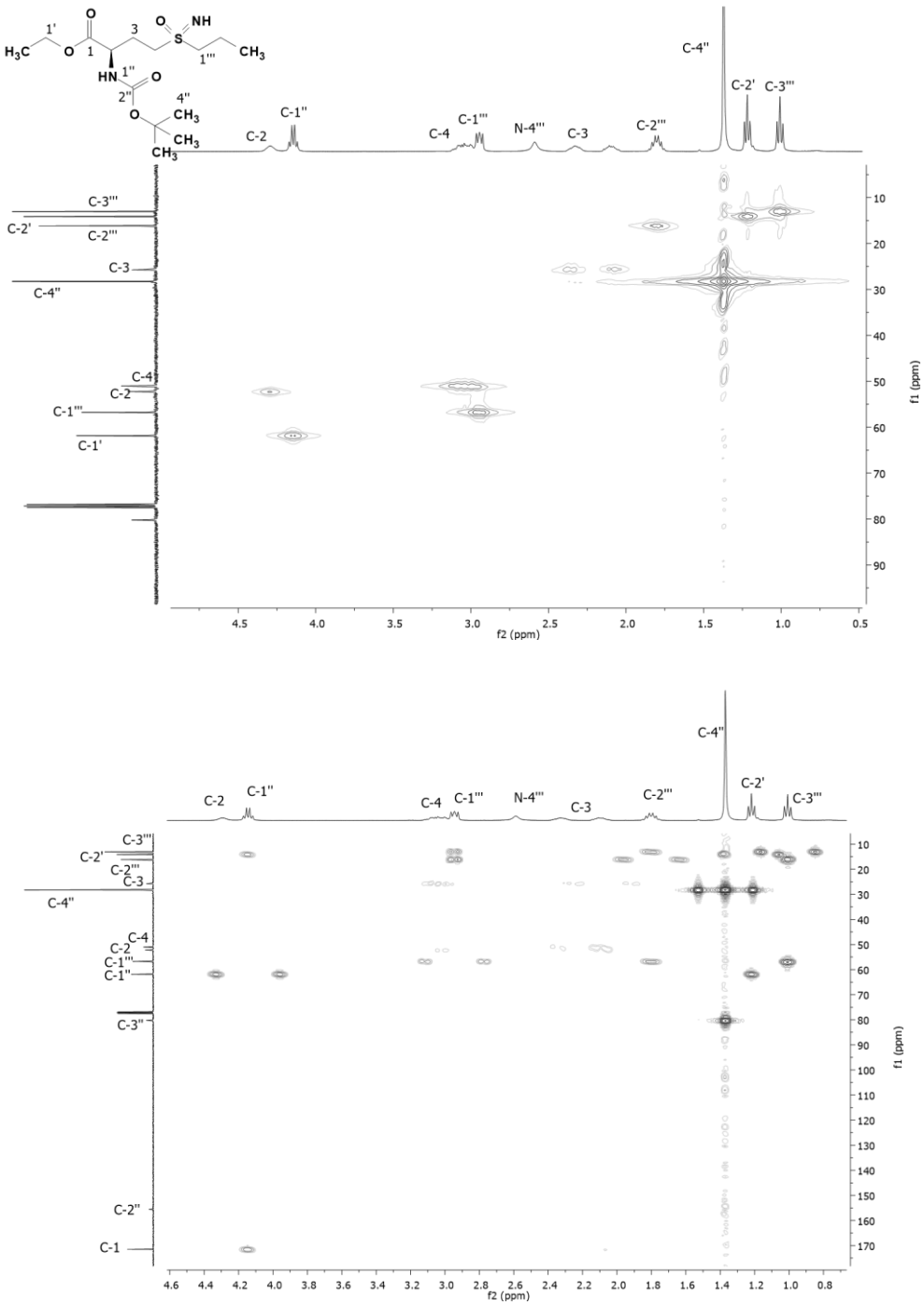


Figura 29. Espectros de HMQC (arriba) y HMBC (abajo) para el compuesto **6d**.

Una vez que se prepararon y caracterizaron cada uno de los análogos alquilados de L-BSO, se centró la atención en la síntesis de los anillos heterocíclicos para la siguiente parte del trabajo.

3.2.4. Síntesis de análogos heterocíclicos de L-BSO

Tal como se planteó dentro de los objetivos de esta tesis, una de las propuestas sintéticas es la modificación de la porción zwitteriónica del L-BSO por anillos heterocíclicos. Esta estrategia hace uso de los conceptos de isósteros y bioisósteros, vistos previamente.

3.2.5. Análogos heterocíclicos a partir de pirazol y 1,2,4-triazol

Como se mencionó en la introducción, al hacer una modificación isostérica es posible modular una propiedad biológica. En este caso, al reemplazar la porción zwitteriónica por anillos heterocíclicos es para poder mejorar la absorción a través de membrana en el parásito e incluso favorecer la coordinación con metales, como Mg^{+2}, necesario para la estabilización del análogo del estado de transición propuesto en la síntesis de GSH (**Figura 30**).

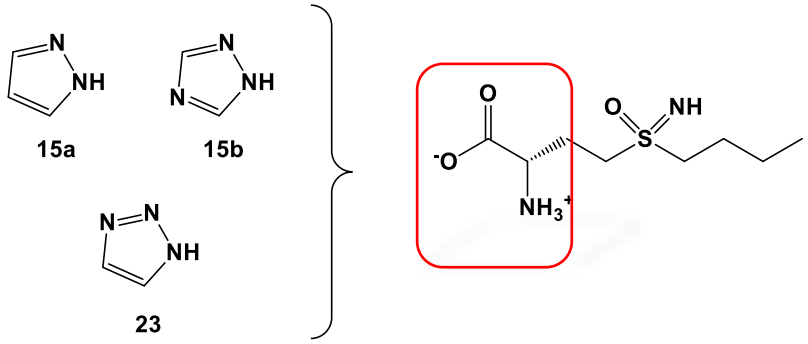
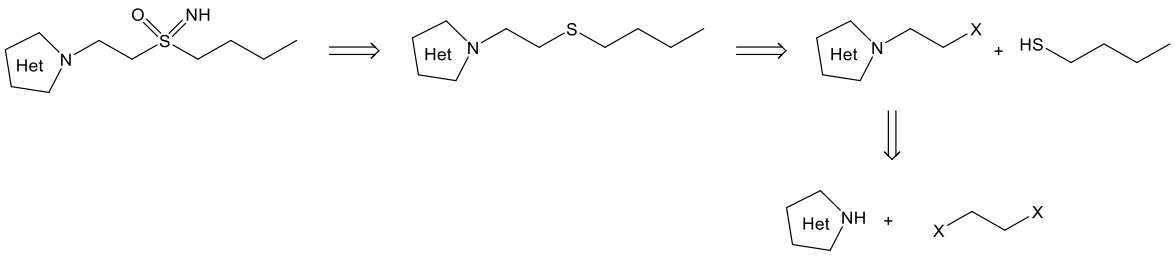


Figura 30. Reemplazo isostéricos de L-BSO considerados para la obtención de nuevos análogos.

Haciendo un análisis retro sintético, se puede observar que los pasos para la formación de estas sulfoximinas son los mismos que para los análogos aminoacídicos ya preparados. Donde las etapas claves corresponden a la del sulfuro respectivo y a la transformación al derivado sulfoximina. Sin embargo, para los isósteros propuestos la manera de preparar los sulfuros necesarios serán diferente dependiendo del anillo en cuestión (**Esquema 20**).



Esquema 20. Retro síntesis de isósteros de L-BSO.

Tal como se indica en la **Figura 30**, se trabajaron con tres heterocíclicos, pirazol (**15a**), 1,2,4-triazol (**15b**), disponibles comercialmente, y 1,2,3-triazol (**23**), el cual fue preparado en el laboratorio, y nos referiremos a él en la siguiente sección.

El primer paso consistió en la alquilación de los heterociclos con 1,2-dicloroetano. Se probaron distintas condiciones experimentales como K_2CO_3/DMF, KOH/EtOH, acetona/TBAB/KOH, NaH/DMF,(*75*) siendo la que entregó mejores resultados en términos de rendimiento y purificación de los productos, fue con la utilización de un sistema bifásico y un catalizador de transferencia de fase como TBAB.(*76*) De esta forma se logran formar los compuestos **17a** y **17b**.

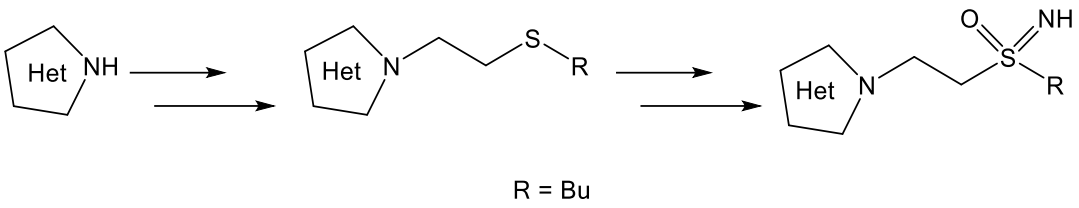
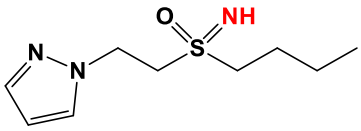
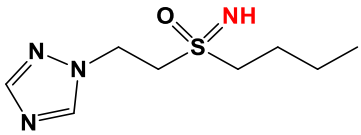


Figura 31. Resumen de la síntesis de isósteros heterocíclicos de L-BSO.

A continuación se prepararon los análogos azufrados, para lo cual se hizo una reacción de sustitución nucleofílica de tipo S_N2 entre **17a-b** y 1-butanotiol, de acuerdo a lo encontrado en literatura, con rendimientos moderados.(*62*)

Finalmente, utilizando las mismas condiciones de reacción de la sección anterior, fue posible realizar la oxidación de los sulfuros **18a-b** hasta los sulfóxidos con *m*-CPBA y posterior formación de las sulfoximinas **20a-b** con MSH. Al igual que en los casos anteriores, al analizar los espectros de RMN-^{1}H se aprecia la aparición de un singlete ancho, correspondiente al grupo NH recién incorporado (**Figura 32**, **Tabla 6**), también se puede apreciar la influencia sobre los CH_2 al formar los sulfóxidos y sulfoximinas, al igual que en los análogos alquílicos de L-BSO (**Tabla 7**).

Tabla 6. Señal de NH en isósteros **20a** y **20b**.

Desplazamientos químicos de NH en sulfoximinas 20a-b	
 **20a**	 **20b**
2,56 ppm	2,92 ppm

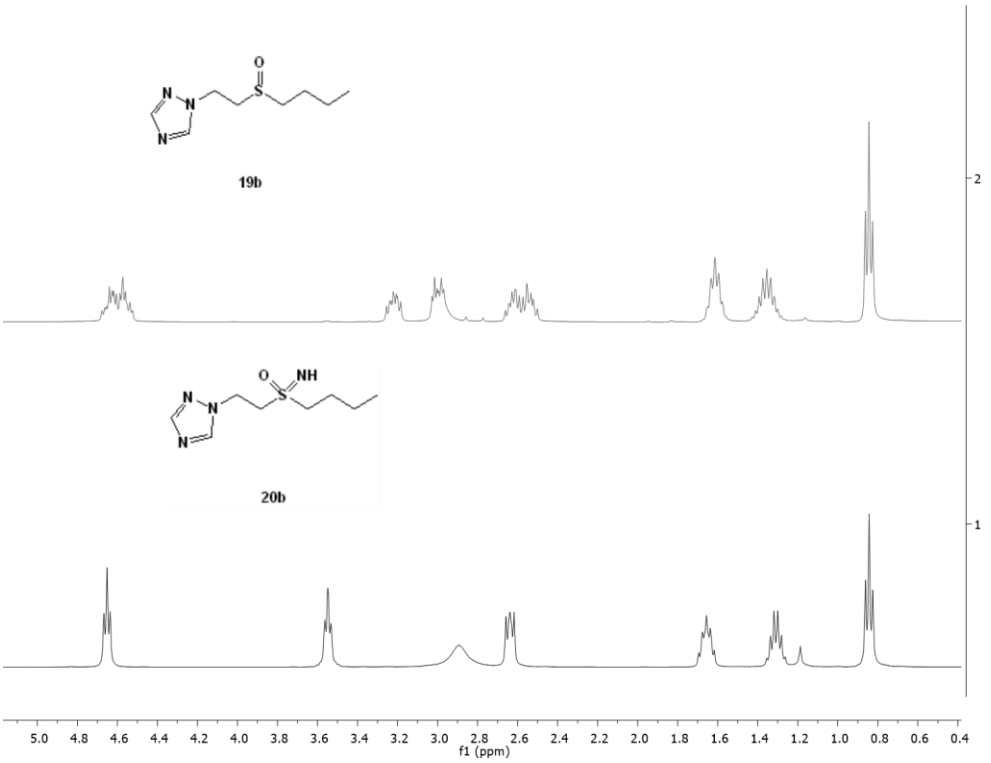
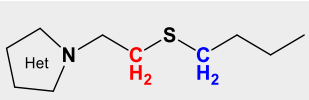
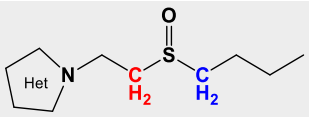
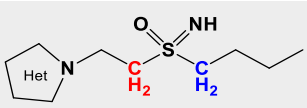


Figura 32. Comparación entre los espectros de RMN-^{1}H de los compuestos **19b** y **20b**. Aquí se logró apreciar la aparición de la señal de NH que se incorpora.

Tabla 7. Comparación de los CH_2 adyacentes al átomo de azufre en sulfuros, sulfóxidos y sulfoximinas.

	Desplazamientos químicos de metilenos en posición α al azufre					
						
	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2
	2,88	2,29	3,02/3,28	2,50/2,60	3,59	2,48
	2,80	2,22	3,05/3,22	2,54/2,63	3,58	2,67

3.2.6. Análogo heterocíclico de L-BSO del tipo 1,2,3-triazol

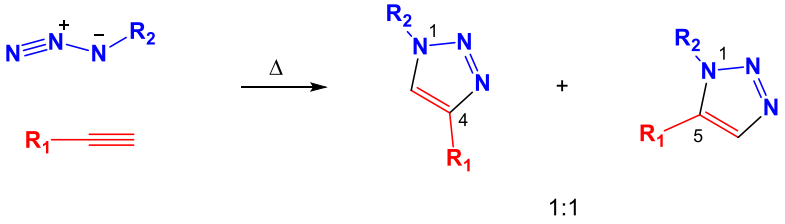
El siguiente heterociclo que se utilizó en esta parte del trabajo sintético corresponde a un análogo de 1,2,3-triazol. Tal como se comentó en la sección anterior, este anillo fue preparado en el laboratorio, haciendo uso una de las reacciones comúnmente empleadas como es la cicloadición 1,3- dipolar.

3.2.7. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar o de Huisgen

Uno de los objetivos de la química médica es sintetizar compuestos durante el proceso del descubrimiento de fármacos, lo que ha sido atractivo para las metodologías sintéticas para permitir la rápida construcción de moléculas. La identificación con estrategias sintéticas rápidas permite al químico médico obtener un gran número de compuestos biológicamente activos en un periodo de tiempo muy corto. Sin embargo, junto con ser rápida, las características claves de este tipo de síntesis son la eficiencia, versatilidad y selectividad. Esto se conoce como "*click chemistry*".

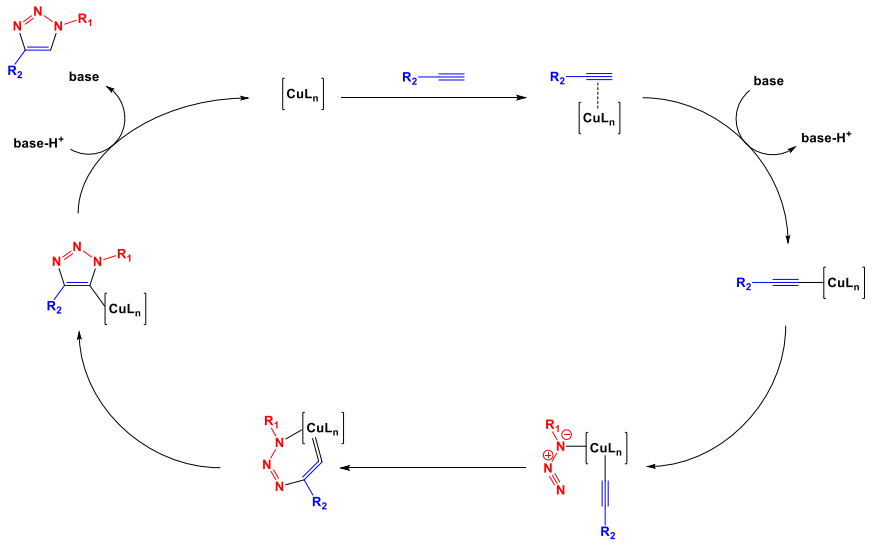
Una de las reacciones más populares dentro de esta metodología sintética es la cicloadición 1,3-dipolar, también conocida como reacción de Huisgen. Esta reacción fue descubierta a principios del siglo XX, pero el potencial de esta reacción y su mecanismo solo fueron revelados en los años 60's por Huisgen y cols.

El potencial de esta reacción es muy alto, ya que el alquilo o la azida pueden estar incorporados en una gran gama de sustituyentes. Sin embargo, esta reacción sufre de una falta de selectividad dando una mezcla de 1,4- y 1,5-regioisomeros (**Esquema 21**), además requiere elevadas temperaturas y largos tiempos de reacción.(*77*)



Esquema 21. Esquema general de la reacción de Huisgen.

Se ha encontrado que al hacer esta reacción catalizada por cobre (I) con unidades de azida regioespecíficas y acetilenos terminales sólo se obtiene el 1,2,3-triazol 1,4-disustituido (**Esquema 22**). De acuerdo con el mecanismo propuesto, en un primer paso el cobre (I) interactúa con el alquino terminal, consiguiendo la activación del triple enlace. Luego, la azida se coordina, mediante un nitrógeno aniónico, al centro metálico, orientándolo para producir la cicloadición, para finalmente entregar el producto 1,4-disustuido y la recuperación del cobre catalítico.(*78*)



Esquema 22. Mecanismo propuesto para la cicloadición 1,3-dipolar.

De esta forma se amplía el espectro y provee 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos en excelentes rendimientos y cercanos a la perfecta regioselectividad. Este proceso catalítico ofrece un nivel sin precedentes de selectividad, fiabilidad y alcance para aquellas síntesis orgánicas que dependen de la creación de enlaces covalentes entre diversos bloques.(*78*)

3.2.8. Síntesis de 1,2,3-triazol y el análogo sulfoximina respectivo.

Sabiendo la importancia que tiene el cobre (I) de la cicloadición, se utilizó CuI para llevar a cabo la síntesis del heterociclo deseado. Efectivamente, luego de hacer la reacción y su posterior purificación, solo se obtuvo un único producto, comprobado por las técnicas espectroscópicas habituales. En su espectro de RMN-^{1}H es posible apreciar una única señal a 7,63 ppm correspondiente al protón de la posición C-5 del anillo, además de las señales correspondientes a las otras partes de la molécula formada (**Figura 33**).

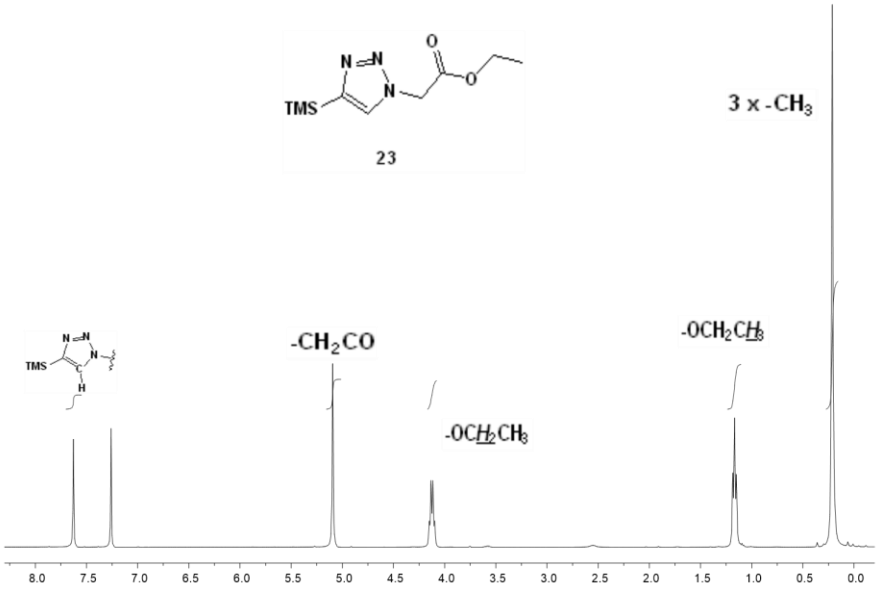
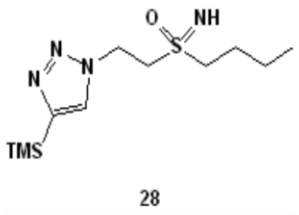


Figura 33. Espectro de RMN-^{1}H del compuesto **23**, donde se aprecia una única señal correspondiente al anillo formado.

Luego de confirmar que se obtuvo el triazol, se procedió con los siguientes pasos de la ruta sintética. Se hizo la reducción del grupo éster con $NaBH_4$, obteniéndose el compuesto **24**,(*79*) para luego hacer la protección del grupo OH con MsCl, transformándolo en un buen grupo saliente, permitiendo hacer la reacción de tipo S_N2 con 1-butanotiol, en las mismas condiciones utilizadas anteriormente (página 145), formando de esta manera el sulfuro **26**.

Finalmente, al hacer la oxidación con *m*-CPBA se obtuvo el compuesto **27** y al hacer reaccionar esta con MSH se obtuvo la sulfoximina **28**, usando las mismas reacciones anteriores. Nuevamente se observó la información entregada por el espectro de RMN-^{1}H del compuesto **28**. Aquí se puede apreciar la aparición de la señal de NH unida al átomo de azufre central, la cual aparece como una señal ancha a 2,83 ppm (**Figura 34**). Además, viendo los correspondientes espectros del sulfuro, del sulfóxido y la sulfoximina, es posible apreciar cómo se desplazan las señales de los grupos metilenos en posición α al átomo de azufre al incorporar el oxígeno y luego el nitrógeno (**Tabla 8**).



28

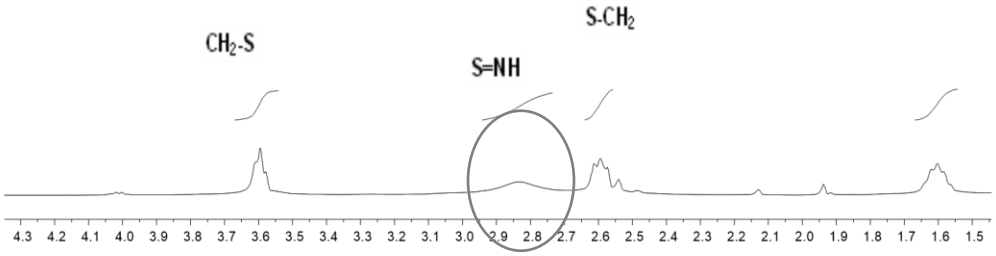
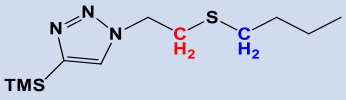
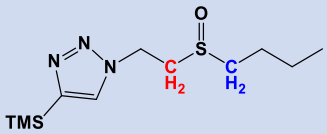
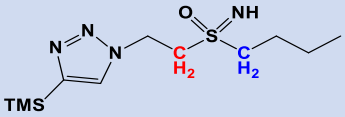


Figura 34. Señal de NH de la sulfoximina **28** y los CH_2 adyacentes al azufre.

Tabla 8. Variación de los desplazamientos químicos de los grupos metilenos en los compuestos **26**, **27** y **28**.

Desplazamientos químicos (ppm) de metilenos en posición α al azufre					
					
CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2
2,84	2,24	3,07/3,29	2,59	3,60	2,59

3.3. Ensayos Biológicos

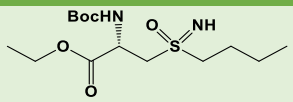
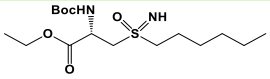
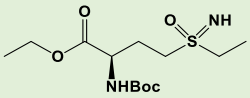
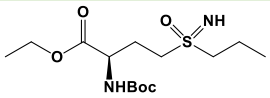
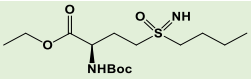
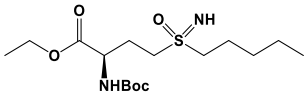
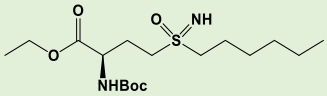
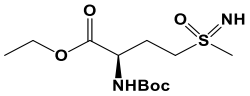
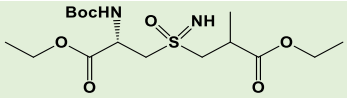
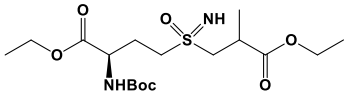
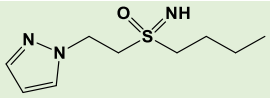
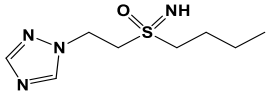
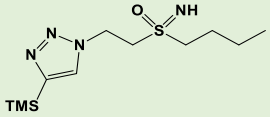
3.3.1. Viabilidad de cultivos de *T. cruzi* en presencia de análogos de L-BSO

Se realizó un *screening* a los 13 compuestos, análogos e isósteros de L-BSO, sobre *T. cruzi* en su forma epimastigote cepa Dm28c, cultivados en medio Diamond, en una cantidad de $3x10^6$ de parásitos por mL, expuestos durante 24 horas a cada uno de los compuestos, en una concentración de 100 μM.

Como se mencionó, el estado morfológico epimastigote no es infectiva y se encuentra exclusivamente en el intestino del triatomino; sin embargo, el trabajo investigativo se realizó en este estado morfológico, ya que el manejo y obtención del parásito es de menor dificultad en comparación con el estado tripomastigote (forma infectiva), y en termino de seguridad para el investigador, hay menor riesgo de contagio.

El principal objetivo al realizar este ensayo es comprobar que la mortalidad de los parásitos, no se deba a la actividad tóxica intrínseca de los compuestos, sino que solo logra sensibilizarlos a la acción de los fármacos en uso. Los resultados se pueden ver en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Viabilidad de análogos de L-BSO estudiados sobre epimastigote de *T. cruzi* a concentración fija de 100 μM.

Compuestos		% de Viabilidad
6a		44,86 ± 3,7
6b		42,90 ± 16,07
6c		51,92 ± 11,9
6d		43,88 ± 4,5
6e		71,09 ± 6,8
6f		62,99 ± 13,1
6g		68,52 ± 6,6
6h		43,40 ± 15,7
6i		39,40 ± 2,3
6j		34,07 ± 10,5
20a		55,71 ± 2,9
20b		60,87 ± 40,0
28		53,91 ± 1,8
Nifurtimox		27,74 ± 7,4

De la **Tabla 9** se puede apreciar que los compuestos **6e**, **6f**, **6g** y **20b** presentan valores de viabilidad mayor al 60 %, es decir, que sobre de 60 % de los parásitos presentes están vivos y que estos análogos no presentan una alta toxicidad por sí mismos. Los compuestos como **6i** o **6j**, son quienes presentaron la menor viabilidad a 100 μM, sin embargo, de igual forma se estudiarán su efecto sobre la concentración de tioles en *T. cruzi*.

También se puede mencionar a partir de la **Tabla 9**, el efecto que presenta el nifurtimox sobre el parasito, lo cual también era conocido. A la misma concentración de los análogos, solo cerca del 30 % de los parásitos se encontrarían vivos.

3.3.2. Efectos de los análogos de L-BSO en el contenido de tioles en *T. cruzi*

Como se mencionó en la introducción, en el *T. cruzi*, los principales componentes que participan en el mecanismo de defensa frente a los agentes generadores de especies reactivas de oxígeno son los tioles GSH y, especialmente, $T(SH)_2$. Por ello, un compuesto como el L-BSO, que sea capaz de disminuir el contenido de tioles, deja al parásito más susceptible a la acción de compuestos electrofílicos o altamente reactivos como los metabolitos del nifurtimox y benznidazol. Así mismo, considerando que el objetivo principal de esta investigación es determinar si los compuestos sintetizados poseen algún efecto inhibitorio en la enzima clave en la síntesis de estos tioles (GCL), se cuantificó el contenido de GSH y $T(SH)_2$, en cultivos de *T. cruzi*, en presencia de cada uno de estos 13 compuestos.

Por ello, una vez realizado el ensayo de viabilidad de parásitos con los derivados sulfoximinicos, se prosiguió con la determinación del efecto que tienen estos compuestos en los niveles de GSH y $T(SH)_2$. La cuantificación de la eventual disminución de contenido de tioles en los cultivos de parásitos, por efecto de la adición de los compuestos, se realizó mediante la técnica de HPLC.

La capacidad inhibitoria de los compuestos **6a-j**, **20a-b** y **28**, o su efectividad en la inhibición, se determina analizando si hay una disminución en los niveles de GSH o preferentemente de $T(SH)_2$, comparados con respecto a un control y a L-BSO.

Los primeros resultados que muestran el efecto de los compuestos seleccionados, en el contenido de glutatión en *T. cruzi* se observa en el **Gráfico 1**. En primer lugar, al considerar los niveles de GSH, se puede observar que la mayoría de los compuestos analizados no mostró un efecto significativo en la disminución de tioles a 100 μM respecto al control. Sin embargo, los compuestos **6b**, **6h** y **6j** mostraron un efecto importante, donde los compuestos **6b** tuvo un comportamiento cercano al

observado para L-BSO, aunque considerando que este último se midió a 500 μM, cabe la posibilidad que tengan una potencia similar o un poco mayor.

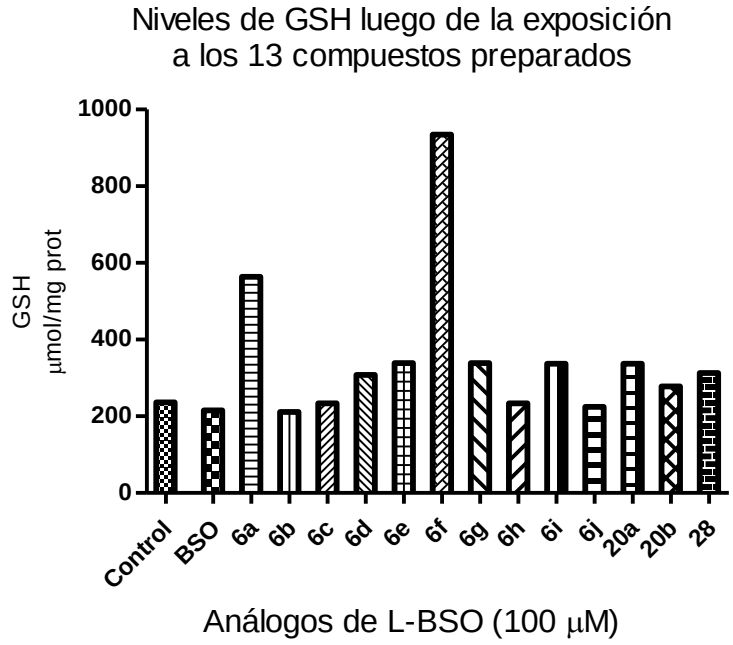
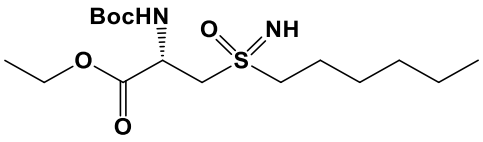
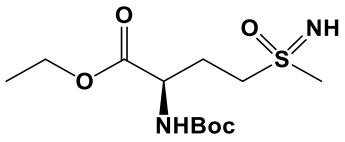


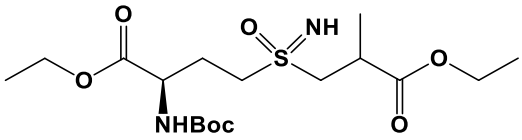
Gráfico 1. Variación del contenido de GSH en el parásito luego de la exposición a los análogos de L-BSO preparados. Valores expresados en μmol de GSH por mg de proteína.



6b



6h



6j

Figura 35. Análogos de L-BSO que lograron una mayor disminución en los niveles de GSH en cultivos de *T. cruzi*.

Por otro lado, se puede observar que hay compuestos que no solo no logran disminuir los niveles de GSH en el parásito, sino que pareciera que más bien incrementan la concentración de GSH, ya que presentan niveles muchos mayores si los comparamos con el control. De entre estos análogos se destacan el compuesto **6a** y el **6f** (**Figura 36**). Con los ensayos realizados hasta el momento, no es posible establecer cuál sería la razón del aumento en los niveles de GSH. Una posible explicación para este efecto es que dentro de la ruta de biosíntesis de GSH (**Figura 37**) se estén viendo afectados otros procesos, los cuales en respuesta a estas moléculas pudieran producir una acumulación de GSH. Por ejemplo, que se libere el contenido de GSH presente en la mitocondria.

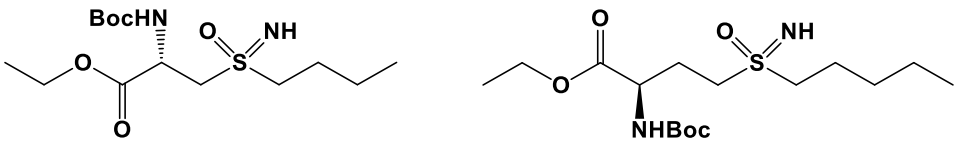


Figura 36. Análogos de L-BSO que incrementan los niveles de GSH en cultivos de *T. cruzi*.

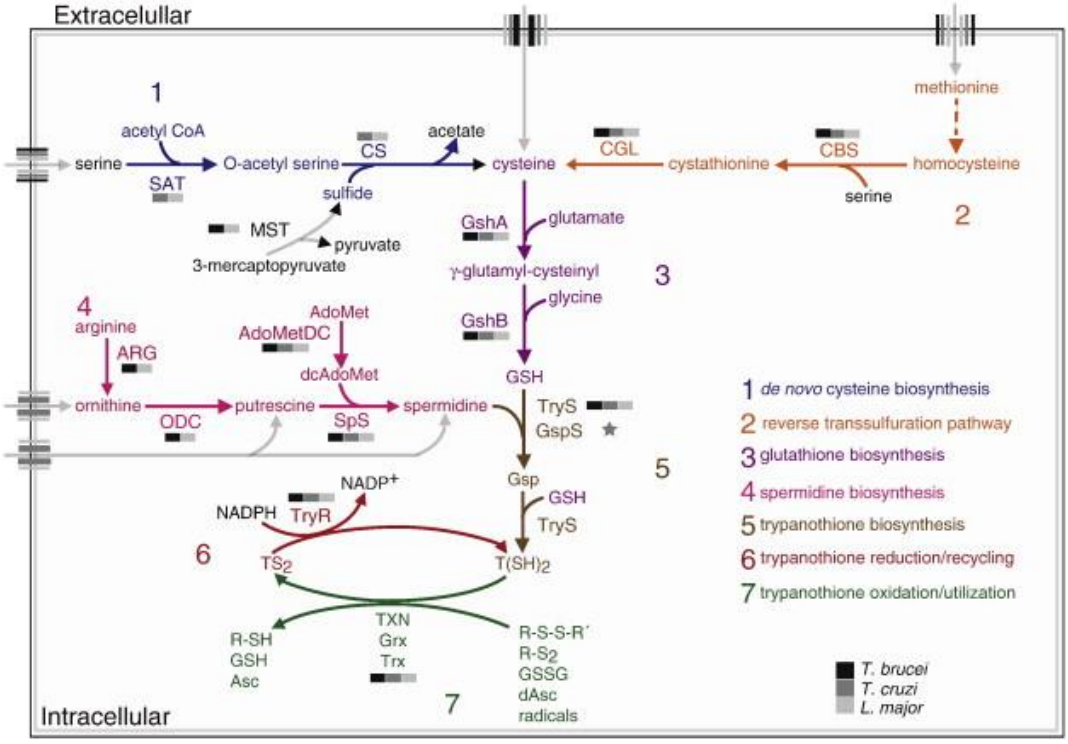
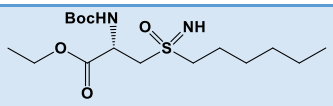
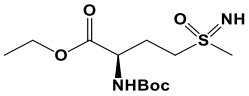
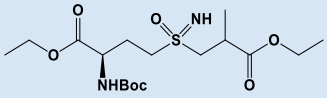


Figura 37. Biosíntesis, reciclaje y utilización de glutatión y tripanotión. La producción de $T(SH)_2$ se puede dividir en la biosíntesis o captación de cisteína, biosíntesis de GSH, biosíntesis o captación de poliaminas y biosíntesis de $T(SH)_2$.(*80*)

Si se trata de realizar alguna relación entre las estructuras químicas de L-BSO y los compuestos de mayor o menor efecto en la concentración de tioles, no se logra apreciar a simple vista si esto es atribuible a las diferencias estructurales presentes, debido a la alta semejanza que existe entre ellas. Por ello, como resultados preliminares, se puede considerar que el hecho que los análogos estudiados de

L-BSO se encuentren protegidos en su porción zwitteriónica no sería eventualmente relevante en el efecto del contenido de GSH en *T. cruzi*. Sin embargo, se calculó el % del contenido de tioles con respecto al control, para los compuestos más promisorios (**Tabla 10**).

Tabla 10, Porcentaje de disminución de GSH en cultivos de *T. cruzi* en presencia de sulfoximinas.

Compuesto		% disminución GSH[a]
6b		10,3
6h		1,0
6j		4,9
L-BSO 500 μM		7,6

[a]: se tabularon solamente aquellos compuestos que presentan un % menor al 100 %

De los valores expresados en la **Tabla 10**, se aprecia que los compuestos **6b** y **6j**, son los que tienen un efecto importante en la disminución del contenido de GSH respecto a L-BSO.

Para el caso de los niveles de $T(SH)_2$ en cultivos de *T. cruzi*, podemos hacer un análisis similar. De acuerdo con los resultados obtenidos en las mediciones con HPLC, estos fueron expresados en μmol de tiol por mg de proteína y se muestran en el **Gráfico 2**.

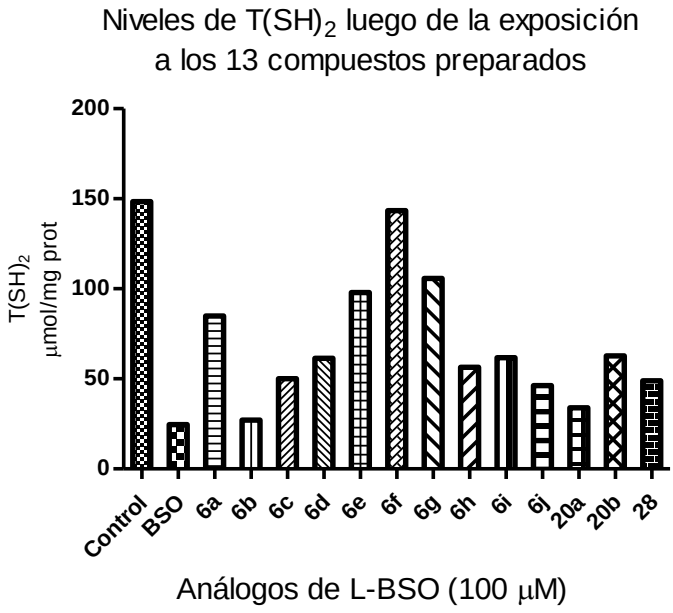
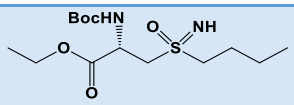
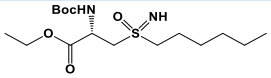
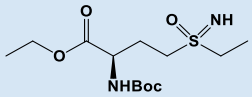
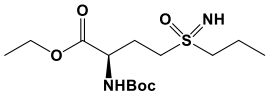
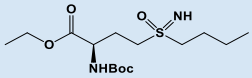
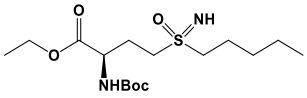
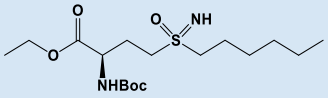
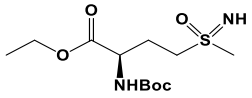
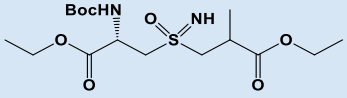
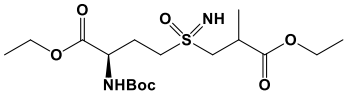
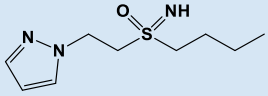
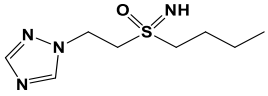
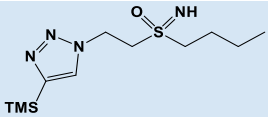


Gráfico 2. Efecto de los análogos de L-BSO sobre el contenido de $T(SH)_2$. Variación expresados en µmol de $T(SH)_2$ por mg de proteína. La concentración para L-BSO es 500 µM.

De acuerdo con **Gráfico 2**, se observa un comportamiento disímil entre los diferentes análogos de L-BSO. Sin embargo, respecto al control todos estos compuestos parecen disminuir los niveles de $T(SH)_2$, a excepción del compuesto **6f**. Este compuesto fue el mismo que produjo el mayor aumento en los niveles de GSH, por ello sería un compuesto interesante de igual forma de estudiar en otro contexto.

Por otro lado, para poder apreciar mejor las diferencias en el contenido de $T(SH)_2$, por parte de los compuestos en estudio, se calculó el porcentaje de disminución en cultivos de *T. cruzi*, según se indica en la **Tabla 11**. De esta tabla se logra evidenciar que la mayoría de ellos logran disminuir la concentración de $T(SH)_2$ respecto al control, y notoriamente a concentraciones 5 veces menos que el L-BSO, se destacan los compuestos **6b** con una disminución cercana al 82 % y **20a**, con un porcentaje del 77 %. Si bien esto último, corresponde a los más interesantes resultados de esta tesis, se necesita realizar las repeticiones adecuadas para validar estos datos.

Tabla 11. Porcentaje de disminución de $T(SH)_2$ por parte de los análogos de L-BSO en cultivos de *T. cruzi*.

Compuesto		% disminución $T(SH)_2$
6a		42,7
6b		**81,8**
6c		66,3
6d		58,6
6e		34,1
6f		3,3
6g		28,8
6h		61,9
6i		58,4
6j		68,8
20a		**77,1**
20b		57,7
28		67,0
BSO 500 µM		**83,4**

De igual forma de la **Tabla 11**, se logra apreciar que hay compuestos que logran generar una disminución no menos interesante de considerar, siendo mayor al 65 % a una concentración de 100 μM los compuestos **6b**, **6c**, **6j**, **20a** y **28** (**Figura 38**). Dos de estos corresponden a análogos heterocíclicos de L-BSO, por lo que el reemplazo de la porción zwitteriónica por estos isósteros tiene un efecto considerable sobre el $T(SH)_2$. Los tres análogos restantes presentan algunas diferencias estructurales entre ellos. El compuesto **6j** presenta un C=O en la posición β de la cadena lateral, lo cual permite asemejarse más al análogo del estado de transición propuesto en el mecanismo de inhibición de GCL. Estudios de acoplamiento molecular inducido en el modelo de GCL de *T. cruzi* se están llevando a cabo para comprender mejor las diferencias presentadas por estos análogos.

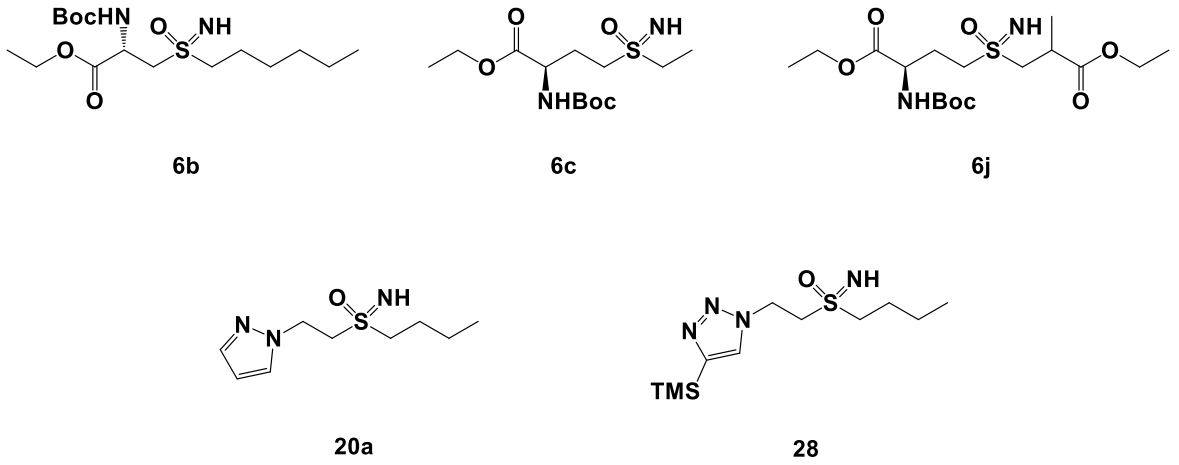


Figura 38. Análogos de L-BSO con una inhibición sobre el 65 % en los niveles de $T(SH)_2$.

De acuerdo con los resultados anteriores, el compuesto **6b** sería el eventualmente mejor inhibidor de la síntesis de tioles en *T. cruzi*, cuyo efecto pudiera atribuirse a la posible inhibición de la GCL. Por ello, ensayos posteriores de potenciación de drogas antichagásicas o inhibición directamente en la enzima.

Con respecto a los compuestos que presentaron una baja actividad, no es posible hacer una correlación, a simple vista, entre las estructuras de estos compuestos y

la baja disminución en los niveles de $T(SH)_2$, de la misma manera que se analizaron los niveles de GSH. Presentan una alta semejanza estructural entre ellos, y al igual que en el análisis hecho para los niveles de GSH, el hecho de que la porción zwitteriónica está protegida no parece influir demasiado en el efecto sobre los niveles de $T(SH)_2$.

Es importante considerar que el mayor efecto observado sobre el contenido de $T(SH)_2$ que sobre GSH, puede explicarse porque el contenido de GSH intramitocondrial no se ve afectado, en el corto plazo, por la taza de síntesis de tioles. Solo cuando hay una depleción duradera de tioles, este comportamiento también se ve afectado.

Cabe destacar que no es posible afirmar que estos resultados sean concluyentes, ya que, por un lado, su efecto fue analizado con la porción zwitterionica protegida, en el caso de los análogos alquilados de L-BSO, mientras que los efectos de L-BSO se observan con esta zona de la molécula desprotegida. Además, hasta el momento no se ha considerado la estereoquímica de los compuestos preparados. En ellos hay al menos dos centros quirales. En base a la bibliografía, se determinó llevar a cabo los ensayos biológicos sin mayores preocupaciones sobre este punto, para luego de ver los resultados, intentar las separaciones de los correspondientes isómeros. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo siguen la misma tendencia que tiene el L-BSO con nifurtimox y benznidazol reportado por Faundez y cols., haciendo estos resultados se deban mantener presentes.

PARTE II

SINTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE QUINONAS

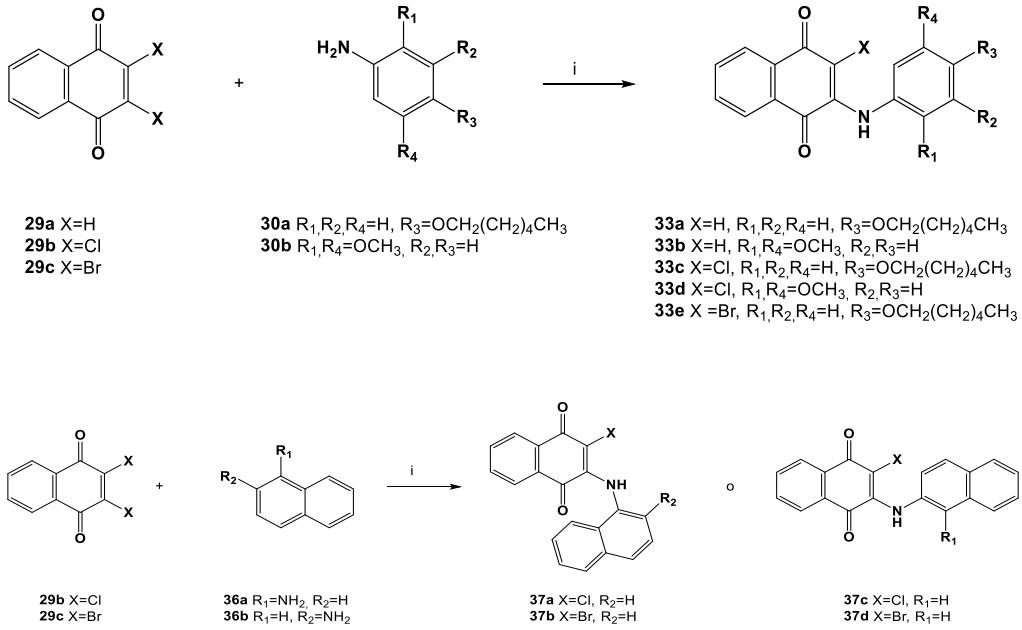
2-AMINOARILQUINONAS

1. PARTE EXPERIMENTAL

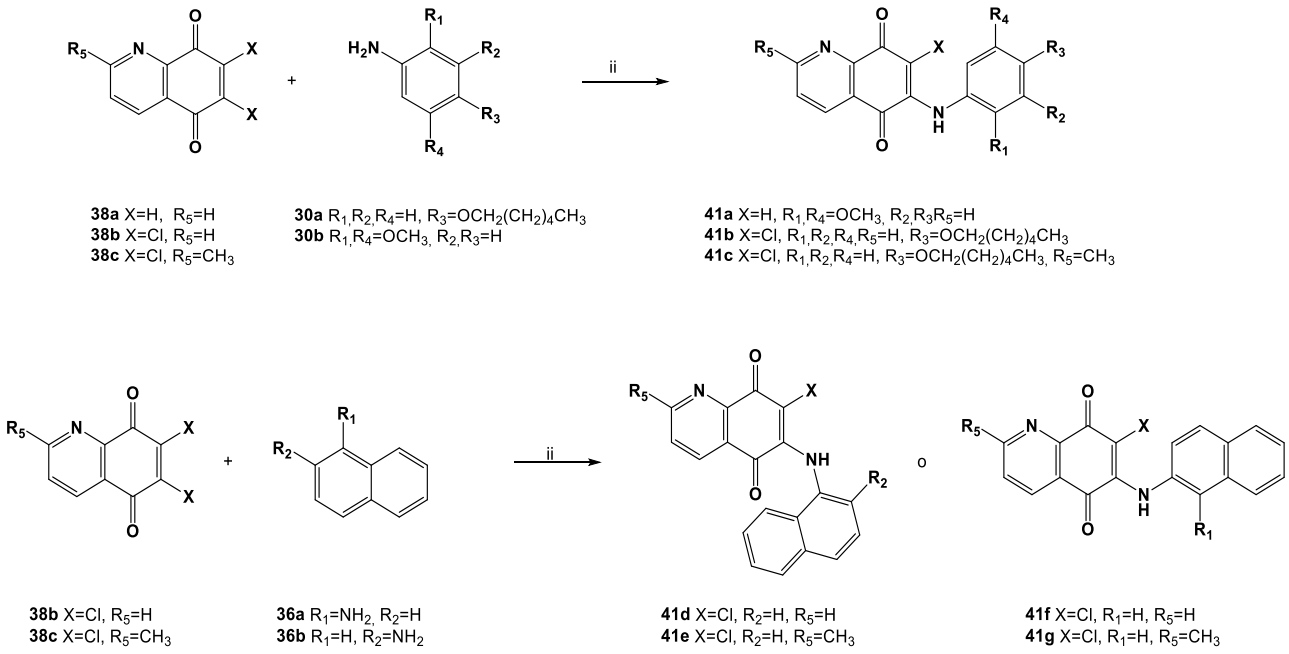
1.1. Técnicas Experimentales

Las técnicas experimentales utilizadas para la preparación y caracterización de los diferentes compuestos sintetizados en esta segunda parte del trabajo de tesis fueron las mismas que se emplearon y detallaron en la sección 2.1 de la parte I (página 46).

1.2. Síntesis de las fenilaminonaftoquinonas 33a-e y 37a-d, y de las fenilaminoquinolindionas 41a-g



Reactivos y condiciones: i) $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, EtOH, t.a., 12 h.



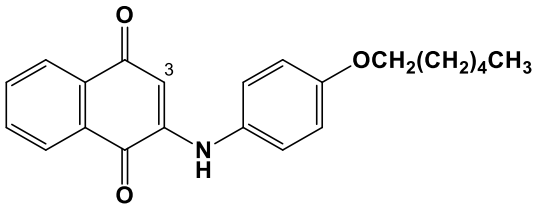
Reactivos y condiciones: ii) $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, EtOH, t.a., 12 h.

Esquema 23. Nuevas quinonas preparadas con p-hexiloxianilina y naftilaminas

Método i: En un matraz de fondo redondo, una disolución de 300 mg (1,89 mmol, 1,0 eq) de la 1,4-naftoquinona **29a**, 732,9 mg (3,78 mmol, 2,0 eq) de la 4-hexiloxianilina (**30a**) y 309,2 mg (0,83 mmol, 0,44 eq) de $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ en 10 mL de EtOH. Se agitó a temperatura ambiente, comprobándose al cabo de 12 horas la desaparición del producto de partida (c.c.f., $CHCl_3$). Tras eliminar el etanol a presión reducida en el rotavapor, el residuo se disolvió con CH_2Cl_2. La fase orgánica se lavó con HCl 2M y disolución saturada de NaCl, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a sequedad. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel (eluyente: $CHCl_3$).

Método ii: En un matraz de fondo redondo, a una disolución de 2,88 g (18,82 mmol, 2,95 eq) de 2,5-dimetoxianilina (**30b**) y 758,2 mg (3,19 mmol, 0,5 eq) de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ en 50 mL de EtOH se le añadió una disolución de 1,01 g (6,38 mmol, 1,0 eq) de la quinolin-5,8-diona **29c** en 100 mL de EtOH y la mezcla se agitó a 30 °C por 12 horas, hasta la transformación total del compuesto de partida (c.c.f., $CHCl_3$). La mezcla de reacción se aciduló con una disolución fría de HCl 1% (20 mL) y la suspensión resultante se extrajo repetidamente con $CHCl_3$ (3 x 30 mL). Las fracciones orgánicas reunidas la fase orgánica se lavaron con agua (2x), se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a sequedad en el rotavapor. El residuo sólido fue purificado por cromatografía en columna sobre silicagel (eluyente: $CHCl_3$).

a) 2-(4-hexiloxifenilamino)naftalen-1,4-diona (**33a)**.



Apariencia: Solido rojo

Punto de fusión: 97-101 °C.

Rendimiento: 74 % (Método i).

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,90-0,92 (m, 3 H, CH_3), 1,35-1,42 (m, 4 H, 2xCH_2), 1,46-1,47 (m, 2 H, CH_2), 1,76-1,83 (m, 2 H, CH_2), 3,95-3,98 (m, 2 H, O-CH_2), 6,22 (s, 1 H, Ar-H), 6,92-6,94 (m, 2 H, 2xAr-H), 7,17-7,19 (m, 2 H, 2xAr-H), 7,45 (s, 1 H, NH), 7,63-7,67 (m, 1 H, Ar-H), 8,10 (m, 4 H, 4xAr-H).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm)**:** 14,1 (CH_3), 22,6 (CH_2), 25,7 (CH_2), 29,3 (CH_2), 31,6 (CH_2), 68,4 (CH_2), 102,4 (CH), 115,4 (CH), 124,8 (CH), 126,1 (CH), 126,4 (CH), 130,4 (C), 131,8 (C), 132,2 (CH), 133,4 (C), 133,9 (CH), 134,8 (CH), 136,7 (CH), 145,6 (C), 157,2 (C), 182,1 (CO), 183,7 (CO).

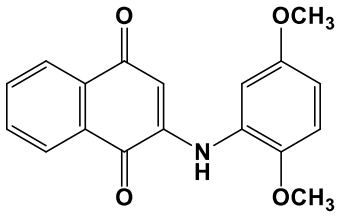
IR (KBr, n, cm^{-1}): 3215 (NH), 1678 (C=O), 1660 (C=O), 1615 (NH).

EM (IQ, *m/z*): 350 $[M+H]^+$ (100 %).

b) 2-(2,5-dimetoxifenilamino)naftalen-1,4-diona (**33b)**.

Apariencia: Solido rojo

Punto de fusión: 113-117 °C



Rendimiento: 81 % (Método i)

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 3,77 (s, 3 H, OCH_3), 3,85 (s, 3 H, OCH_3), 6,28 (s, 1 H, Ar-H), 6,78 (d, *J* = 1,9 Hz, 1 H, Ar-H), 6,83-6,92 (m, 2 H, 2xAr-H), 7,67 (td, *J* = 7,4 Hz, *J'* = 1,0 Hz, 1 H, Ar-H), 7,77 (td, *J* = 7,4 Hz, *J'* = 1,0 Hz, 1 H, Ar-H), 8,0 (s, 1 H, NH), 8,11 (dd, *J* = 7,4 Hz, *J'* = 1,0 Hz, 2 H, 2xAr-H).

RMN-^{13}C (101 MHz, CDCl, δ, ppm): 55,8 (OCH_3), 56,2 (OCH_3), 103,9 (CH), 107,8 (CH), 108,9 (CH), 111,6 (CH), 126,0 (CH), 126,5 (CH), 127,6 (C), 130,4 (C), 132,3 (CH), 133,2 (C), 134,8 (CH), 144,5 (C), 145,3 (C), 153,7 (C), 181,9 (CO), 183,9 (CO).

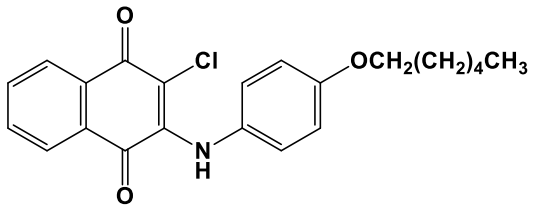
IR (KBr, n, cm^{-1}): 3349 (NH), 1673 (CO), 1637 (CO), 1602 (C=C).

EM (IQ, *m/z*): 310 $[M+H]^+$ (100 %).

c) 2-cloro-3-((4-(hexiloxi)fenil)amino)naftalen-1,4-diona (**33c**).

Apariencia: Solido violeta

Punto de fusión: 135-136 °C



Rendimiento: 70 % (Método i).

RMN-^{1}H (400 MHz, CDCl3, d, ppm): 0,90 (t, *J* = 7,0 Hz, 3 H, CH_3), 1,31-1,35 (m, 4 H, 2xCH_2), 1,47-1,49 (m, 2 H, CH_2), 1,73-1,80 (m, 2 H, CH_2), 3,93 (t, *J* = 6,6 Hz, 2 H, O-CH_2), 6,83 (d, *J* = 8,8 Hz, 2 H, 2xAr-H), 7,01 (d, *J* = 8,8 Hz, 2 H, 2xAr-H), 7,61-7,64 (m, 2 H, CH, NH), 7,71 (t, *J* = 7,5 Hz, 1 H, Ar-H), 8,04 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H, Ar-H), 8,13 (d, *J* = 7,7 Hz, 1 H, Ar-H).

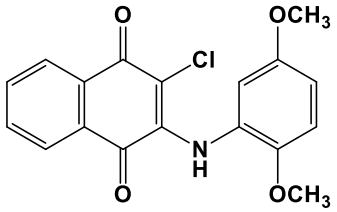
RMN-^{13}C (101 MHz, CDCl3, d, ppm): 14,08 (CH_3), 22,65 (CH_2), 25,77 (CH_2), 29,28 (CH_2), 31,64 (CH_2), 68,33 (CH_2), 113,40 (C), 114,16 (CH), 126,30 (CH), 126,91 (CH), 127,02 (CH), 129,83 (C), 130,17 (C), 132,74 (C), 132,78 (CH), 135,01 (CH), 141,90 (C), 157,45 (C), 177,34 (CO), 180,56 (CO).

IR (KBr, ν, cm^{-1}): 3224 (NH), 2949 (CH), 1677 (CO).

EM (ESI, *m/z*): 384 $[M+H]^+$ (100 %).

d) 2-cloro-3-(2,4-dimetoxifenilamino)naftalen-1,4-diona (**33d**).

Apariencia: Sólido violeta



Punto de fusión: 146-149 °C

Rendimiento: 83 % (Método i)

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, d, ppm): 3,77 (s, 3 H, OCH_3), 3,82 (s, 3 H, OCH_3), 6,56-6,57 (m, 1 H, Ar-H), 6,70-6,73 (m, 1 H, Ar-H), 6,81-6,83 (m, 1 H, Ar-H), 7,62 (s, 1 H, NH), 7,66-7,70 (m, 1 H, Ar-H), 7,74-7,78 (m, 1 H, Ar-H), 8,10-8,11 (m, 1 H, Ar-H), 8,18-8,20 (m, 1 H, Ar-H).

RMN-^{13}C (101 MHz, CDCl3, d, ppm): 56,3 (OCH_3), 56,5 (OCH_3), 111,3 (CH), 111,6 (CH), 111,7 (CH), 115,4 (C), 127,3 (CH), 127,4 (C), 127,5 (CH), 130,4 (C), 133,0 (CH), 133,3 (C), 135,3 (CH), 142,0 (C), 147,2 (C), 153,3 (C), 177,8 (CO), 180,8 (CO).

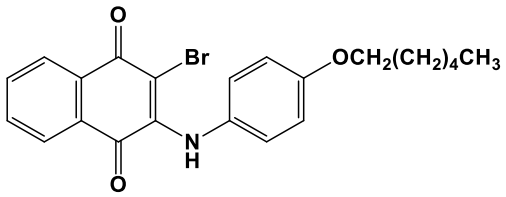
IR (KBr, n, cm^{-1}): 3314 (NH), 1676 (CO), 1655 (CO).

EM (IQ, *m/z*): 345 $[M+H]^+$ (100 %).

e) 2-bromo-3-((4-(hexiloxi)fenil)amino)naftalen-1,4-diona (**33e**).

Apariencia: Solido violeta

Punto de fusión: 125-127 °C



Rendimiento: 28 % (Método i)

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 0,87 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, CH_3), 1,30-1,32 (m, 4H, 2xCH_2), 1,39-1,44 (m, 2H, CH_2), 1,70-1,77 (m, 2H, CH_2), 3,89 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, OCH_2), 6,80 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, 2xAr-H), 6,99 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, 2xAr-H), 7,55-7,59 (m, 1H, Ar-H), 7,63-7,67 (m, 1H, Ar-H), 7,70 (s, 1H, NH), 7,96 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, Ar-H), 8,06 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H).

^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$): 13,93 (CH_3), 22,51 (CH_2), 25,63 (CH_2), 29,14 (CH_2), 31,50 (CH_2), 68,15 (CH_2), 105,54 (C), 114,03 (2xCH), 126,65 (2xCH), 126,79 (CH), 127,08 (CH), 129,60 (C), 129,99 (C), 132,32 (C), 132,55 (CH), 134,75 (CH), 144,25 (C), 157,40 (C), 176,92 (CO), 179,85 (CO).

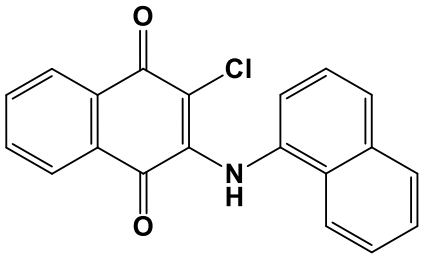
IR (KBR, cm^{-1}): 3227 (NH), 2949 (CH), 1675 (CO), 1601 (C=C).

f) 2-cloro-3-(naftalen-1-ilamino)naftalen-1,4 diona (**37a**).

Apariencia: Solido violeta.

Punto de fusión: 178-179 °C.

Rendimiento: 45 % (Método i)



^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 7,08 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, Ar-H), 7,37 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,42-7,49 (m, 2H, 2xAr-H), 7,57-7,63 (m, 1H, Ar-H), 7,65-7,72 (m, 2H, 2xAr-H), 7,79-7,84 (m, 2H, 2xAr-H), 7,88-7,92 (m, 1H, Ar-H), 8,04 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, Ar-H), 8,10 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H,Ar-H).

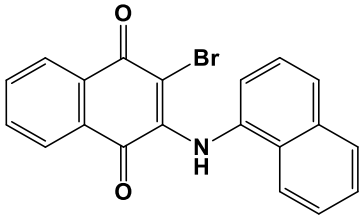
^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$): 114,62 (C), 122,47 (CH), 123,22 (CH), 124,90 (CH), 126,58 (CH), 126,94 (CH), 127,06 (CH), 127,11 (CH), 127,25 (CH), 128,65 (CH), 129,69 (C), 129,98 (C), 132,78 (C), 133,04 (CH), 133,48 (C), 134,05 (C), 135,19 (CH), 142,83 (C), 177,52 (CO), 180,65 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3449 (NH), 1668 (CO), 1644 (C=C).

EM (ESI, *m/z*): 334 $[M+H]^+$ (100 %).

2-bromo-3-(naftalen-1-ilamino)naftalen-1,4-diona (**37b**).

Apariencia: Solido violeta



Punto de Fusión: 162-164 °C.

Rendimiento: 39 % (Método i)

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 7,22 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, Ar-H), 7,46 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,51-7,59 (m, 2H, 2xAr-H), 7,69 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, Ar-H), 7,72-7,84 (m, 2H, 2xAr-H), 7,88-7,93 (m, 1H, Ar-H), 7,98 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, Ar-H), 8,12 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, Ar-H), 8,19 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H).

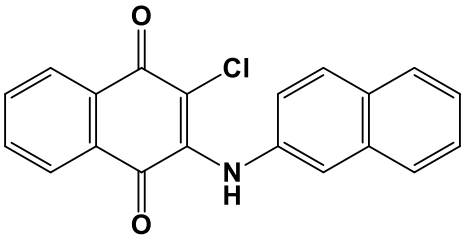
^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$): 107,05 (C), 122,58 (CH), 123,73 (CH), 124,93 (CH), 126,62 (CH), 126,97 (CH), 127,21 (CH), 127,24 (CH), 127,56 (CH), 128,63 (CH), 129,93 (C), 130,04 (C), 132,59 (C), 133,00 (CH), 133,53 (C), 134,11 (C), 135,13 (CH), 145,39 (C), 177,40 (CO), 180,15 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 1613 (CO), 1672 (CO), 1591 (C=C).

EM (ESI, m/z): 379 $[M+H]^+$ (100 %).

g) 2-cloro-3-(naftalen-2-ilamino)naftalen-1,4 diona (**37c**).

Apariencia: Solido violeta



Punto de fusión: 156-158 °C.

Rendimiento: 41 % (Método i)

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 7,27 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H, Ar-H),7,45-7,54 (m, 3H, 3xAr-H), 7,71 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,76-7,90 (m, 5H, 5xAr-H), 8,15 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, Ar-H), 8,22 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, Ar-H).

^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$): 115,40 (C), 121,47 (CH), 123,35 (CH), 125,92 (CH), 126,95 (CH), 127,11 (CH), 127,26 (CH), 127,66 (CH), 127,86 (CH), 128,32 (CH), 129,99 (C), 131,32 (C), 132,73 (C), 133,11 (CH), 135,04 (C), 135,17 (CH), 141,60 (C), 177,60 (CO), 180,67 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3311 (NH), 1665 (CO), 1603 (CO), 1574 (C=C).

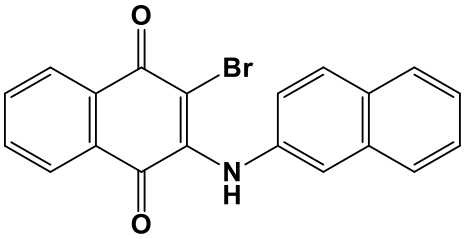
EM (ESI, *m/z*): 334 $[M+H]^+$ (100 %).

h) 2-bromo-3-(naftalen-2-ilamino)naftalen-1,4-diona (**37d**).

Apariencia: Solido violeta

Punto de fusión: 128-130 °C

Rendimiento: 32 % (Método i)



^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 7,27 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, Ar-H), 7,46-7,53 (m, 3H, 3xAr-H), 7,69 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,74-7,85 (m, 4H, 4xAr-H), 7,94 (s, 1H, NH), 8,11 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H. Ar-H), 8,21 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H).

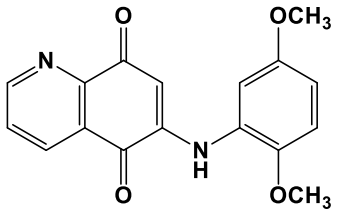
^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$): 108,07 (C), 121,90 (CH), 123,69 (CH), 125,94 (CH), 126,91 (CH),127,15 (CH),127,50 (CH), 127,65 (CH), 127,85 (CH), 128,32 (CH), 129,91 (C), 131,35 (C), 132,46 (C), 133,01 (CH), 133,10 (C), 134,99 (C), 135,05 (CH), 144,19 (C), 177,43 (CO), 180,15 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3221 (NH), 1673 (CO), 1593 (CO), 1567 (C=C).

EM (ESI, *m/z*): 378 $[M]^+$ (100 %).

i) 7-(2,5-dimetoxifenilamino)quinolin-5,8-diona (**41a**).

Apariencia: Solido violeta.



Punto de fusión: 77-80 °C

Rendimiento: 67 % (Método ii)

RMN-^{1}H (400 MHz, CDCl3, d, ppm): 3,80 (s, 3 H, OCH_3), 3,88 (s, 3 H, OCH_3), 6,65-6,71 (m, 2 H, 2xAr-H), 6,86-6,91 (m, 1 H, Ar-H), 7,00-7,02 (m, 1 H, Ar-H), 7,27 (s, 1 H, NH), 7,59-7,66 (m, 1 H, Ar-H), 8,42-8,47 (m, 1 H, Ar-H), 9,04-9,05 (m, 1 H, Ar-H).

RMN-^{13}C (101 MHz, CDCl3, d, ppm): 55,1 (OCH_3), 56,0 (OCH_3), 110,6 (CH), 111,0 (CH), 112,8 (CH), 123,5 (C), 126,4 (CH), 126,6 (C), 134,1 (CH), 145,1 (C), 146,4 (CH), 148,0 (C), 153,0 (CH), 154,1 (C), 180,5 (CO), 181,2 (CO).

IR (KBr, ν, cm^{-1}): 3328 (NH), 1673 (CO), 1630 (CO), 1570 (C=C).

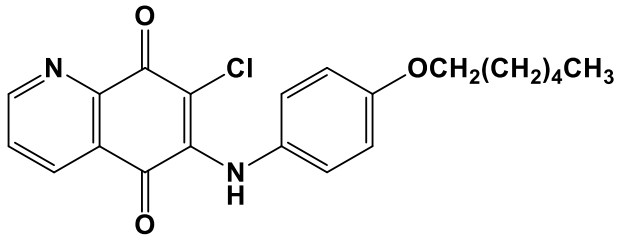
EM (IQ, *m/z*): 310 $[M]^+$ (100 %).

j) 7-cloro-6-(4-hexiloxifenilamino)quinolin-5,8-diona (**41b**)

Apariencia: Solido rojo

Punto de fusión: 146-147 °C

Rendimiento: 77 % (Método ii)



^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 0,82 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, CH_3), 1,22-1,29 (m, 4H, 2xCH_2), 1,32-1,42 (m, 2H, CH_2), 1,64-1,74 (m, 2H, CH_2), 3,85 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH_2), 6,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, 2xAr-H), 6,94 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, 2xAr-H), 7,54 (dd, *J* = 7,8 Hz, *J* = 4,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,69 (s, 1H, NH), 8,28 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, Ar-H), 8,90 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H, Ar-H).

^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$): 13,90 (CH_3), 22,44 (CH_2), 25,56 (CH_2), 29,06 (CH_2), 31,43 (CH_2), 68,15 (CH_2), 114,03 (2xCH), 114,33 (C), 126,21 (2xCH), 126,67 (C), 126,74 (CH), 129,60 (C), 134,65 (CH), 141,34 (C), 148,21 (C), 155,07 (CH), 157,46 (C), 175,55 (CO), 179,86 (CO).

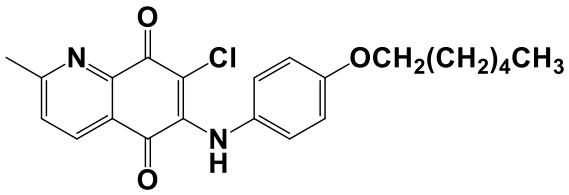
IR (KBr, cm^{-1}): 3240 (NH), 2917 (CH), 1692 (CO), 1591 (C=C).

EM (ESI, *m/z*): 384 $[M]^+$ (100 %).

k) 7-cloro-6-(hexiloxifenilamino)-2-metilquinolin-5,8-diona (**41c**).

Apariencia: Solido rojo

Punto de fusión: 155-157 °C.



Rendimiento: 43 % (Método ii)

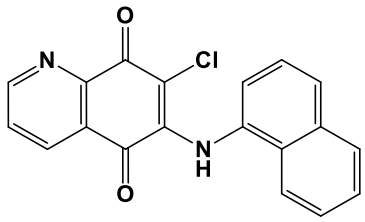
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 0,91 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, CH_3), 1,31-1,37 (m, 4H, 2xCH_2), 1,42-1,51 (m, 2H, CH_2), 1,74-1,83 (m, 2H, CH_2), 2,79 (s, 3H, CH_3), 3,97 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, OCH_2), 6,87 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, 2xAr-H), 7,04 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, 2xAr-H), 7,46 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,61 (s, 1H, NH), 8,29 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar-H).

^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$): 14,16 (CH_3), 22,72 (CH_2), 25,60 (CH_3), 25,85 (CH_2), 29,35 (CH_2), 31,72 (CH_2), 68,46 (OCH_2), 114,36 (CH), 114,47 (C), 124,78 (C), 126,42 (CH), 126,82 (CH), 129,92 (C), 135,04 (CH), 141,34 (C), 148,27 (C), 157,74 (C), 166,17 (C), 176,21 (CO), 180,27 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3214 (NH), 2926 (CH), 1676 (CO), 1572 (C=C).

l) 7-cloro-6-(naftalen-1-ilamino)quinolin-5,8-diona (**41d**)

Apariencia: Solido rojo anaranjado



Punto de fusión: 166-168 °C.

Rendimiento: 34 % (Método ii).

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 7,20 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, Ar-H), 7,48 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,53-7,60 (m, 2H, 2xAr-H), 7,63-7,69 (m, 1H, Ar-H), 7,82 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,88 (s, 1H, NH), 7,93 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,97 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 8,47 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H,Ar-H), 9,07 (s, 1H, Ar-H).

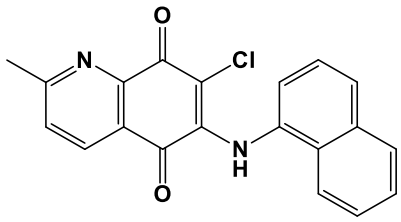
^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$): 115,84 (C), 122,19 (CH), 123,32 (CH), 124,81 (CH), 126,60 (CH), 126,93 (CH), 126,97 (C), 127,02 (CH), 127,40 (CH), 128,64 (CH), 129,55 (C), 133,02 (C), 133,98 (C), 134,86 (CH), 142,32 (C), 148,45 (C), 155,44 (CH), 175,82 (CO), 180,12 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3221 (NH), 2923 (CH), 1741 (CO), 1548 (C=C).

EM (ESI, *m/z*): 336 $[M+H]^+$ (100 %).

m) 7-cloro-2-metil-6-(naftalen-1-ilamino)quinolin-5,8-diona (**41e**).

Apariencia: Solido naranja



Punto de fusión: 165-167 °C.

Rendimiento: 52 % (Método ii).

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 2,80 (s, 3H, CH_3), 7,19 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,44-7,51 (m, 2H, 2xAr-H), 7,52-7,59 (m, 2H,2xAr-H), 7,81 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H,Ar-H), 7,86 (s, 1H, NH), 7,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,97 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, Ar-H), 8,33 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, Ar-H).

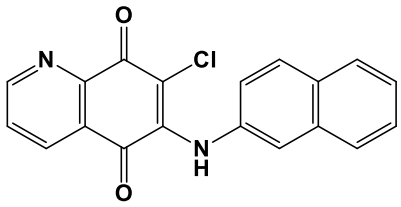
^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$): 25,63 (CH_3), 115,56 (C), 122,36 (CH), 123,35 (CH), 124,94 (CH), 126,68 (CH), 126,94 (CH), 127,07 (CH), 127,35 (CH), 128,75 (CH), 129,65 (C), 133,24 (C), 134,10 (C), 135,10 (CH), 142,24 (C), 148,23 (C), 166,28 (C), 176,25 (CO), 180,24 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3329 (NH), 3296 (CH), 1666 (CO), 1582 (CO), 1490 (C=C)

EM (ESI, *m/z*): 350$[M+H]^+$ (100 %).

n) 7-cloro-6-(naftalen-2-ilamino)quinolin-5,8-diona (**41f**).

Apariencia: Solido rojo



Punto de fusión: 180-183 °C.

Rendimiento: 30 % (Método ii).

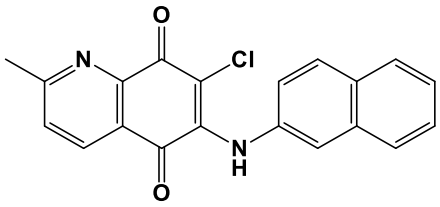
^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 7,23 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,42-7,52 (m, 3H, 3xAr-H), 7,61 (dd, *J* = 7,5 Hz, *J* = 4,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,73-7,83 (m, 3H, 3xAr-H), 7,87 (s, 1H, NH), 8,40 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, Ar-H), 9,03 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H, Ar-H).

^{13}C-RMN (101 MHz, $CDCl_3$): 116,46 (C), 121,76 (CH), 123,28 (CH), 126,13 (CH), 127,04 (2xCH), 127,67 (CH), 127,85 (CH), 128,42 (CH), 129,79 (C), 131,43 (C), 133,02 (C), 134,62 (C), 134,90 (CH), 141,13 (C), 148,43 (C), 155,45 (CH), 175,94 (CO), 180,14 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3506 (NH), 3342 (CH), 1672 (CO), 1577 (CO).

o) 7-cloro-2-metil-6-(naftalen-2-ilamino)quinolin-5,8-diona (**35h**).

Apariencia: Solido naranja



Punto de fusión: 202-205 °C.

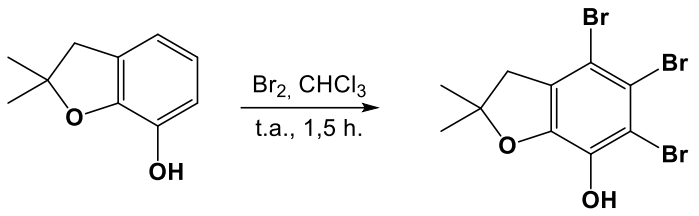
Rendimiento: 48 % (Método ii)

^{1}H-RMN (200 MHz, DMSO-d$_6$): 2,67 (s, 3H, CH_3), 7,39 (dd, *J* = 8,8 Hz, *J* = 1,9 Hz, 1H, Ar-H); 7,43-7,54 (m, 2H, 2xAr-H), 7,57 (s, 1H, Ar-H), 7,67 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,85 (dd, *J* = 14,4 Hz, *J* = 6,2 Hz, 3H, 3xAr-H), 8,29 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, Ar-H), 9,53 (s, 1H, NH).

^{13}C-RMN (101 MHz, DMSO-d$_6$): 24,47 (CH_3), 116,02 (C), 120,28 (CH), 123,58 (CH), 125,00 (CH), 125,28 (C), 126,27 (CH), 126,59 (CH), 127,07 (CH), 127,27 (CH), 127,35 (CH), 130,25 (C), 132,62 (C), 134,48 (CH), 136,55 (C), 142,48 (C), 147,19 (C), 164,19 (C), 175,28 (CO), 179,69 (CO).

IR (KBr, cm^{-1}): 3187 (NH), 2922 (CH), 1676 (CO), 1602 (CO), 1579 (C=C).

1.3. 4,5,6-Tribromo-2,2-dimetil-2,3-dihidrobenzofuran-7-ol (43)



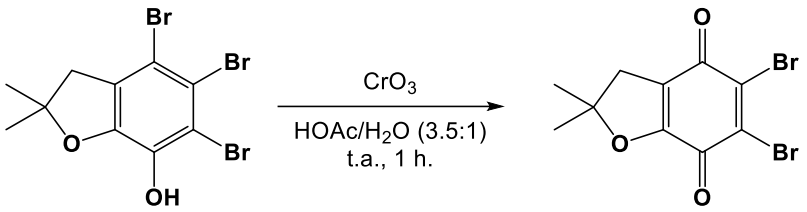
42 **43**

En un matraz de fondo redondo, a una disolución agitada magnéticamente de 2,0 g (12,18 mmol, 1,0 eq) de 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol **42** en cloroformo (200 mL), se añadió gota a gota, a temperatura ambiente, durante 30 minutos, una disolución de 1,6 mL de Br_2 (30,35 mmol, 2,5 eq) en 40 mL de cloroformo. La agitación se continuó hasta que al cabo de 1,5 horas había desaparecido el producto de partida (c.c.f.). La disolución se la lavó con una disolución acuosa de tiosulfato de sodio al 10 % y agua. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a sequedad en el rotavapor. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna (eluyente: CH_2Cl_2), aislándose 2,93 g (7,31 mmol, 60 %) del compuesto **43,** como un sólido blanco, coincidiendo sus datos espectroscópicos con los encontrados en literatura.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,52 (s, 6 H, 2xCH_3); 3,06 (s, 2 H, CH_2).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 28,36 (2xCH_3); 46,60 (CH_2); 89,49 (C); 112,34 (C); 112,81 (C); 116,09 (C); 130,00 (C); 138,09 (C); 145,03 (C).

1.4. 5,6-Dibromo-2,2-dimetil-dihidrobenzofuran-4,7-diona (44)



43 **44**

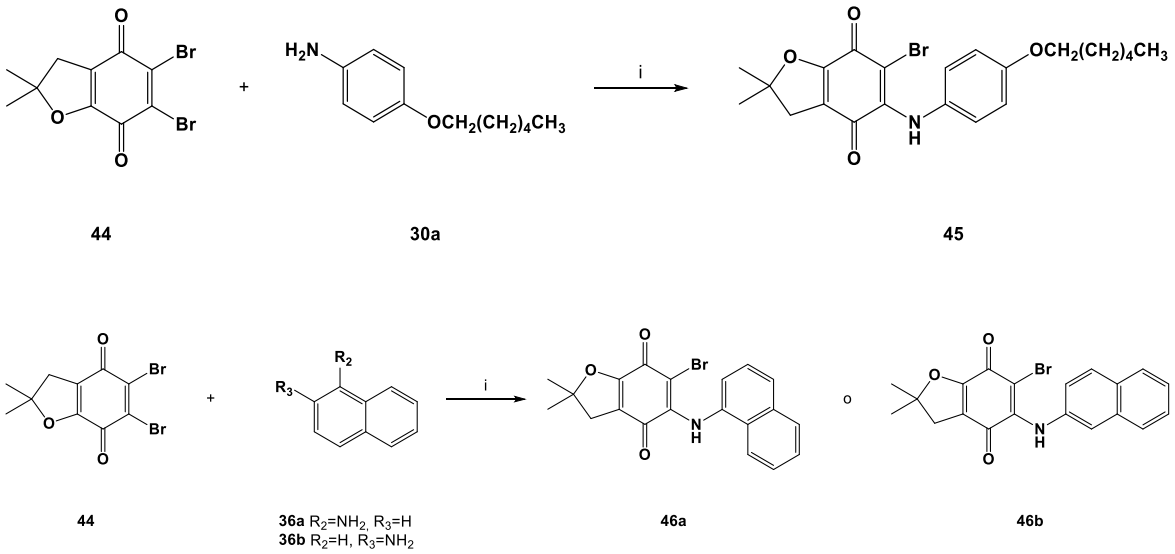
Una disolución de 149,7 mg de óxido crómico (1,5 mmol, 3,0 eq) en 3,2 mL de agua, se adicionó gota a gota a temperatura ambiente sobre una disolución de 200 mg del compuesto **43** (0,5 mmol, 1,0 eq) en 7,2 mL de una mezcla de ácido acético glacial-agua (3,5/1), agitada magnéticamente. La agitación se continuó una hora más y, a continuación, la mezcla de reacción se diluyó con 32 mL de agua y se extrajo con diclorometano (3 x 16 mL). La fase orgánica se lavó con disolución de bicarbonato de sodio (10%) hasta pH neutro, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a sequedad en el rotavapor. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (eluyente CH_2Cl_2), obteniéndose 109,2mg (0,32 mmol, 65 %) del compuesto **44**, como un sólido rojo.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,55 (s, 6 H, 2xCH_3); 2,91 (s, 2 H, CH_2).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 28,38 (2xCH_3); 40,31 (CH_2); 93,77 (C); 120,26 (C); 135,25 (C); 141,47 (C); 156,95 (C); 170,60 (CO); 174,36 (CO).

IR (KBr, ν, cm^{-1}): 1684 (C=O); 1638 (C=O); 1177; 762 (C-Br).

1.5. Síntesis de arildihidrobenzofurandionas (45, 46a-b)



Reactivos y condiciones: i) $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, EtOH, t.a., 12 h.

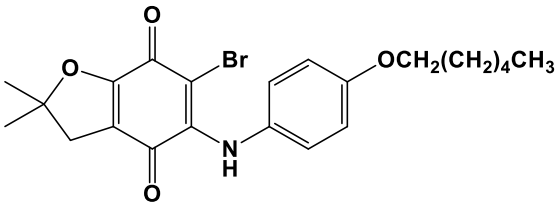
Esquema 24.Sintesis de benzofurandionas

Para obtener las benzofurandionas **45** y **46a-b** se utilizó el método i, descrito en la sección 1.2 de la parte II (página 164). Los productos obtenidos fueron purificados por cromatografía en columna sobre sílicagel, usando $CHCl_3$ como eluyente.

a) Bromo-5-((4-(hexiloxi)fenil)amino)-2,2-dimetil-2,3-dihidrobenzofuran-4,7-diona (**45**).

Apariencia: Solido violeta

Punto de fusión: 161-163 °C



Rendimiento: 78 %

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 0,89 (t, *J* = 7,0 Hz, 3 H, CH_3), 1,31-1,35 (m, 4 H, 2xCH_2), 1,41-1,49 (m, 2 H, CH_2), 1,56 (s, 6 H, 2xCH_3), 1,73-1,80 (m, 2 H, CH_2), 2,86 (s, 2 H, CH_2); 3,94 (t, *J* = 6,6 Hz, 2 H, O-CH_2), 6,84 (d, *J* = 8,9 Hz, 2 H, 2xAr-H), 7,01 (d, *J* = 8,7 Hz, 2 H, 2xAr-H), 7,89 (s, 1 H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 14,10 (CH_3), 22,66 (CH_2), 25,78 (CH_2), 28,39 (2xCH_2), 29,27 (CH_2), 31,65 (CH_2), 39,38 (CH_2), 68,36 (OCH_2), 94,13 (C), 95,47 (C), 114,20 (2xCH), 114,71 (C), 127,14 (2xCH), 129,44 (C), 143,84 (C), 157,96 (C), 161,45 (C), 172,51 (CO), 177,70 (CO).

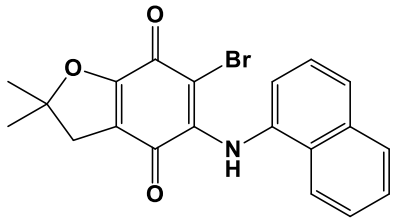
IR (KBr, ν, cm^{-1}): 3448 (NH), 3295 (C-H), 1655 (CO), 1564 (CO).

EM (ESI, *m/z*): 448,11 $[M+H]^+$ (100 %).

b) Bromo-2,2-dimetil-5-(naftalen-1-ilamino)-2,3-dihidrobenzofuran-4,7-diona (**46a**).

Apariencia: Sólido rojo

Punto de fusión: 173-175 °C



Rendimiento: 69 %

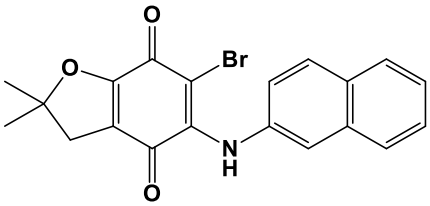
RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,61 (s, 6 H, 2xCH_3), 2,94 (s, 2 H, CH_2), 7,23 (d, *J* = 7,3 Hz, 1 H, Ar-H), 7,46 (t, *J* = 7,8 Hz, 1 H, Ar-H), 7,51-7,59 (m, 2 H, 2xAr-H), 7,82 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H, Ar-H), 7,88-7,92 (m, 3 H, 3xAr-H), 8,13 (s, 1 H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 28,50 (2xCH_3), 39,53 (CH_2), 94,35 (C), 96,61 (C), 115,05 (C), 122,59 (CH), 124,36 (CH), 124,89 (CH), 126,71 (CH), 127,11 (CH), 127,73 (CH), 128,68 (CH), 130,11 (C), 133,00 (C), 134,02 (C), 144,79 (C), 161,42 (C), 172,71 (CO), 177,76 (CO).

IR (KBr, n, cm^{-1}): 3264 (NH), 1664 (CO), 1583 (CO), 1571 (C=C).

EM (ESI, *m/z*): 398,07 $[M+H]^+$ (100 %).

c) Bromo-2,2-dimetil-5-(naftalen-2-ilamino)-2,3-dihidrobenzofuran-4,7-diona (**46b**).



Apariencia: Solido rojo

Punto de fusión: 177-179 °C

Rendimiento: 71 %.

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 1,59 (s, 6 H, 2xCH_3), 2,91 (s, 2 H, CH_2), 7,32 (dd, *J* = 8,8 Hz, *J* = 1,8 Hz, 1 H, Ar-H), 7,45-7,55 (m, 2 H, 2xAr-H), 7,69 (s, 1 H, Ar-H), 7,75-7,88 (m, 3 H, 3xAr-H), 7,90 (s, 1 H, NH).

RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 28,47 (2xCH_3), 39,49 (CH_2), 93,62 (C), 97,68 (C), 115,10 (C), 119,54 (CH), 121,56 (CH), 126,25 (CH), 127,31 (CH), 127,67 (CH), 127,92 (CH), 129,86 (CH), 131,30 (C), 133,80 (C), 134,91 (C), 145,38 (C), 161,92 (C), 179,37 (CO), 179,57 (CO).

IR (KBr, n, cm^{-1}): 3293 (NH), 2922 (CH), 1655 (CO), 1570 (CO).

EM (ESI, *m/z*): 398,04 $[M+H]^+$ (100 %).

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Síntesis de 2-fenilaminonaftoquinonas

La segunda parte de la tesis doctoral corresponde a la síntesis de una serie de nuevas 2-fenilaminonaftoquinonas con diferentes patrones de sustitución, que obedecen a los patrones estructurales indicados en la **Figura 39**. Todo ello con el objeto de dar continuidad a trabajos ya realizados en el grupo de investigación y validar el farmacóforo 2-aminonaftoquinona como fragmento clave para compuestos con actividad tripanosomicida.

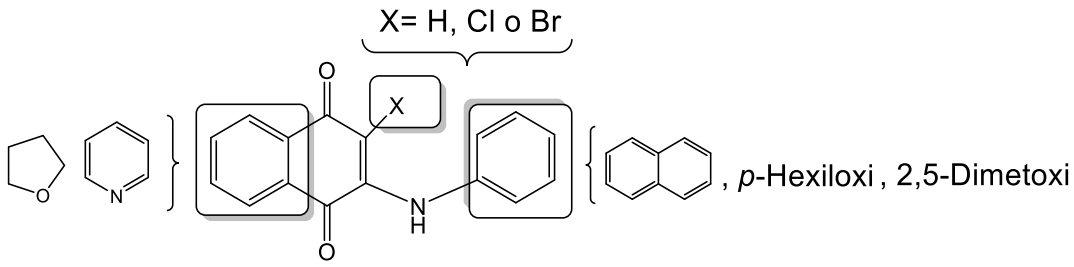
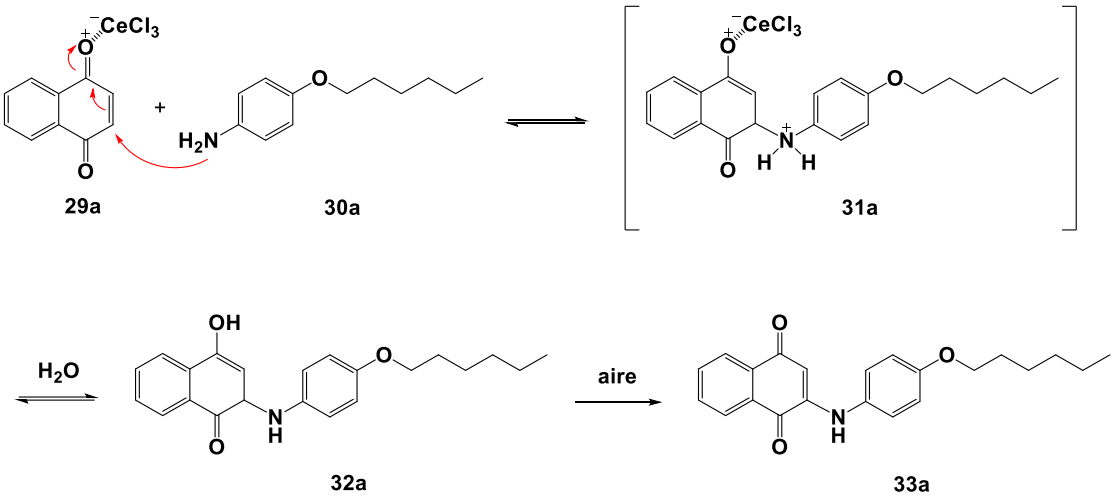


Figura 39. Modificaciones propuestas para la síntesis de quinonas.

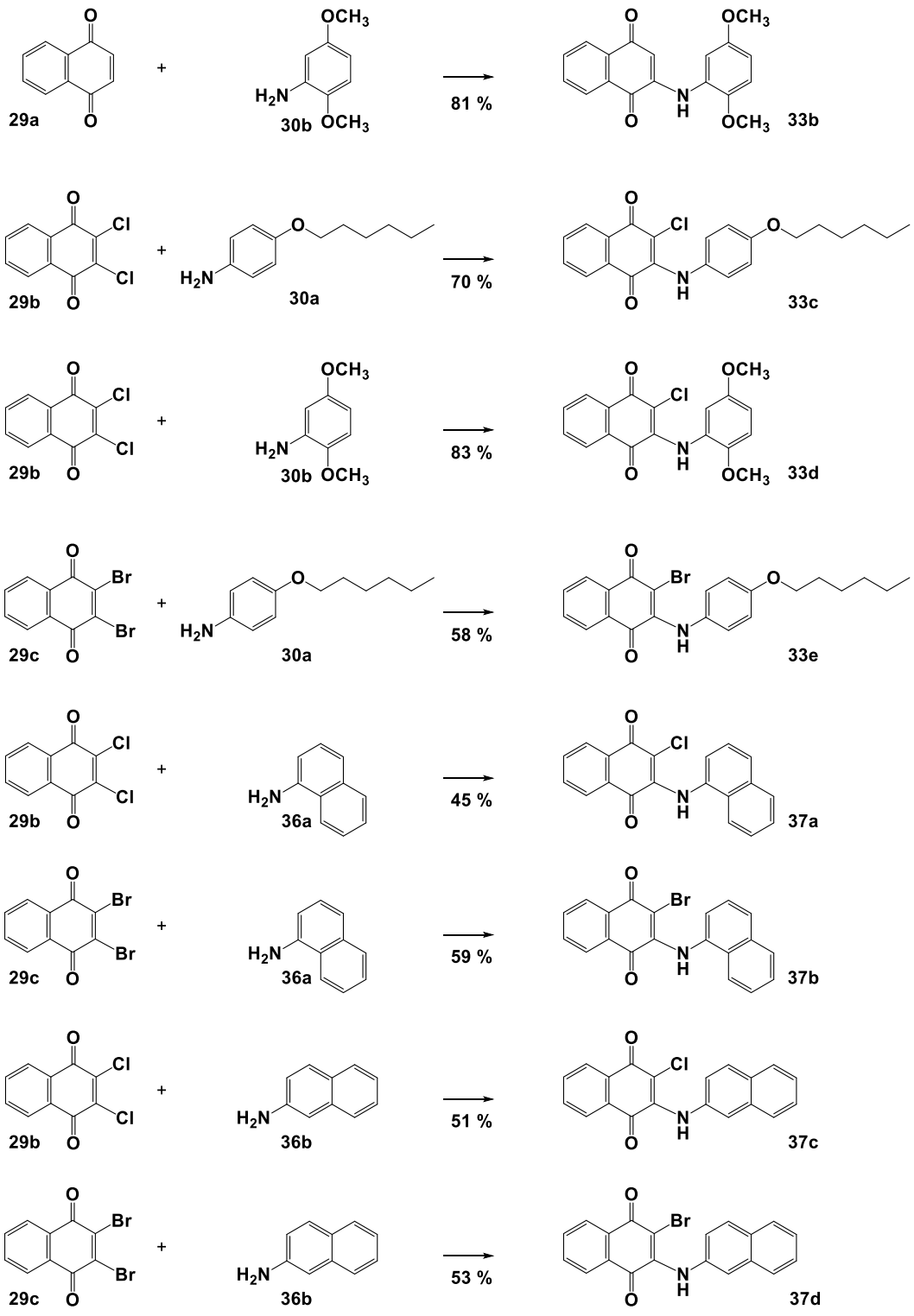
Así, cuando se hizo reaccionar la naftoquinona comercial (**29a**) con la 4-hexiloxianilina (**30a**), en presencia de $CeCl_3$, se obtuvo en un 74 % de rendimiento la 2-(hexiloxifenilamino)naftalen-1,4-diona (**33a**). La formación de **33a** se puede explicar mediante el mecanismo indicado a continuación (**Esquema 25**). La adición de Michael (adición 1,4) de la amina **30a** a sistema carbonílico α,β-insaturado de la naftoquinona **29a** da lugar a la formación del aducto **31a**. La reacción es catalizada por $CeCl_3$, un ácido de Lewis que se coordina al grupo carbonilo, exaltando la reactividad del sistema quinonico con nucleófilos, al hacer más nucleófila la posición C-3, facilitando ello el ataque de la amina.(*81, 82*) El aducto **31a** reacciona con agua, provocando la hidrólisis del enlace O-Ce, así como la tautomerización del segundo grupo carbonilo de quinona, resultando ello en la formación del naftaléndiol **32a**, que se oxida de forma espontánea e irreversible por acción del oxígeno del aire, generándose de esta manera la 2-aminofenilnaftoquinona **33a** obtenida.



Esquema 25. Mecanismo de formación de **33a**.

La estructura de la 2-aminofenilnaftoquinona **33a** se estableció fácilmente a partir de sus datos espectroscópicos. Su espectro de masas, confirmó la masa molecular del compuesto y su espectro de IR, mostró a 3125 cm^{-1} una típica banda de vibración de tensión N-H de aminas secundarias, así como dos bandas a 1678 y 1660 cm^{-1}, típicas de grupos carbonilo de quinonas. Se analizo su espectro de RMN-^{1}H, donde se apreció un singlete, cercano a los 6,20 ppm, correspondiente al protón de la posición C-3, en posición α al carbono carbonílico, y un singlete, en 7,45 ppm, el cual corresponde al protón de la amina del sistema fenilamina. También se encontraron las señales del grupo hexiloxi sustituyente de la amina. Además, se observó un multiplete cercano a los 3,96 ppm, el cual corresponde al metileno unido al átomo de oxígeno, varios multipletes entre los 1,36 y los 1,80 ppm, de los demás grupos metilenos, para encontrar la señal correspondiente a CH_3 como un multiplete cercano a 0,91 ppm. La estructura del compuesto **33a** se ratificó con el espectro de RMN-^{13}C, ya que en él aparecen las distintas señales características de carbonilos de tipo quinona, sobre los 180 ppm, las señales de los protones aromáticos (100–160 ppm), y las seis señales de la cadena alifática, entre los 14 y los 70 ppm.

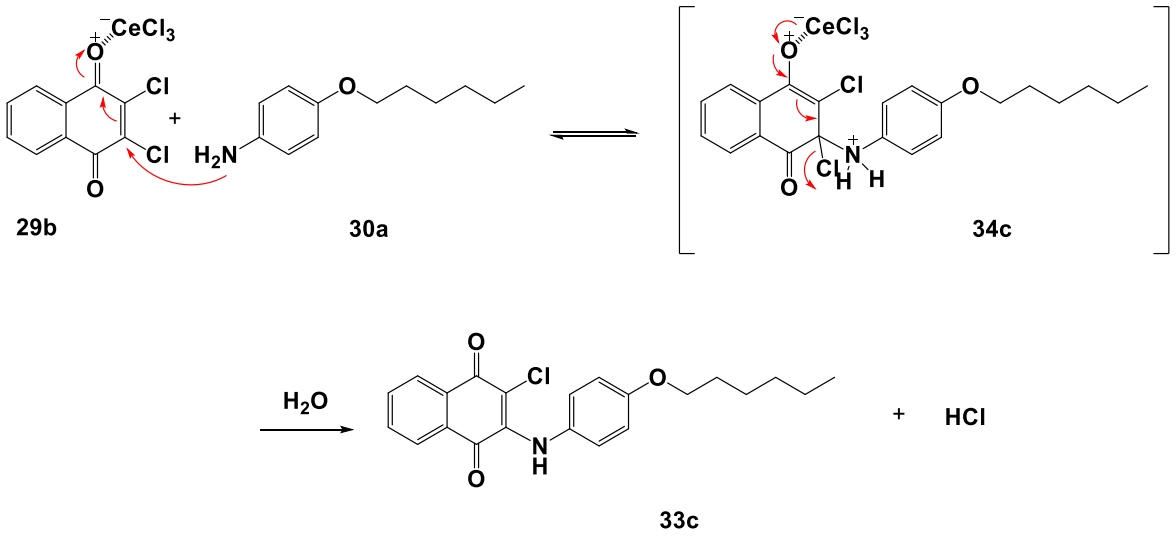
Empleando el mismo procedimiento, se prepararon las ocho 2-aminoarilnaftoquinonas adicionales mostradas en el **Esquema 26**, en el que se indica para cada una de ellas únicamente las sustancias de partida, sin ninguna consideración mecanística adicional.



Esquema 26. 2-Aminoarilnaftoquinonas preparadas de acuerdo al protocolo utilizado para **33a**.

Así, cuando se hizo reaccionar a la naftoquinona (**29a**) con la 2,4-dimetoxianilina (**30b**), se obtuvo la 2-aminofenilnaftoquinona **33b** con un rendimiento del 81 %.

En los ensayos posteriores la naftoquinona fue sustituida por la 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona, la cual está disponible comercialmente, debido a que es conocido que la presencia de halógenos facilita la adición de nucleófilos al sistema quinónico. El mecanismo de reacción para cuando se parte de un haloquinona, es ligeramente diferente al indicado en el **Esquema 26**. Así, como se ve en el **Esquema 27**, la adición de Michael de la anilina **30a** a la dicloronaftoquinona **29b**, facilitada por el $CeCl_3$, conduce a la formación de un aducto **34c**, que evoluciona eliminando un átomo de cloro, como cloruro, lo que conlleva la generación del sistema quinónico del producto de reacción **33c** que se expone en el **Esquema 28** para el caso de la 2-aminofenilnaftoquinona **33c**.



Esquema 27. Mecanismo de la adición de Michael en quinonas dihalogenadas.

Cuando se caracterizó el compuesto **33c**, mediante RMN-^{1}H, se pudo observar las señales que corresponden a la cadena alifática del grupo hexiloxi. Se encontró un triplete a 0,90 ppm del grupo CH_3, una serie de multipletes entre los 1,30 ppm y 1,80 ppm, que corresponden a los grupos metilenos y un triplete, cercano a los 4,0 ppm, del metileno unido a oxígeno. Se logro ver, además, dos pares de dobletes, a 6,83 ppm y 7,01 ppm, que corresponden a los protones aromáticos de la anilina, y finalmente, cuatro grupos de señales correspondientes a los aromáticos del sistema quinonico, en donde el multiplete de 7,62 ppm incluye además la señal de NH, que se superpone con la de un protón aromático. Esta asignación de señales también fue posible hacer, gracias a la información entregada por el espectro de COSY-^{1}H (**Figura 40**). Aquí, se vieron claramente dos grandes grupos de señales, las que corresponden a la cadena hexiloxi por un lado y a los protones de los anillos aromáticos y quinonicos por otro, además del NH presente en la molécula. Los dobletes a 6,80 y 7,0 ppm aproximadamente, solo se acoplan entre sí, mientras que las señales de los protones aromáticos se acoplan entre ellas, siendo la de la señal cercana a los 7,60 ppm un poco más difícil de analizar dada la presencia del NH en la misma zona.

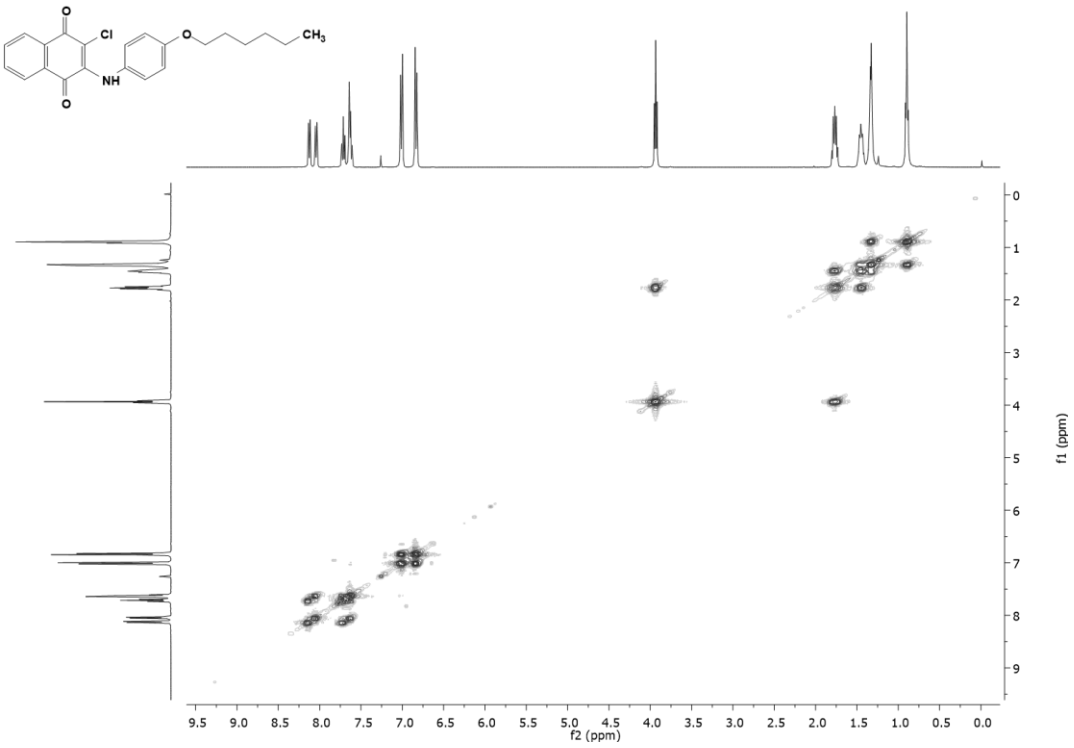


Figura 40. Espectro de COSY-^{1}H para el compuesto **33c**.

La sustitución de la amina **30a** a la dicloronaftoquinona **29b** se estableció de forma inequívoca mediante los espectros de HMQC y HMBC, analizando las correlaciones entre H y C (**Figura 41**). Aquí se pudo ver que una de las señales de carbonilo, a 180 ppm aprox., tiene un acoplamiento con el doblete cercano a los 8,0 ppm y, además el acoplamiento con el multiplete donde se encuentra la señal del NH, mientras que la otra señal de carbonilo, a 177 ppm aprox., presenta un acoplamiento H-C solo con el doblete a 8,13 ppm, protón del anillo aromático, estableciendo de esta manera que el carbonilo a 180 ppm corresponde al átomo de carbono C-1 y el carbonilo a 177 ppm corresponde al átomo de carbono C-4.

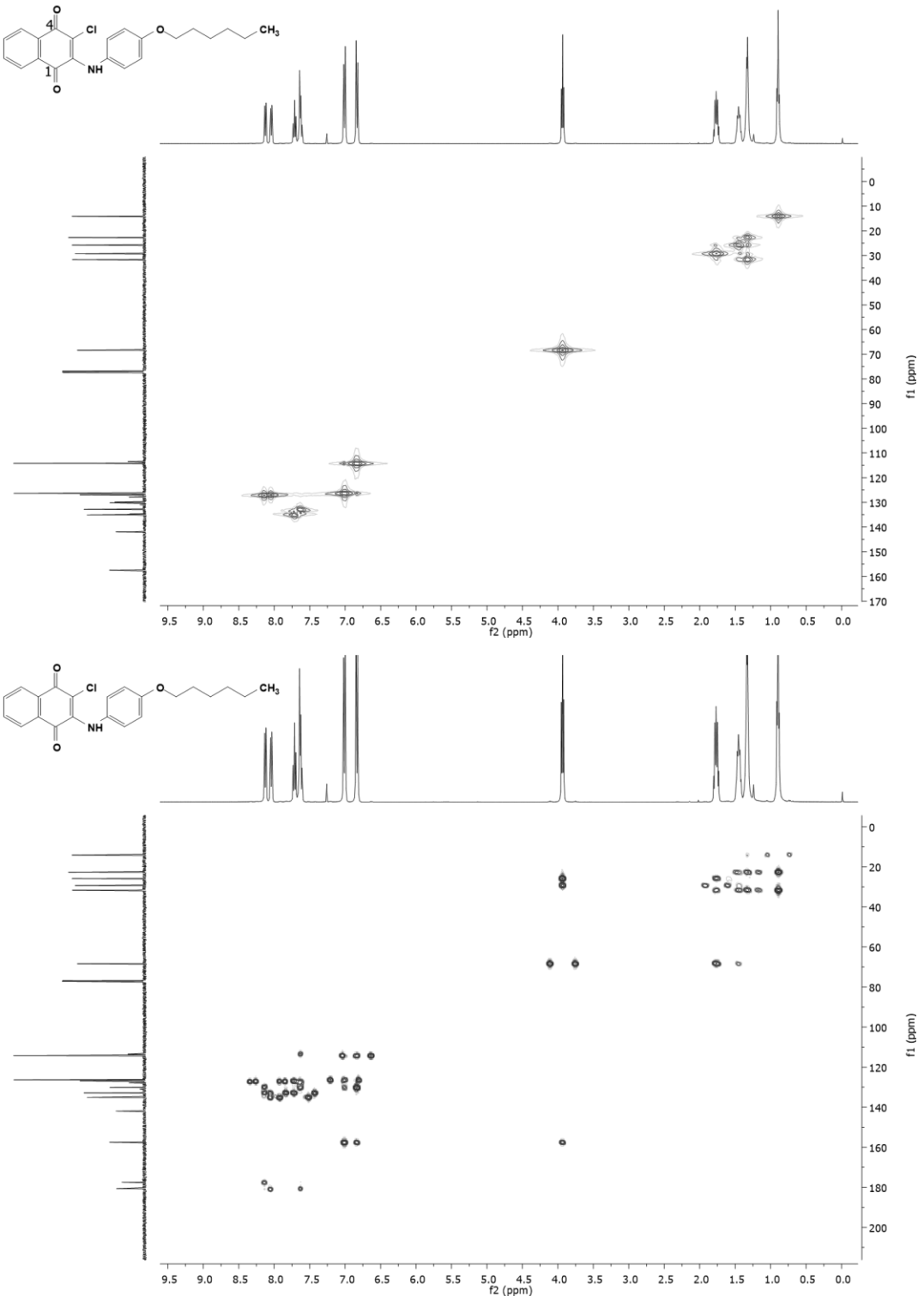


Figura 41. Espectros de HMQC y HMBC del compuesto **33c**.

Se prepararon también a partir de la dicloronaftoquinona **29b** una 2-aminofenilnaftoquinona (**33d**), así como las 2-aminonaftilnaftoquinonas **37a** y **37c**.

También se ensayó la 2,3-dibromo-1,4-naftoquinona (**29c**) como sustancia de partida, preparándose 2-aminoarilquinonas similares a las obtenidas a partir de su quinona diclorada análoga, que son los compuestos **33e**, **37b** y **37d**. Los rendimientos fueron del rango de los obtenidos a partir de la dicloronaftoquinona en el caso de los compuestos **37b** y **37d**, e inferior en el caso del compuesto **33e**.

En la **Figura 42** se muestra el espectro de HMBC para el compuesto **37b**, en el cual se pudo ver como la señal correspondiente al NH tiene un acoplamiento con la señal a 107 ppm, que corresponde al carbono cuaternario de la posición C-1', así como con la señal de carbonilo a 180 ppm, determinando que se trate de la señal del carbonilo de la posición C-4. La señal del otro carbonilo, en la posición C-1, tiene un acoplamiento con el doblete que aparece a 8,18 ppm, debido al protón de la posición C-8.

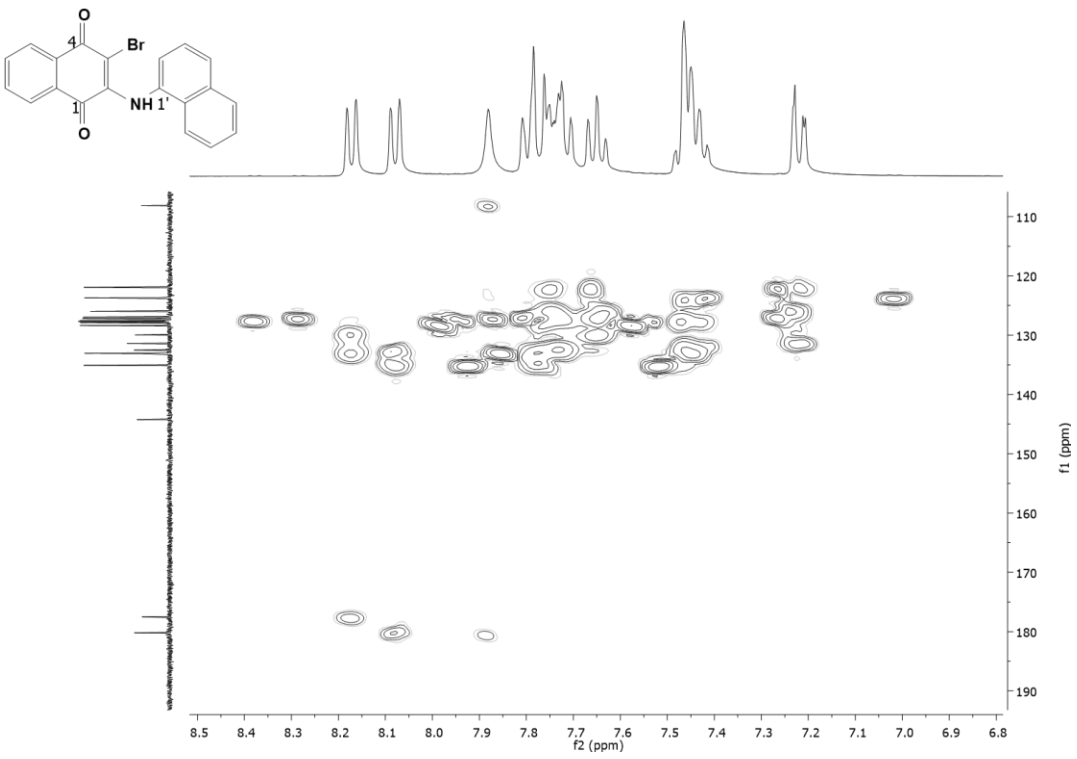
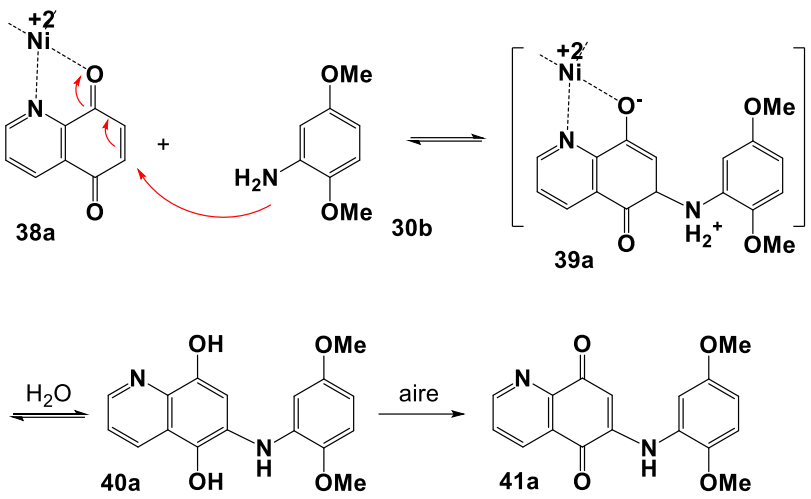


Figura 42. Espectro de HMBC del compuesto **37b**, confirmando la regioselectividad de la sustitución.

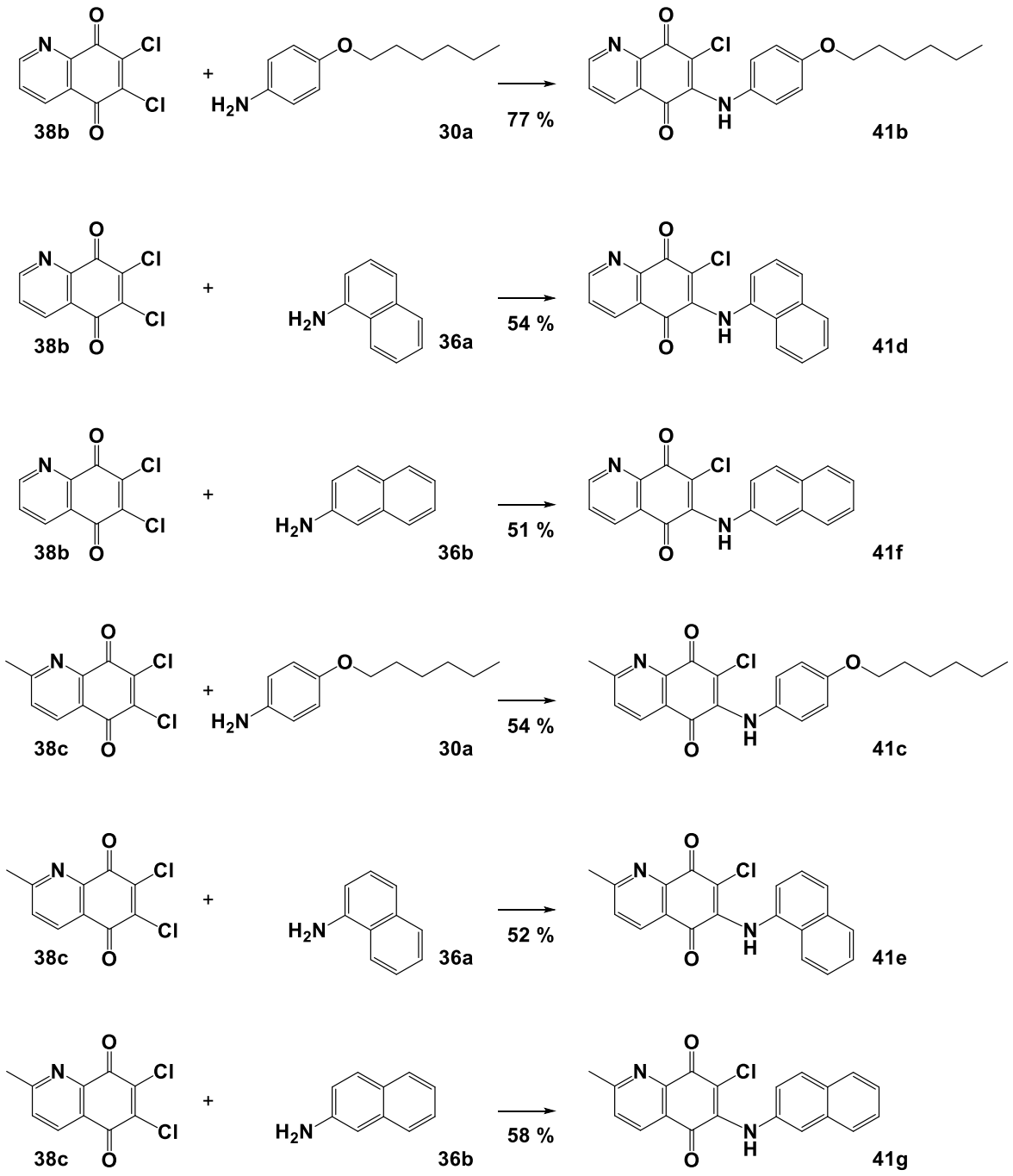
Se preparó un segundo tipo de derivados de 2-aminoarilquinónicos, utilizando como quinona de partida la quinilín-5,8-diona, empleándose ahora una variante del método usado para preparar 2-aminofenilnaftoquinonas a partir de naftoquinonas. Así, cuando se hizo reaccionar la quinolindiona **38a** con la 2,5-dimetoxianilina, en presencia de $NiCl_2$, se obtuvo en un 67 % el aducto correspondiente, 7-(2,5-dimetoxifenilamino)quinolin-5,8-diona (**41a**), como pudo establecerse a partir de sus propiedades espectroscópicas. Su espectro de masas confirmó la masa molecular del compuesto (M = 310) y el espectro de IR presentó bandas similares a las de los compuestos análogos previos: a 3328 cm^{-1} la banda correspondiente a la vibración de tensión de los carbonilos de quinona. En cuanto a su espectro de RMN de protón, muestra 3,80 y 3,88 ppm sendos singletes, de tres protones cada uno, debidos a los grupos metoxilo, mostrando además entre 6,65 y 9,05 ppm siete señales, debidas a N-H y a los siete protones aromáticos del compuesto.



Esquema 28. Mecanismo de formación de **41a**.

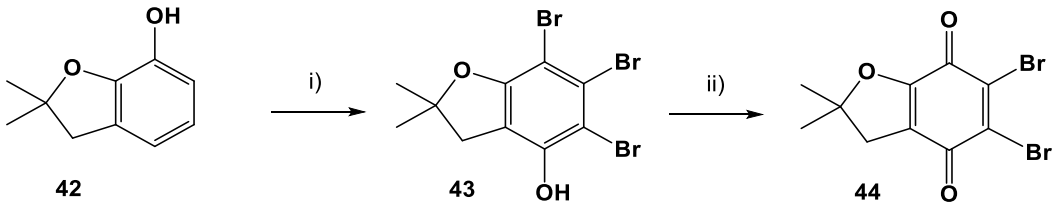
En el caso actual de adición de aminas a la quinolin-5,8-diona se utilizó $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, en lugar de $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, ya que el Ni^{+2} es capaz de coordinarse simultáneamente con el carbonilo de la quinona y con el nitrógeno del anillo piridina, determinando ello una sustitución regioselectiva de la amina (**Esquema 28**).[*(83)*]

Utilizando las mismas condiciones en la formación del compuesto **41a**, se prepararon tres derivados de la quinolinquinona **38b**, los compuestos **41b**, **41d** y **41f**. Además, a partir de una tercera quinolinquinona (compuesto **38c**) se prepararon los 2-naftilderivados **41c**, **41e** y **41g** (**Esquema 29**).



Esquema 29. Compuestos preparados a partir de las quinolin-5,8-dionas **38b** y **38c**.

Finalmente se ensayó una séptima quinona, la 5,6-dibromo-2,2-dimetil-2,3-dihidrobenzofuran-4,7-diona (**44**), que puede considerarse formalmente derivada de la naftoquinona, por reemplazamiento del anillo bencénico por un anillo de tipo furánico. Esta quinona **44** se preparó siguiendo un procedimiento conocido (**Esquema 30**),(*84*) a partir del 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol (**42**), que al ser tratado con un exceso de Br_2 a temperatura ambiente dio lugar a la formación del derivado tribromado **43**, obtenido con un rendimiento del 60 %. A continuación, se realizó una reacción de oxidación, utilizando como agente oxidante óxido crómico, a temperatura ambiente, con lo que se obtuvo, con un 65 % de rendimiento, la quinona **44** deseada, cuyo espectro de RMN-^{1}H presentó, a 1,55 ppm, un singlete debido a los seis protones de sus dos grupos metilo y a 2,91 ppm un singlete de dos protones, debido al grupo metileno. Su espectro de RMN-^{13}C es concordante con su cadena carbonada, presentando a 170,60 y 174,36 ppm las señales de sus dos grupos carbonilo.



Esquema 30. Condiciones: i) Br_2, $CHCl_3$, t.a., 1,5 h. ii) CrO_3, H_2O/AcOH, t.a., 2 h.

Cuando la quinona dibromada **44** se hizo reaccionar con las arilaminas **30a**, **36a** y **36b**, empleando las condiciones previas de preparación de 2-aminoarilnaftoquinonas (procedimiento i), se obtuvieron las arilaminas **45**, **46a** y **46b**, respectivamente, como pudo establecerse fácilmente a partir de las propiedades espectroscópicas y analíticas correspondientes. Al igual que en los casos anteriores, la información espectroscópica obtenida del RMN-^{1}H para el compuesto **45**, nos permitió corroborar la formación de los productos esperados (**Figura 43**). Aquí se pudo ver como se repite el patrón de señales correspondientes

a la cadena alifática en la posición C-4’ de la anilina, pero se encontraron nuevas señales, de los dos metilos sustituyentes del furano, cercano a los 1,50 ppm, al igual que el metileno del furano, el cual se encuentra aproximadamente a 2,80 ppm. Además, vemos las señales correspondientes a los protones aromáticos de la anilina, con el mismo patrón de efecto tejado, que se aprecia en los compuestos anteriormente preparados en los cuales está incorporado esta anilina.

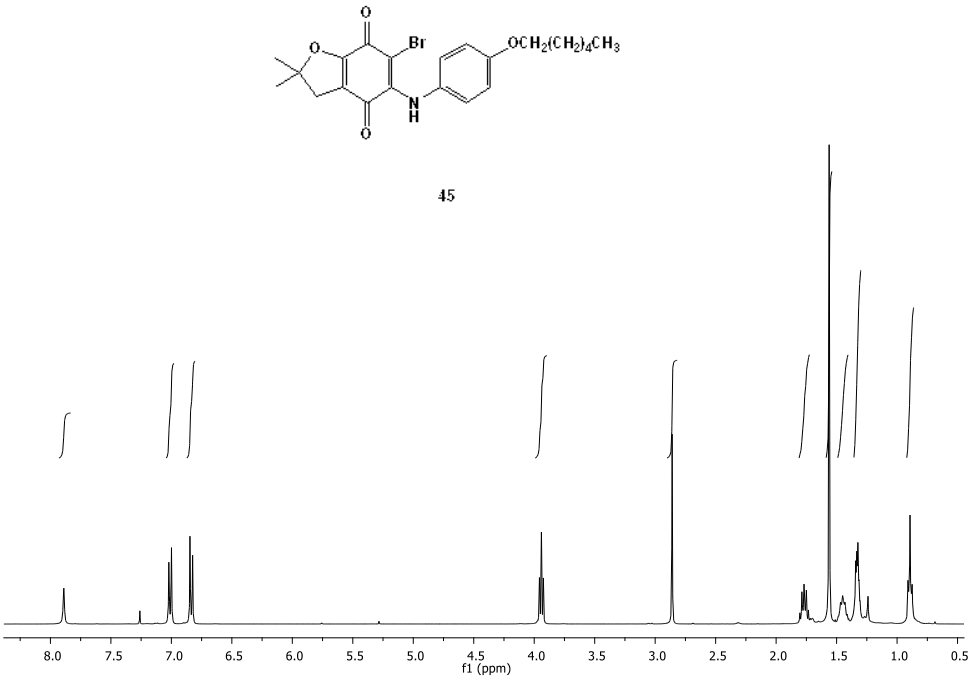
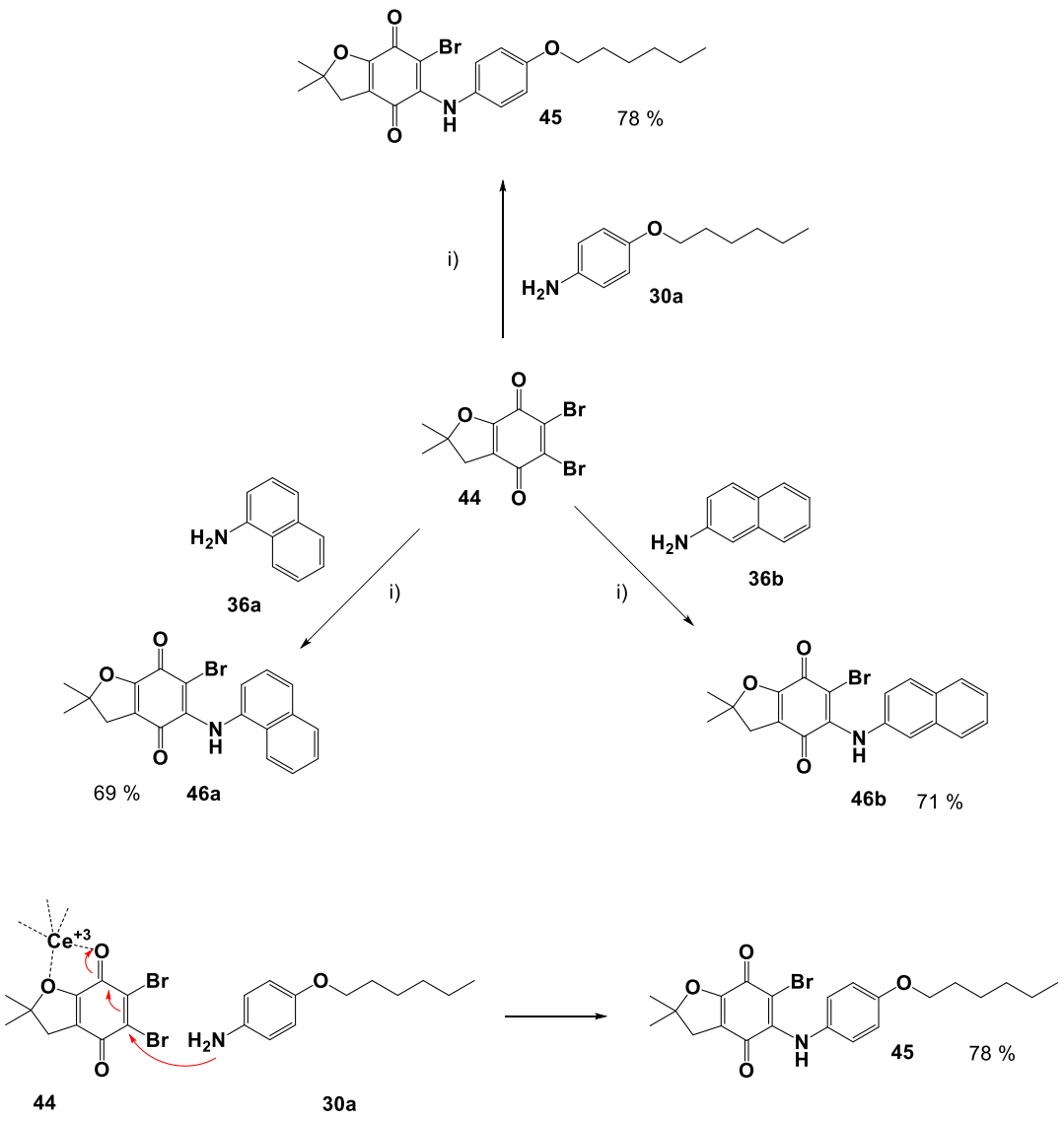


Figura 43. Espectro de RMN-^{1}H del compuesto **45**.

La regioquímica que se observó en estos casos de adición de la amina, pone de manifiesto que el ácido de Lewis empleado en este caso para catalizar la reacción jugó el mismo papel orientador que el $NiCl_2$ en el caso de las quinolinquinonas, como se indica en el **Esquema 31**. El Ce^{+3} se coordina simultáneamente al oxígeno del furano y al carbonilo de la quinona, promoviendo ello el ataque del nitrógeno a la posición C-5 de la quinona **44**.



Esquema 31. Condiciones: i) $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, EtOH, t.a., 2 h.

La regioquímica observada ha podido ponerse claramente de manifiesto mediante el espectro de HMBC del compuesto **45** (**Figura 44**).

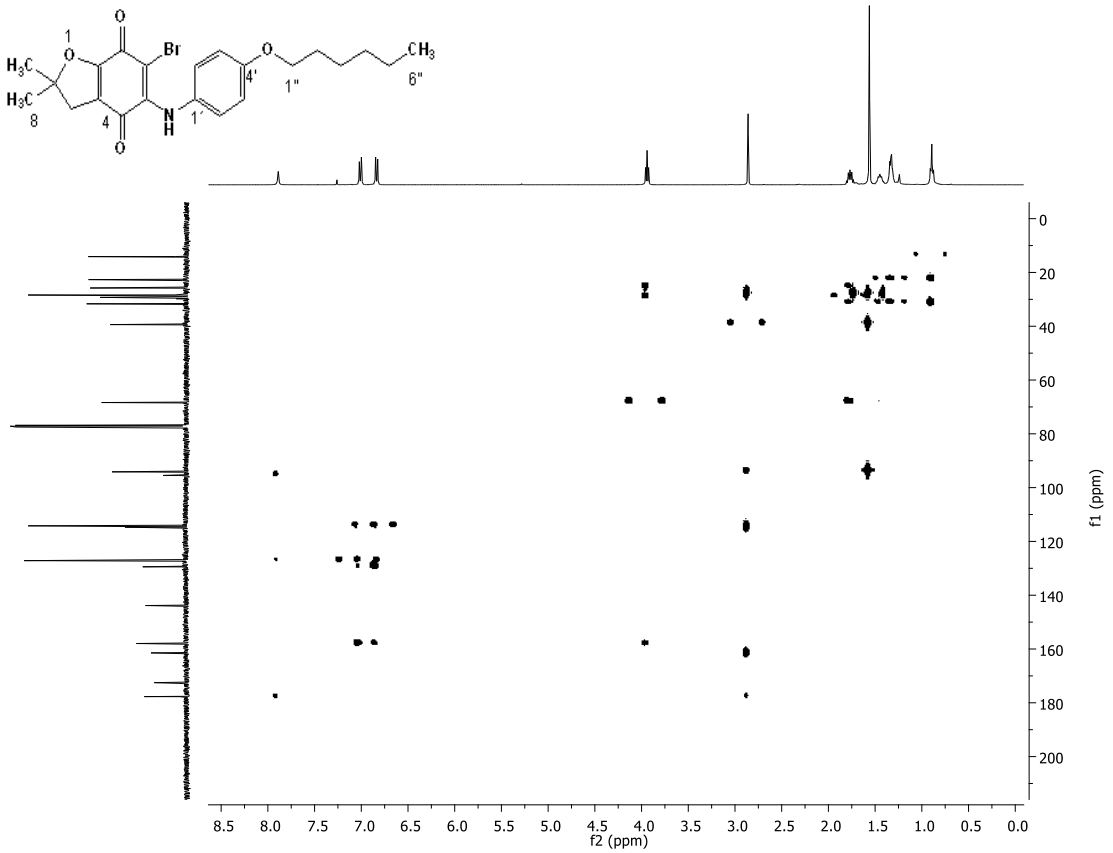


Figura 44. Espectro de HMBC del compuesto **45**.

En este espectro podemos apreciar como la señal correspondiente al NH (7,89 ppm) muestra los siguientes acoplamientos:

a) Un acoplamiento con una señal de un carbono cuaternario (95 ppm), correspondiente a C-1'.

b) Un acoplamiento con los grupos CH de las posiciones C-2' y C-6' de la anilina, que aparecen en 127 ppm.

c) Un acoplamiento del carbonilo en C-4 (la señal a 177 ppm) con el CH_2 en C-3 (señal a 2,86 ppm).

Debido a la semejanza estructural de los compuestos previamente preparados, se determinó agruparlos en dos grupos distintos, los que se denominaron Serie I al que contiene los compuestos **33a-d** y **41a**, y como Serie II al que contiene a los compuestos **33e**, **37a-b**, **41b-e**, **45** y **46a-b**. Al hacer esto, se facilitó el posterior análisis de los efectos de estos compuestos sobre el parásito, haciendo un estudio estructura-actividad, cuyos resultados se reportan en el siguiente apartado.

2.2. Evaluación Biológica

2.2.1. Actividad tripanosomicida de derivados de 2-aminonaftoquinonas (Serie I)

Basados en resultados previos obtenidos por Salas y cols.,(*53*) se procedió en una primera instancia, a diseñar y sintetizar un conjunto de cinco nuevos derivados de 2-fenilaminoquinonas (**33a-d** y **41a**), las cuales recogían algunos aspectos estructurales interesantes de reconsiderar para estudiar si era posible incrementar la actividad tripanosomicida y selectividad, como por ejemplo la sustitución de la posición C-3 del hidrógeno por un halógeno o el reemplazo del anillo bencénico por uno de piridina. En la **Figura 45** se muestran las cuatro modificaciones estudiadas previamente sobre el núcleo 2-aminonaftoquinona, que sirvió de patrón para las nuevas estructuras **33a-d** y **41a**.

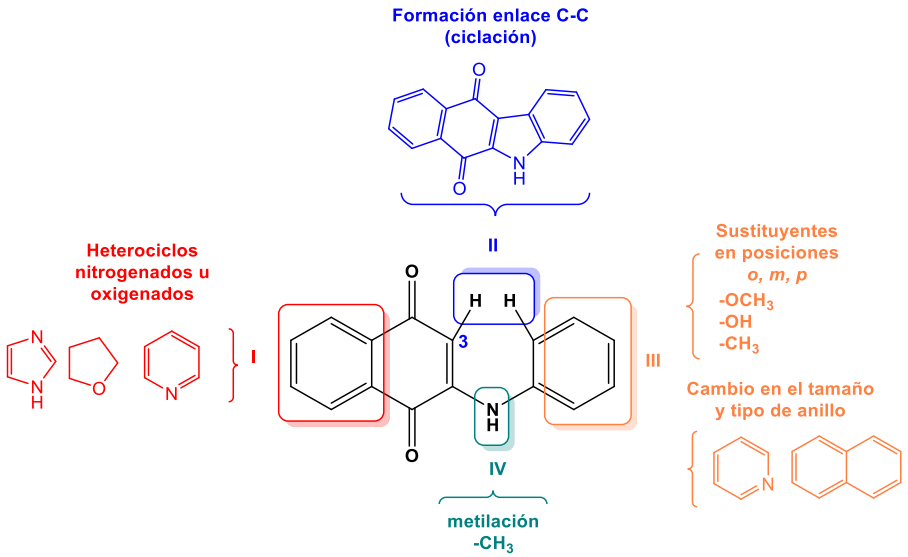
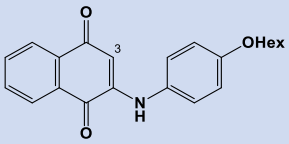
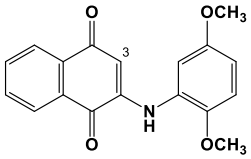
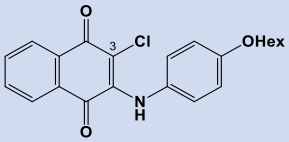
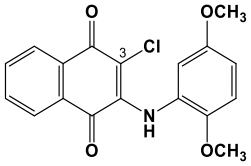
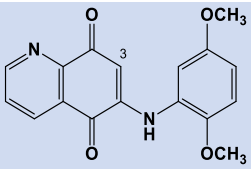


Figura 45. Modificaciones estructurales de derivados de 2-aminonaftoquinonas utilizadas como patrón para los compuestos **33a-d** y **41a**.

La actividad tripanosomicida fue testeada contra epimastigote de *T. cruzi* y aquellos que exhibieron mayor actividad que nifurtimox, usado como droga de referencia, fueron ensayados contra la forma tripomastigotes del parásito. Para cuantificar la eficacia relativa de estas quinonas *in vitro* comparada con las drogas estándar, se determinaron valores de IC_{50}, el cual corresponde a un valor de concentración necesaria del compuesto para reducir una población conocida de células al 50 %. Así mismo, en orden de encontrar algún patrón estructural que ayudara a validar las modificaciones propuestas para estas nuevas moléculas basadas en la **Figura 45**, un set de propiedades estéreo-electrónicas fueron calculadas y utilizadas en un intento de comprender las diferencias en los resultados de actividad tripanosomicida.

Tabla 12. Efecto de 2-aminonaftoquinonas de la serie I sobre cultivos de crecimiento en *T. cruzi*.

Compuesto	IC_{50} (µM) epimastigote[a]	% Mortalidad tripomastigote[b]	IC_{50} (µM) Vero[a]	IS[c]
 33a	1,72 ± 0,3	69,63 ± 4,2	27,04 ± 6,1	16
 33b	23,30 ± 4,7	-	>50	
 33c	6,04 ± 0,1	46,30 ± 4,1	195,85 ± 26,9	32
 33d	>100	-	>100	-
 41a	2,45 ± 0,1	32,62 ± 4,6	15,43 ± 4,5	6,3
Nifurtimox	21,05 ± 0,1	42,62 ± 3,7	411,13 ± 7,6	20

[a] Los resultados son un promedio de tres experimentos independientes. [b] Concentración de droga usados de acuerdo con el valor de IC_{50} en epimastigote. [c] IS: Índice de selectividad, expresado como la razón de IC_{50} de células Vero sobre IC_{50} en epimastigote.

Al comparar los compuestos **33b** y **41a**, se observó que, tal como se esperaba, el reemplazo del anillo bencénico unido al sistema quinónico, por parte de un anillo de

piridina, permite incrementar el efecto tripanosomicida. En este caso, **41a** fue aproximadamente 10 veces más potente que su análogo **33b**. Así mismo, **41a**, resulto ser más potente que nifurtimox. Como fue demostrado por Salas y cols., este reemplazo isostérico genera un cambio electrónico en la molécula que le permite un aumento en la estabilidad del radical, intermediario necesario para el efecto tripanosomicida, como parte del mecanismo propuesto.(*85*)

Para tratar de entender este comportamiento, se realizó un estudio teórico con lo cual es posible examinar los valores del gap de energía HOMO-LUMO de los compuestos **33b** y **41a** (**Tabla 13**). Si bien estas diferencias fueron muy pequeñas, existe por otro lado una diferencia en la distribución del HOMO y LUMO entre ellos, como se puede apreciar en la **Figura 46**, donde el átomo de nitrógeno de la porción heterocíclica genera un mayor efecto deslocalizador de la nube electrónica en el HOMO. Este cambio puede estar asociado con una conformación más plana de **41a** que **33b**, lo cual pudiera ofrecer mayor accesibilidad hacia un blanco biológico específico.

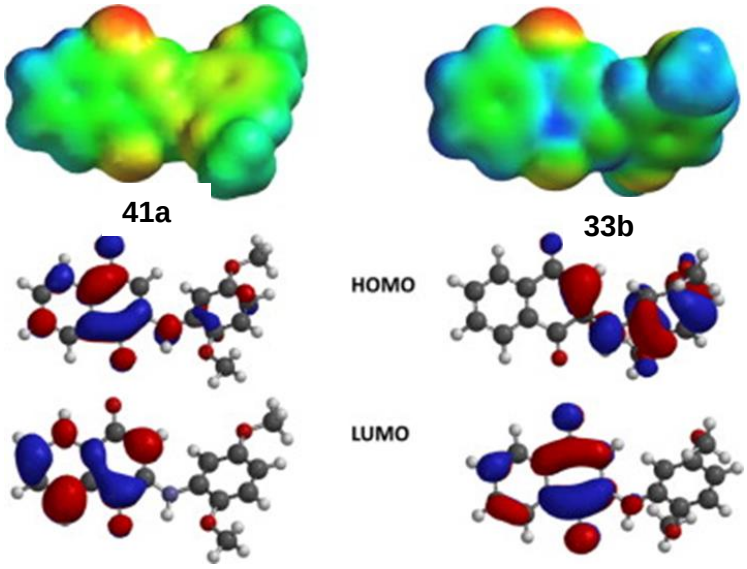


Figura 46. Representación de los potenciales electrostáticos y orbitales frontera para **41a** y **33b**.

Tabla 13. Propiedades estéreo-electrónicas calculadas para los compuestos **31a-d** y **41a**.

Compuesto	Área Superficial (A^2)	Log *P*	Momento Dipolar (D)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	HOMO-LUMO Gap
33a	44,90	5,55	3,25	-8,34	1,02	17,70
33b	52,47	2,99	2,11	-8,09	0,94	17,12
33c	44,94	6,46	4,58	-8,35	0,72	17,42
33d	52,51	3,90	2,60	-7,84	0,73	16,41
41a	62.16	2.34	2.20	-8.01	0.94	16.96
Nifurtimox	84.64	0.89	9.57	-9.75	0.77	20.22

De los resultados de la **Tabla 13**, también se desprende el hecho que el reemplazo del átomo de H-3 por un átomo de cloro, generaron los compuestos **33c** y **33d**. Ambos compuestos mostraron una disminución de su efecto tripanosomicida respecto a sus homólogos no halogenados **33a** y **33b**. Sin embargo, para **33c** la disminución del efecto tripanosomicida va interesantemente relacionada con un significativo aumento de la selectividad hacia células Vero, según se discutirá más adelante.

Por otro lado, la **Figura 47** muestra que la sustitución de H por Cl en C-3 (**33a** vs **33c** y **33b** vs **33d**) modifica le geometría de cada molécula y la distribución electrónica alrededor del sistema quinónico. De igual forma, en ambos casos, la disminución de la actividad tripanosomicida va acompañada del aumento de la lipofília (**Tabla 13**).

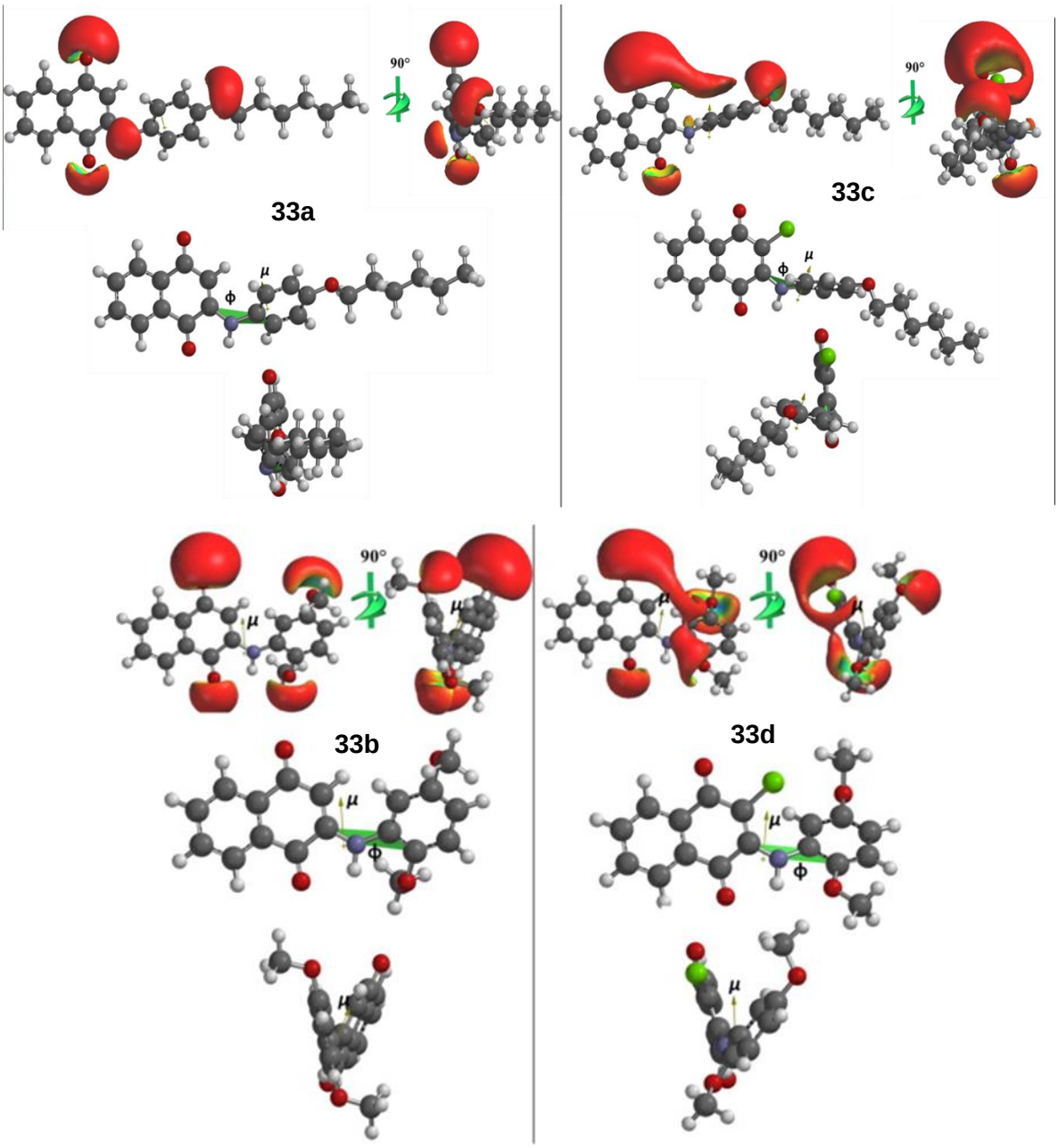


Figura 47. Análisis geométrico y electrónico para **33a** vs **33c** y **33b** vs **33d**.

Respecto a los resultados de la actividad tripanosomicida mostrados en la **Tabla 12**, también se puede hacer una última relación. Esta sería entre los compuestos **33a** (IC_{50} = 1,72 μM) y **33b** (IC_{50} = 23,30 μM) donde se evidencia que el aumento en el tamaño de la cadena alquílica del radical, incrementa la potencia

de este compuesto respecto al de menor tamaño. Este hecho pudiera estar relacionado con una eventual mejor capacidad de atravesar las membranas del parásito, lo cual se condice con los valores de Log*P* calculados (**Tabla 13**). Para ahondar en esta explicación, un modelo de membranas fue construido y evaluados *in silico* las interacciones entre los lípidos de la membrana con nifurtimox, **33a** y el compuesto que ya fue reportado **47**, cuyo log*P* calculado es de 4,38 (**Figura 48**). En este modelo, los tres ligandos migraron al centro de la membrana ocupando un volumen similar y las porciones hidrofóbicas en **33a** y **47** se superpusieron. Los valores de energía libre de unión para los complejos con nifurtimox fueron -3,63 kcal/mol mientras que para **33a** y **47** fueron de -6.88 y -7,73 kcal/mol respectivamente, en concordancia con los valores de log*P*.

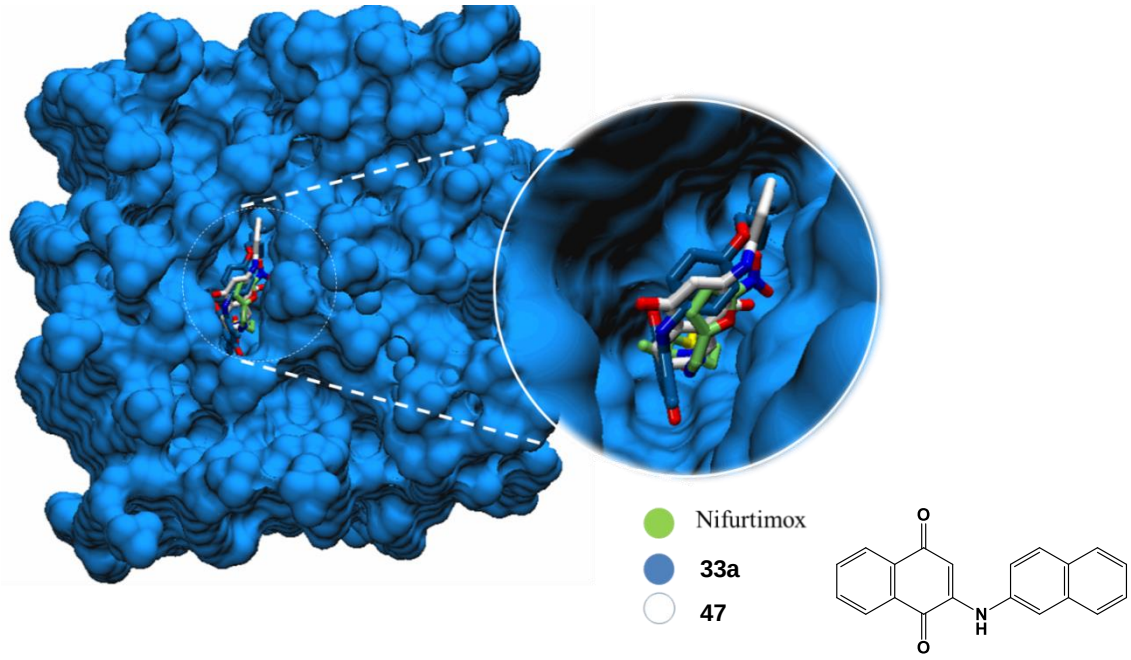


Figura 48. Modelo de membrana usado para calcular *in silico* las interacciones con nifurtimox, **33a** y **47**.

Ahora, si bien es interesante estudiar el efecto de estas moléculas en la forma epimastigote, es más importante determinar su efecto sobre la forma tripomastigote,

por cuanto es la forma infectiva del parásito. Para ello, se determinó la mortalidad de tripomastigotes a la concentración IC_{50} obtenida en cultivos de epimastigote (**Tabla 12**). Lamentablemente no se pudo determinar el valor de IC_{50} de estas moléculas por problemas de solubilidad en los medios de cultivo, y en algunos casos por la baja actividad antiparasitaria. Sin embargo, los resultados de la **Tabla 12**, indican que tanto **33a** como **33c** presentan similar toxicidad en ambas formas del parásito. Lo anterior indicaría que estos compuestos retienen el efecto tripanosomicida en los diferentes estados del ciclo de vida del parásito y para el caso de **33a**, es aún mayor en la forma infectiva. Este hecho pudiera estar relacionado con la lipofília, pero debido al pequeño número de compuesto no se puede asegurar.

Finalmente, para este conjunto de moléculas, **33a-d** y **41a**, fue determinado el efecto citotóxico *in vitro* en un modelo celular (células Vero), cuya importancia está determinada porque permite predecir potenciales efectos tóxicos en el mamífero hospedero. Por tanto, un potencial agente antichagásico debe presentar el menor efecto citotóxico posible y como es conocido que las quinonas son capaces de generar especies reactivas de oxígeno, es necesario hacer estas determinaciones. En la **Tabla 12** se muestran los valores de citotoxicidad y el índice de selectividad, según procedimientos descritos en la parte metodológica, para los compuestos de mayor actividad tripanosomicida.

De la **Tabla 12** se puede observar que la mayor parte de las moléculas mostraron ser menos tóxicas en células de mamíferos que en tripanosoma. Por ello, cabe resaltar que el compuesto **33a** mostró un índice de selectividad cercano a 16 y su análogo estructural clorado **33c** duplico este valor a 32; mientras que el valor para nifurtimox es alrededor de 20. Del análisis estructural de **33c**, se pudiera pensar que el grupo hexilo en la posición *para* de la porción fenilamino y el átomo de cloro en C-3 son responsables de este efecto. El compuesto **41a**, presentó un bajo índice de selectividad en comparación con nifurtimox, lo cual reduce la oportunidad de que estas estructuras sean consideradas en futuros estudios terapéuticos.

Con estos antecedentes es posible plantear que un nuevo modelo de sustitución a considerar para el desarrollo de nuevos agentes tripanosomicidas más efectivos y seguros sería el que se expone para el siguiente grupo de derivados de 2-aminonaftoquinonas.

2.2.2. Actividad tripanosomicida de derivados de 2-aminonaftoquinonas (Serie II)

Considerando el efecto tripanosomicida y selectividad de los compuestos usados como referencia para la síntesis de los compuestos de la serie anterior (**Figura 45**, página 247), así como los resultados de estos mismo, se volvió a rediseñar nuevos derivados de 2-fenilaminoquinonas (**Figura 49**), las cuales recogen todos los aspectos estructurales que pudieran estar relacionados con la actividad tripanosomicida y selectividad. En la **Figura 49** se muestran las modificaciones estudiadas previamente sobre el núcleo 2-aminonaftoquinona, que sirvió de patrón para las nuevas estructuras **33e**, **37a-d**, **41b-g**, **45** y **46a-b**. Es por ello, que ahora el número de compuestos a sintetizar es mucho mayor que la serie anterior, debido a que son más las variables que se quieren considerar.

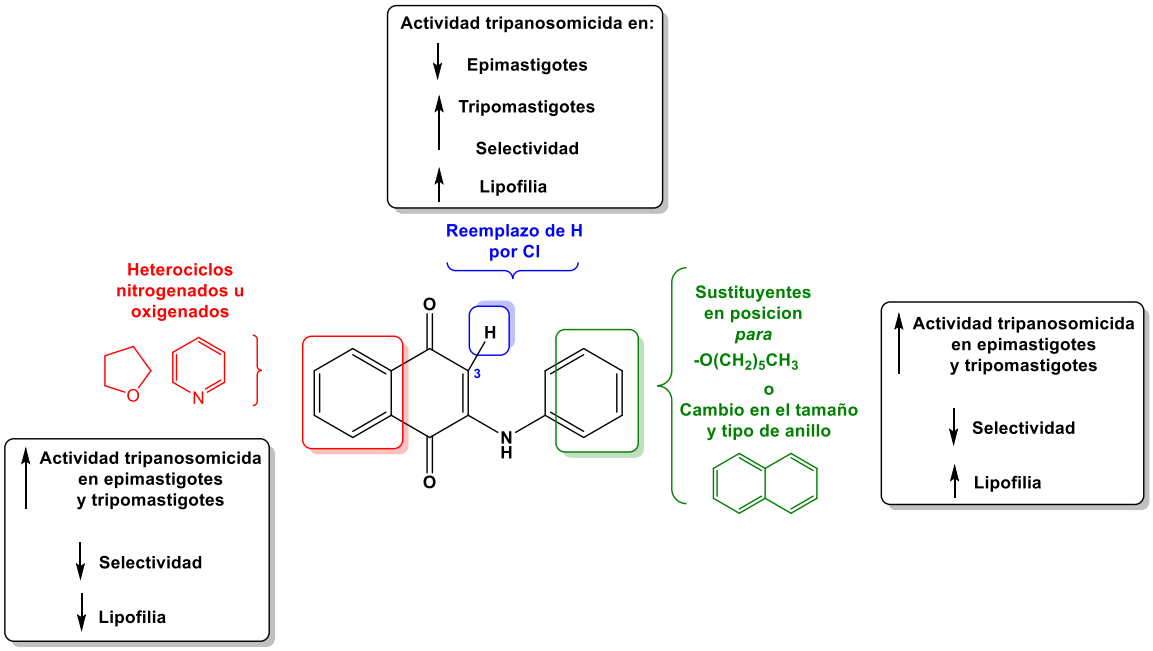
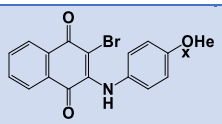
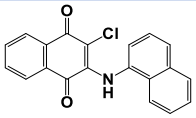
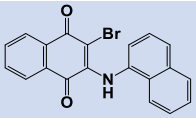
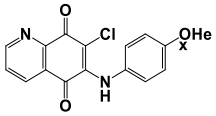
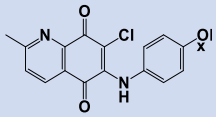
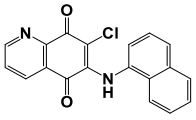
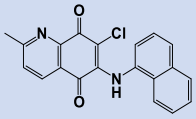
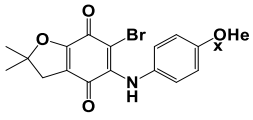
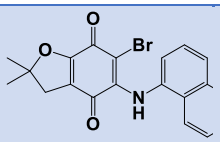


Figura 49. Modificaciones estructurales de derivados de 2-aminonaftoquinonas utilizadas como patrón para los compuestos **33e**, **37a-d**, **41b-g**, **45** y **46a-b**.

Al ser estos compuestos los últimos sintetizados, se obtienen preliminarmente algunos resultados que se indica en la **Tabla 14**, pero que, sin embargo, ayudan a validar algunas modificaciones y combinaciones de ellas propuestas en las estructuras sintéticas diseñadas a partir de la figura anterior.

Tabla 14. Efecto sobre el crecimiento del parásito en cultivo de *T. cruzi*, debido a la acción de las quinonas de la serie II.

	Compuestos	IC_{50} (μM) epimastigote	IC_{50} (μM) tripomastigotes	IC_{50} (μM) RAW 264,7	IS[a]
33e		n.d.	85,74 ± 7,50	15,75 ± 0,49	0,18
37a		>100	n.d.	n.d.	n.d.
37b		>100	n.d.	n.d.	n.d.
41b		n.d.	0,349 ± 0,089	29,19 ± 2,19	84
41c		n.d.	>100	n.d.	n.d.
41d		>100	n.d.	n.d.	n.d.
41e		>100	n.d.	n.d.	n.d.
45		n.d.	>100	n.d.	n.d.

46a		>100	n.d.	n.d.	n.d.
	Nifurtimox	n.d.	16,19 ± 0,22	266,0	16
	Benznidzol	n.d.	103,6 ± 0,60	121,0	1,2

n.d.: no determinado. [a] IS: índice de selectividad, expresado como la razón de IC_{50} en células RAW 264,7 sobre IC_{50} en tripomastigotes.

Los datos que se muestran en la **Tabla 14** fueron obtenidos gracias a la colaboración del Dr. Claudio Olea. Dentro de los resultados más interesantes de considerar que se muestran en la **Tabla 14**, se puede observar que cuatro de estos compuestos fueron directamente ensayados en la forma tripomastigote, a modo de obtener rápidamente una idea del efecto tripanosomicida de mayor relevancia farmacológica. De igual forma permitió hacer una rápida interpretación de las modificaciones propuestas y de cierta forma validar algunas hipótesis planteadas a partir de los compuestos **33a-d** y **41a**. Se destaca particularmente el compuesto **41b**, el cual fue muy potente contra la forma tripomastigote con un IC_{50} = 0,35 μM, valor nunca antes reportado por nuestro grupo en la forma infectiva y que además presentaba una notoria selectividad en comparación con células RAW 264,7, siendo más de cinco veces más selectivo que nifurtimox y 70 veces más que benznidazol. Estos resultados, nos indican que la combinación de las modificaciones del esqueleto 2-fenilaminonaftoquinonas conformadas por: i) reemplazo del anillo bencénico por piridina (no 2-metilpiridina); ii) sustitución del H por Cl en C-3 (no así Br) y iii) la presencia de una cadena lipofílica en posición *para* de la porción 2-fenilamino, son características farmacofóricas preliminares importantes para el desarrollo de nuevos agentes antichagásicos más potentes y selectivos. La **Figura 50** resume, de igual forma el comportamiento de estas modificaciones en la actividad biológica estudiada y considera los análogos de **41b** y mostrados en la **Tabla 14**.

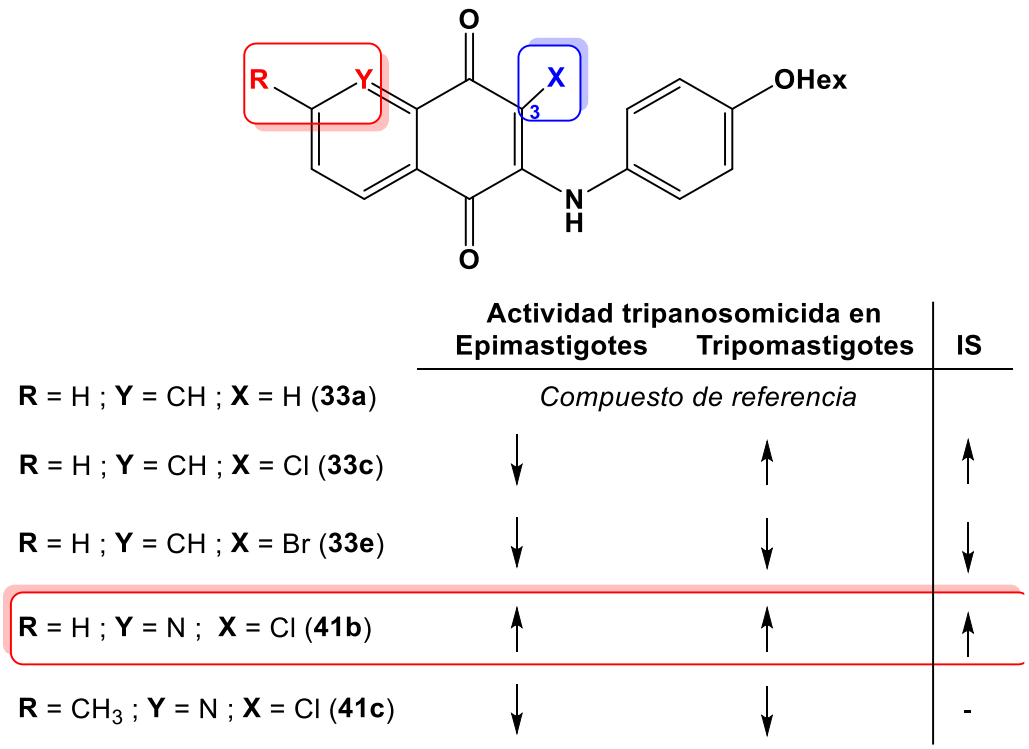


Figura 50. Resumen del efecto tripanosomicida y selectividad generado por los derivados de 2-aminonaftoquinonas estudiados.

Finalmente, a partir de los resultados de la **Tabla 14**, además se puede indicar que aquellas modificaciones que incluyeron el reemplazo de la porción fenilamino por naftilamino (compuestos **37a-b, 41d-e** y **46a**), disminuyo significativamente el efecto tripanosomicida en la forma epimastigote (IC_{50} > 100 μM) y por ello, no fue necesario realizar ensayos sobre la forma tripomastigote o RAW. Este efecto pudiera eventualmente deberse a la sustitución del hidrógeno por el halógeno en C-3, debido a que los derivados no halogenados reportados previamente por Salas y cols., indicaban que esta sustitución con anillos fusionados incrementaba el efecto tripanosomicida, aunque con una baja selectividad.(*53*) Estudios computacionales

que ayuden a entender estas diferencias se están llevando a cabo a modo de dar una respuesta un poco más consistente.

4. CONCLUSIONES

Del trabajo realizado en esta tesis, tanto de la parte I como de la parte II, es posible llegar a las siguientes conclusiones:

Se diseñaron y sintetizaron diez nuevos análogos de L-Butionina Sulfoximina (L-BSO) y 3 isósteros heterocíclicos, los que fueron caracterizados por las técnicas espectroscópicas y espectrometricas correspondientes. Los resultados preliminares de los ensayos biológicos indican que algunos análogos e isóteros de L-BSO tuvieron un comportamiento bastante similar en lo que se refiere a la disminución en los niveles de GSH y $T(SH)_2$, pero observados a una concentración mucho menor. Los compuestos **6b** y **20a** fueron lo que presentaron los mejores resultados, sobre todo a lo que se refiere a la disminución de $T(SH)_2$, en el estado epimastigote de *T. cruzi*.

Debido al pequeño número de compuestos ensayados, no es posible establecer claramente una relación estructura –actividad para los análogos de L-BSO estudiados. Sin embargo, se destaca que el incremento en el largo de la cadena alquílica de la porción adyacente a la sulfoximina (**6b**), o que el reemplazo de la porción zwitteriónica por un anillo nitrogenado, fueron factores que son claves para mejorar la actividad inhibitoria en la biosíntesis de $T(SH)_2$ de análogos de L-BSO.

Por otro lado, basados en información estructural previa, en esta tesis, se diseñaron y sintetizaron 19 nuevos derivados de quinonas, los cuales fueron caracterizados por las técnicas espectroscópicas y espectrometricas respectivas y agrupadas en dos series.

De las quinonas de la Serie I, el compuesto **33c** presentó un significativo efecto tripanosomicida en la forma epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*, así como una alta selectividad en su citotoxicidad en modelos de células VERO (SI = 32), al ser comparado con nifurtimox.

Para la Serie II, fue el compuesto **41b** el que presentó una mejor actividad frente a *T. cruzi* en el estado tripomastigote. Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad en células RAW, siendo este compuesto el que presentó la mayor selectividad, en función del valor observado (SI = 84). Siendo este el mejor resultado de esta tesis.

Al realizar un análisis preliminar de estructura-actividad de las quinonas estudiadas, se observa que el reemplazo de un anillo de piridina por un anillo bencénico y la presencia de un átomo de cloro en la posición 3 del esqueleto de naftoquinona, así como la incorporación de un grupo hexiloxi en la posición 4 de la porción ariloxi, fueron modificaciones claves para lograr un compuesto de mayor potencia hacia la forma infectiva del parásito (tripomastigote) y aumentar la selectividad del compuesto.

Por último, en base a los ensayos realizados y los resultados obtenidos, se puede decir que se lograron preparar distintos compuestos con un marcado efecto en *T. cruzi*, ya sea afectando la biosíntesis de $T(SH)_2$ o con actividad tripanosomicida por sí mismo. Futuros estudios, pudieran ser orientados en realizar ensayos de complementación entre estos análogos de L-BSO y los fármacos de referencia o las quinonas más promisorias reportadas en esta tesis.

BIBLIOGRAFIA

1. P. J. Hotez, D. H. Molyneux, A. Fenwick, J. Kumaresan, S. E. Sachs, J. D. Sachs, L. Savioli, Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine* **357**, 1018-1027 (2007).
2. C. D. Mathers, M. Ezzati, A. D. Lopez, Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Negl Trop Dis* **1**, e114 (2007).
3. Á. Moncayo, A. C. Silveira, Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**, 17-30 (2009).
4. C. Chagas, Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1**, 159-218 (1909).
5. A. C. Aufderheide, W. Salo, M. Madden, J. Streitz, J. Buikstra, F. Guhl, B. Arriaza, C. Renier, L. E. Wittmers, G. Fornaciari, A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2034-2039 (2004).
6. R. E. Bernstein, Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. *Journal of the Royal Society of Medicine* **77**, 608 (1984).
7. G. A. Schmunis, Z. E. Yadon, Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta tropica* **115**, 14-21 (2010).
8. A. Rassi, J. A. Marin-Neto, Chagas disease. *The Lancet* **375**, 1388-1402 (2010).
9. J. Muñoz, J. G. i Prat, M. Gállego, F. Gimeno, B. Treviño, P. López-Chejade, O. Ribera, L. Molina, S. Sanz, M. J. Pinazo, Clinical profile of Trypanosoma cruzi infection in a non-endemic setting: Immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta tropica* **111**, 51-55 (2009).
10. F. Florián Sanz, C. Gómez Navarro, N. Castrillo García, A. Pedrote Martínez, E. Lage Gallé, in *Anales de medicina interna*. (SciELO Espana, 2005), vol. 22, pp. 538-540.
11. G. A. Schmunis, Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **102**, 75-86 (2007).
12. A. Abras, M. Gallego, C. Munoz, N. A. Juiz, J. C. Ramirez, C. I. Cura, S. Tebar, A. Fernandez-Arevalo, M. J. Pinazo, L. de la Torre, E. Posada, F. Navarro, P. Espinal, C. Ballart, M. Portus, J. Gascon, A. G. Schijman, Identification of Trypanosoma cruzi Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). *Parasitology international* **66**, 83-88 (2017); published online EpubApr (10.1016/j.parint.2016.12.003).
13. W. Apt, I. Heitmann, L. Jercic, M. Isabel, L. Jofré, I. Noemí, V. San Martín, J. Sapunar, M. Torres, I. Zulantay, Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte I. Introducción y epidemiología. *Revista chilena de infectología* **25**, 189-193 (2008).
14. P. Jimenez, J. Jaimes, C. Poveda, J. D. Ramirez, A systematic review of the Trypanosoma cruzi genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*, 1-15 (2018); published online EpubSep 13 (10.1017/S0031182018001506).
15. A. Toso, F. Vial, N. Galanti, Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile* **139**, 258-266 (2011).
16. C. Bern, Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine* **364**, 2527-2534 (2011).

17. B. S. Hall, C. Bot, S. R. Wilkinson, Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 13088-13095 (2011).
18. A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata, A. F. Casini, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology* **66**, 1499-1503 (2003).
19. B. S. Hall, S. R. Wilkinson, Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 115-123 (2012).
20. L. Murcia, B. Carrilero, M. Segovia, M. NIETO, E. ESCUDERO, J. PARRA-RUIZ, C. VIDAILLAC, M. RYBAK, J. AZANZA, J. BARBERÁN, Limitations of currently available Chagas disease chemotherapy. *Revista española de quimioterapia* **25**, 10-16 (2012).
21. R. Viotti, B. A. de Noya, T. Araujo-Jorge, M. Grijalva, F. Guhl, M. López, J. Ramsey, I. Ribeiro, A. Schijman, S. Sosa-Estani, Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 635-639 (2014).
22. M.-J. Pinazo, G. Espinosa, M. Gállego, P. L. López-Chejade, J. A. Urbina, J. Gascón, Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **82**, 583-587 (2010).
23. I. Molina, J. Gómez i Prat, F. Salvador, B. Treviño, E. Sulleiro, N. Serre, D. Pou, S. Roure, J. Cabezos, L. Valerio, Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine* **370**, 1899-1908 (2014).
24. F. S. Buckner, J. A. Urbina, Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2**, 236-242 (2012).
25. Y. J. Seo, J. W. Lee, E. H. Lee, H. K. Lee, H. W. Kim, Y.-H. Kim, Role of glutathione in the adaptive tolerance to H 2 O 2. *Free Radical Biology and Medicine* **37**, 1272-1281 (2004).
26. A. P. Fernandes, A. Holmgren, Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants and Redox Signaling* **6**, 63-74 (2004).
27. R. L. Krauth-Siegel, M. A. Comini, Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1780**, 1236-1248 (2008).
28. M. A. Comini, N. Dirdjaja, M. Kaschel, R. L. Krauth-Siegel, Preparative enzymatic synthesis of trypanothione and trypanothione analogues. *International journal for parasitology* **39**, 1059-1062 (2009).
29. D. M. Krzywanski, D. A. Dickinson, K. E. Iles, A. F. Wigley, C. C. Franklin, R.-M. Liu, T. J. Kavanagh, H. J. Forman, Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress. *Archives of biochemistry and biophysics* **423**, 116-125 (2004).
30. D. Toroser, C. S. Yarian, W. C. Orr, R. S. Sohal, Mechanisms of γ-glutamylcysteine ligase regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1760**, 233-244 (2006).
31. H. H. Bailey, L-S, R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chemico-biological interactions* **111**, 239-254 (1998).
32. F. Irigoín, L. Cibils, M. A. Comini, S. R. Wilkinson, L. Flohé, R. Radi, Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 733-742 (2008).

33. G. Maccari, T. Jaeger, F. Moraca, M. Biava, L. Flohé, M. Botta, A fast virtual screening approach to identify structurally diverse inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**, 5255-5258 (2011).
34. M. Paulino, F. Iribarne, M. Dubin, S. Aguilera-Morales, O. Tapia, A. Stoppani, The chemotherapy of Chagas' disease: an overview. *Mini reviews in medicinal chemistry* **5**, 499-519 (2005).
35. Y. Zhang, C. S. Bond, S. Bailey, M. L. Cunningham, A. H. Fairlamb, W. N. Hunter, The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen Trypanosoma cruzi at 2.3 Å resolution. *Protein science* **5**, 52-61 (1996).
36. U. Lücking, Sulfoximines: a neglected opportunity in medicinal chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 9399-9408 (2013).
37. L. Buglioni, V. Bizet, C. Bolm, Methionine and Buthionine Sulfoximines: Syntheses under Mild and Safe Imidation/Oxidation Conditions. *Advanced Synthesis & Catalysis* **356**, 2209-2213 (2014).
38. O. W. Griffith, M. E. Anderson, A. Meister, Inhibition of glutathione biosynthesis by prothionine sulfoximine (Sn-propyl homocysteine sulfoximine), a selective inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 1205-1210 (1979).
39. M. Faundez, L. Pino, P. Letelier, C. Ortiz, R. López, C. Seguel, J. Ferreira, M. Pavani, A. Morello, J. D. Maya, Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to Trypanosoma cruzi. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 126-130 (2005).
40. C. Vazquez, M. Mejia-Tlachi, Z. Gonzalez-Chavez, A. Silva, J. S. Rodriguez-Zavala, R. Moreno-Sanchez, E. Saavedra, Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in Trypanosoma cruzi. *FEBS letters* **591**, 3881-3894 (2017); published online EpubDec (10.1002/1873-3468.12904).
41. C. F. Lagos, R. Araya-Secchi, P. Thomas, T. Pérez-Acle, R. A. Tapia, C. O. Salas, Molecular modeling of Trypanosoma cruzi glutamate cysteine ligase and investigation of its interactions with glutathione. *Journal of molecular modeling* **18**, 2055-2064 (2012).
42. M. Harmata, A new sulfoximine synthesis. *Tetrahedron Letters* **30**, 437-440 (1989).
43. C. R. Johnson, E. U. Jonsson, C. C. Bacon, Preparation and reactions of sulfonimidoyl chlorides. *The Journal of Organic Chemistry* **44**, 2055-2061 (1979).
44. C. M. Hendriks, J. Reball, C. Bolm, Methyl 4-Pentafluorosulfanylphenyl Sulfoximines. *Synlett* **26**, 73-75 (2015).
45. N. A. Meanwell, Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *Journal of medicinal chemistry* **54**, 2529-2591 (2011).
46. I. Langmuir, ISOMORPHISM, ISOSTERISM AND COVALENCE. *Journal of the American Chemical Society* **41**, 1543-1559 (1919).
47. C. Thornber, Isosterism and molecular modification in drug design. *Chemical Society Reviews* **8**, 563-580 (1979).
48. N. Brown, Bioisosteres and scaffold hopping in medicinal chemistry. *Molecular Informatics* **33**, 458-462 (2014).
49. H. L. Friedman, Influence of isosteric replacements upon biological activity. *NAS-NRS Publication*, 295-358 (1951).
50. D. J. Carini, D. D. Christ, J. V. Duncia, M. E. Pierce, in *Integration of Pharmaceutical Discovery and Development*. (Springer, 1998), pp. 29-56.
51. E. M. Naylor, P. K. Chakravarty, C. A. Costello, R. S. Chang, T.-B. Chen, K. A. Faust, V. J. Lotti, S. D. Kivlighn, G. J. Zingaro, P. K. Siegl, Potent imidazole angiotensinII antagonists: acyl

sulfonamides and acyl sulfamides as tetrazole replacements. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **4**, 69-74 (1994).
52. A. C. Pierce, E. ter Haar, H. M. Binch, D. P. Kay, S. R. Patel, P. Li, CH⊙⊙⊙ O and CH⊙⊙⊙ N Hydrogen Bonds in Ligand Design: A Novel Quinazolin-4-ylthiazol-2-ylamine Protein Kinase Inhibitor. *Journal of medicinal chemistry* **48**, 1278-1281 (2005).
53. I. Sieveking, P. Thomas, J. C. Estévez, N. Quiñones, M. A. Cuéllar, J. Villena, C. Espinosa-Bustos, A. Fierro, R. A. Tapia, J. D. Maya, 2-Phenylaminonaphthoquinones and related compounds: Synthesis, trypanocidal and cytotoxic activities. *Bioorganic & medicinal chemistry* **22**, 4609-4620 (2014).
54. V. S. Londero, T. A. da Costa-Silva, K. S. Gomes, D. D. Ferreira, J. T. Mesquita, A. G. Tempone, M. C. M. Young, G. Jerz, J. H. G. Lago, Acetylenic fatty acids from Porcelia macrocarpa (Annonaceae) against trypomastigotes of Trypanosoma cruzi: Effect of octadec-9-ynoic acid in plasma membrane electric potential. *Bioorganic chemistry* **78**, 307-311 (2018); published online EpubAug (10.1016/j.bioorg.2018.03.025).
55. A. Ventura Pinto, S. Lisboa de Castro, The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules* **14**, 4570-4590 (2009).
56. C. Salas, R. A. Tapia, K. Ciudad, V. Armstrong, M. Orellana, U. Kemmerling, J. Ferreira, J. D. Maya, A. Morello, Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and α-and β-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorganic & medicinal chemistry* **16**, 668-674 (2008).
57. R. A. Tapia, C. Salas, A. Morello, J. D. Maya, A. Toro-Labbé, Synthesis of dihydronaphthofurandiones and dihydrofuroquinolinediones with trypanocidal activity and analysis of their stereoelectronic properties. *Bioorganic & medicinal chemistry* **12**, 2451-2458 (2004).
58. C. O Salas, M. Faúndez, A. Morello, J. Diego Maya, R. A Tapia, Natural and synthetic naphthoquinones active against Trypanosoma cruzi: an initial step towards new drugs for Chagas disease. *Current medicinal chemistry* **18**, 144-161 (2011).
59. D. Perrin, W. Armarego, D. Perrin, Purification of organic chemicals. *Purification of Laboratory Chemicals* **3**, 65 (1988).
60. T. Shiraiwa, K. Nakagawa, N. Kanemoto, T. Kinda, H. Yamamoto, Synthesis of optically active homocysteine from methionine and its use in preparing four stereoisomers of cystathionine. *Chemical and pharmaceutical bulletin* **50**, 1081-1085 (2002).
61. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
62. N. Tokutake, J. Hiratake, M. Katoh, T. Irie, H. Kato, J. i. Oda, Design, synthesis and evaluation of transition-state analogue inhibitors of Escherichia coli γ-glutamylcysteine synthetase. *Bioorganic & medicinal chemistry* **6**, 1935-1953 (1998).
63. D. Hamilton, J. H. Wu, G. Batist, Structure-based identification of novel human γ-glutamylcysteine synthetase inhibitors. *Molecular pharmacology* **71**, 1140-1147 (2007).
64. M. Faúndez, R. López-Munoz, G. Torres, A. Morello, J. Ferreira, U. Kemmerling, M. Orellana, J. D. Maya, Buthionine sulfoximine has anti-Trypanosoma cruzi activity in a murine model of acute Chagas' disease and enhances the efficacy of nifurtimox. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**, 1837-1839 (2008).
65. K. Koerber-Plé, G. Massiot, Jui-Aug 1995 Total Synthesis of Nosiheptide. Synthesis of Thiazole Fragments. (1995).
66. B. Movassagh, P. Shaygan, Michael addition of thiols to α, β-unsaturated carbonyl compounds under solvent-free conditions. *Arkivoc* **12**, 130-137 (2006).

67. A. Kamimura, N. Murakami, F. Kawahara, K. Yokota, Y. Omata, K. Matsuura, Y. Oishi, R. Morita, H. Mitsudera, H. Suzukawa, On the regioselectivity for the Michael addition of thiols to unsymmetrical fumaric derivatives. *Tetrahedron* **59**, 9537-9546 (2003).
68. W. Guo, G. Lv, J. Chen, W. Gao, J. Ding, H. Wu, Rongalite® and base-promoted cleavage of disulfides and subsequent Michael addition to α, β-unsaturated ketones/esters: an odorless synthesis of β-sulfido carbonyl compounds. *Tetrahedron* **66**, 2297-2300 (2010).
69. R. A. Tapia, Aductos de Michael de hidroxiquinonas biciclicas. Obtención y aplicación en síntesis de quinonas carbo- y heterocíclicas. *Pontificia Universidad Católica de Chile* **Tesis para optar al grado de Doctor en Química.**, (1981).
70. J. C. Namyslo, C. Stanitzek, A palladium-catalyzed synthesis of isoalliin, the main cysteine sulfoxide in onions (Allium cepa). *Synthesis*, 3367-3369 (2006).
71. M. C. Aversa, P. Bonaccorsi, C. Faggi, G. Lamanna, S. Menichetti, Enantiopure arenesulfenic acids as intermediates in stereoselective synthesis. *Tetrahedron* **61**, 11902-11909 (2005).
72. A. L. Schwan, M. J. Verdu, S. P. Singh, J. S. O'Donnell, A. N. Ahmadi, Diastereoselective alkylations of a protected cysteinesulfenate. *The Journal of organic chemistry* **74**, 6851-6854 (2009).
73. L. Harris, S. P. Mee, R. H. Furneaux, G. J. Gainsford, A. Luxenburger, Alkyl 4-chlorobenzoyloxycarbamates as highly effective nitrogen source reagents for the base-free, intermolecular aminohydroxylation reaction. *The Journal of organic chemistry* **76**, 358-372 (2010).
74. J. R. Mendiola, J. A.; Mateos, C.; Soriano J. F.; de Frutos, O.; Niemeier, J. K.; Davis E. M., Preparation, Use, and Safety of O-Mesitylenesulfonylhydroxylamine. *Organic Process Research & Development* **13**, 263-267 (2009).
75. R. Sudini, H. Wei, Cesium Carbonate as an Efficient Base for Alkylation of 3-(1H-Imidazol-4-yl) pyridine. *Synthetic Communications* **40**, 81-86 (2009).
76. R. A. Tapia, Y. Prieto, F. Pautet, M. Domard, M. E. Sarciron, N. Walchshofer, H. Fillion, Synthesis and antileishmanial activity of indoloquinones containing a fused benzothiazole ring. *European Journal of Organic Chemistry* **2002**, 4005-4010 (2002).
77. G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1, 3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Medicinal Research Reviews* **28**, 278-308 (2008).
78. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, A stepwise huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie* **114**, 2708-2711 (2002).
79. H.-X. Jin, H.-H. Liu, Q. Zhang, Y. Wu, On the susceptibility of organic peroxy bonds to hydride reduction. *The Journal of organic chemistry* **70**, 4240-4247 (2005).
80. B. Manta, M. Comini, A. Medeiros, M. Hugo, M. Trujillo, R. Radi, Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1830**, 3199-3216 (2013).
81. G. Bartoli, M. Bosco, E. Marcantoni, M. Petrini, L. Sambri, E. Torregiani, Conjugate Addition of Amines to α, β-Enones Promoted by CeCl3⊙ 7H2O-NaI System Supported in Silica Gel. *The Journal of organic chemistry* **66**, 9052-9055 (2001).
82. G. Bartoli, E. Marcantoni, M. Marcolini, L. Sambri, Applications of CeCl3 as an environmental friendly promoter in organic chemistry. *Chemical reviews* **110**, 6104-6143 (2010).

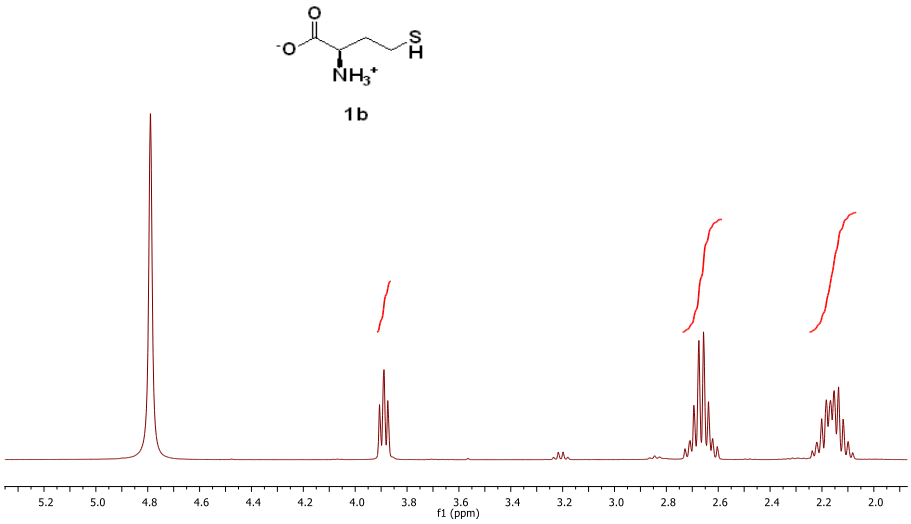
83. K. Yoshida, M. Ishiguro, H. Honda, M. Yamamoto, Y. Kubo, Regioselective 6-amination and 6-arylation of 5, 8-quinolinedione promoted by metal ions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **61**, 4335-4340 (1988).
84. C. O. SALAS SANCHEZ, ESTUDIO DE SINTESIS DE QUINONAS HETEROCICLICAS DERIVADAS DE BENZOFURANOQUINONAS: OBTENCION DE DERIVADOS DE RHINACANTONA. APLICACION DE NUEVOS PARAMETROS EN RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD. (2005).
85. K. Vázquez, C. Espinosa-Bustos, J. Soto-Delgado, R. A. Tapia, J. Varela, E. Birriel, R. Segura, J. Pizarro, H. Cerecetto, M. González, New aryloxy-quinone derivatives as potential anti-Chagasic agents: synthesis, trypanosomicidal activity, electrochemical properties, pharmacophore elucidation and 3D-QSAR analysis. *RSC Advances* **5**, 65153-65166 (2015).

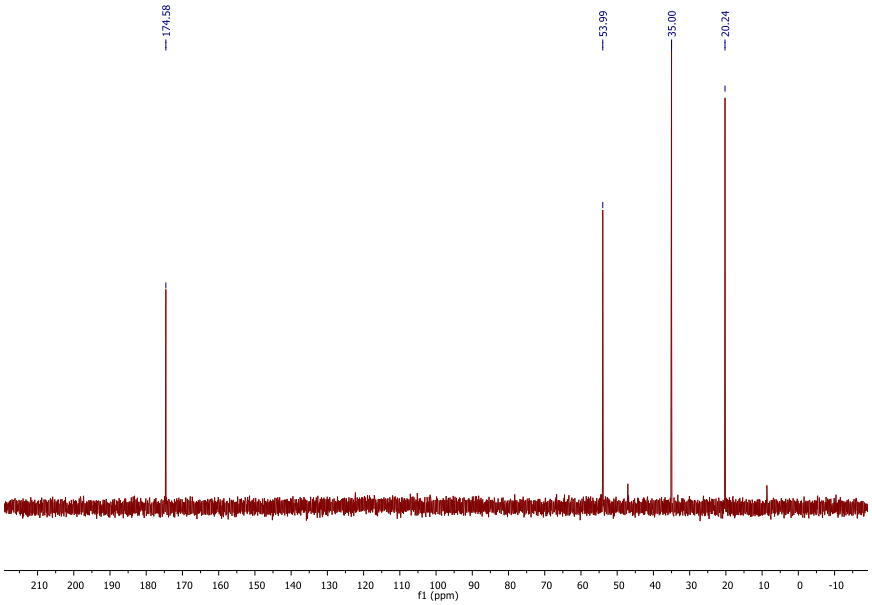
ANEXO

Espectros de resonancia magnética nuclear de ^{1}H y ^{13}C de los compuestos sintetizados.

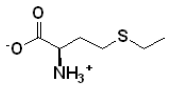
- Análogos e Isósteros de L-BSO.

RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **1b**.

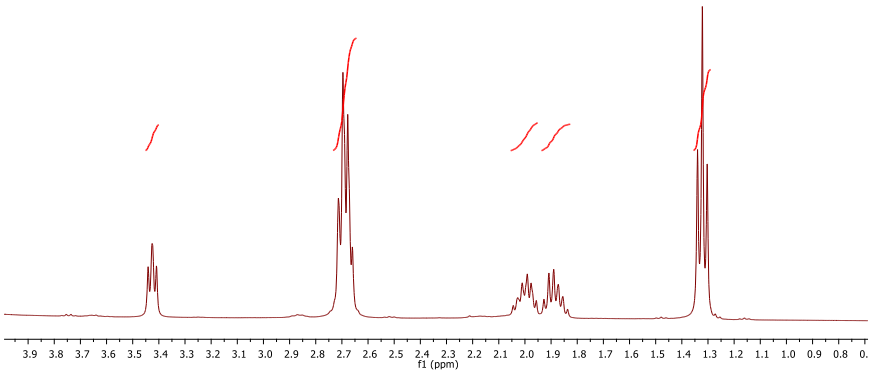


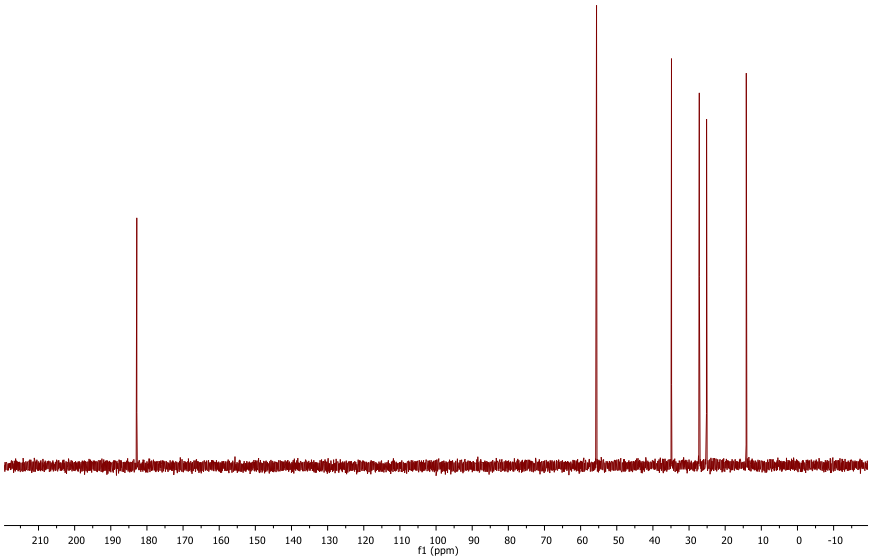


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **3c**.

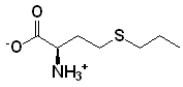


3c

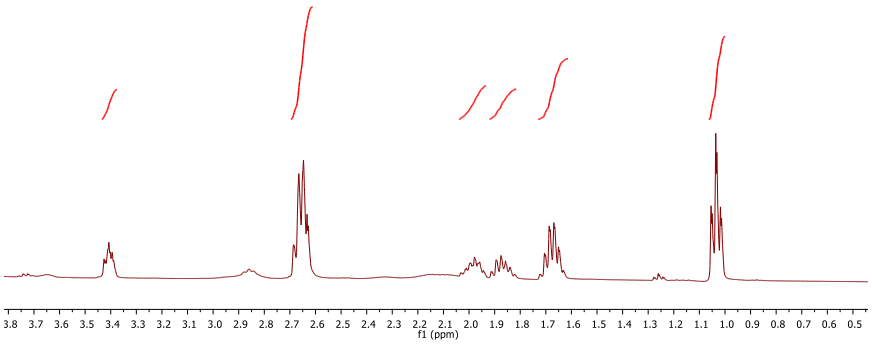


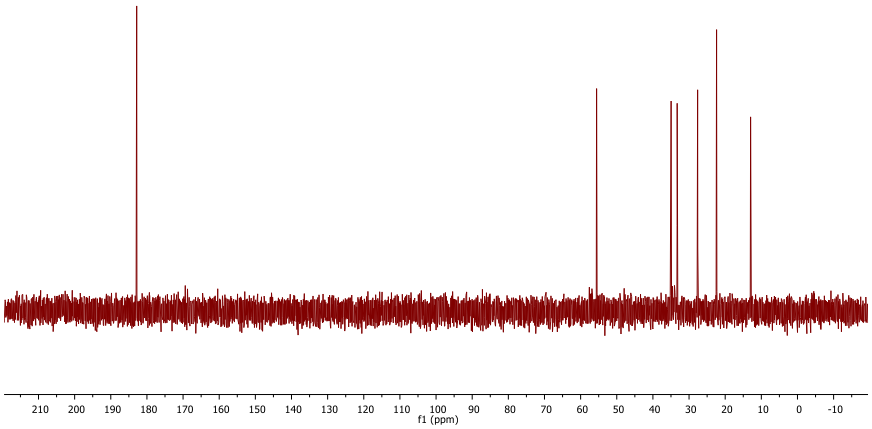


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **3d**.

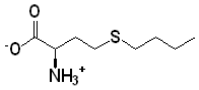


3d

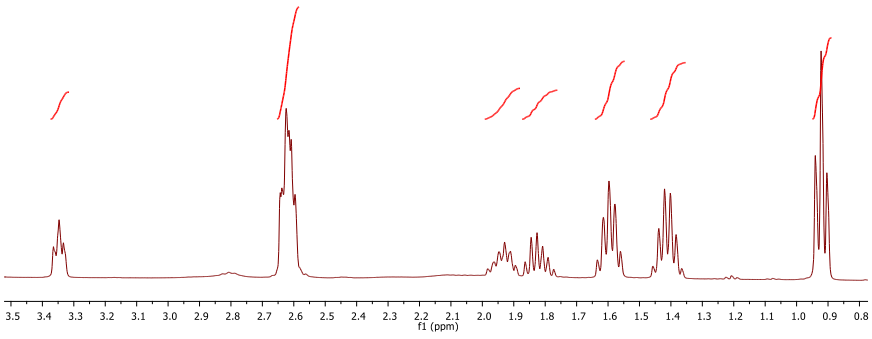


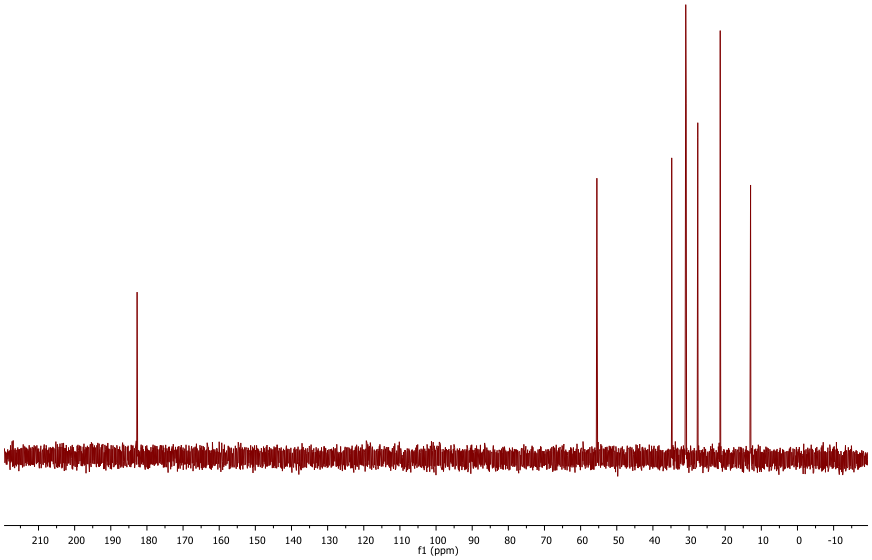


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **3e**.

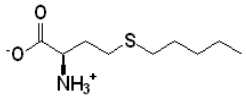


3e

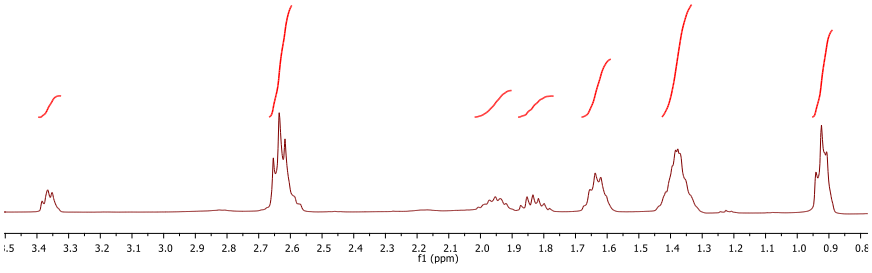


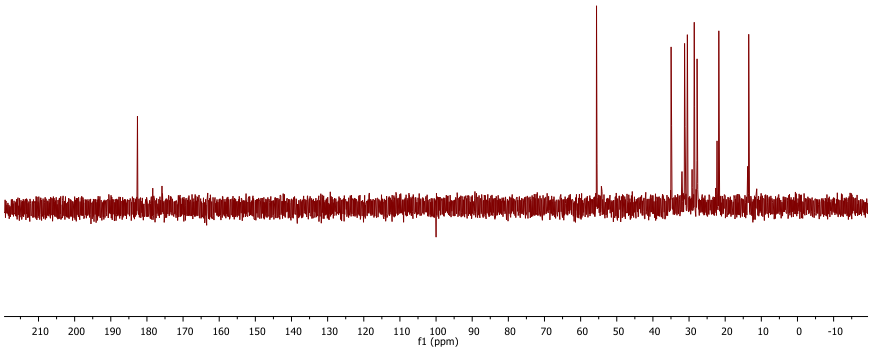


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **3f**.

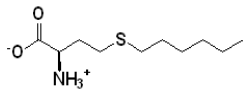


3f

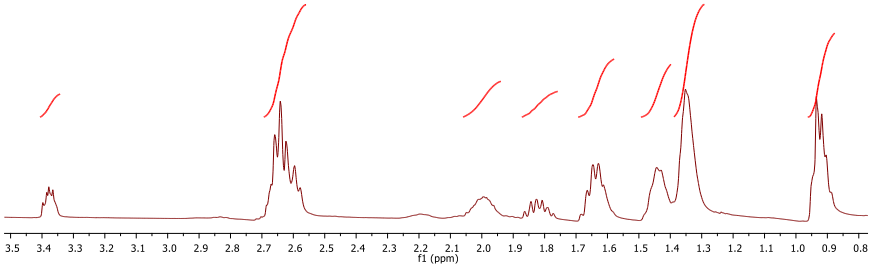


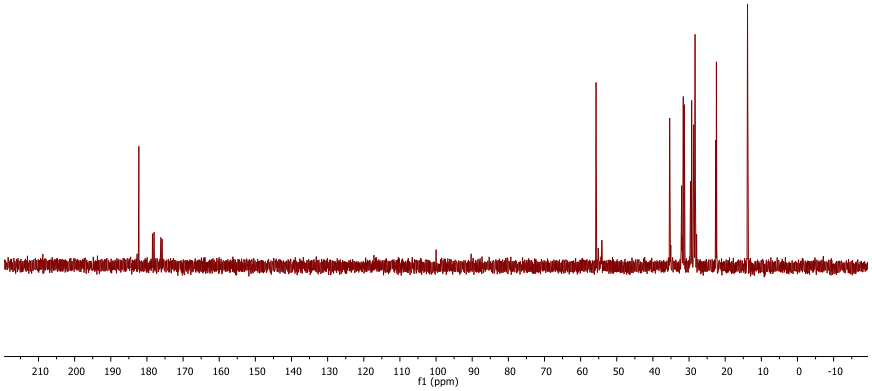


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **3g**.

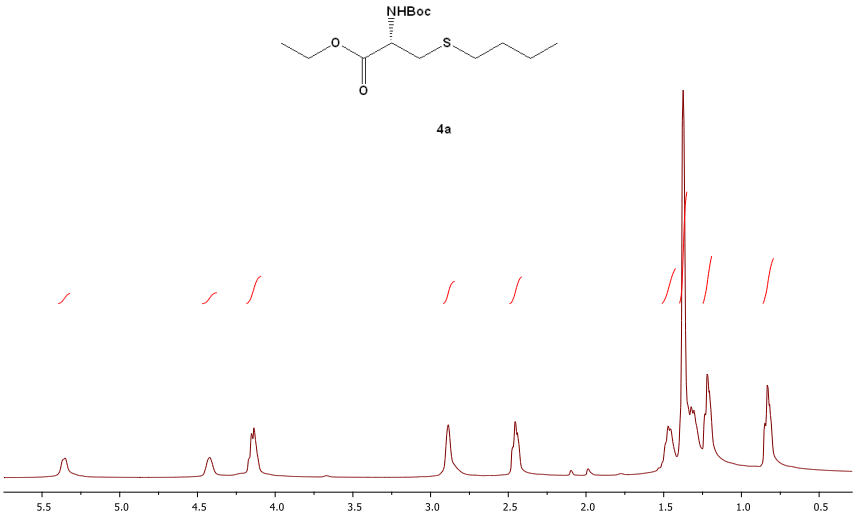


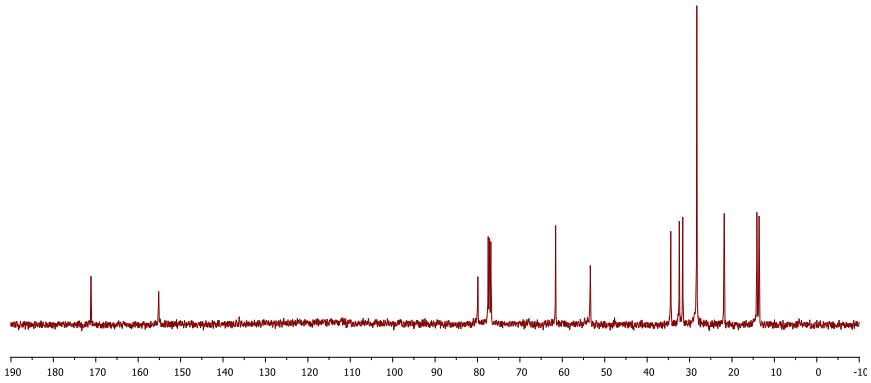
3g



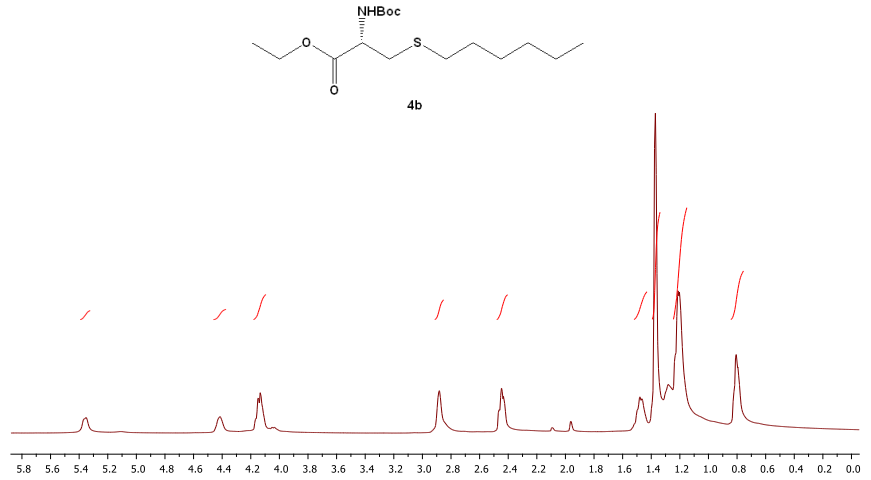


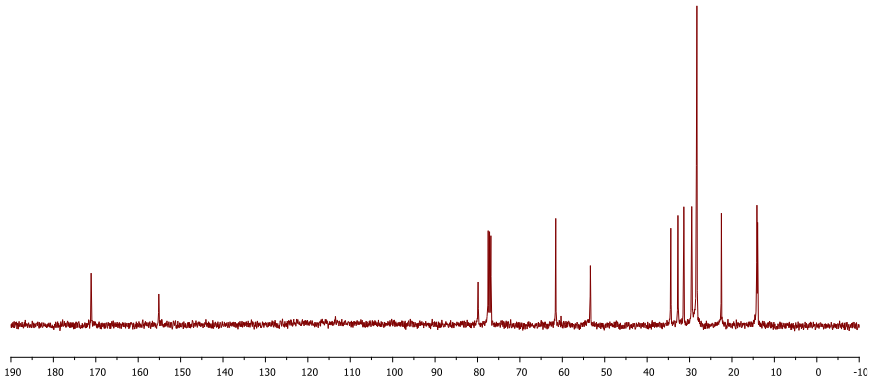
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4a**.



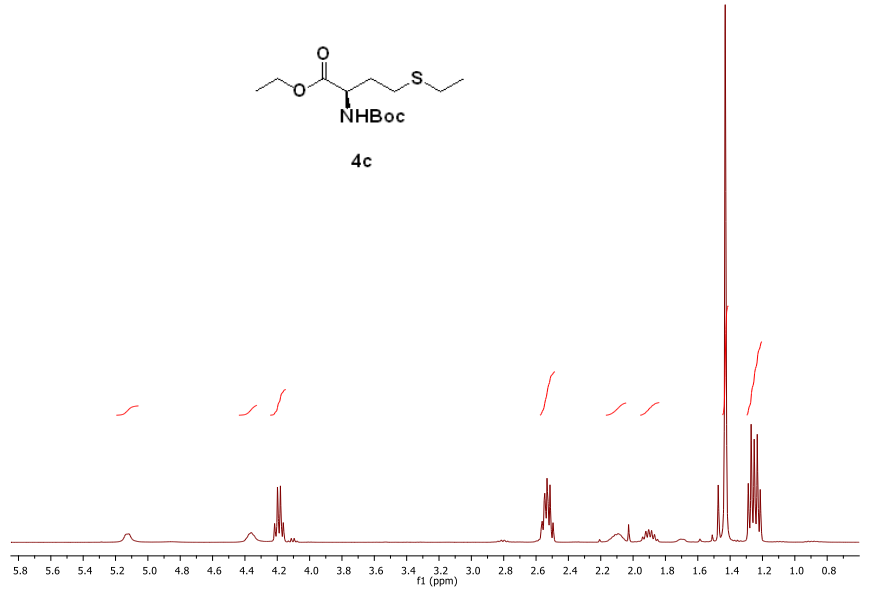


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4b**.

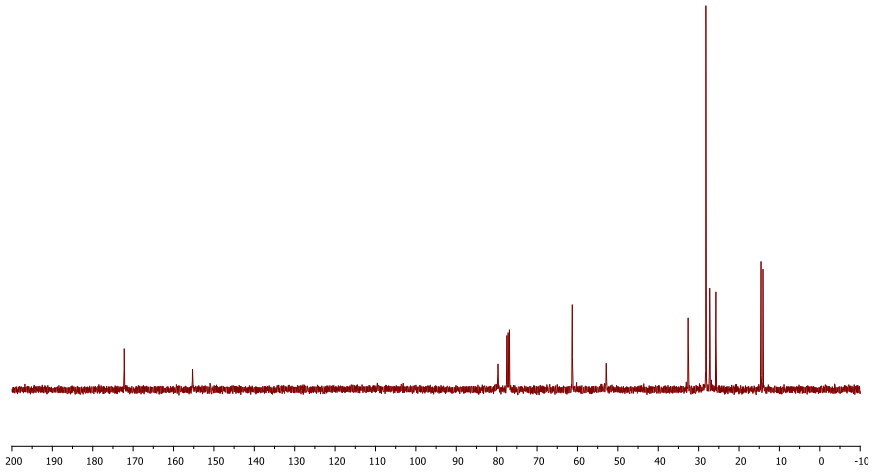




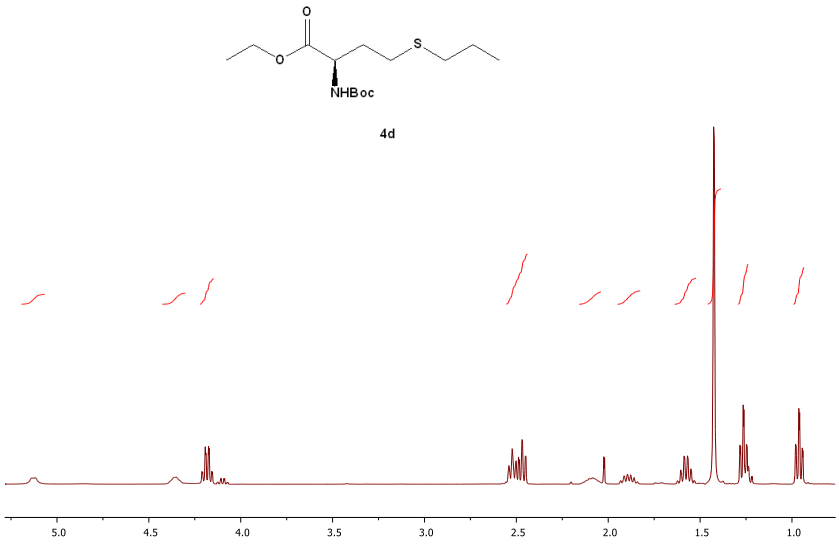
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4c**.

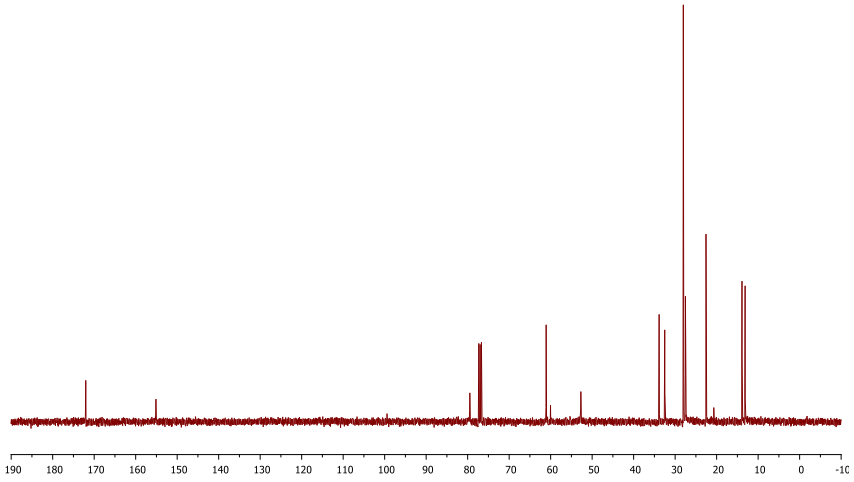


4c

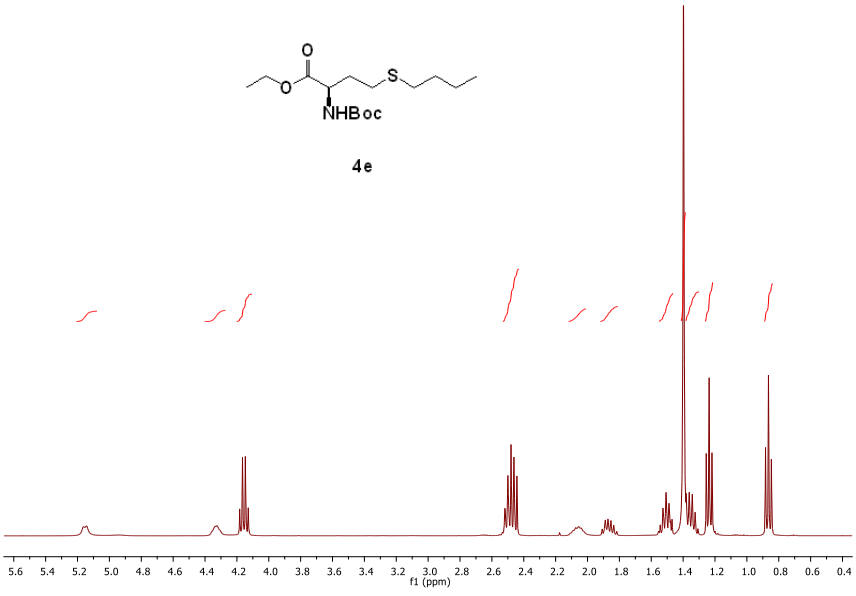


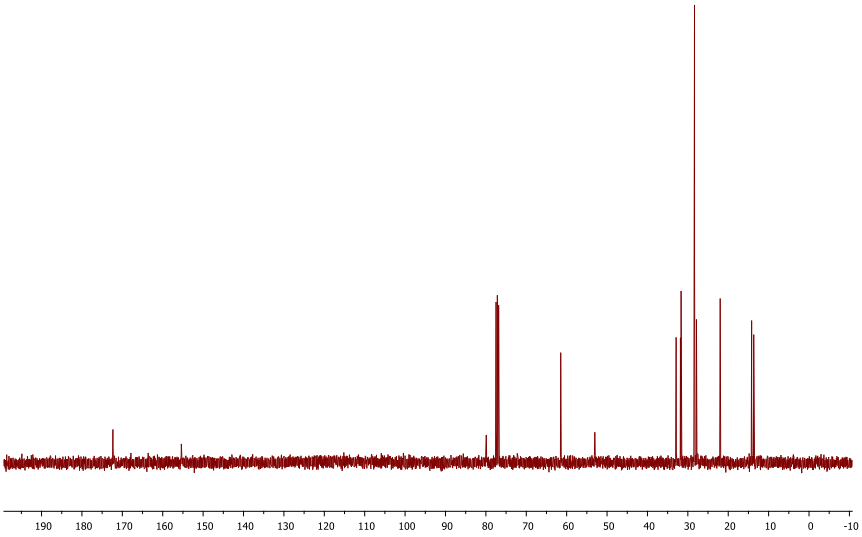
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4d**.



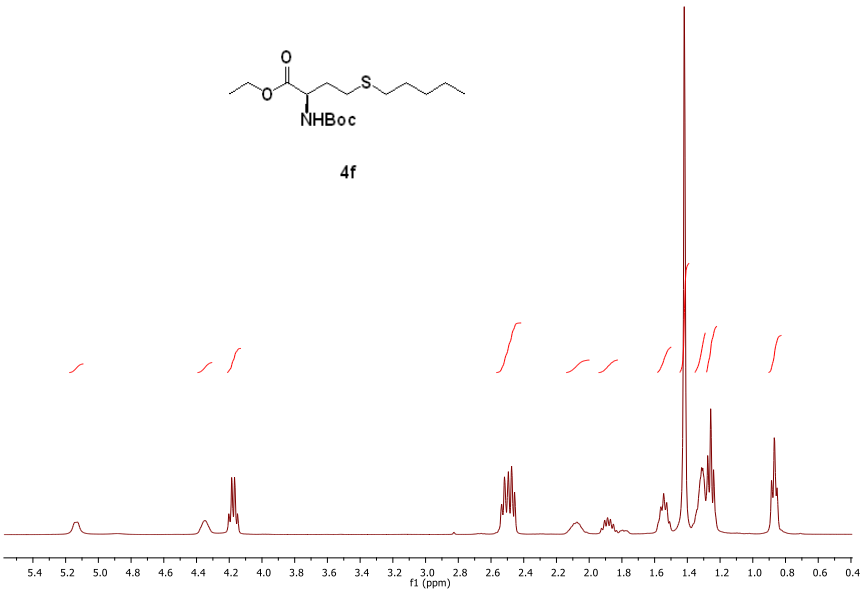


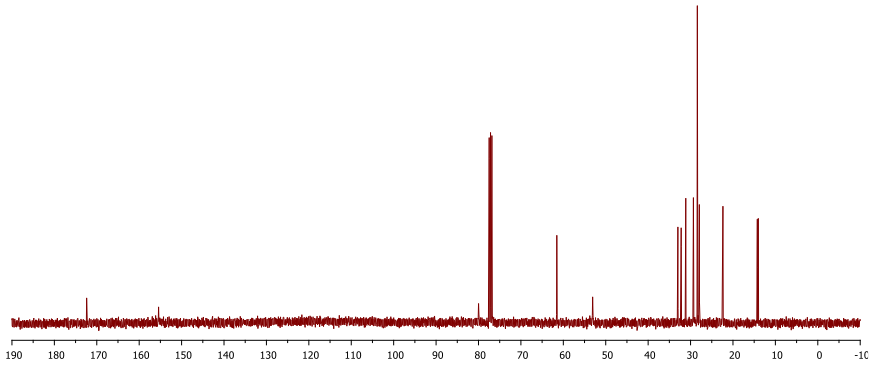
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4e**.



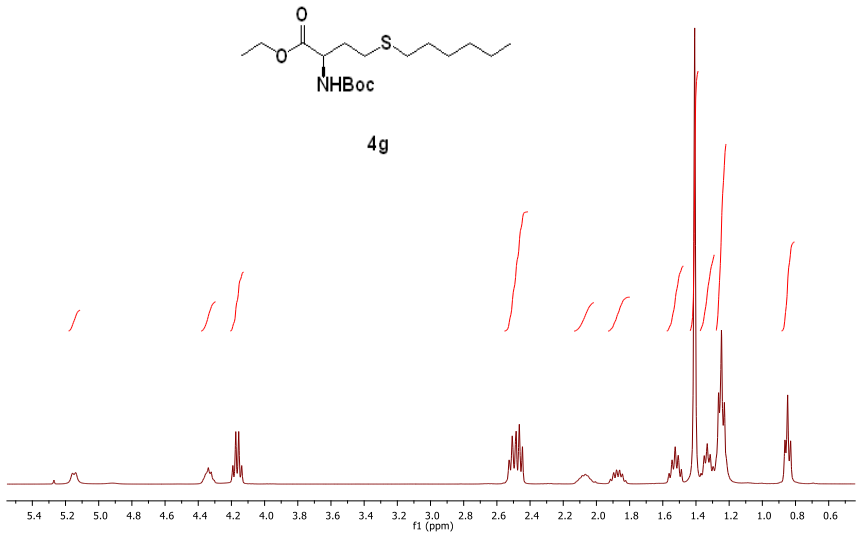


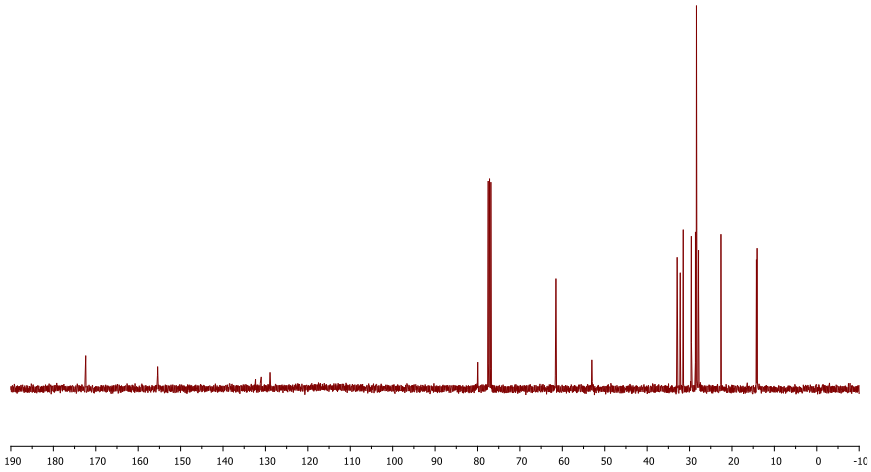
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4f**.



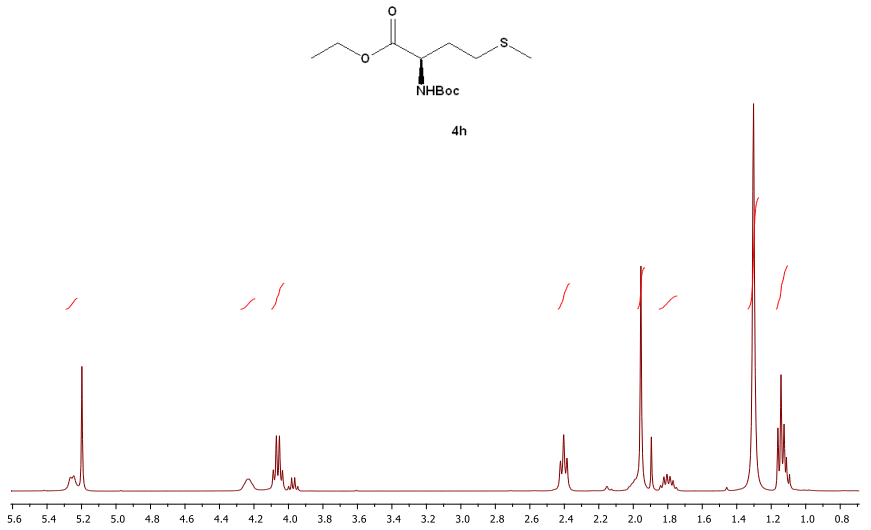


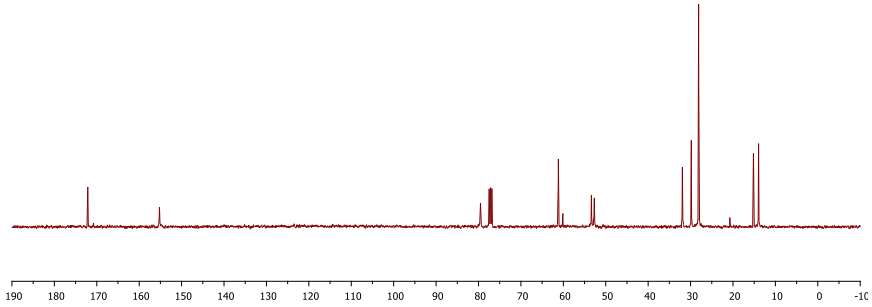
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4g**.



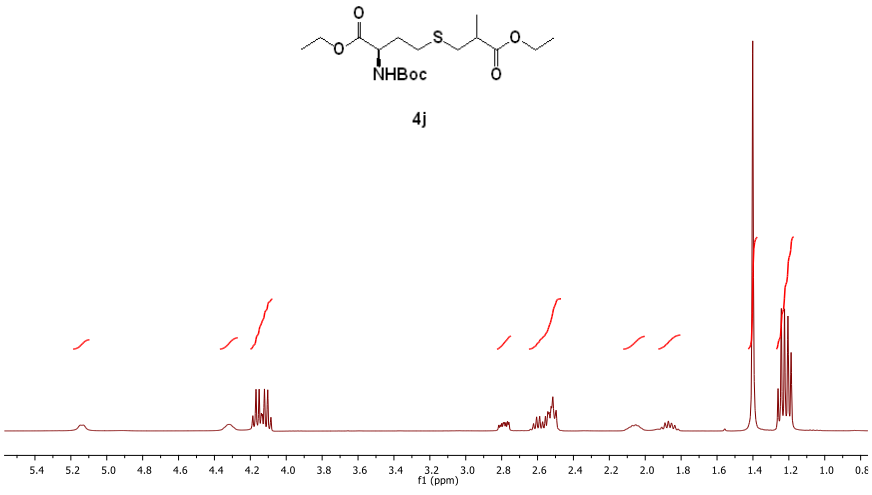


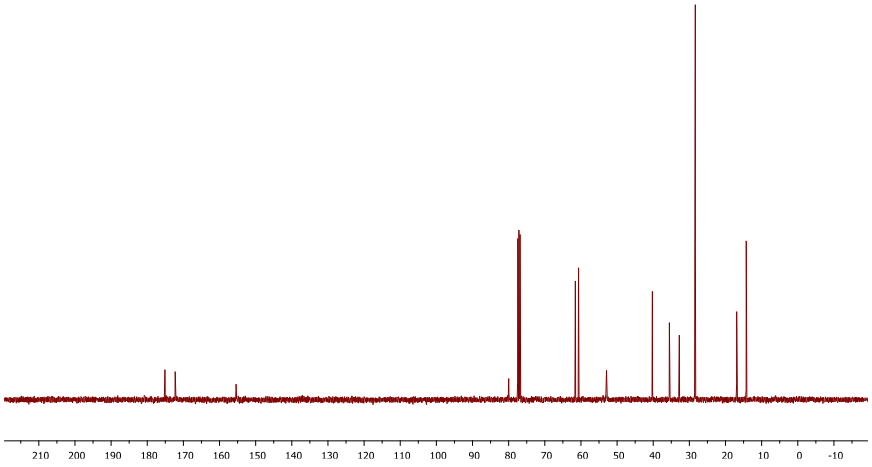
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4h**.



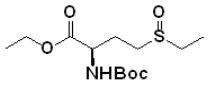


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4j**.

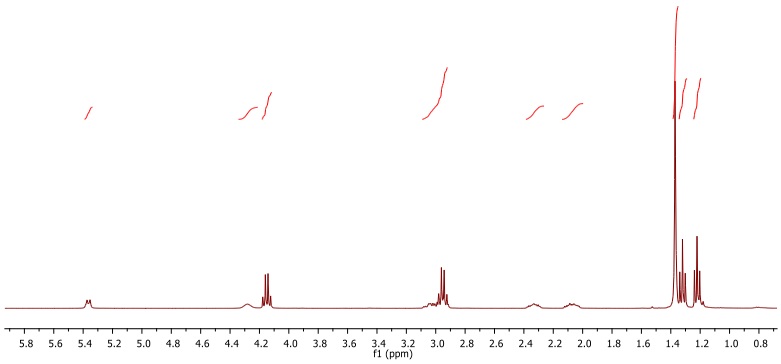


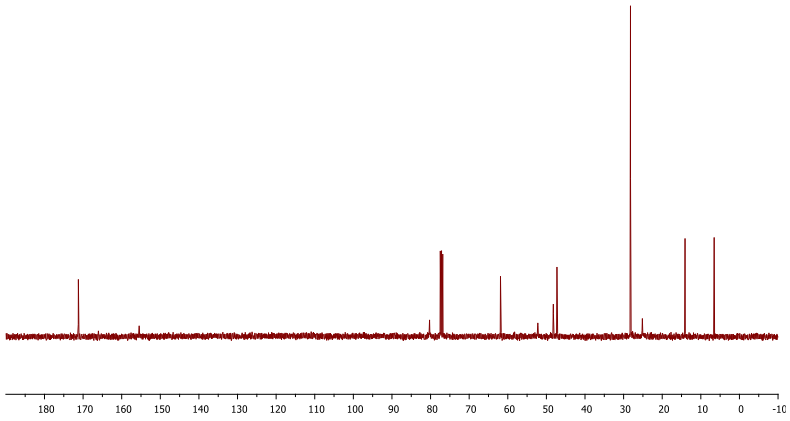


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5ca**.

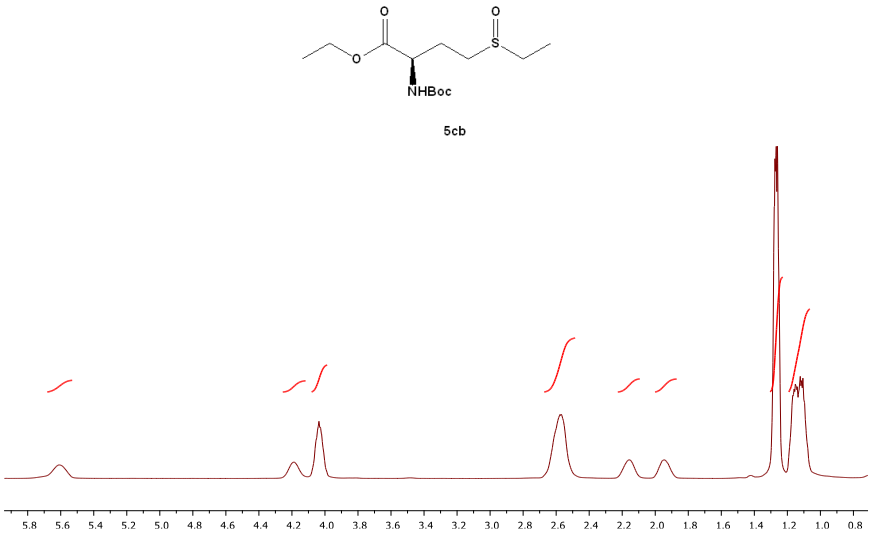


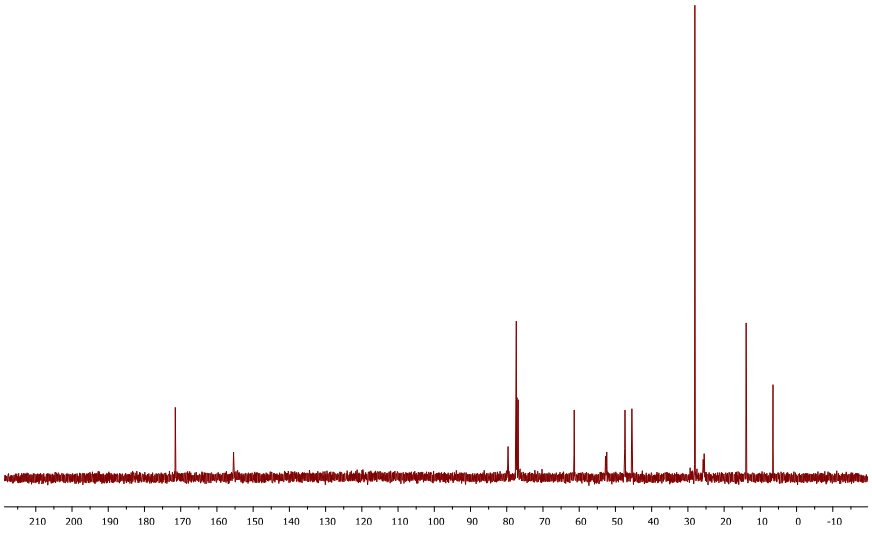
5ca



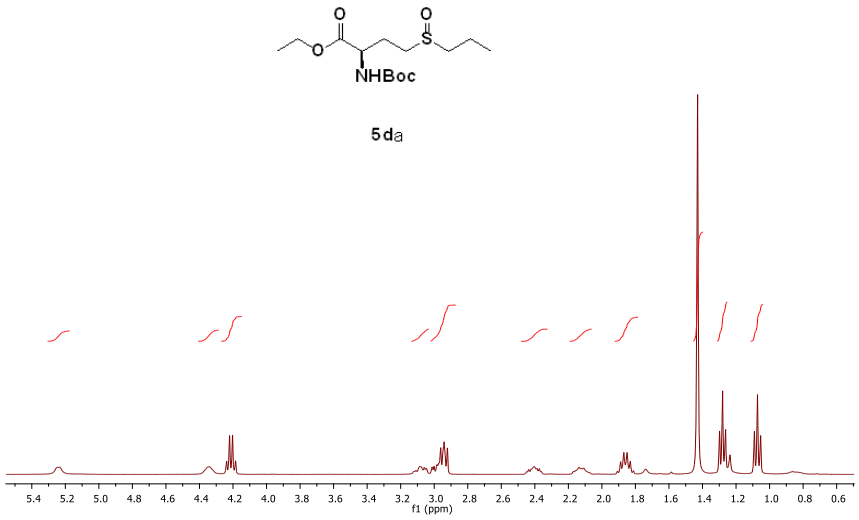


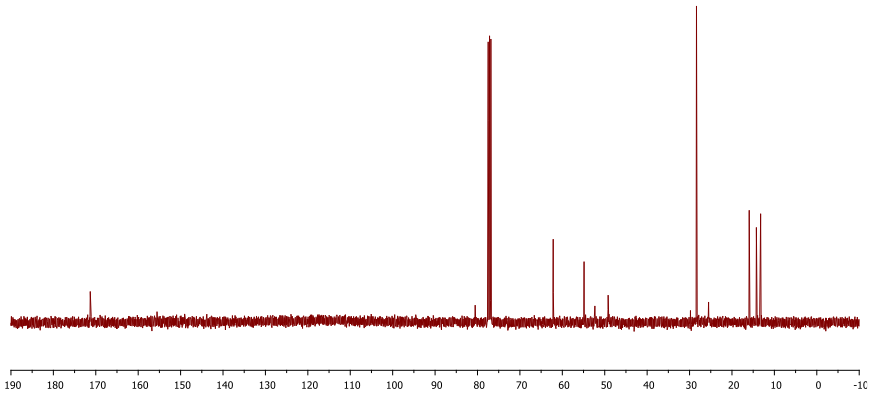
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5cb**.



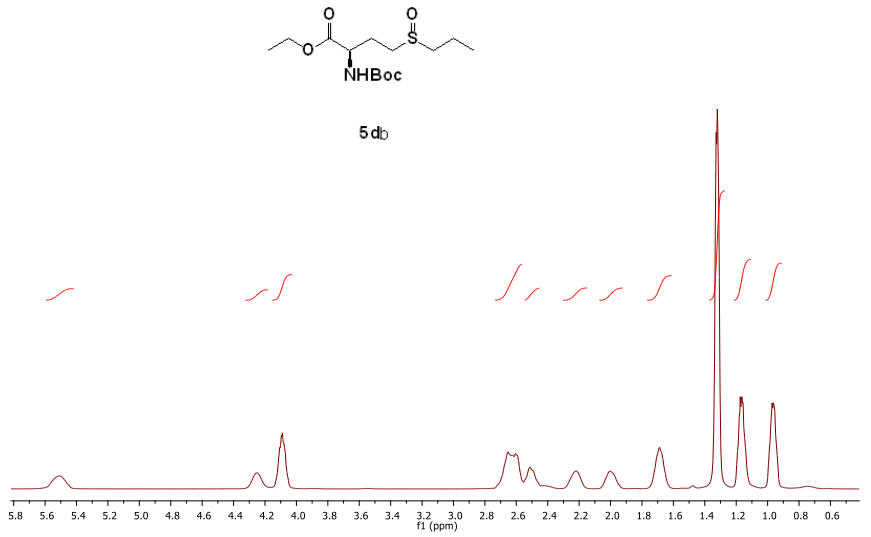


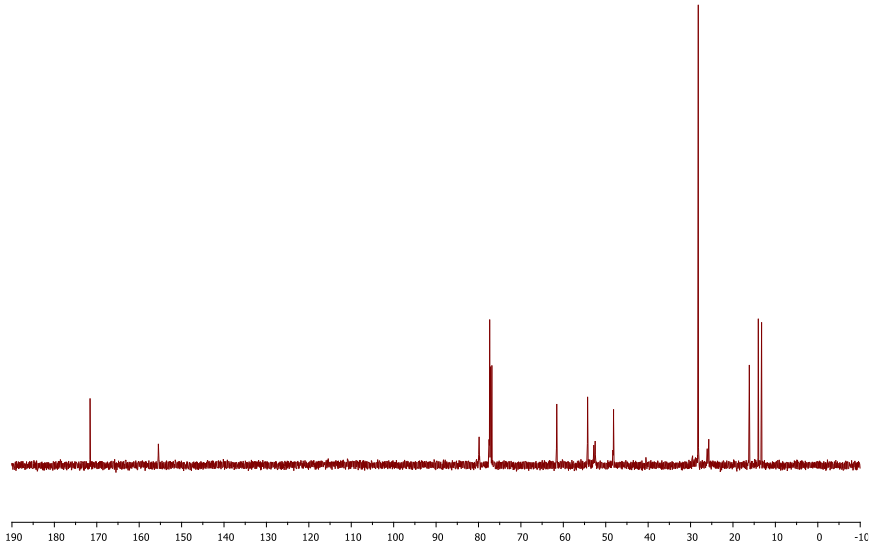
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5da**.



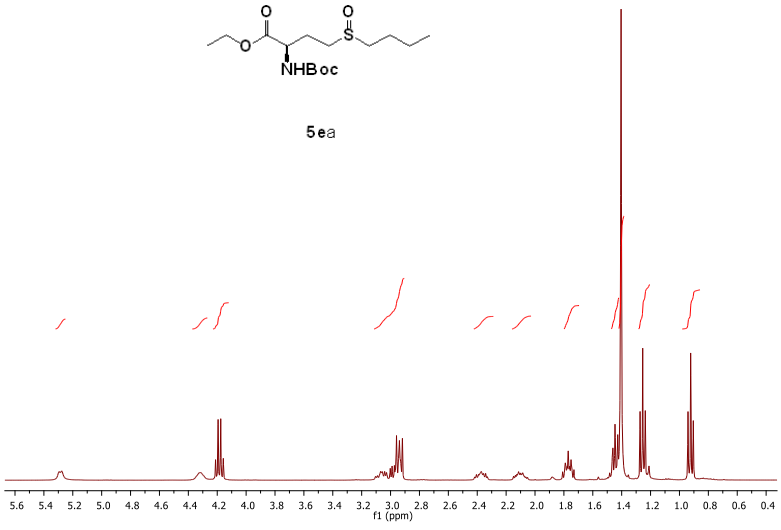


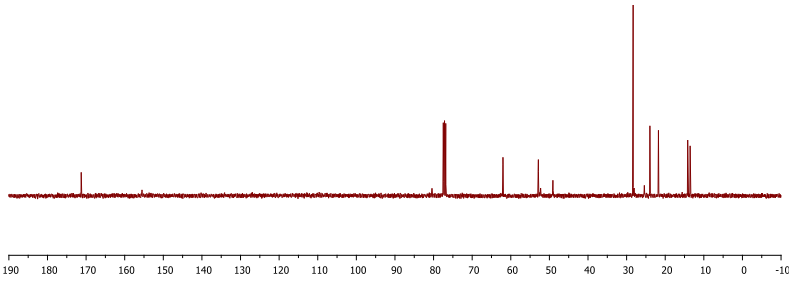
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5db**.





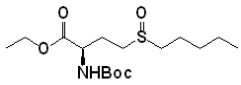
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5ea**.



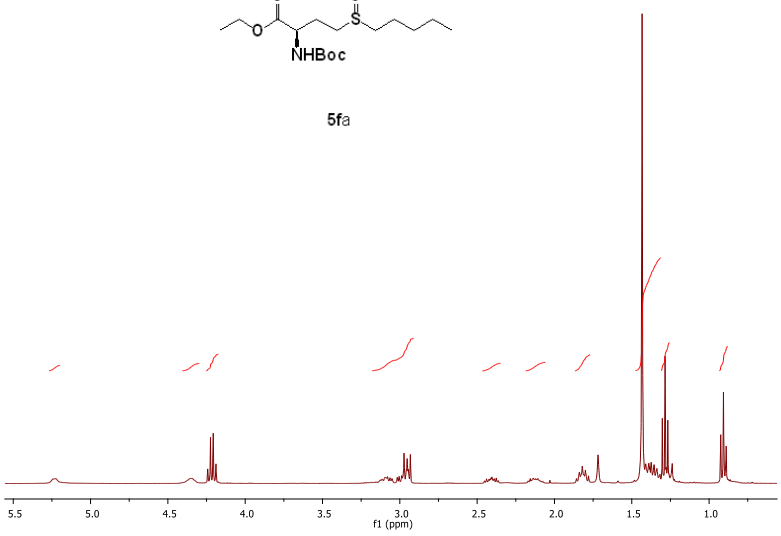


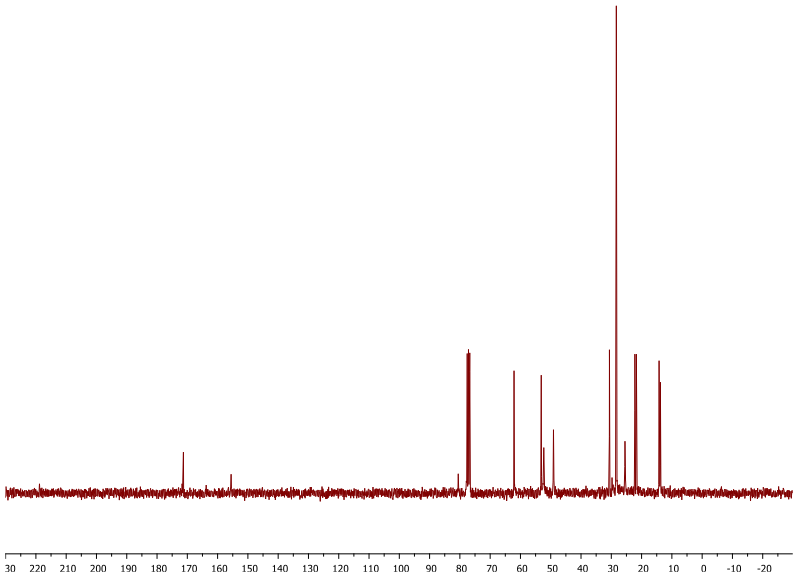
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5eb**.

RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5fa**.

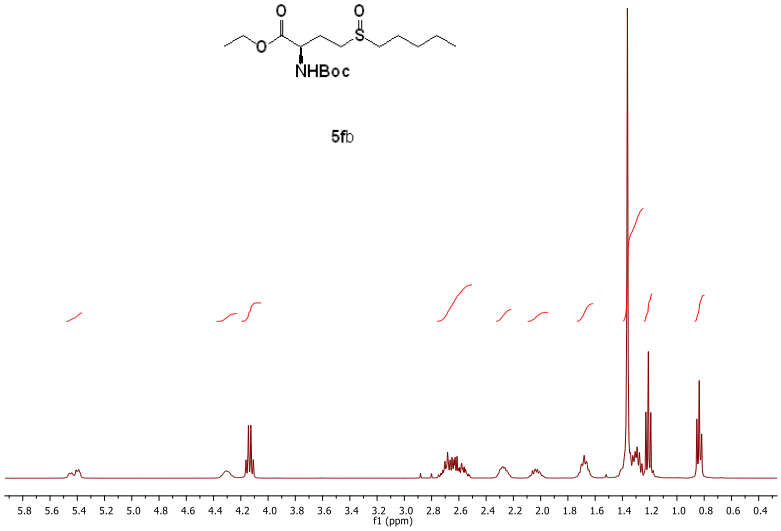


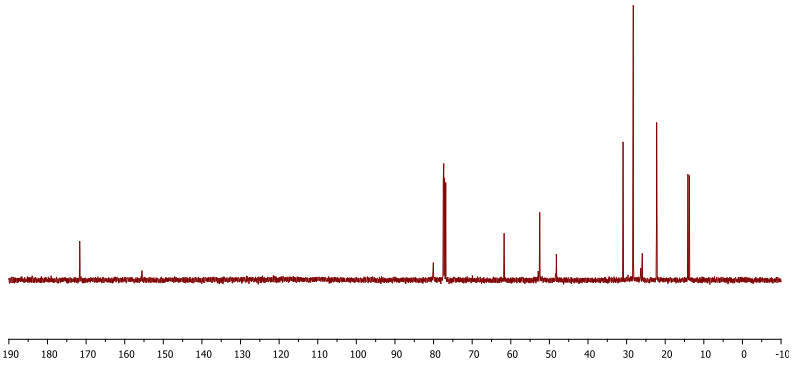
5fa



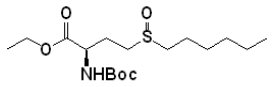


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5fb**.

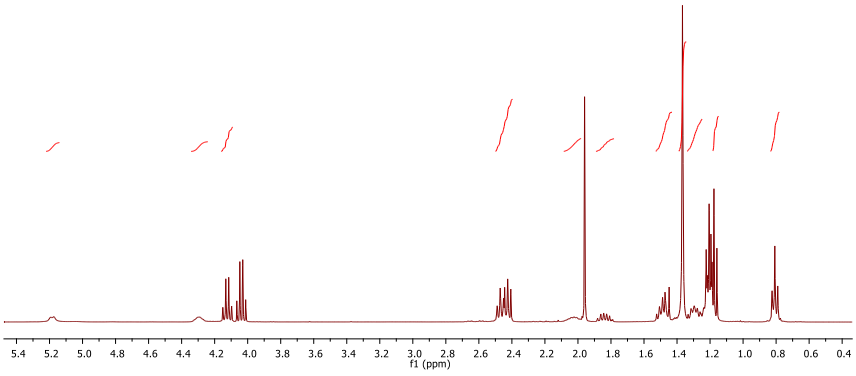


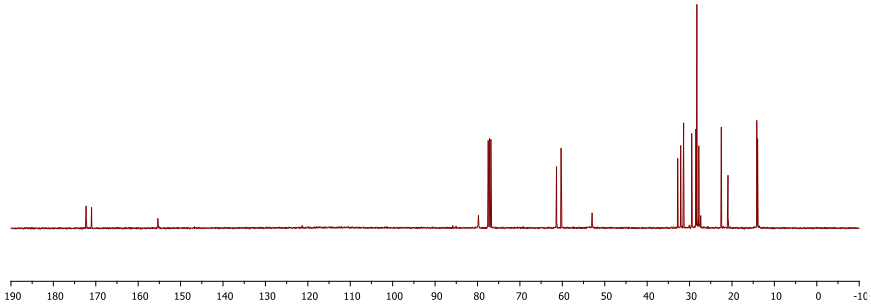


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5ga**.

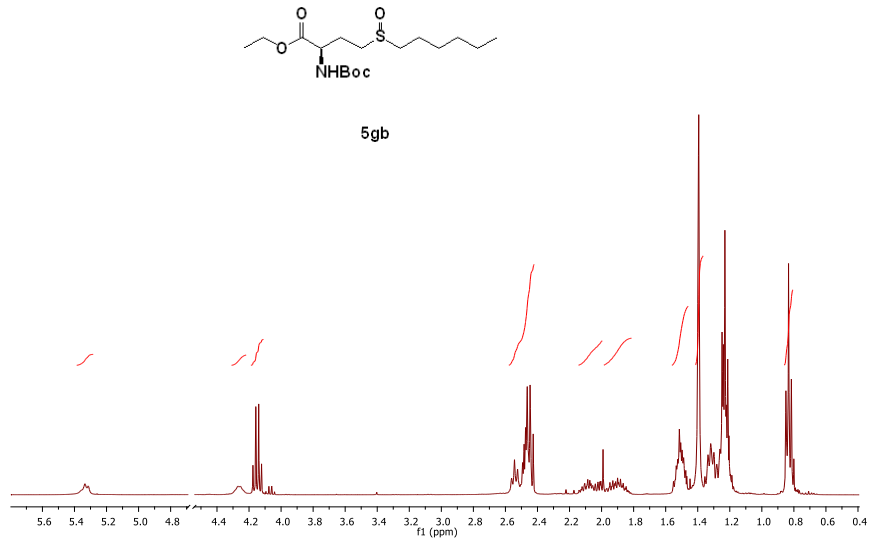


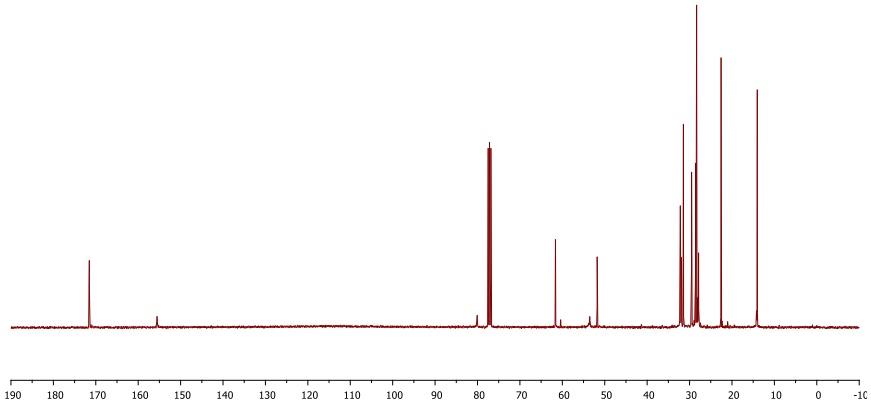
5ga



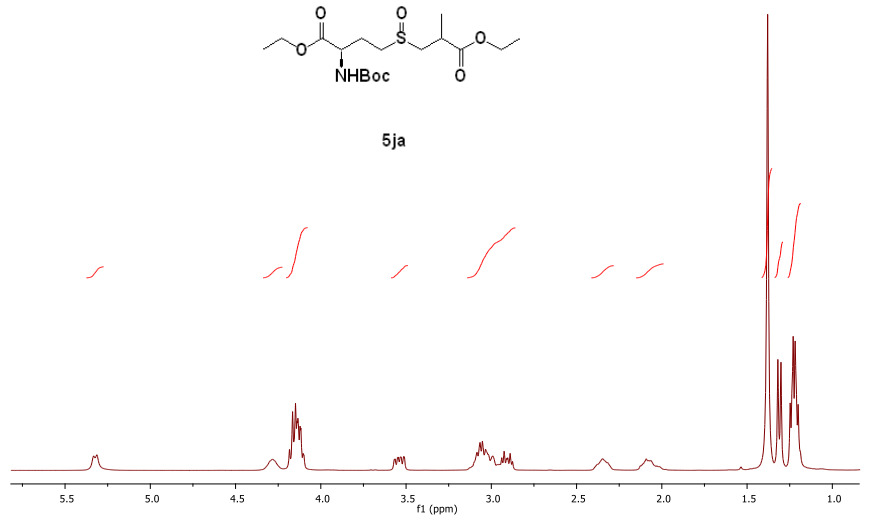


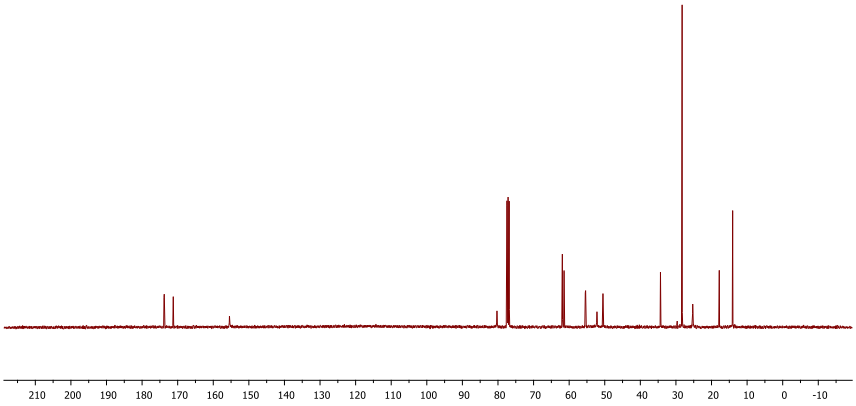
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5gb**.



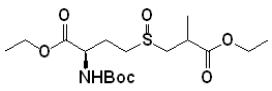


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5ja**.

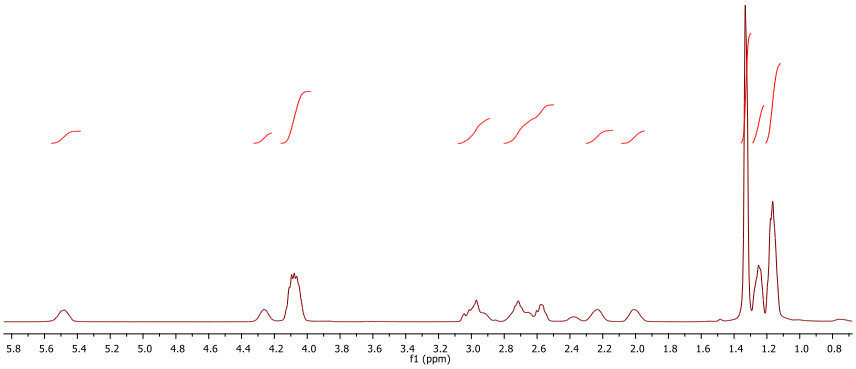


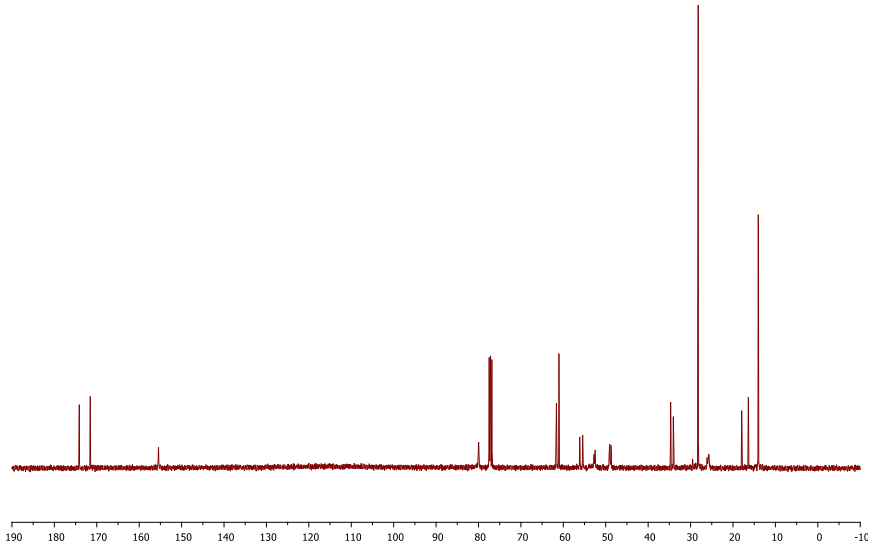


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5jb**.

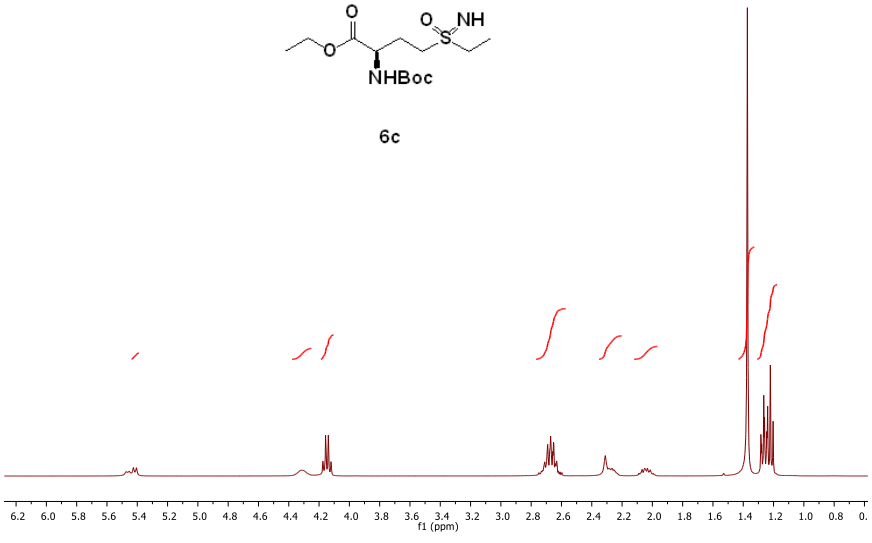


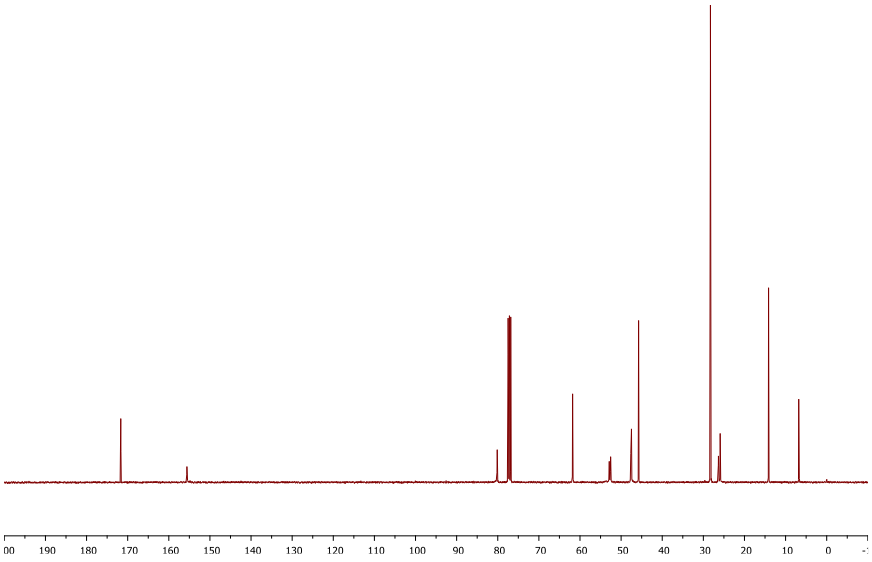
5jb



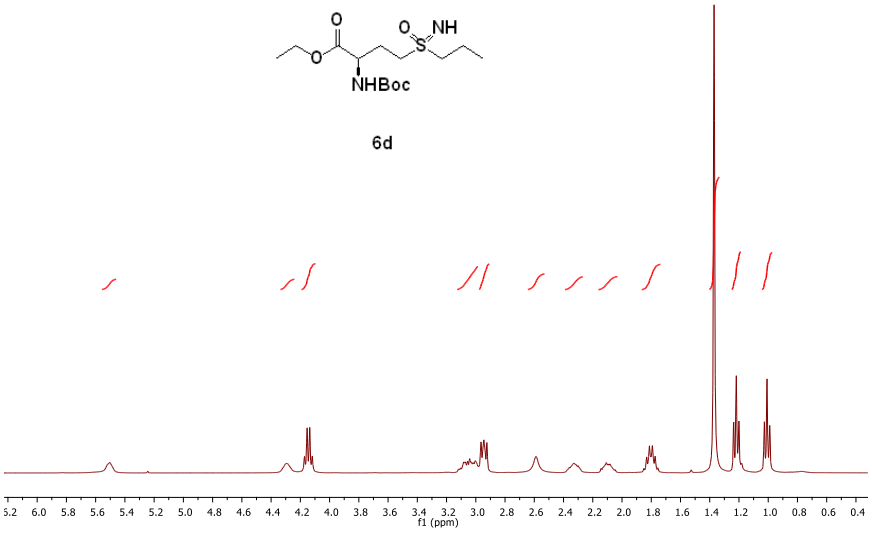


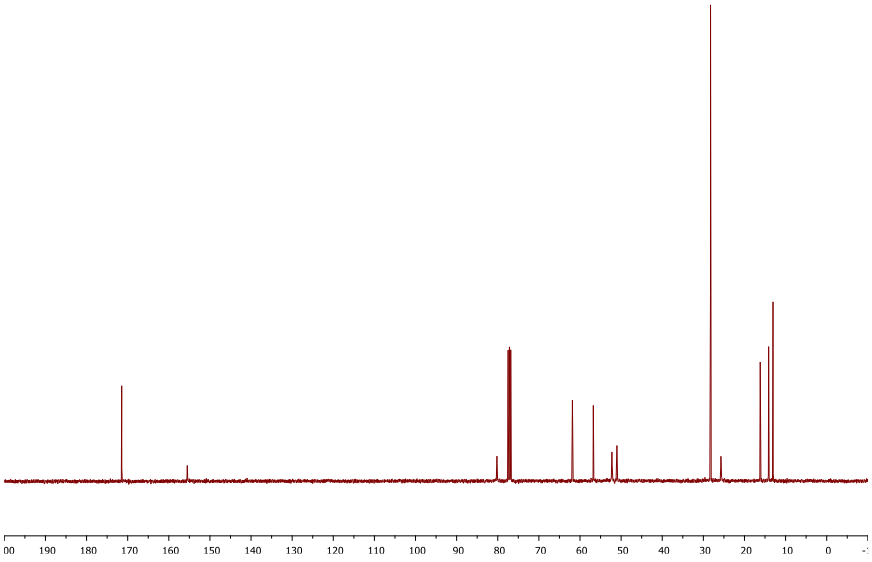
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **6c**.



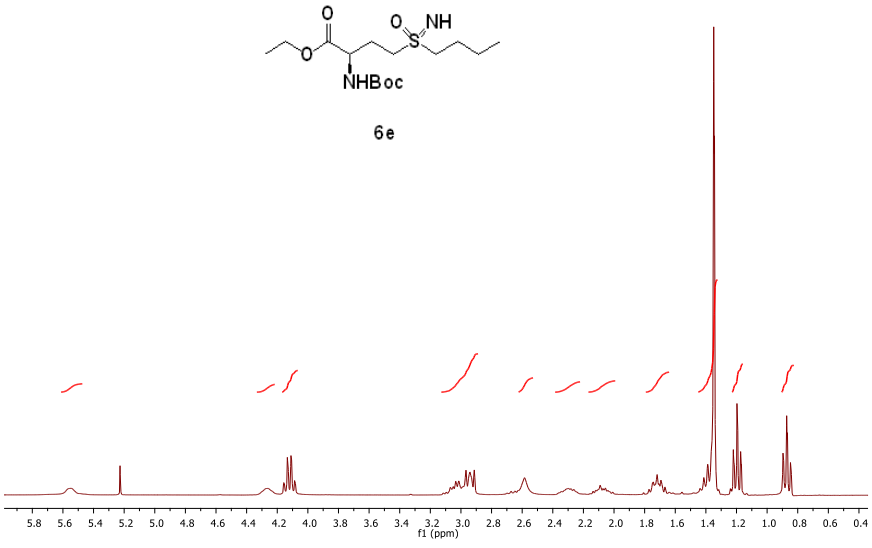


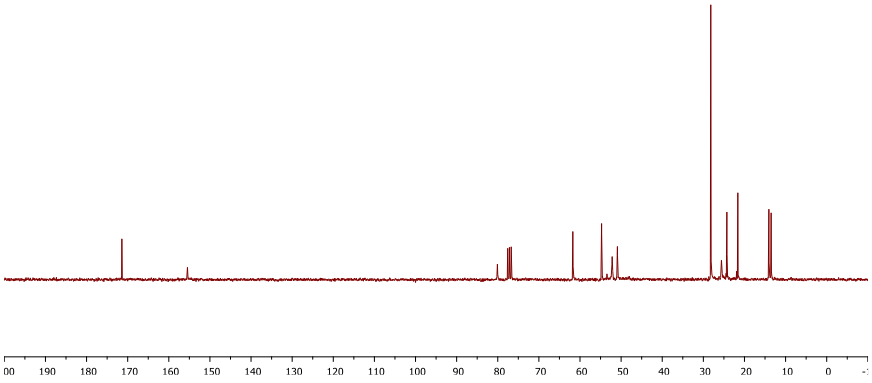
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **6d**.



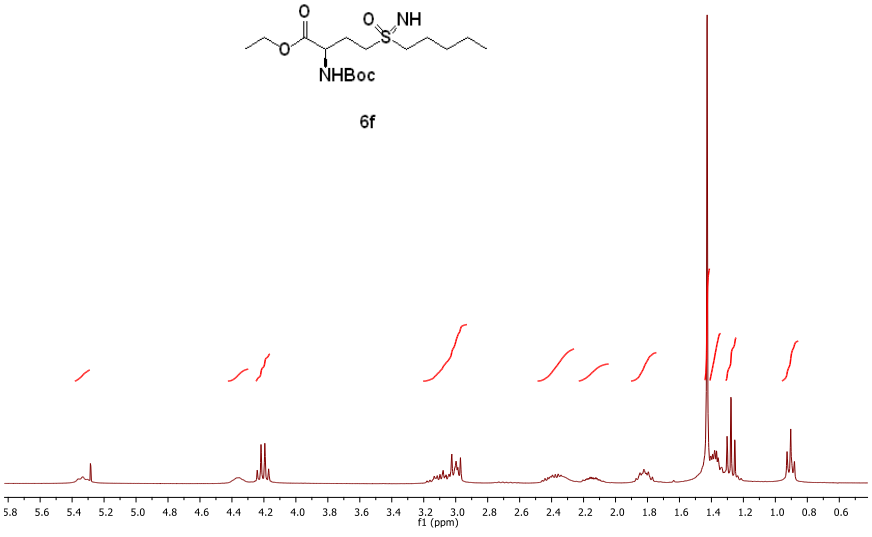


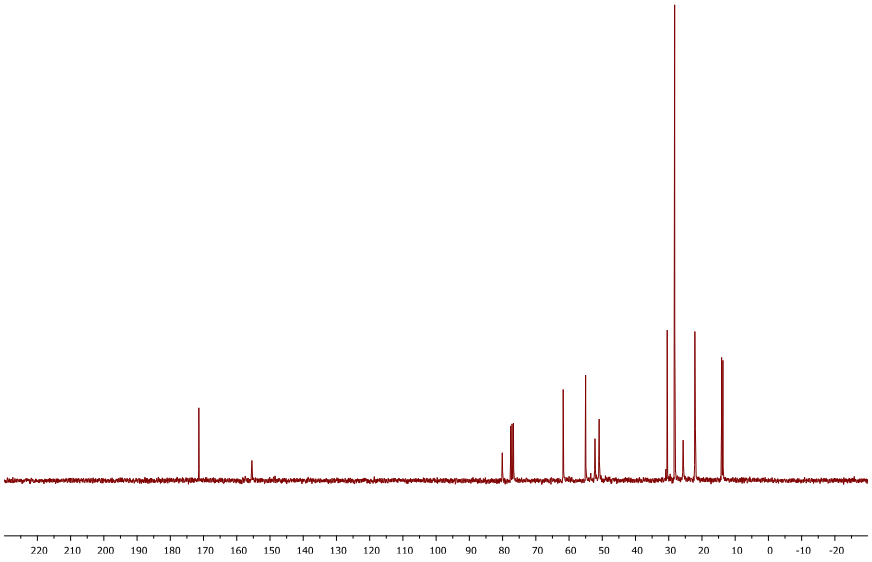
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **6e**.



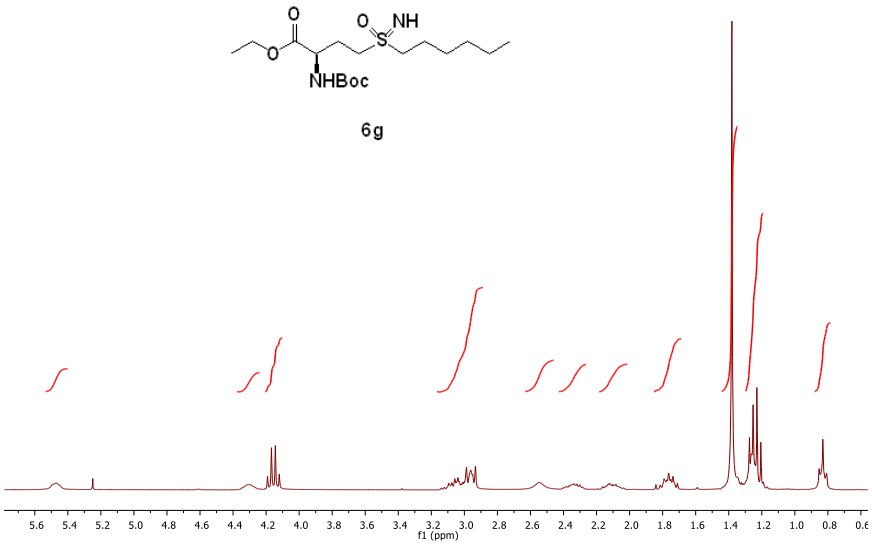


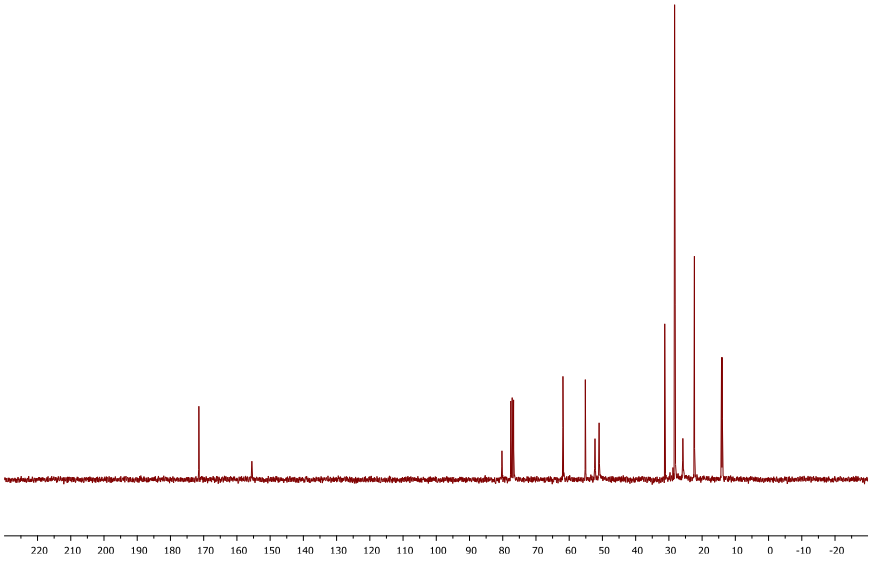
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **6f**.



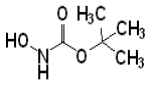


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **6g**.

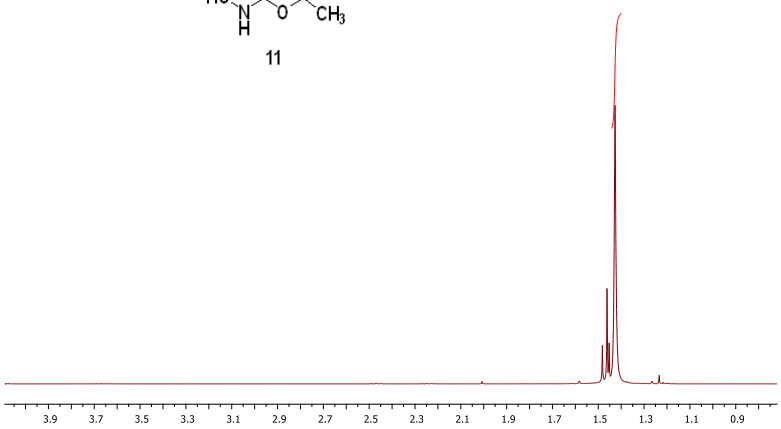


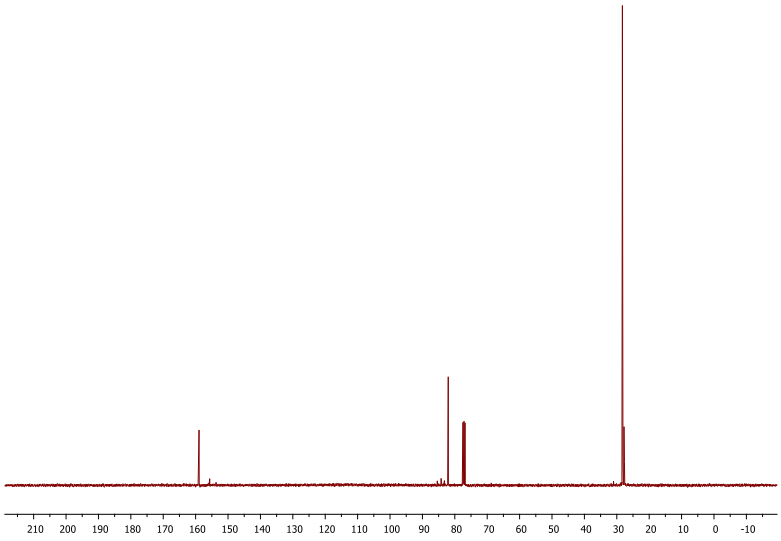


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **11**.

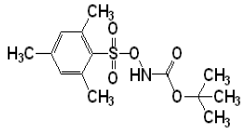


11

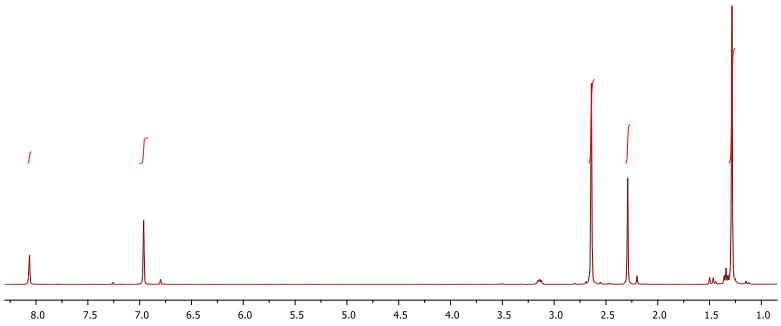


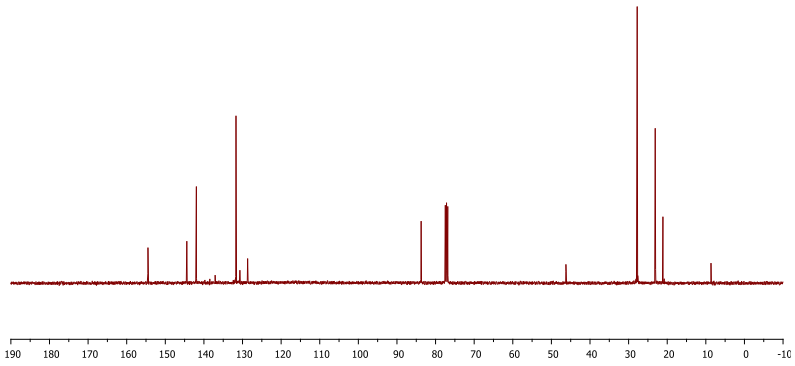


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **13**.

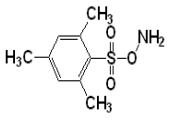


13

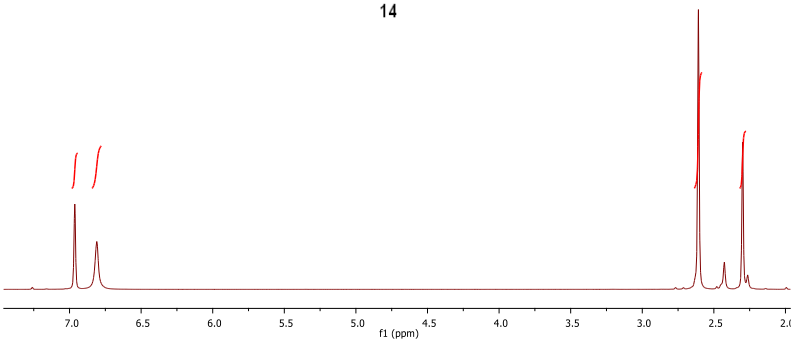


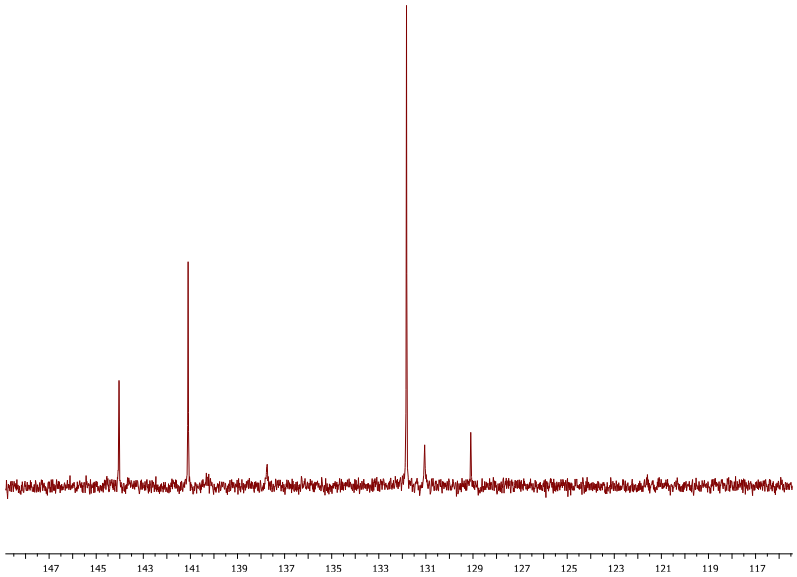


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **14**.

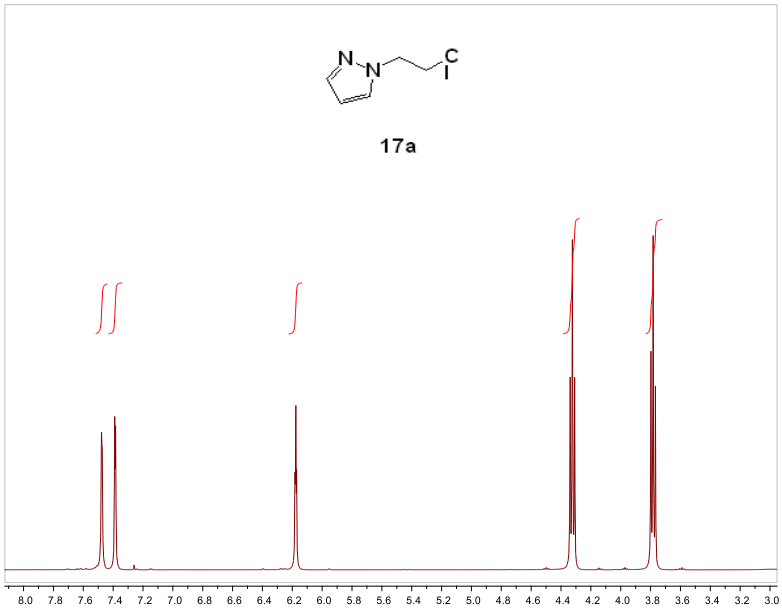


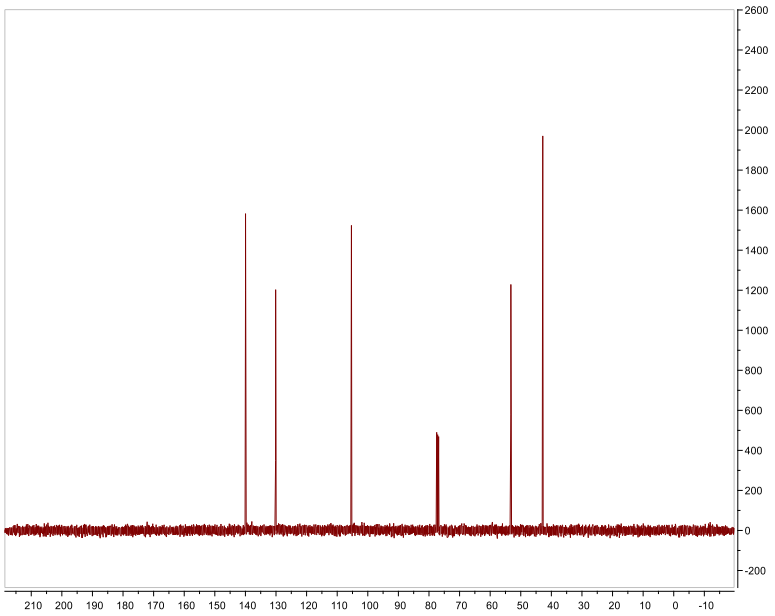
14



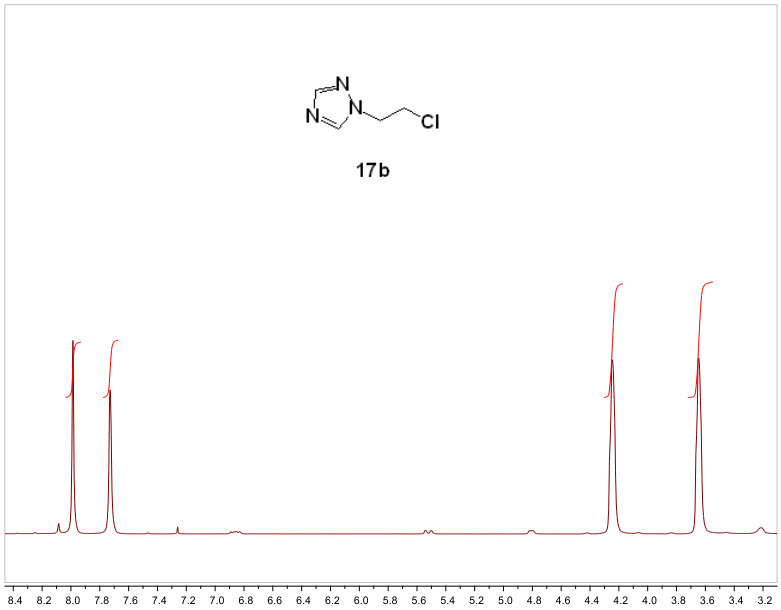


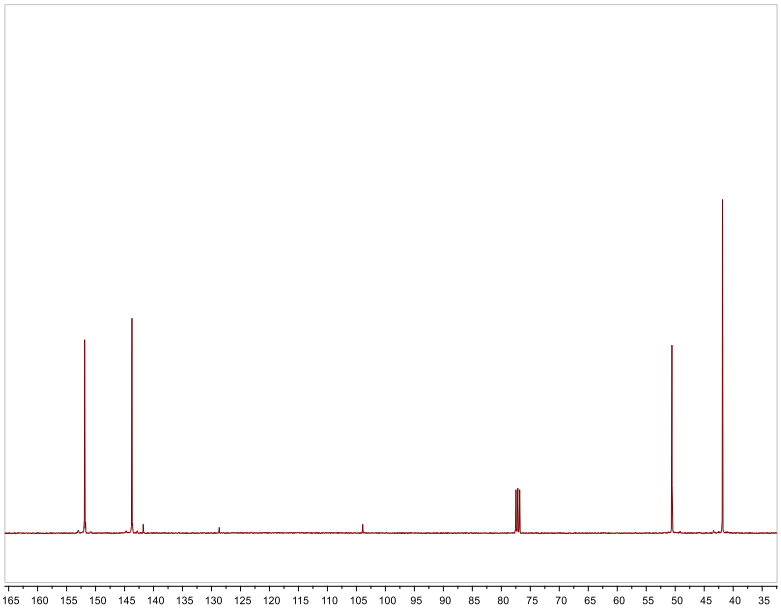
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **17a**.



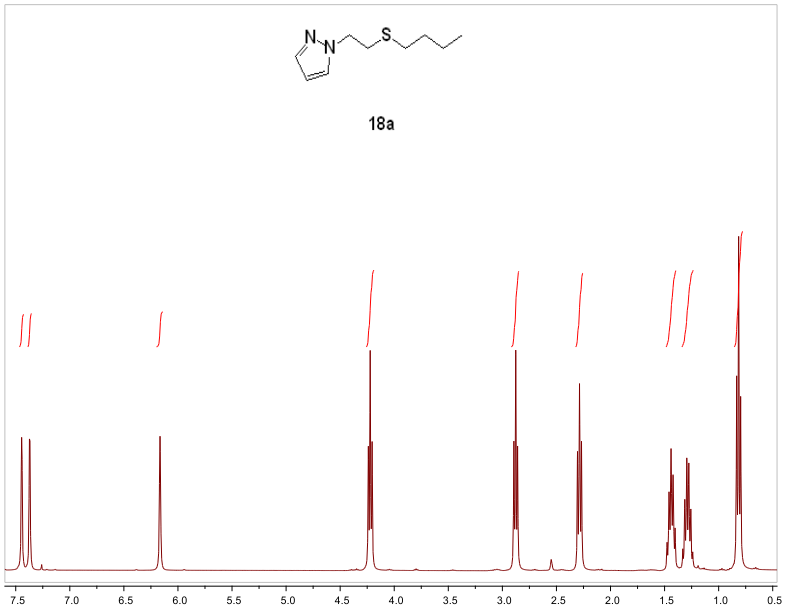


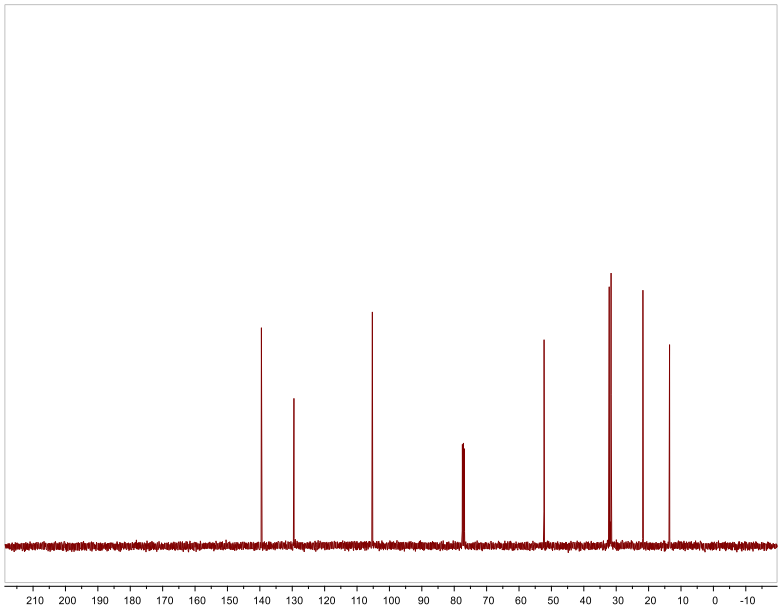
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **17b**.



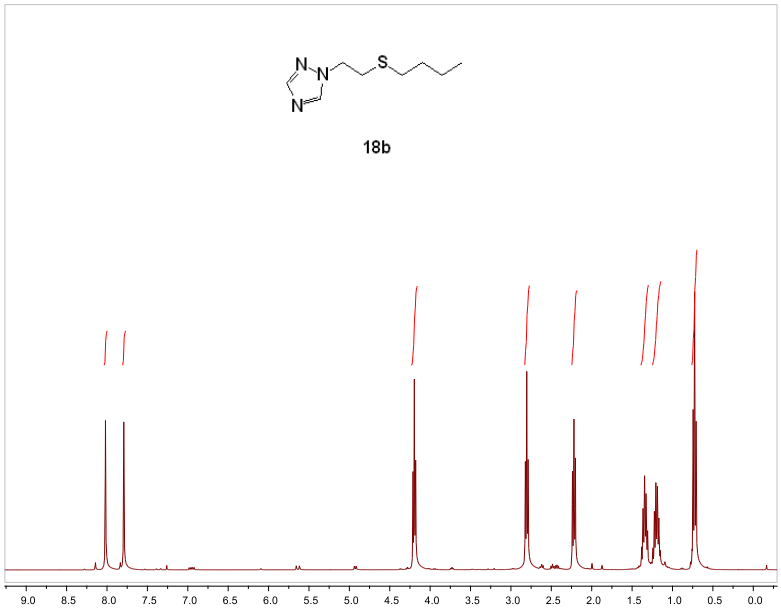


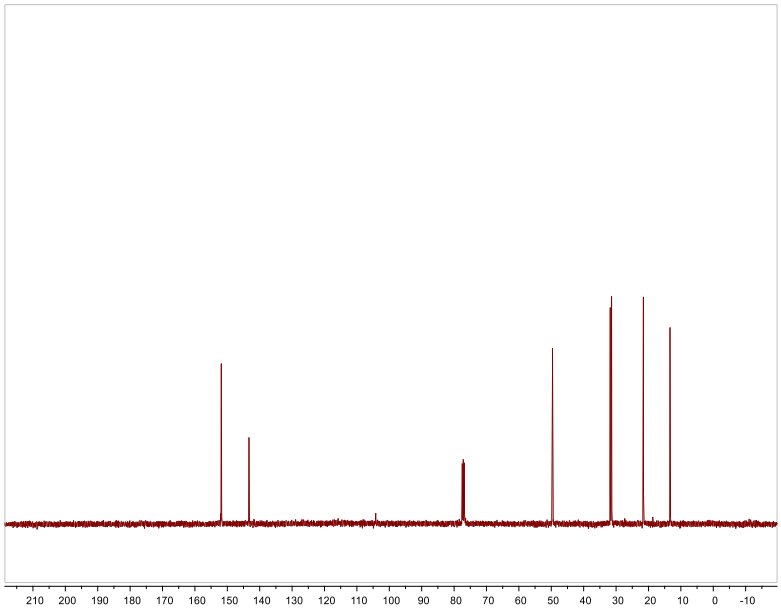
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **18a**.



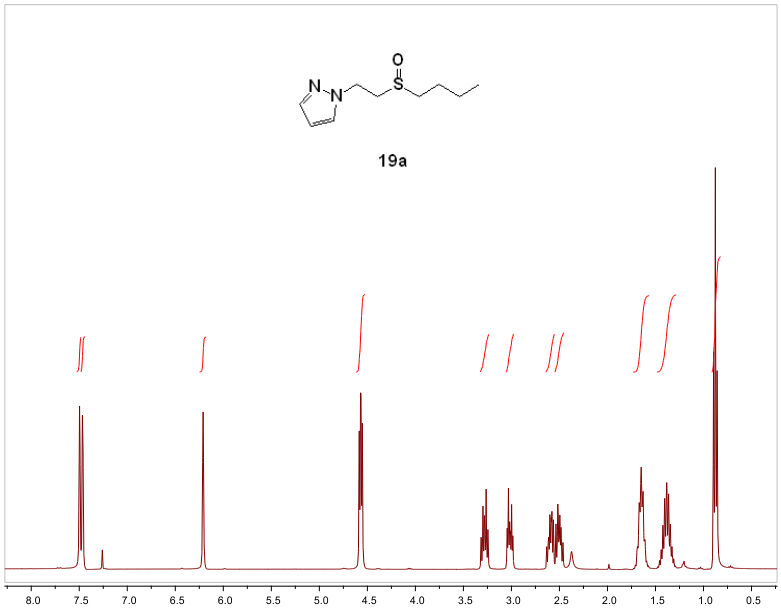


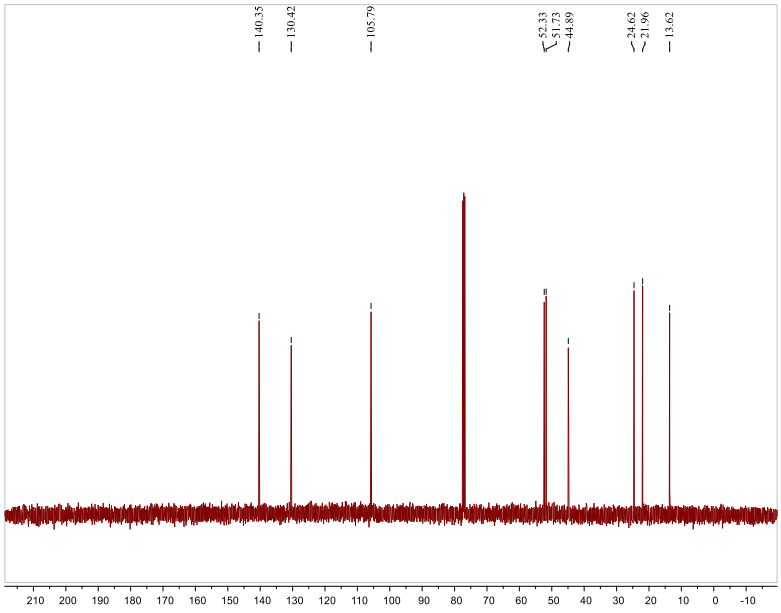
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **18b**.



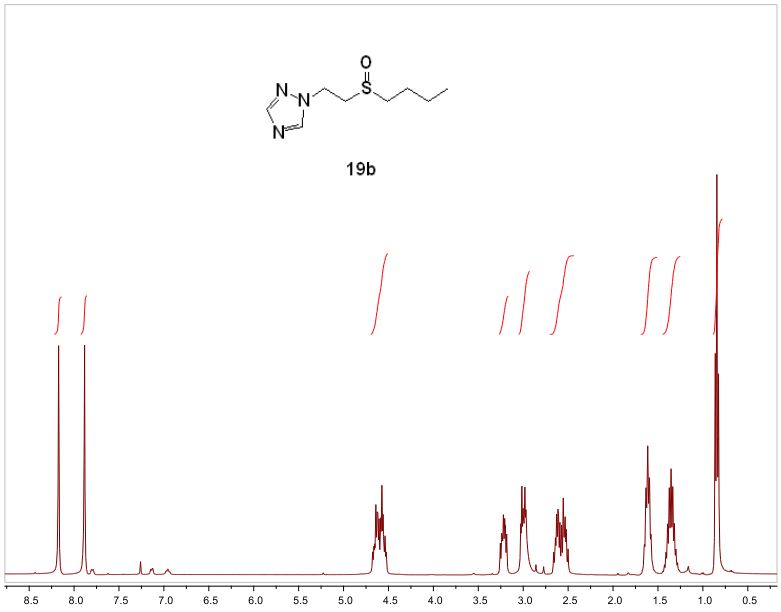


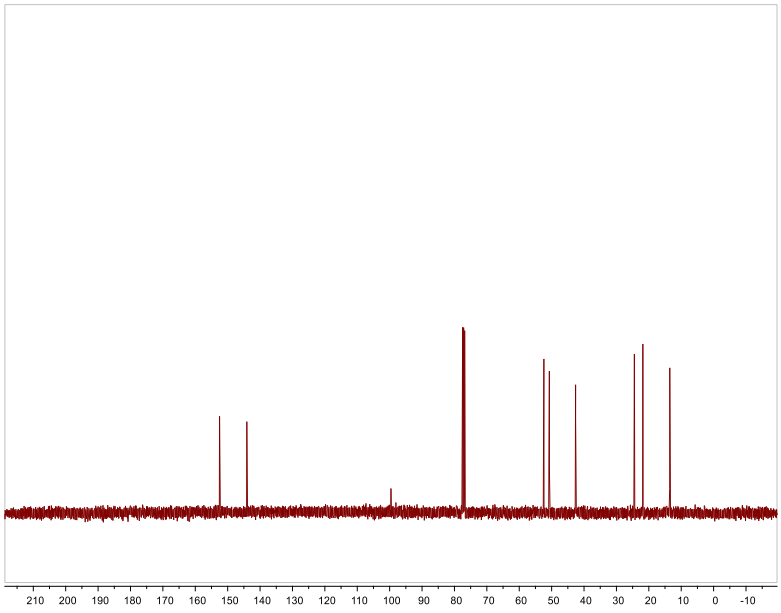
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **19a**.



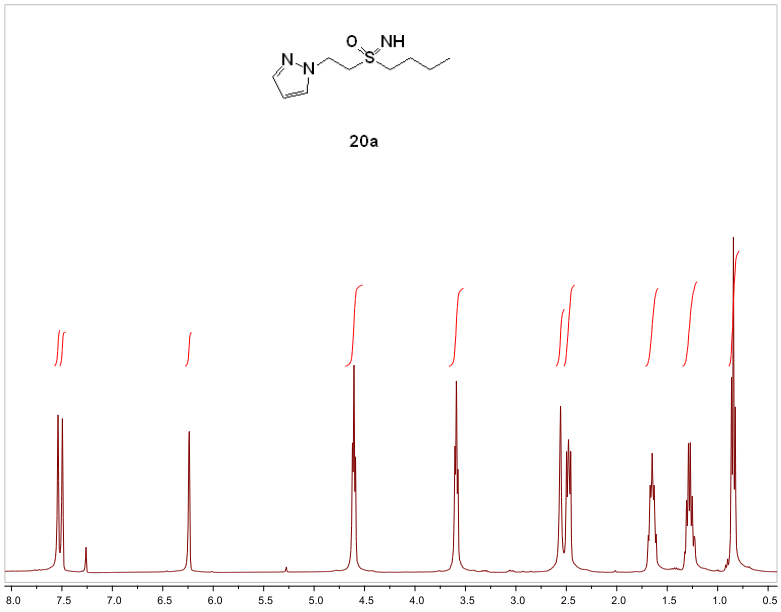


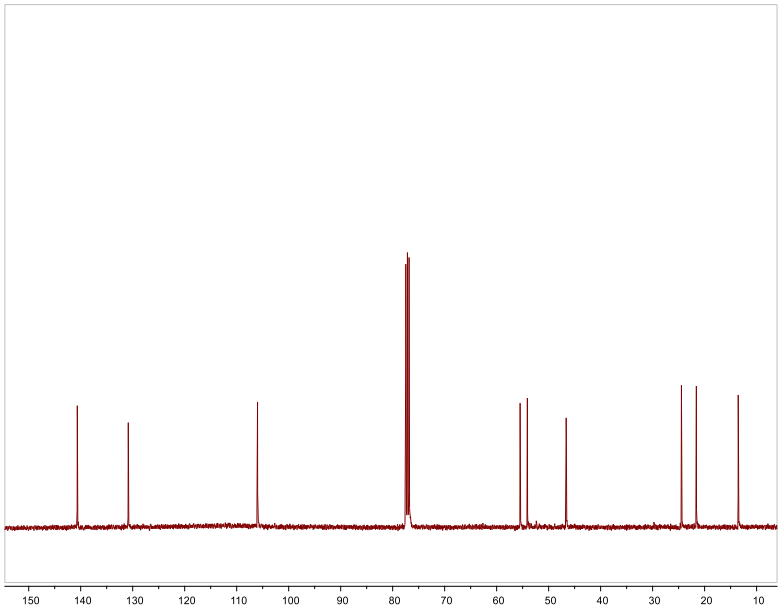
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **19b**.



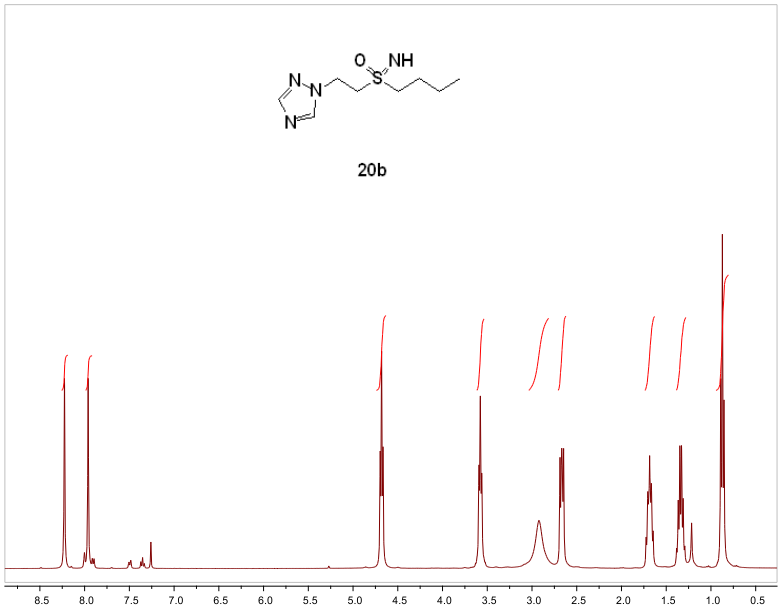


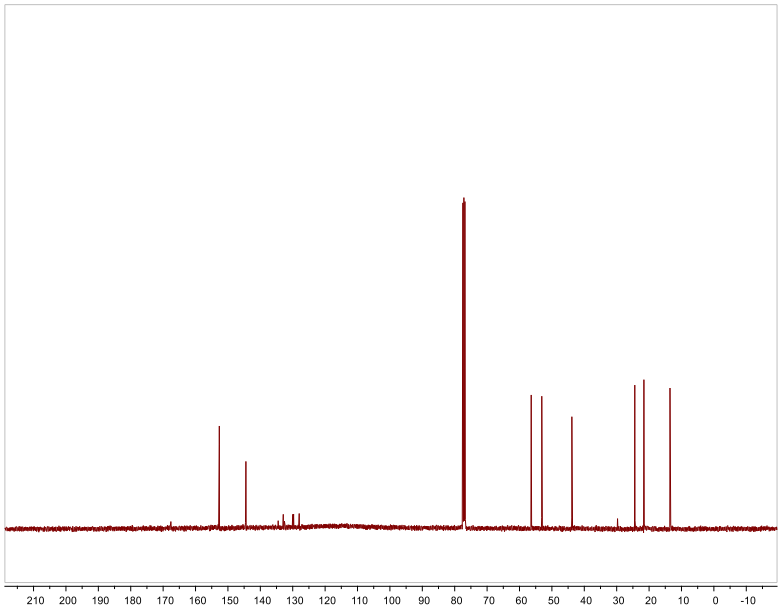
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **20a**.



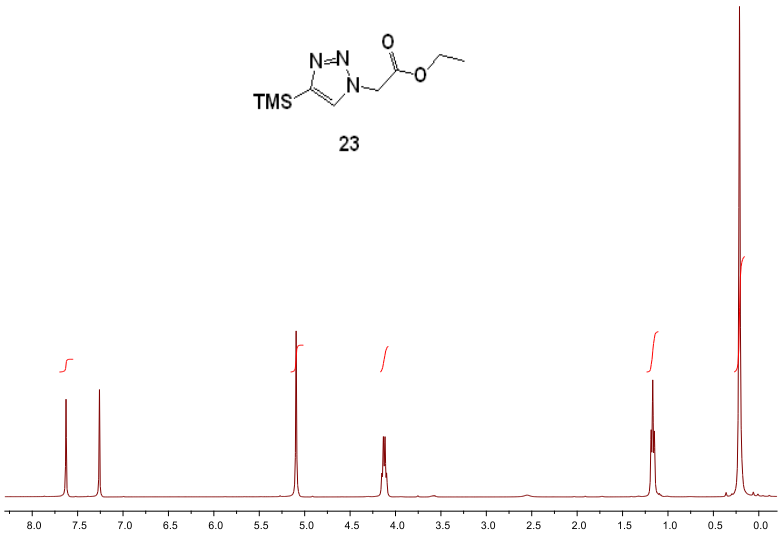


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **20b**.

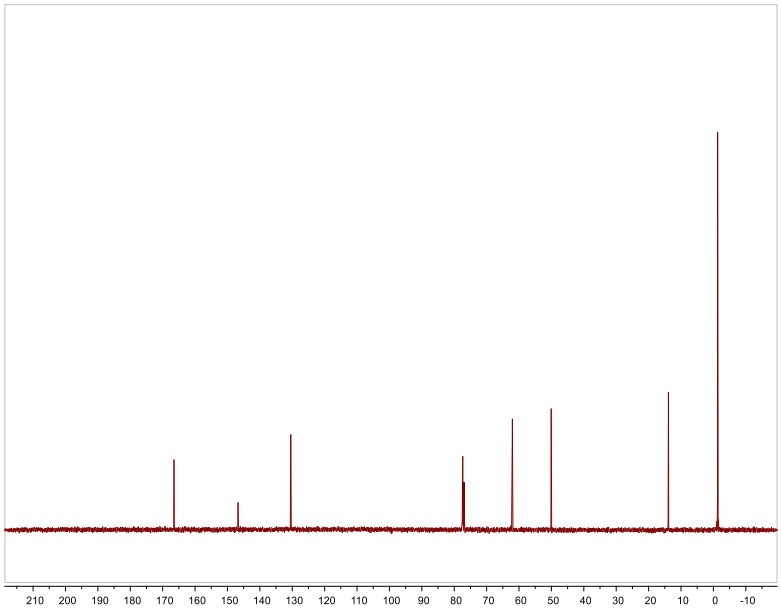




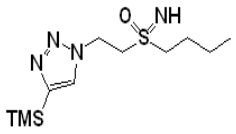
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **23**.



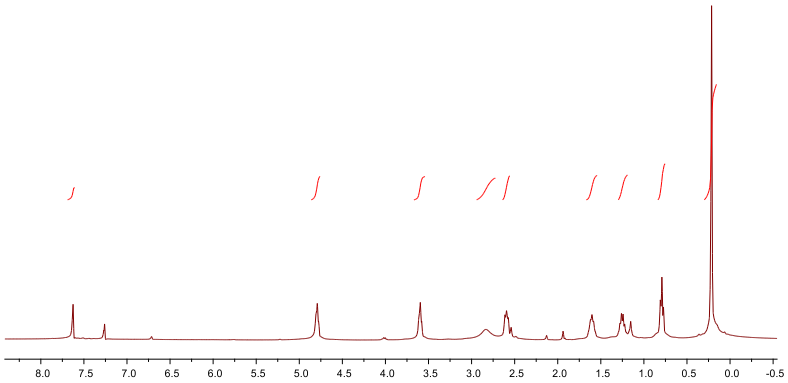
23

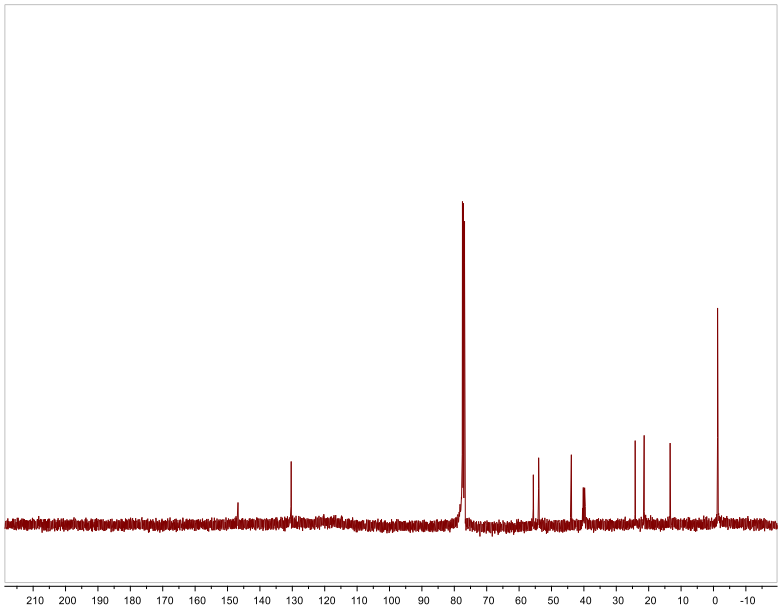


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **28**.



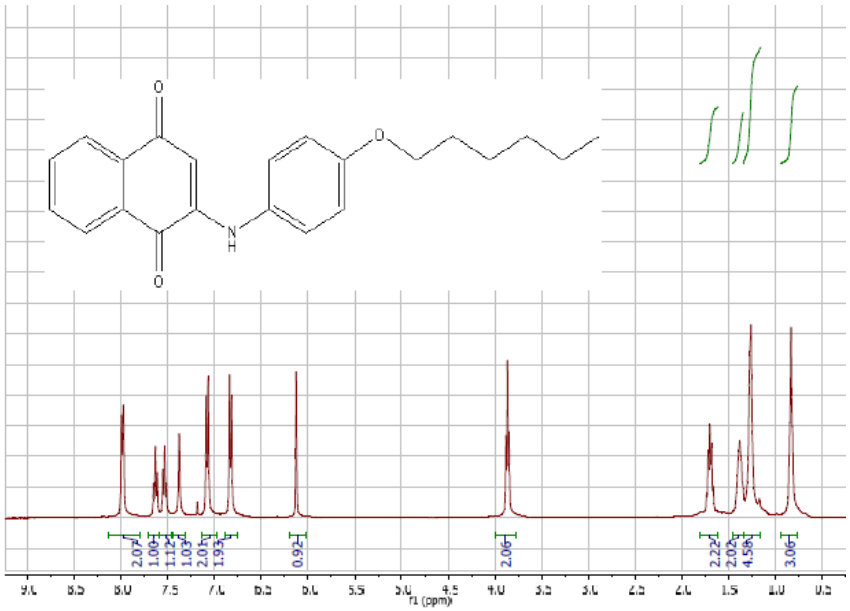
28

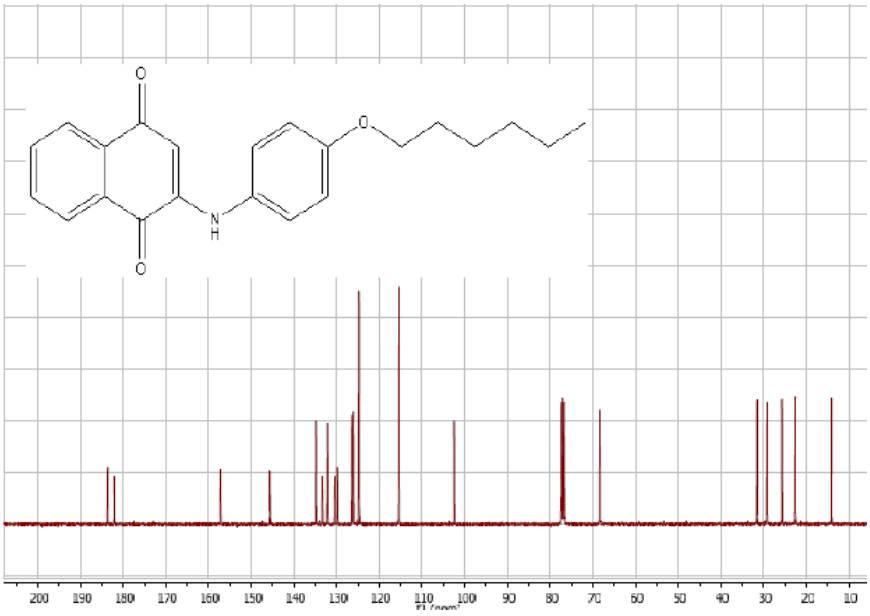



210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10

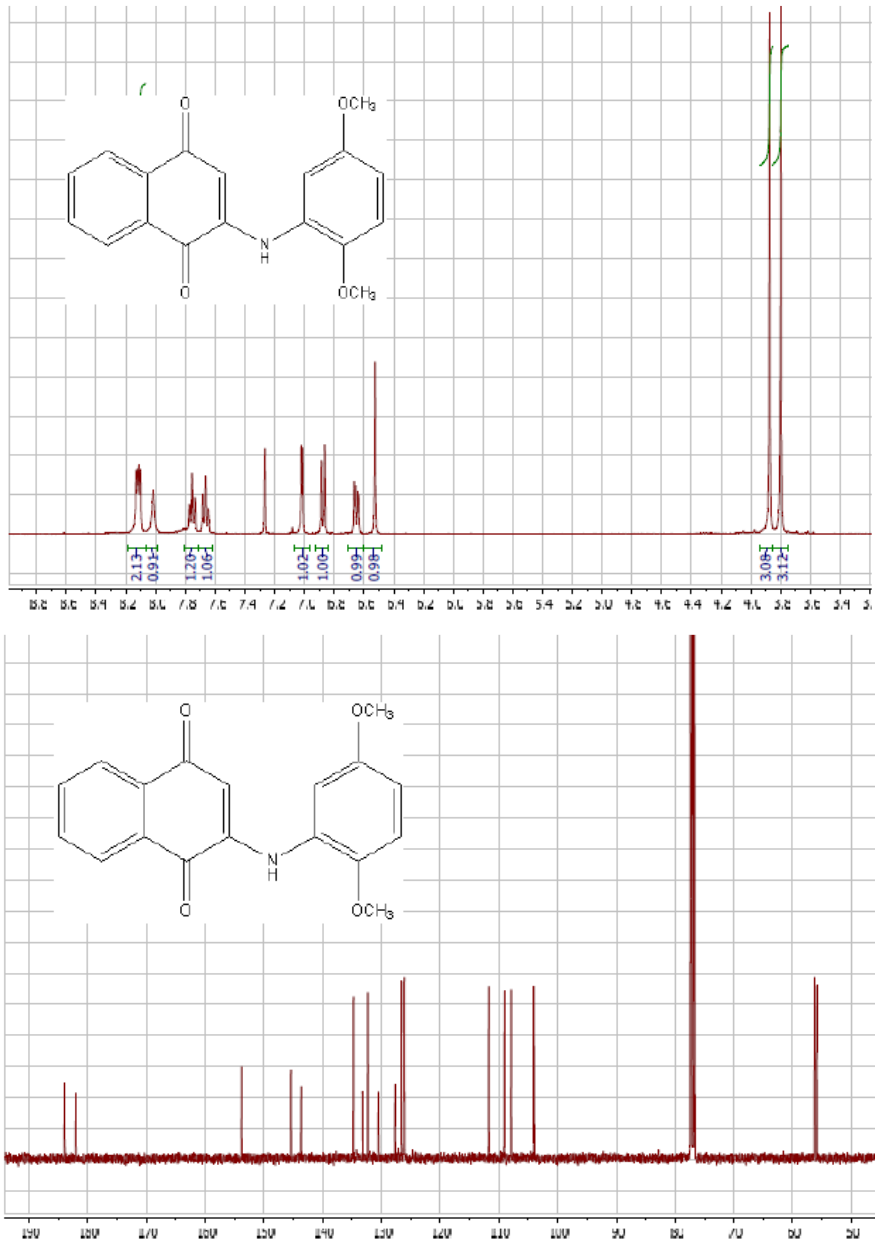
- 2-Aminoarilquinonas

RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **33a**.

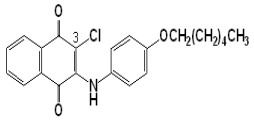




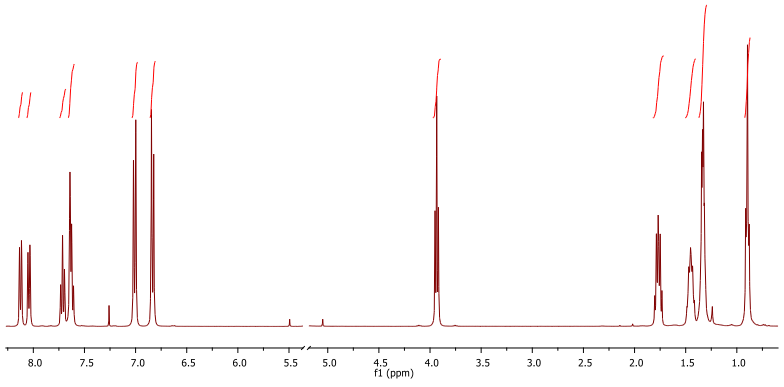
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **33b**.

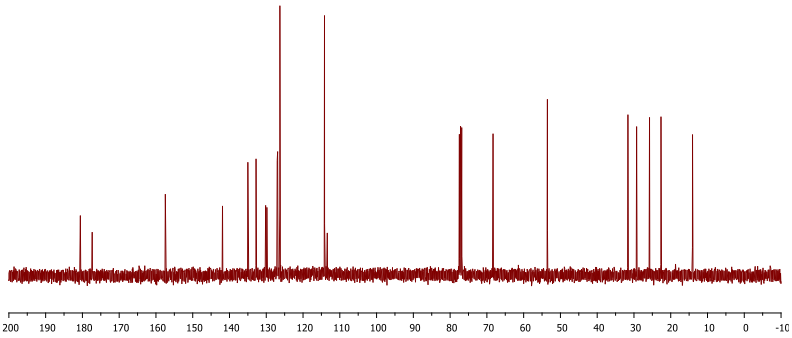


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **33c**.

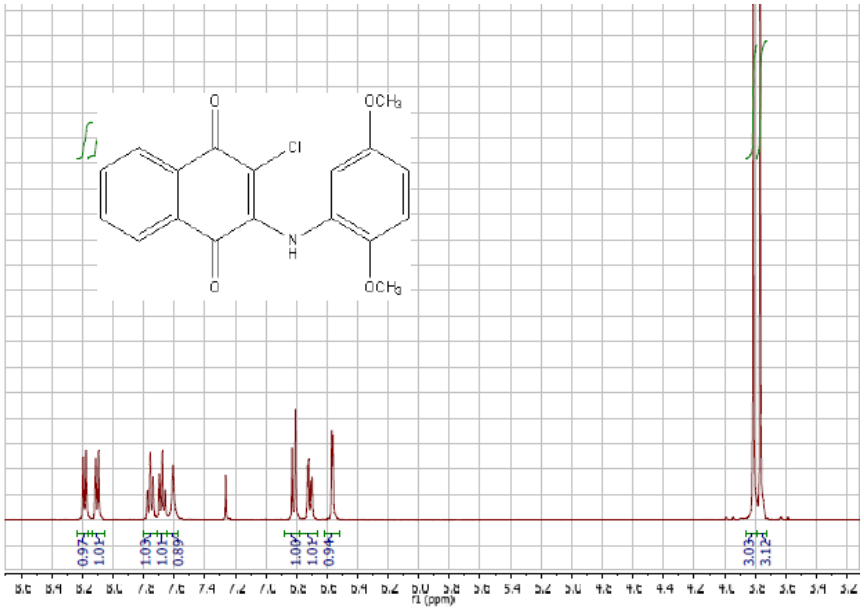


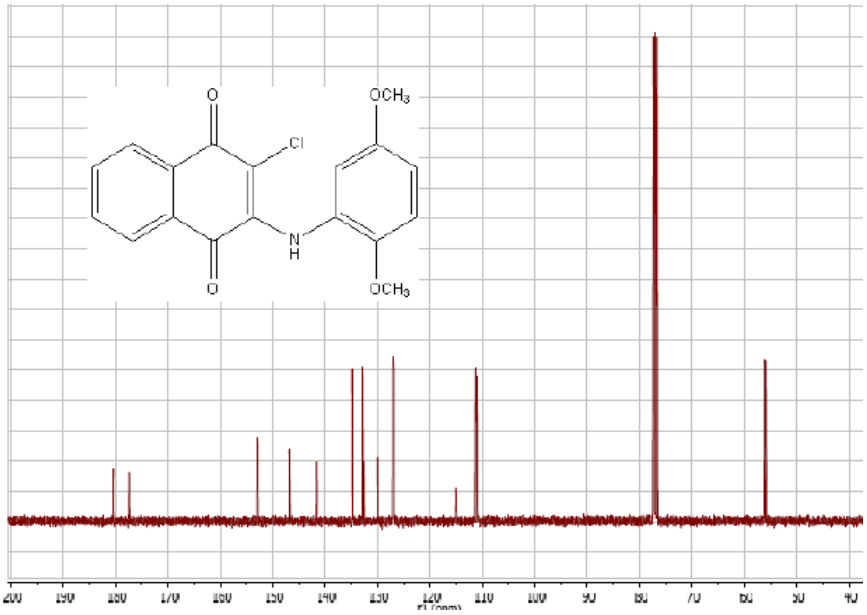
33c



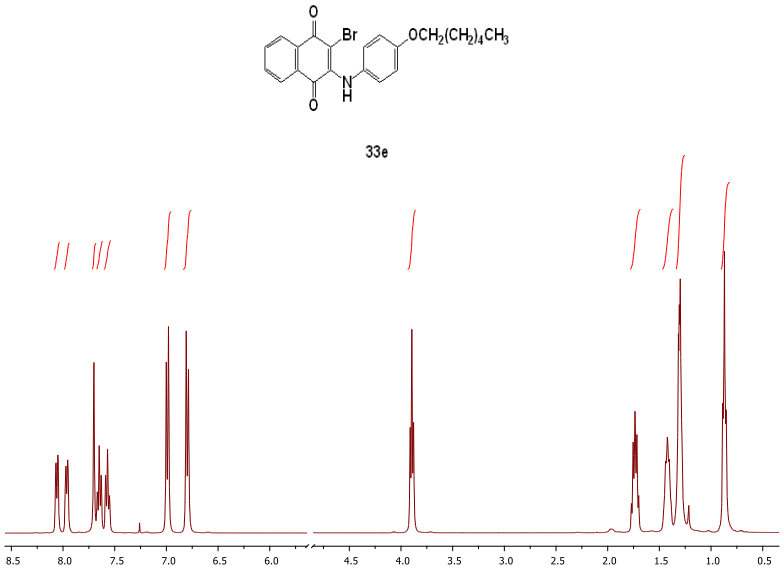


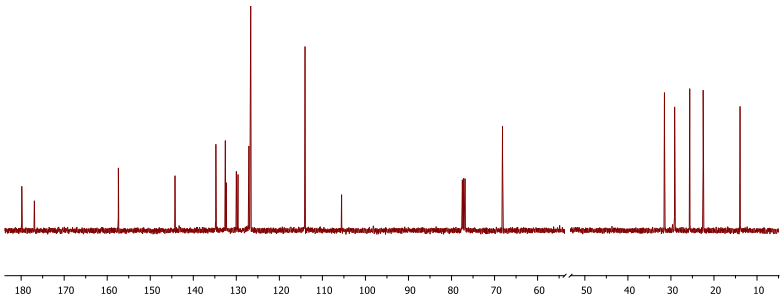
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **33d**.



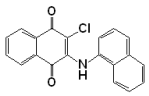


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **33e**.

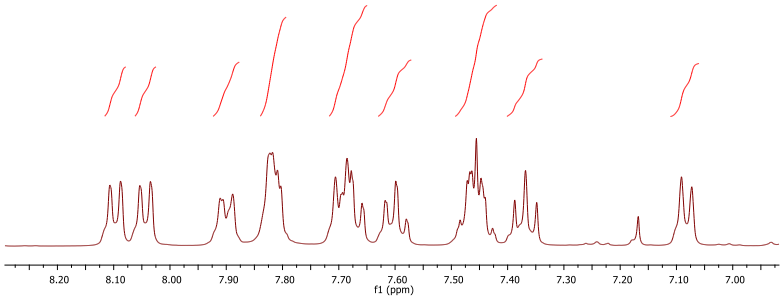


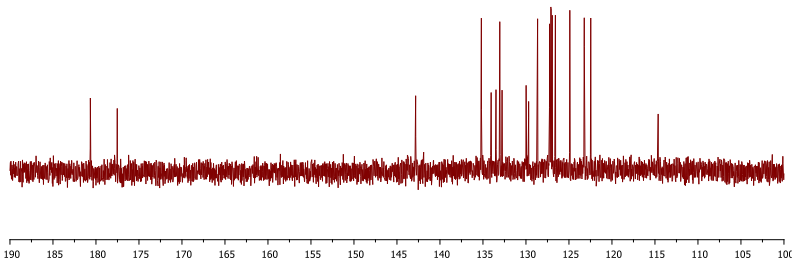


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **37a**.

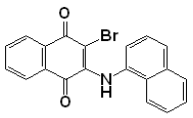


37a

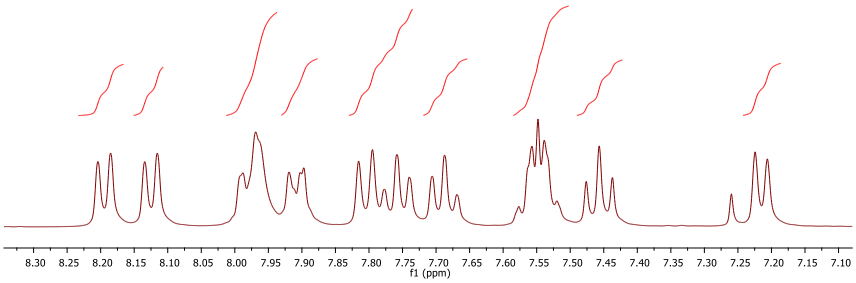


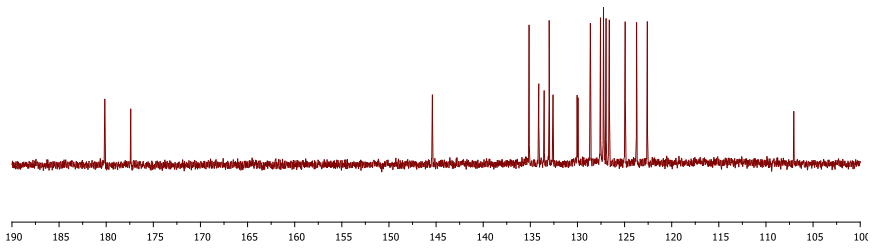


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **37b**.

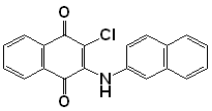


37b

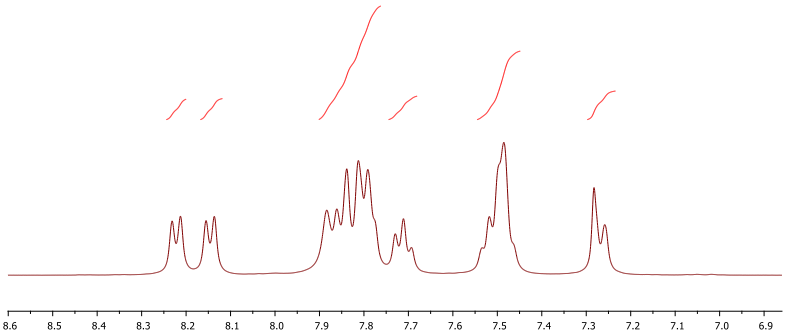


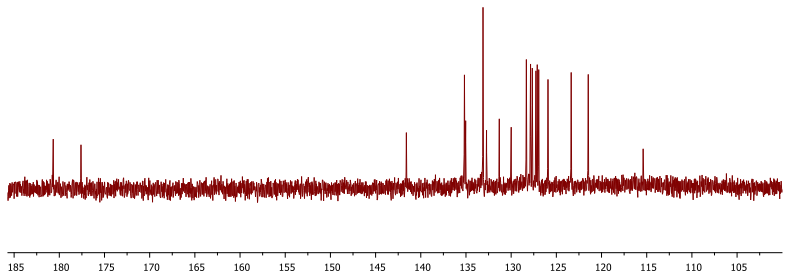


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **37c**.

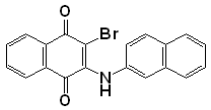


37c

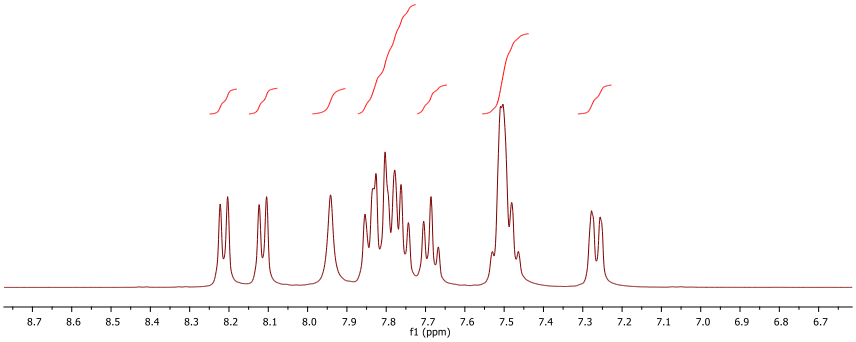


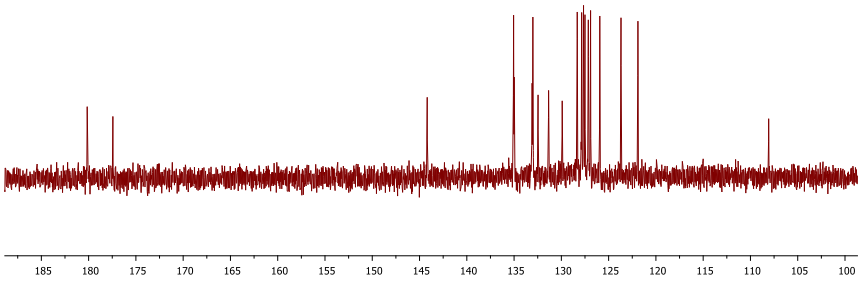


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **37d**.

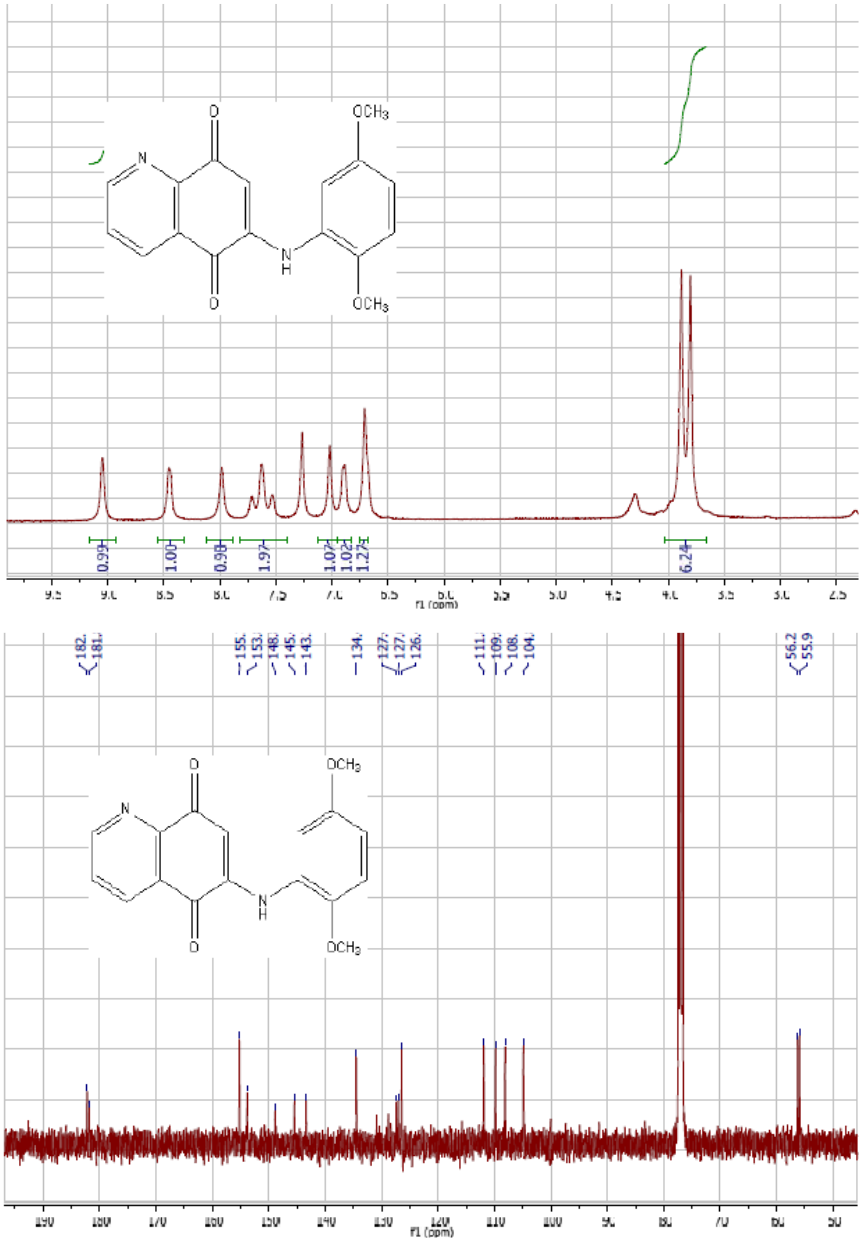


37d

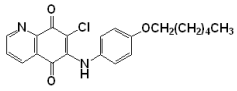




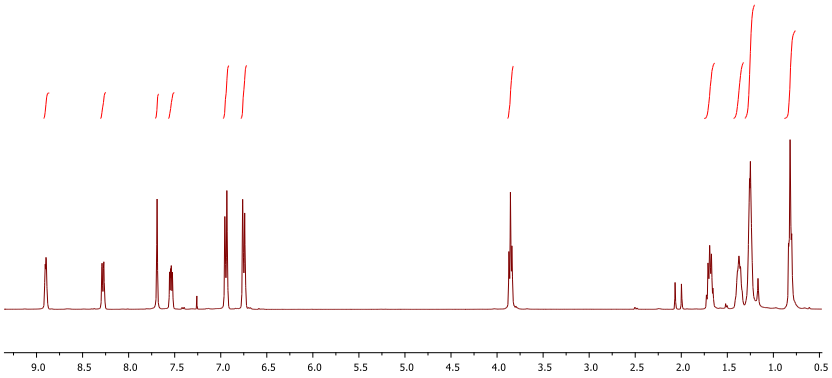
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **41a**.

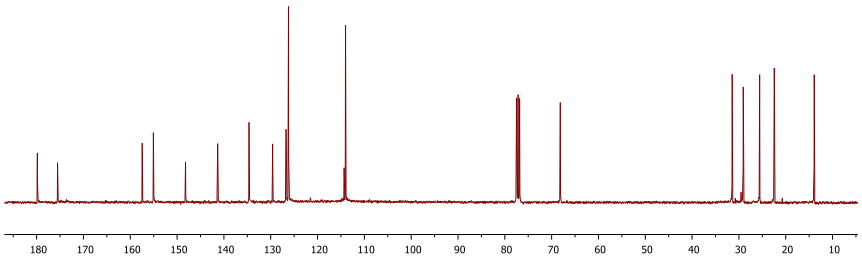


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **41b**.

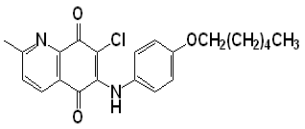


41b

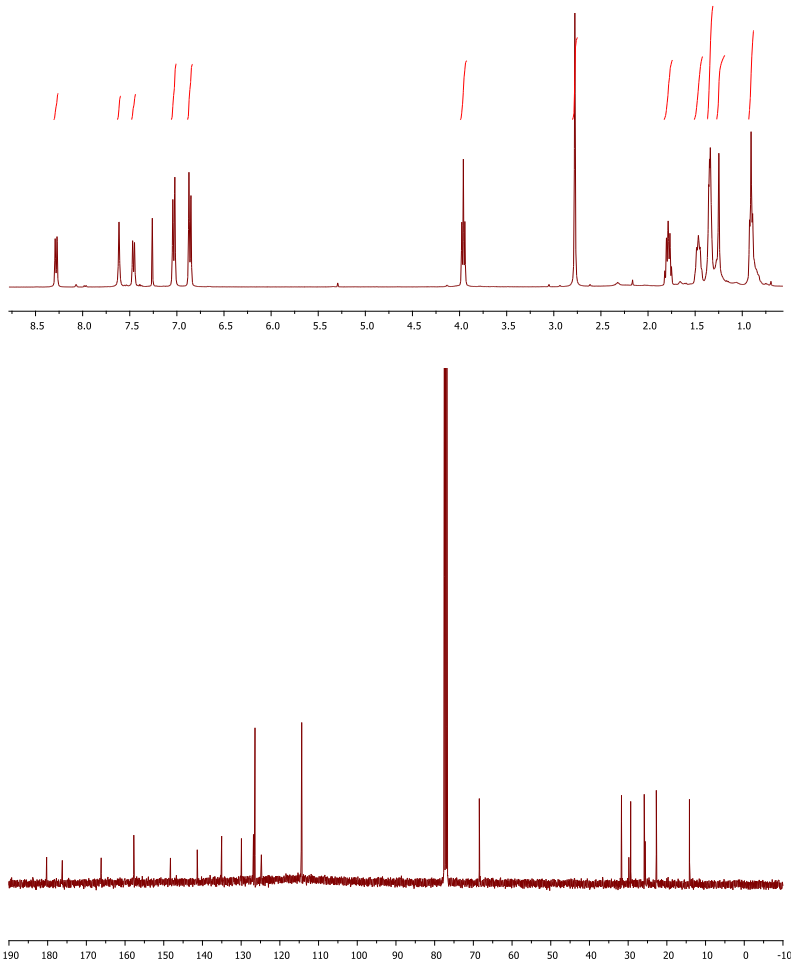




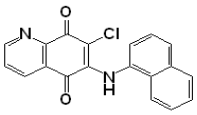
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **41c**.



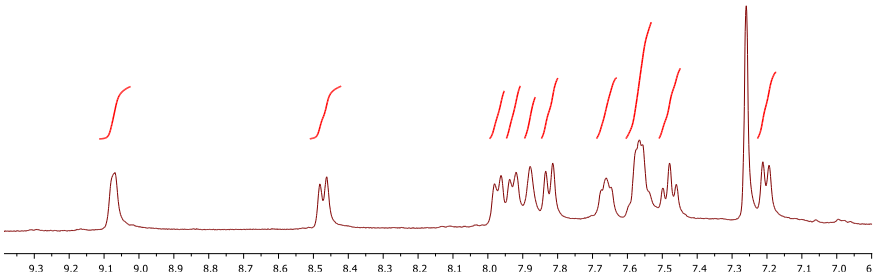
41c

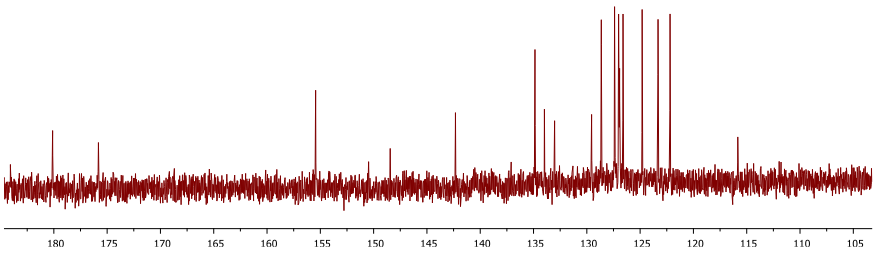


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **41d**.

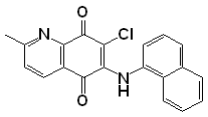


41d

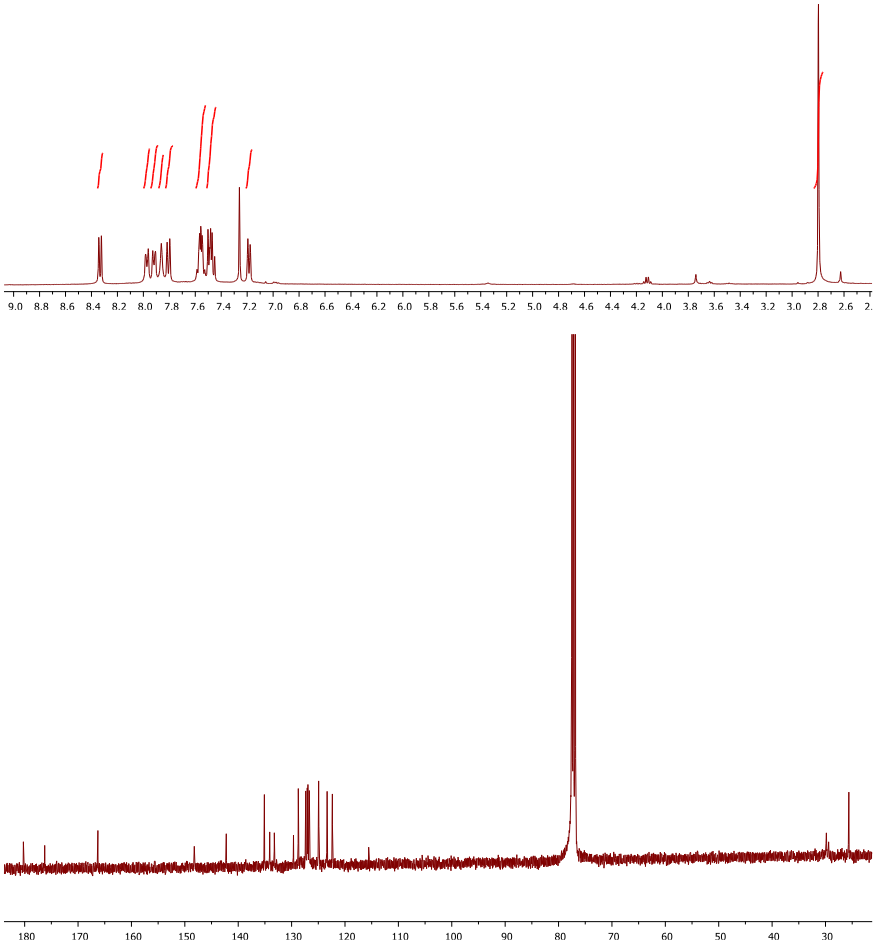




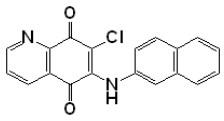
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **41e**.



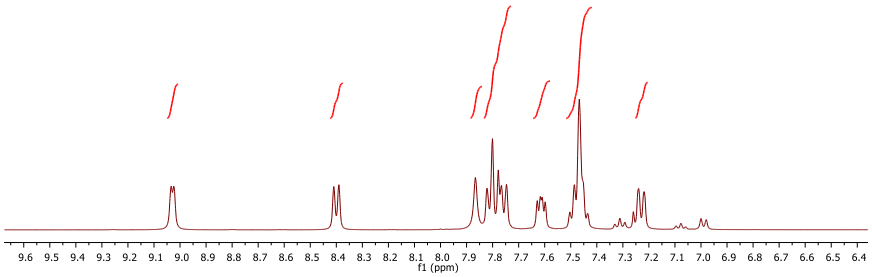
41e

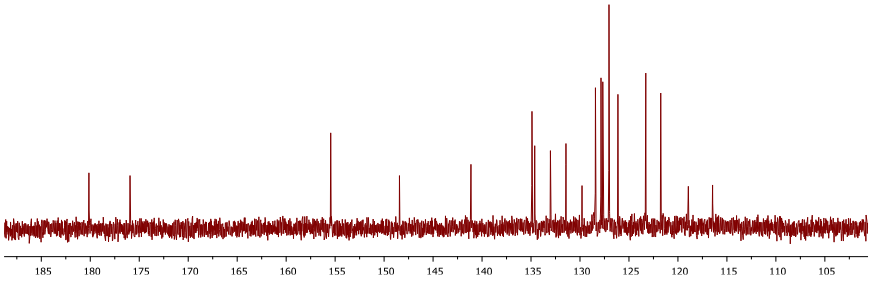


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **41f**.

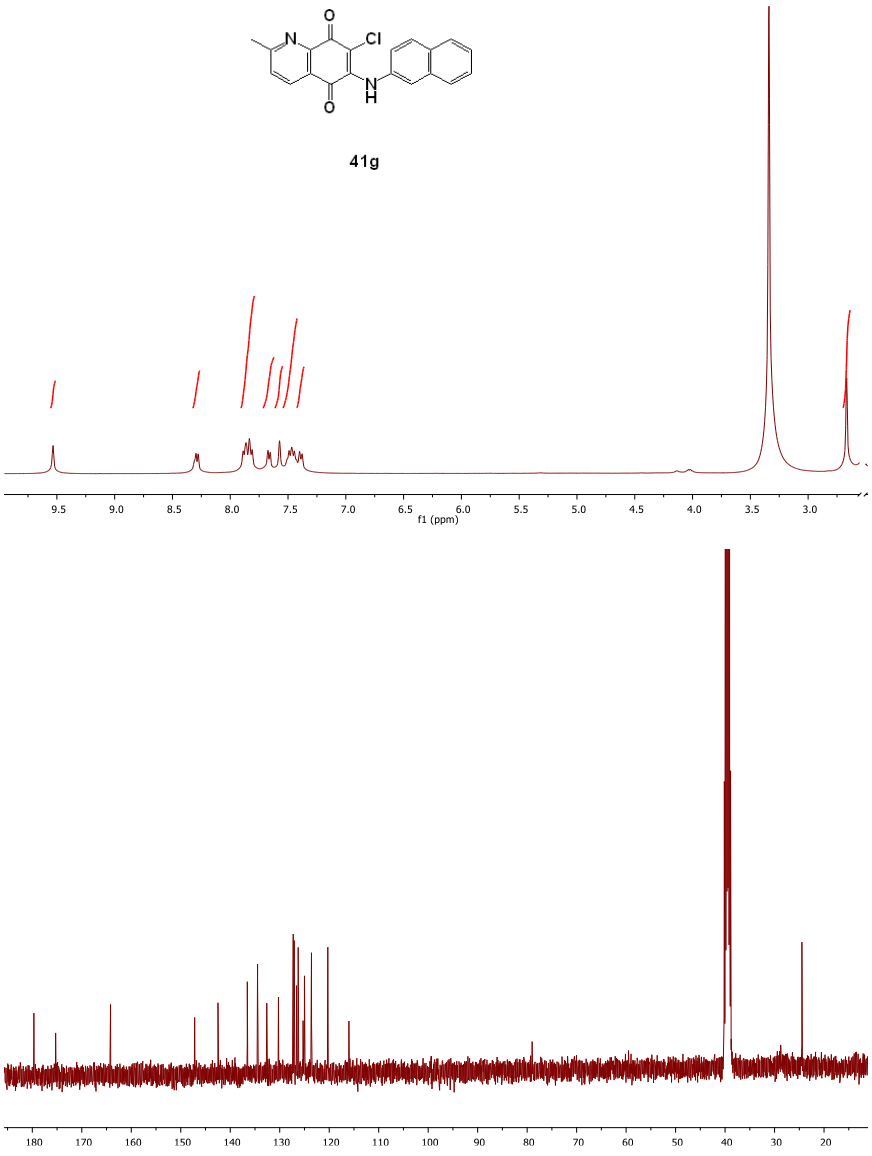


41f

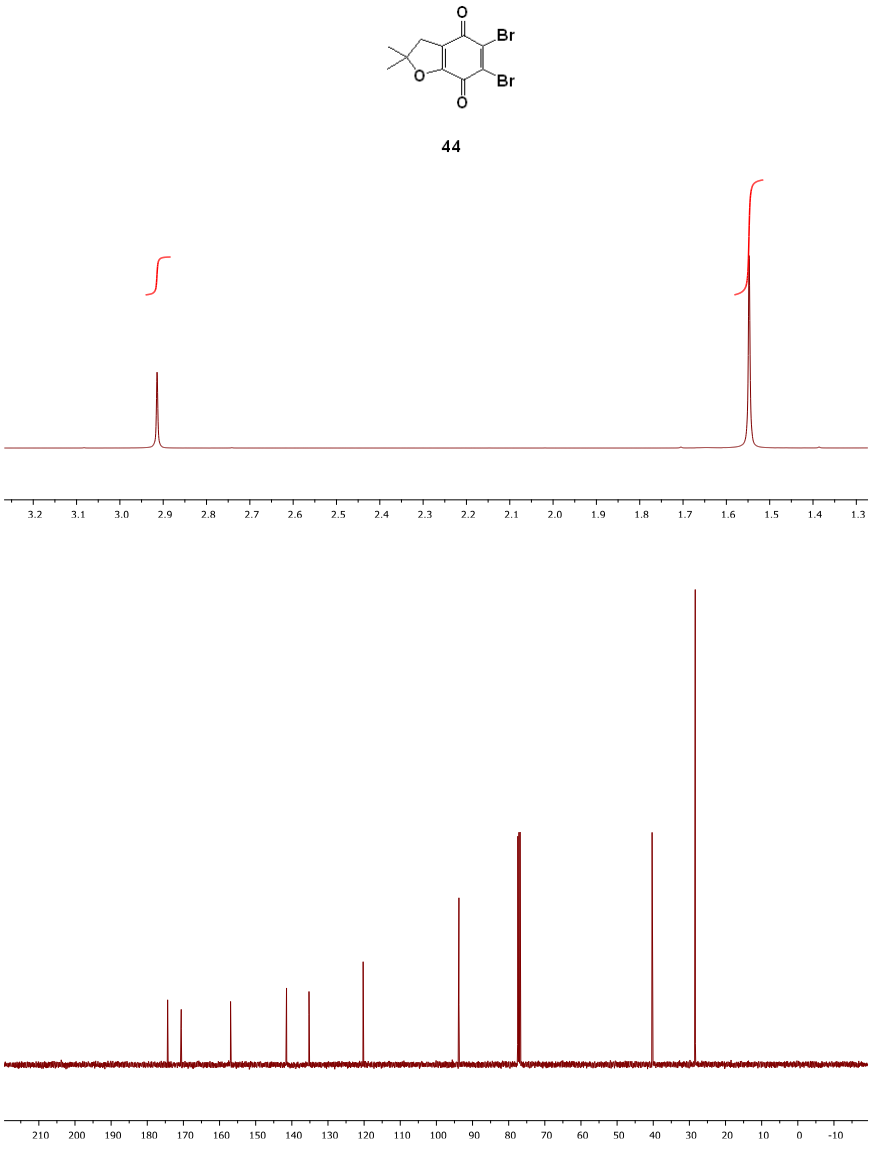




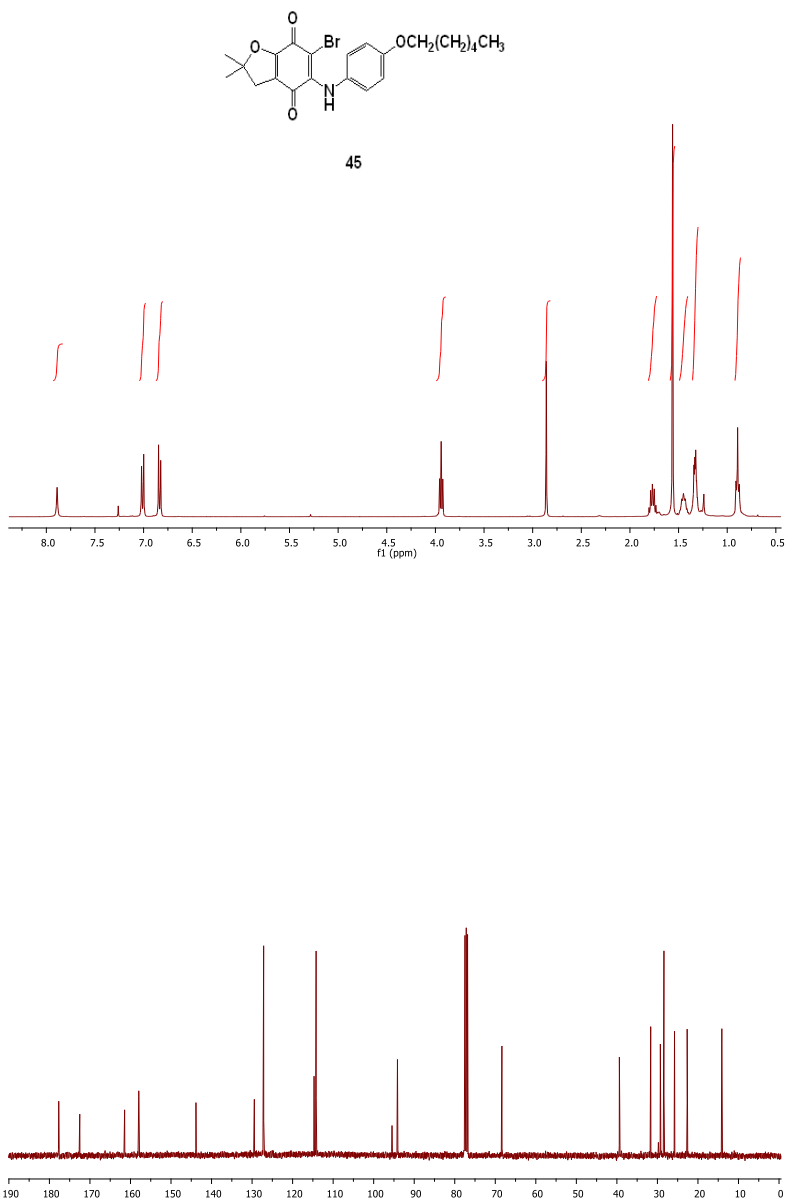
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **41g**.



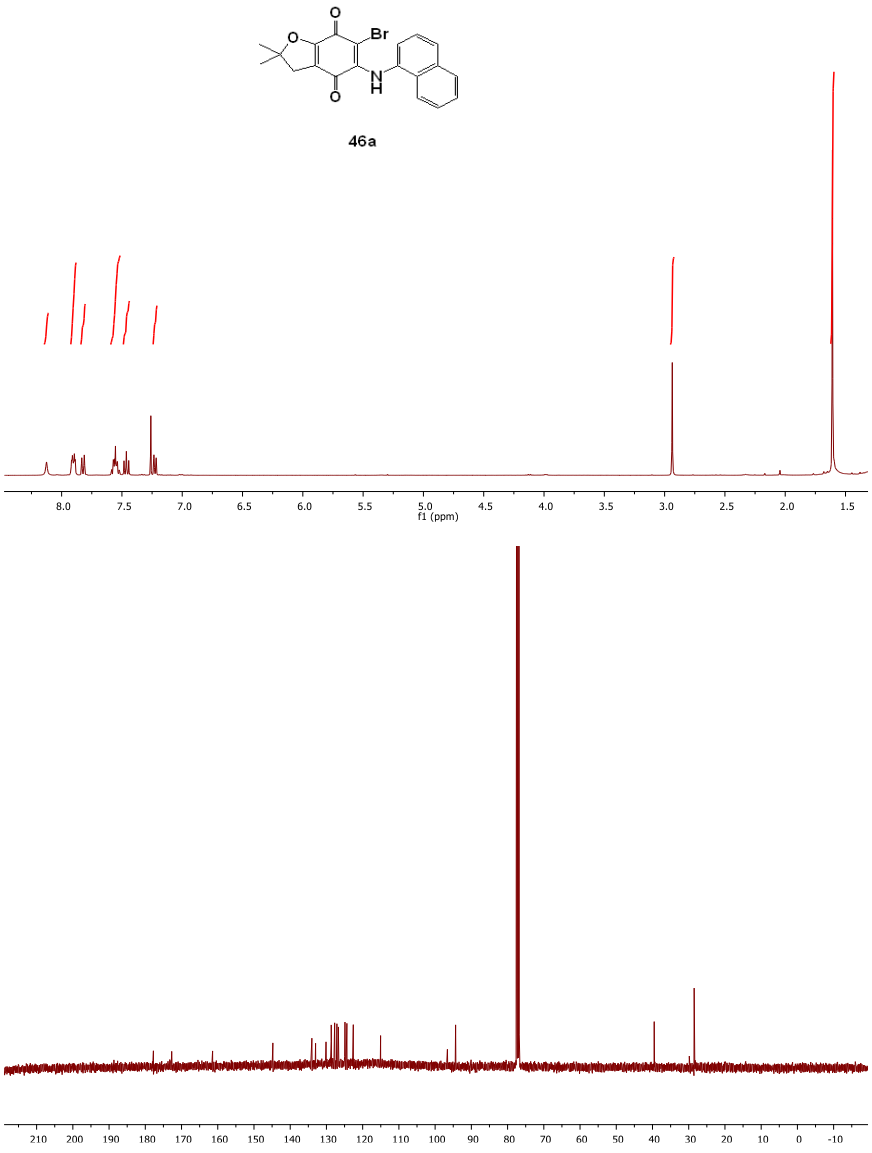
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **44**.



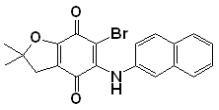
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **45**.



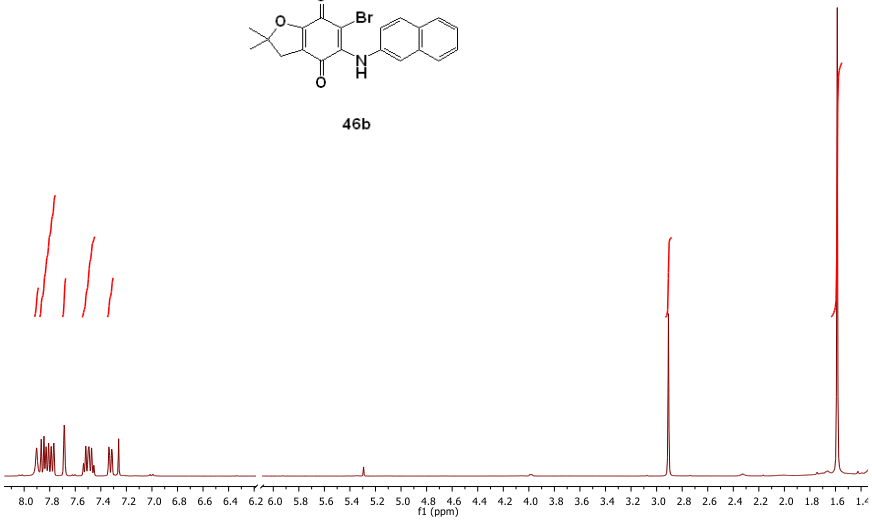
RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **46a**.

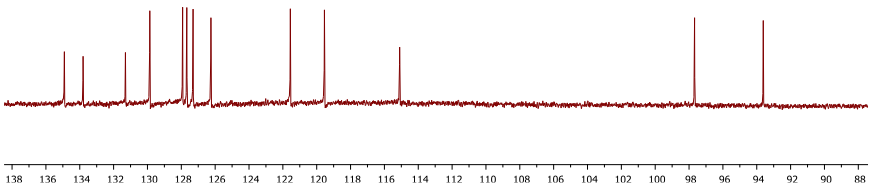


RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **46b**.


O
Br
O
N
H
O

46b


8.0 7.8 7.6 7.4 7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6
f1 (ppm)


138 136 134 132 130 128 126 124 122 120 118 116 114 112 110 108 106 104 102 100 98 96 94 92 90 88