



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

Diseño y síntesis de pseudo productos naturales mediante reacciones multicomponentes: una estrategia para el descubrimiento de compuestos potencialmente bioactivos

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires, área Química Orgánica

Lic. Agustín Galilea

Director de Tesis: Dr. Javier A. Ramírez

Director Adjunto de Tesis: Dra. Sofia Lorena Acebedo

Consejero de Estudios: Dra. María L. Uhrig

Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Fecha de defensa: Buenos Aires, 11/2025

Resumen

En la búsqueda de nuevas entidades químicas con propiedades terapéuticas, los productos naturales han desempeñado un papel fundamental como fuente de nuevos fármacos. Sin embargo, este enfoque presenta limitaciones, como la dificultad para obtenerlos de manera sostenible y su escasez en la naturaleza, lo que restringe su disponibilidad para aplicaciones terapéuticas directas.

Frente a estos desafíos, esta tesis explora la viabilidad de diseñar y sintetizar pseudo productos naturales (pPNs), compuestos sintéticos que imitan las características estructurales y propiedades fisicoquímicas de los productos naturales, utilizando reacciones multicomponentes. Esta estrategia busca replicar la complejidad y diversidad de los productos naturales mediante un enfoque sintético eficiente.

El trabajo se centró en el desarrollo de métodos para la síntesis de bibliotecas de compuestos basadas en el enfoque de Síntesis Orientada a la Biología (BIOS), que aprovecha los *scaffolds* químicos presentes en los productos naturales, estructuras que han sido seleccionadas evolutivamente. Mediante técnicas de quimioinformática, se analizó la relevancia biológica de los compuestos sintetizados, comparando sus propiedades estructurales y funcionales con las de los productos naturales, con el objetivo de maximizar su potencial terapéutico.

Además, se empleó la reacción Ugi Split, una reacción multicomponente poco explorada, como paso clave en la síntesis de los compuestos. Estos fueron evaluados en ensayos fenotípicos basados en cultivos celulares para determinar su bioactividad.

Los resultados indican que los pPNs diseñados no solo ocupan una región poco explorada del espacio químico, sino que también exhiben perfiles de actividad prometedores en distintos ensayos de bioactividad. En conclusión, este estudio demuestra que la combinación de BIOS, quimioinformática y reacciones multicomponentes constituye una estrategia robusta y eficiente para el desarrollo de nuevos compuestos con potencial para impactar positivamente en el descubrimiento de moléculas orgánicas biológicamente relevantes.

Design and synthesis of pseudo-natural products using multicomponent reactions: a strategy for the discovery of potentially bioactive compounds

Abstract

In the search for new chemical entities with therapeutic properties, natural products have historically played a fundamental role as a source of new drugs. However, this approach faces challenges such as the difficulty of sustainable procurement and their scarcity in nature, which limits their availability for direct therapeutic applications.

To address these challenges, this thesis explores the feasibility of designing and synthesizing pseudo-natural products (pNPs), synthetic compounds that mimic the structural features and physicochemical properties of natural products using multicomponent reactions. This strategy seeks to replicate the complexity and diversity of natural products through an efficient synthetic approach.

The work focused on developing methods for synthesizing compound libraries based on the Biology-Oriented Synthesis (BIOS) approach, which leverages chemical scaffolds present in natural products—structures that have been selected through evolution. Using chemoinformatics techniques, the biological relevance of the synthesized compounds was analyzed by comparing their structural and functional properties with those of natural products, aiming to maximize their therapeutic potential.

Additionally, the Split Ugi reaction, an underexplored multicomponent reaction, was employed as a key step in the synthesis of these compounds, which were evaluated in phenotypic assays based on cell cultures to assess their bioactivity.

The results indicate that the designed pNPs not only occupy a previously unexplored region of chemical space but also exhibit promising activity profiles in various bioactivity assays. In conclusion, this study demonstrates that combining BIOS, chemoinformatics, and multicomponent reactions is a robust and efficient strategy for developing new compounds with the potential to significantly impact the discovery of biologically relevant organic molecules.

Agradecimientos

Este trabajo no habría podido concretarse sin el apoyo de tantas personas que, desde distintos ámbitos, me acompañaron en este recorrido. A cada una de ellas, quiero expresarles mi agradecimiento.

En primer lugar, al equipo del Laboratorio 10 y DQO, espacio que se convirtió en mi segunda casa durante muchos años. A Javier, mi director, gracias por brindarme la oportunidad de sumarme a este proyecto y por tu orientación constante, tanto en lo personal como en lo laboral. A Lore, mi codirectora, por tu paciencia infinita y tu capacidad para transmitir calma cuando parecía que no había. A Mati, por los infinitos litros de mate, charlas y chismecitos compartidos. A Ceci, por estar siempre, por tu compañía y tu apoyo incondicional en los momentos más desafiantes. A Gabi y Paula, colegas, con quienes las discusiones se transformaban en aprendizajes y en nuevas perspectivas que enriquecieron este trabajo.

A Gonza, mi compañero, gracias por tu paciencia y por tu apoyo constante, por ser ese cable a tierra que me sostuvo en los momentos no tan brillantes y por acompañarme en cada paso de este proceso.

A mi familia, por su amor, su confianza y su apoyo inquebrantable en mí. Sus palabras de aliento incondicional fueron fundamentales para llegar hasta este punto.

A mis amigos, gracias por los momentos compartidos, por la risa y la complicidad, y también por ayudarme a desconectar cuando más lo necesitaba.

Finalmente, a las instituciones que hicieron posible esta tesis: a la Universidad de Buenos Aires, por la educación pública que me formó y me permitió transitar este camino, y a CONICET, por la beca otorgada y el respaldo que significó para el desarrollo de esta investigación.

A todos, gracias de corazón.

Contenido

CAPÍTULO 1: Introducción	7
La búsqueda de compuestos orgánicos con actividad biológica	7
La conexión entre la química sintética y los productos naturales	8
El problema de la relevancia biológica	10
Derivados semisintéticos: casos destacados	11
Diseño <i>de novo</i> : libertad estructural y retos de relevancia biológica	13
Pseudo productos naturales (pPNs): concepto y alcances	15
Péptidos naturales como punto de partida bioactivo	18
Lipopéptidos naturales: diversidad estructural y funcional	20
De la inspiración natural al diseño funcional <i>de novo</i>	22
Expansión del diseño funcional: nuestro trabajo de 2012.....	23
Criterios y herramientas para evaluar relevancia biológica	24
Ensayos fenotípicos como vía de descubrimiento bioactivo.....	25
Sinopsis de este trabajo de tesis.....	27
Referencias.....	28
CAPÍTULO 2: Diseño de Pseudo Productos Naturales	37
El problema de la similitud y la diversidad en Química	37
Definición y alcance de la quimioinformática	38
Análisis exploratorio de datos: Análisis de Componentes Principales (PCA)	41
Caracterización de colecciones moleculares mediante PCA	42
Identificando diferencias clave: El Análisis Discriminante Lineal (LDA).....	50
Evaluación de la “naturalidad”: <i>NP-likeness score</i>	54
Hacia una definición cuantitativa del concepto de pseudo producto natural	56
Referencias.....	57
CAPÍTULO 3: Biblioteca PIP1	63
Introducción	63
La reacción multicomponente de Ugi	63
La reacción de Ugi Split como variación atractiva	66
Diseño de la biblioteca a sintetizar.....	68
Selección de los bloques	68
Caracterización y análisis	70

Selección de los compuestos a sintetizar	73
Síntesis.....	77
Preparación de bloques de construcción.....	77
Síntesis de los productos Ugi Split (PIP1)	92
Ensayos biológicos.....	112
Ensayos antifúngicos	113
Ensayos antiproliferativos	115
Ensayos antivirales	118
Referencias.....	127
CAPÍTULO 4: Biblioteca PIP2	135
Introducción	135
Diseño de la nueva biblioteca	138
Preparación de bloques de construcción.....	141
Selección de los nuevos pPNs a sintetizar	161
Caracterización y análisis	165
Síntesis de la biblioteca (PIP2)	167
Ensayos biológicos.....	185
Ensayos antifúngicos	185
Ensayos antiproliferativos	187
Referencias.....	190
CAPÍTULO 5: Biblioteca CIC	195
Introducción	195
Síntesis.....	198
Preparación de bloques de construcción.....	198
Síntesis de los productos Ugi Split (CIC)	204
Clivaje de los distintos grupos protectores	210
Caracterización de los compuestos como potenciales pPNs.....	217
Ensayos biológicos.....	226
Ensayos antifúngicos	226
Ensayos antiproliferativos	228
Referencias.....	231

CAPÍTULO 6: Discusión General	239
La Síntesis Orgánica como Productora de Propiedades: El Paradigma de Hammond y el Propósito de la Síntesis	239
Marco de Análisis para las Bibliotecas de la Presente Tesis: El Paisaje Químico Interno	239
El Paisaje Químico Externo: Posicionamiento de los pPNs en el Contexto Global ..	244
Hacia una Definición Cuantitativa y Unificada del Concepto de pPN	251
Implicancias Metodológicas y Posicionamiento de la Estrategia de la Tesis	253
Conclusiones y perspectivas futuras	259
Referencias.....	262
CAPÍTULO 7: Sección Experimental	267
Síntesis y caracterización de compuestos orgánicos	267
Consideraciones sintéticas generales y métodos de elucidación estructural.....	267
Técnicas sintéticas experimentales y caracterización de los compuestos obtenidos en el Capítulo 3	268
Técnicas sintéticas experimentales y caracterización de los compuestos obtenidos en el Capítulo 4	308
Técnicas sintéticas experimentales y caracterización de los compuestos obtenidos en el Capítulo 5	348
Análisis quimioinformático	366
Preparación de las bases de datos	366
Cálculo de los descriptores moleculares.....	366
Construcción de bibliotecas virtuales	368
Análisis exploratorio y reducción de dimensionalidad	368
Análisis supervisado y clasificación	368
Visualización de agrupamientos.....	368
Medidas de similitud con productos naturales.....	369
Selección racional de subconjuntos.....	369
Ensayos de actividad.....	369
Ensayos antifúngicos	369
Ensayos antiproliferativos	370
Ensayos antivirales	372
Referencias.....	373

Capítulo 1

Introducción

CAPÍTULO 1: Introducción

La búsqueda de compuestos orgánicos con actividad biológica

Desde tiempos remotos, las sociedades humanas han recurrido a una amplia variedad de preparaciones naturales para tratar dolencias comunes. Estos procedimientos incluían la elaboración de infusiones, ungüentos, bálsamos, cataplasmas o extractos crudos obtenidos a partir de plantas, minerales o productos animales. Si bien carecían de un conocimiento sistemático sobre la composición de estas sustancias, muchas culturas desarrollaron, por medio del ensayo y error, formas empíricas de seleccionar y aplicar estos recursos.

Al tratarse de preparaciones de origen natural, éstas contenían una mezcla compleja y variable de sustancias químicas y el riesgo de efectos secundarios no deseados era alto: es interesante notar que los griegos utilizaban el término “pharmakon” para describir tanto un medicamento como un veneno. La información sobre estos medicamentos antiguos no estuvo disponible en forma masiva hasta la introducción de la imprenta en el Siglo XV, lo que llevó a la publicación de herbarios y farmacopeas que propiciaron el uso, y el mal uso, de estos remedios entre los médicos de la época. Ocurrió entonces un proceso donde se fueron seleccionando progresivamente los tratamientos benéficos, y abandonando los ineficientes o incluso dañinos. En ese sentido se tiene el caso del emético tártaro (tartrato de potasio y antimonio), que causó tantas intoxicaciones que obligó al Parlamento de París a prohibir su uso en 1566, lo que probablemente sea el primer caso registrado de una regulación legal sobre el uso de un medicamento.



Figura 1.1: Durante milenios la Humanidad utilizó plantas medicinales para tratar distintas dolencias.

Un punto de inflexión se produjo a principios del siglo XIX con el desarrollo de nuevas técnicas de extracción y purificación, que permitieron aislar principios activos en forma pura a partir de fuentes naturales. El caso paradigmático fue el aislamiento de la morfina

por Sertürner en 1805, que marcó el inicio de una era donde los medicamentos podían administrarse como compuestos individuales con efectos definidos. Este avance consolidó a los productos naturales (PNs) como una vertiente central en la farmacología moderna.

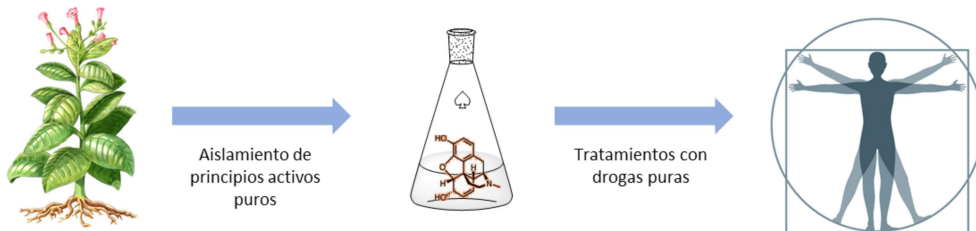


Figura 1.2: En los últimos dos siglos comenzaron a utilizarse compuestos químicos, naturales y sintéticos, como medicinas.

Paralelamente, otro desarrollo decisivo se produjo con la consolidación de la Química Orgánica Sintética como disciplina. La síntesis del hidrato de cloral por Liebig, del ácido barbitúrico por Bayer y la posterior producción de aspirina por la empresa Bayer abrieron una segunda vertiente: la posibilidad de generar compuestos medicinales por vía sintética, sin necesidad de extraerlos de fuentes naturales.

Estos desarrollos marcaron el inicio de la era de la industria farmacéutica. Para 1910, Paul Ehrlich y su grupo comenzaron a desarrollar arsfenamina a base de arsénico (Salvarsan), como el primer tratamiento medicinal efectivo para la sífilis, y de ese modo iniciaron la práctica médica de la quimioterapia. Para la misma época, John Langley formuló su teoría sobre las sustancias receptoras, que serían compuestos presentes en el organismo que al aceptar un compuesto estimulante pueden provocar una respuesta biológica. Estas ideas fueron el germen del concepto de receptor biológico, uno de los pilares fundamentales de la Química Medicinal actual.^{1,2}

La conexión entre la química sintética y los productos naturales

Este proceso no avanzó de manera dicotómica, sino que con el tiempo fue emergiendo un espacio intermedio, más complejo, en el que se interconectaron distintas estrategias provenientes de la química sintética y de la farmacognosia. A medida que la química orgánica avanzaba, los PNs dejaron de ser simplemente extraídos o utilizados como tales, para convertirse en puntos de partida estructurales para el diseño de nuevas entidades

químicas. Muchas drogas se sintetizaron completamente en laboratorio, pero partiendo de motivos estructurales identificados en PNs.³ Así, este enfoque permitió combinar la validación biológica que aporta la evolución natural con la flexibilidad y escalabilidad que ofrece la síntesis.

En este sentido, un análisis detallado de los nuevos medicamentos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) entre 1981 y 2019 reveló que el 34% de los medicamentos que se basaban en pequeñas moléculas eran PNs o derivados directos de PNs, incluidas las estatinas, varios anticancerígenos y muchos inmunosupresores.⁴

Esta contribución relativa de los PNs parece impresionante, especialmente en un contexto de disminución del interés por parte de las principales compañías farmacéuticas en buscar nuevos compuestos activos entre los PNs. Esta situación está motivada por varias razones: por un lado, existen preocupaciones legales derivadas de la Convención de las Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica que busca regular el acceso internacional a los PNs.⁵⁻⁷ Otra creencia generalizada es que los PNs son de alguna manera incompatibles con los enfoques de descubrimiento de fármacos modernos, particularmente aquellos dirigidos a blancos moleculares.

A todo esto, se suma que, si bien es cierto que los PNs están disponibles en la naturaleza, y que están esperando a ser descubiertos, encontrarlos y aislarlos suele resultar muy complejo. En primer lugar, acceder a la muestra biológica en cuestión puede ser en sí misma una tarea difícil, ya que la fuente podría localizarse en un ambiente remoto, dificultando su recolección. Luego surge el problema de encontrar cantidades suficientes del material biológico que provea la cantidad necesaria del compuesto, puesto que éste se encuentra generalmente a nivel de trazas. Y finalmente, aislarlo y caracterizarlo, lo que implica un costo altísimo en cuanto a tiempo de trabajo y equipamientos, ya que se requieren de sucesivos pasos de extracción, técnicas cromatográficas avanzadas y un análisis exhaustivo para elucidar estructuras.

Estas objeciones que frenaron la búsqueda de nuevos PNs se potenciaron con la expectativa, aún no cumplida, de que las técnicas de síntesis química combinatoria podrían proporcionar todos los compuestos nuevos necesarios para el descubrimiento exitoso de moléculas líderes. Actualmente las empresas farmacéuticas son propietarias de colecciones de compuestos sintéticos cuyo número puede llegar a varios millones, pero aun así en la práctica los resultados han sido decepcionantes. Sólo algunos pocos de ellos

han llegado a originar drogas útiles, como por ejemplo el sorafenib, desarrollado por Bayer y aprobado para el tratamiento de cáncer hepático y renal.⁸

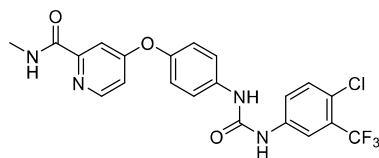


Figura 1.3: Estructura del sorafenib, uno de los escasos medicamentos descubierto mediante estrategias de química combinatoria.

Numerosos estudios retrospectivos revelaron una limitación crítica intrínseca a la mayoría de los compuestos generados por química combinatoria: estos resultan estructuralmente simples y carentes de propiedades emergentes clave para la bioactividad.⁹ El caso del sorafenib, uno de los pocos éxitos atribuidos a esta estrategia, es la excepción más que la regla. Se hizo evidente que la generación masiva de compuestos sintéticos no era suficiente si no estaban guiados por principios funcionales compatibles con sistemas biológicos.¹⁰

Hoy en día se reconoce que la **relevancia biológica** de una colección de moléculas es más importante que el tamaño de la biblioteca a investigar.

El problema de la relevancia biológica

El concepto de relevancia biológica remite, en términos generales, a la capacidad de una molécula para interactuar de manera eficaz con componentes de sistemas biológicos — enzimas, receptores, canales, estructuras celulares— y desencadenar una respuesta funcional. No se trata únicamente de afinidad o potencia, sino de una compatibilidad global entre las propiedades químicas de un compuesto y el entorno biológico en el que debe actuar. Factores como la estructura tridimensional, la densidad de grupos funcionales, la polaridad, la flexibilidad estructural, e incluso la capacidad de atravesar membranas o resistir la degradación metabólica, influyen en esa relevancia. Desde una perspectiva evolutiva, los PNs tienden a poseer este tipo de compatibilidad porque han sido seleccionados para cumplir funciones específicas en organismos vivos. En cambio, muchas moléculas diseñadas exclusivamente en función de criterios estructurales o

sintéticos, sin una referencia funcional, pueden carecer de esa pertinencia biológica, por más novedosas que resulten desde el punto de vista químico.

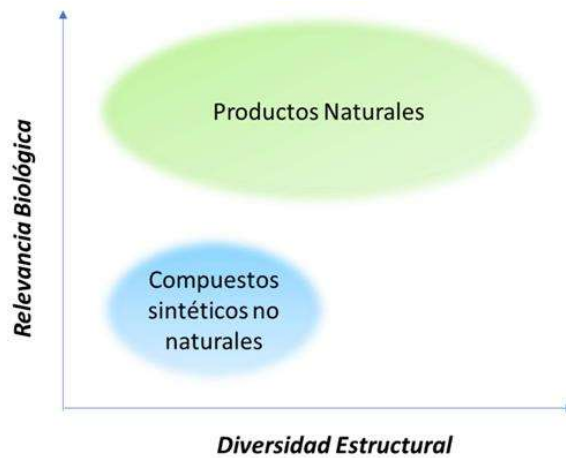


Figura 1.4: Actualmente contamos con bibliotecas de millones de compuestos orgánicos sintéticos no naturales. Sin embargo, su alcance como fuente de moléculas con actividad biológica está acotado por la diversidad química y la relevancia biológica de sus miembros.

La vía históricamente consolidada para asegurar relevancia biológica en nuevas entidades químicas ha sido la modificación química de PNs accesibles. Cuando un compuesto natural puede obtenerse en cantidad suficiente —por extracción, fermentación o síntesis parcial—, su derivatización permite ajustar o mejorar propiedades farmacológicas sin perder la arquitectura general responsable de su bioactividad.

Este enfoque ha dado lugar a numerosas clases de fármacos y sigue siendo altamente productivo en contextos donde el esqueleto natural es difícil de mejorar desde cero. Si bien no constituye una innovación radical, representa una forma eficiente de conservar la relevancia biológica, al tiempo que se adapta la molécula a las exigencias de la farmacología moderna: estabilidad metabólica, solubilidad, biodisponibilidad, o reducción de efectos adversos.

Derivados semisintéticos: casos destacados

Un ejemplo clásico de esta estrategia es el caso del paclitaxel (Taxol), un alcaloide diterpénico aislado originalmente de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*).¹¹ El paclitaxel actúa como un agente antimitótico: estabiliza los microtúbulos e impide su despolimerización, bloqueando así la progresión del ciclo celular y provocando la muerte

de células en división.¹² Debido a su complejidad estructural, su síntesis total era muy limitada, lo que llevó al desarrollo de variantes semisintéticas como el docetaxel, producidas a partir de precursores obtenidos de otras especies de tejo más accesibles. El docetaxel conserva el mismo mecanismo de acción, pero presenta una mayor solubilidad y un perfil farmacocinético optimizado, lo que lo hace clínicamente más manejable.¹³ Actualmente se utiliza en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, de próstata y de pulmón no microcítico.

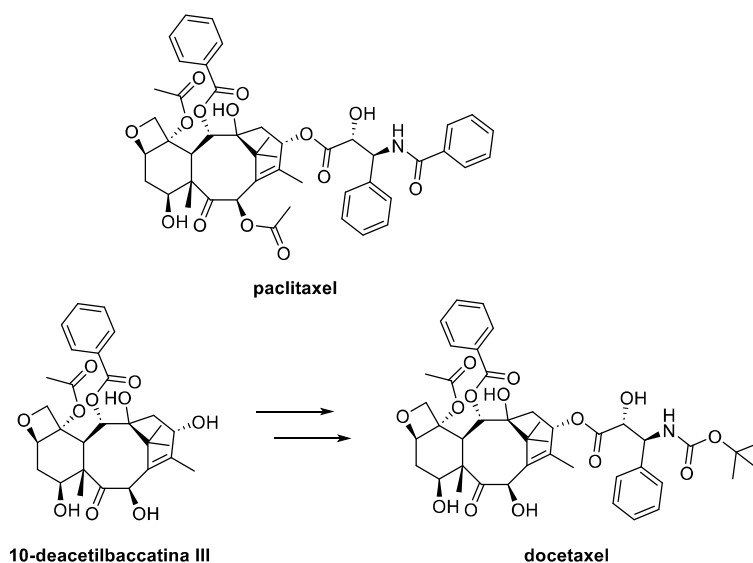


Figura 1.5: Estructuras del paclitaxel, un producto natural con actividad anticancerígena, y de su análogo semisintético docetaxel, obtenido a partir de 10-deacetilbaicatin III, un precursor natural más accesible extraído de *Taxus baccata*.

Un caso más reciente que ilustra la vigencia de esta estrategia es la omaveloxolona (comercializada como Skyclarys), un triterpenoide semisintético aprobado por la FDA en 2023 para el tratamiento de la ataxia de Friedreich, una enfermedad neurodegenerativa mitocondrial poco frecuente.¹⁴ Derivado del ácido oleanólico, un triterpeno natural ampliamente distribuido en plantas, la omaveloxolona fue desarrollada mediante una estrategia de semisíntesis dirigida a optimizar propiedades farmacológicas clave. Su mecanismo de acción se basa en la activación del factor de transcripción Nrf2 y la inhibición de NF- κ B, lo que resulta en una mejora de la función mitocondrial, reducción del estrés oxidativo y efectos antiinflamatorios.¹⁵ A pesar de la complejidad estructural de los triterpenos y las dificultades asociadas a su modificación química, avances recientes en biología sintética y comprensión de las rutas biosintéticas han permitido desarrollar variantes funcionales como la omaveloxolona. Su aprobación marca un hito dentro de los

triterpenos clínicamente útiles¹⁶ y demuestra el potencial de intervenir sobre esqueletos naturales complejos mediante modificaciones racionales, preservando la relevancia biológica e introduciendo mejoras terapéuticas significativas.

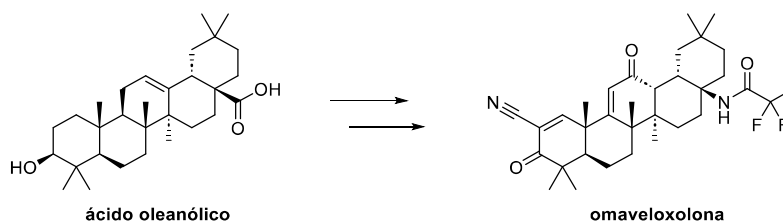


Figura 1.6: Estructura de la omaveloxolona, fármaco aprobado para el tratamiento de la ataxia de Friedreich, y de su precursor natural ácido oleanólico, un triterpeno vegetal abundante.

En conjunto, esta estrategia clásica de búsqueda basada en la modificación de PNs explica en gran medida por qué una proporción significativa de los fármacos aprobados en las últimas décadas —incluidos antibióticos, antitumorales, inmunosupresores y antiparasitarios— siguen siendo PNs modificados o derivados directos. Su éxito radica en que parten de estructuras validadas, seleccionadas evolutivamente, sobre las cuales la química moderna puede operar con precisión para optimizar la acción terapéutica sin perder el núcleo funcional de la molécula original.

Diseño *de novo*: libertad estructural y retos de relevancia biológica

En marcado contraste con las estrategias que parten de estructuras naturales preexistentes, una vía alternativa es el diseño *de novo*, que propone construir nuevas moléculas desde cero, sin depender de esqueletos biológicos ya disponibles. Este enfoque busca optimizar propiedades deseadas —como la actividad biológica, la solubilidad o la estabilidad— mediante la combinación de fragmentos estructurales y la aplicación de reacciones químicas definidas. Dentro de este marco se distinguen dos estrategias complementarias: por un lado, el diseño ***de novo* basado en fragmentos**, que implica ensamblar bloques moleculares diversos en nuevas disposiciones arquitectónicas; y por otro, el diseño **basado en reacciones**, que se centra en transformaciones químicas conocidas para generar estructuras inéditas con criterios de factibilidad sintética.^{17,18}

Este tipo de diseño intenta incorporar la relevancia biológica mediante información funcional obtenida a partir de bases de datos, herramientas computacionales y modelos

de inteligencia artificial. La idea es guiar la generación estructural con datos biológicos previos, ya sea a través del entrenamiento de modelos sobre bibliotecas de compuestos bioactivos, la aplicación de filtros basados en *docking* molecular, o la selección de candidatos por su similitud con compuestos conocidos.

Un ejemplo representativo de esta estrategia es el trabajo de Merk *et al.* quienes llevaron adelante un diseño *de novo* orientado a identificar nuevos ligandos para los receptores nucleares RXR y PPAR.¹⁹ El punto de partida fue la actividad conocida de distintos PNs, como el ácido valerénico, con efecto agonista parcial sobre RXR β . A partir de esas estructuras se utilizó la herramienta DOGS (*Design of Genuine Structures*) para generar compuestos nuevos químicamente accesibles. DOGS construye moléculas *de novo* combinando bloques de construcción reales mediante un conjunto definido de reacciones químicas codificadas, lo que asegura que cada estructura propuesta tenga una ruta sintética plausible.²⁰

Los compuestos generados fueron evaluados mediante SPiDER (*Self-organizing map-based Prediction of Drug Equivalence Relationships*), una herramienta que predice la afinidad de moléculas hacia blancos moleculares conocidos basándose en descriptores farmacofóricos y propiedades globales, sin requerir alta similitud estructural directa.²¹ Esta etapa permitió identificar aquellos candidatos cuya distribución de propiedades indicaba una afinidad potencial hacia RXR y PPAR, aún en ausencia de homología clara con los ligandos originales.

A partir de esta combinación de generación estructural y filtrado funcional, se seleccionaron cinco compuestos para síntesis, cuatro de los cuales mostraron actividad biológica significativa *in vitro* sobre los receptores RXR. El estudio constituye una validación clara del diseño *de novo* que combina inspiración en PNs, reglas sintéticas explícitas y predicción de blancos macromoleculares.

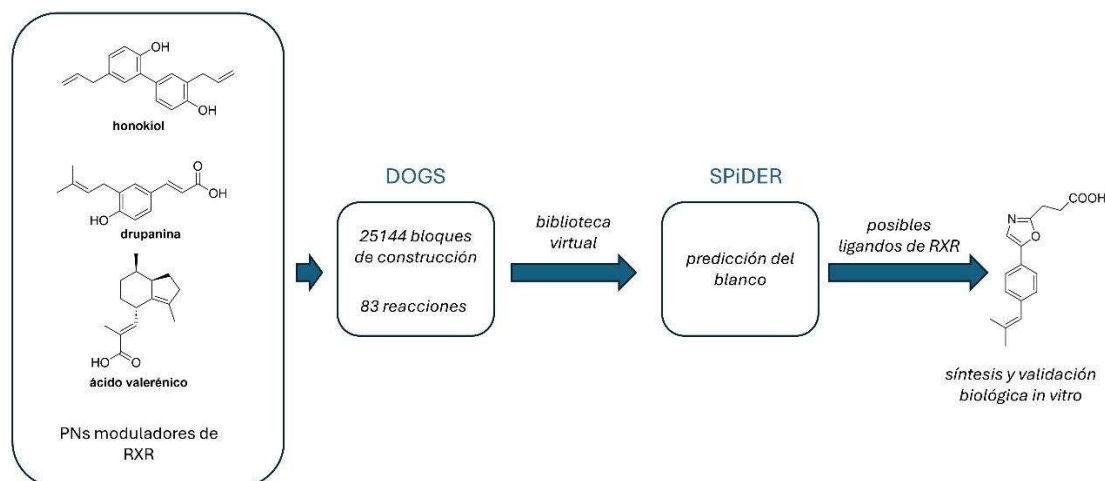


Figura 1.7: Diseño de novo de moduladores del receptor RXR.

A diferencia de la modificación de PNs—donde la estructura base ya está optimizada por evolución—, el diseño *de novo* parte de una libertad estructural mucho mayor, pero enfrenta el desafío de generar relevancia biológica a partir de principios abstractos o inferidos. Esta diferencia subraya la importancia de contar con criterios robustos que permitan orientar esa libertad hacia moléculas no solo nuevas, sino también biológicamente interesantes.

Pseudo productos naturales (pPNs): concepto y alcances

En la última década, se observó que la diversidad del espacio estructural de los PNs está limitada por las rutas biosintéticas conservadas en organismos vivos, resultado de la selección natural.

Una formulación reciente, enmarcada explícitamente dentro del diseño *de novo*, ha sido propuesta por el grupo de Herbert Waldmann. En contraste con aquellas estrategias que generan moléculas inéditas a partir de principios estructurales abstractos—incluyendo reglas combinatorias, algoritmos evolutivos o modelos generativos— sin incorporar información biológica directa, este enfoque propone la creación de nuevas arquitecturas moleculares mediante la recombinación sintética de fragmentos estructurales derivados de PNs. Waldmann propuso que, al combinar químicamente dos fragmentos de PNs biosintéticamente no relacionados, es posible crear nuevas clases de compuestos con

relevancia biológica que exploran un espacio químico y biológico novedoso. Los compuestos resultantes se conocen como **pseudo productos naturales (pPNs)**.^{22,23}

Esta estrategia parte del supuesto de que muchos PNs han sido moldeados por la evolución para interactuar eficazmente con blancos biológicos, por lo que sus subestructuras conservan elementos críticos para el reconocimiento molecular, incluso fuera del contexto original. Así, el diseño de pPNs no reproduce estructuras completas ni rutas biosintéticas conocidas, sino que explora regiones del espacio químico biológicamente relevante pero aún inexplorado, integrando libertad estructural con anclaje bioinspirado.^{24,25}

En este sentido, los pPNs buscan ir más allá de la réplica de estructuras naturales: el objetivo no es copiar, sino reorganizar creativamente los componentes generados en la biosíntesis para acceder a nuevas funciones y mecanismos de acción. Como ha señalado el propio Waldmann, este tipo de diseño tiene el potencial de cubrir áreas del espacio químico biológicamente relevante que no están exploradas ni por los PNs ni por las bibliotecas sintéticas tradicionales.

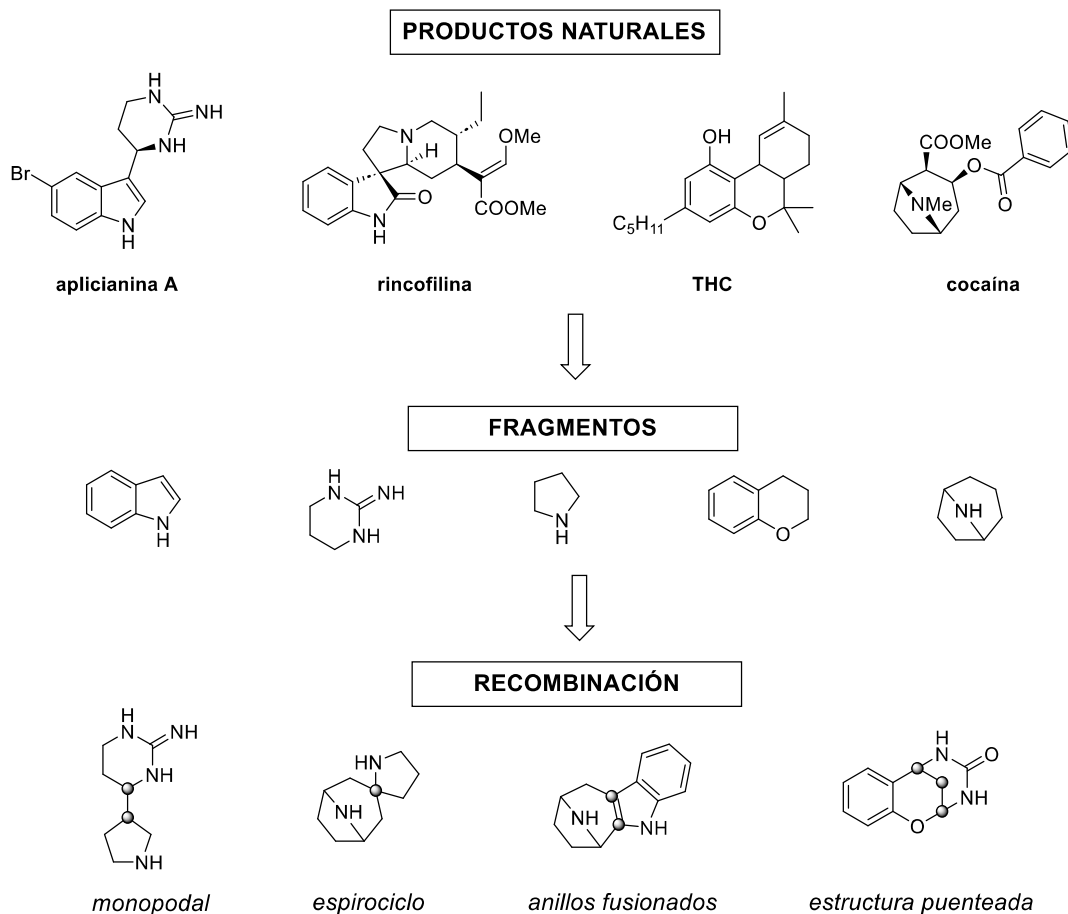


Figura 1.8: Diseño de los pseudo productos naturales (pPNs).

A modo de ejemplo, puede discutirse brevemente el caso de la síntesis de estructuras puenteadas bautizadas como “cromopinonas”, las cuales se forman conceptualmente mediante la combinación de fragmentos de cromano y tetrahidropirimidinona (THPM), no relacionados biosintéticamente, empleando una reacción de Biginelli seguida de una ciclación intramolecular (Figura 1.9). Estas moléculas fueron sometidas a ensayos celulares *in vitro*, donde se observó una marcada inhibición en la absorción de glucosa en células HCT116 tratadas con la cromopinona 1. Estudios posteriores revelaron que las cromopinonas actúan como inhibidores selectivos de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3, mostrando además capacidad para inhibir el crecimiento de células cancerosas.²⁶

Es importante destacar que ni el cromano ni los fragmentos de THPM presentan actividad hacia los transportadores de glucosa. Este caso ilustra cómo el diseño funcionalmente guiado puede conducir a bioactividades emergentes no previsibles a partir de los fragmentos individuales.

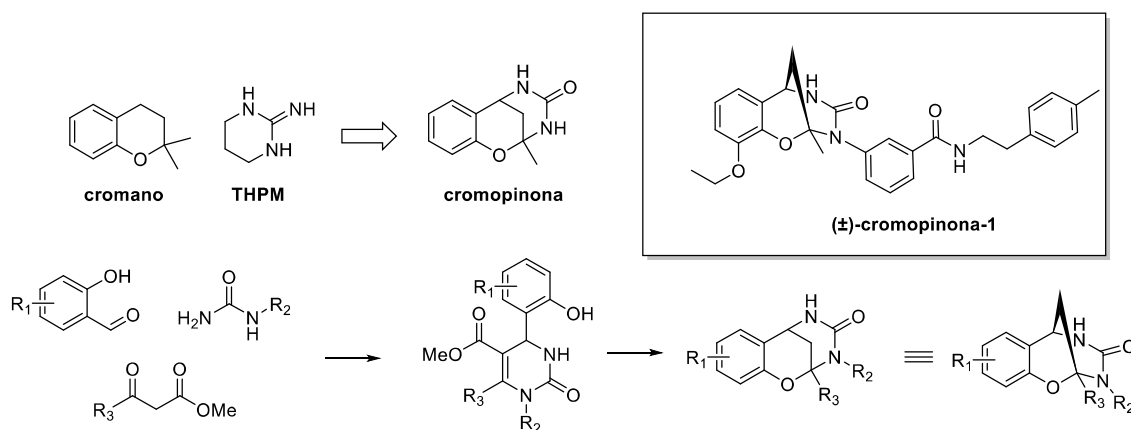


Figura 1.9: Diseño y síntesis multicomponente de cromopinonas.

Uno de los aspectos más atractivos de este enfoque es su compatibilidad con estrategias sintéticas potentes, como las reacciones multicomponente (RMC), que permiten ensamblar arquitecturas complejas de manera eficiente.^{25,27} Estas metodologías facilitan la generación de bibliotecas químicas diversificadas, con variaciones sistemáticas en la conectividad, la orientación espacial o la densidad funcional de los fragmentos empleados.

En conjunto, este enfoque puede considerarse una forma de diseño *de novo* funcionalmente guiado, donde la innovación estructural se equilibra con restricciones

racionales derivadas de la biología. Al hacerlo, los pPNs ofrecen una alternativa conceptual y práctica tanto a la derivatización clásica de compuestos naturales como al diseño generativo sin guía biológica explícita, proponiendo una lógica de diseño que combina inspiración biológica con exploración sintética sistemática.

Estas estrategias, que integran inspiración biológica con herramientas modernas de síntesis y análisis, definen el panorama actual de búsqueda de nuevas entidades bioactivas, y constituyen el marco conceptual dentro del cual se inscribe el presente trabajo.

Péptidos naturales como punto de partida bioactivo

Tanto en las estrategias que implican la modificación de PNs, en el diseño *de novo* orientado por información biológica, como en la construcción de pPNs, el punto de partida debe ser un conjunto de compuestos naturales con actividades biológicas bien caracterizadas. La elección de estos referentes no es arbitraria: estructuras que han demostrado su eficacia en contextos fisiológicos o terapéuticos ofrecen una base funcionalmente validada para el diseño racional de nuevas entidades.²⁸ En este sentido, los péptidos naturales representan una fuente especialmente fértil de inspiración, tanto por su diversidad estructural como por su capacidad de interactuar de forma específica con blancos biológicos. Sus propiedades los convierten en una clase privilegiada de PNs a la hora de diseñar nuevos compuestos bioactivos, y serán un eje central en el trabajo presentado en esta tesis.

Los péptidos naturales están formados por secuencias de aminoácidos de longitud variable, enlazados por enlaces peptídicos, y pueden clasificarse en dos grandes grupos según su origen biosintético: péptidos ribosomales y no ribosomales.

Los péptidos ribosomales son sintetizados, como ocurre con las proteínas, por la maquinaria genética convencional a partir de ARNm. Muchos de ellos cumplen funciones fisiológicas clave en los organismos que los producen, incluyendo el control de procesos hormonales, inmunológicos o metabólicos. Ejemplos representativos incluyen a la insulina, una hormona peptídica fundamental en la regulación de la glucemia, la oxitocina, que participa en funciones reproductivas y las defensinas, péptidos antimicrobianos endógenos que forman parte de la inmunidad innata.

Por otro lado, los péptidos no ribosomales (NRPs) son sintetizados por enzimas multimodulares específicas —las NRPSs (*nonribosomal peptide synthetases*)— que no dependen de la traducción genética tradicional.²⁹ Esta vía biosintética permite la incorporación de aminoácidos no proteinogénicos, modificaciones estructurales complejas (ciclaciones, metilaciones, formación de heterociclos) y combinaciones con otras clases moleculares como ácidos grasos o azúcares. Los NRPs incluyen muchos antibióticos, inmunosupresores y agentes antifúngicos de gran valor clínico, como la ciclosporina A, un potente inmunosupresor usado en trasplantes, los antibióticos gramicidina y daptomicina, y la bleomicina, empleado como agente quimioterapéutico.

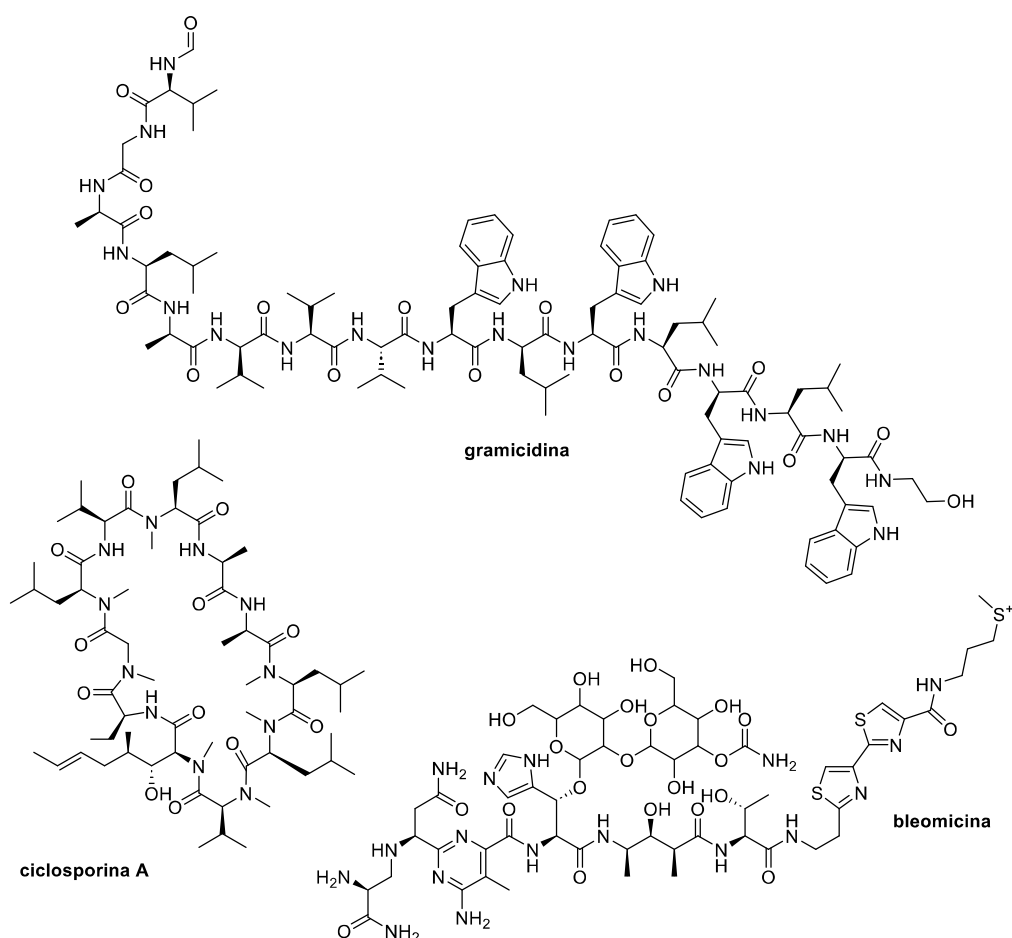


Figura 1.10: Estructuras representativas de péptidos no ribosomales de interés clínico.

La riqueza estructural y funcional de los péptidos naturales ha despertado un interés sostenido en su aplicación terapéutica.^{30,31} Esta clase de compuestos ofrece ventajas importantes como su alta especificidad por blancos biológicos y su baja toxicidad relativa. Sin embargo, también presentan desafíos importantes: muchos péptidos son susceptibles

a degradación proteolítica, poseen baja biodisponibilidad oral y una vida media corta en plasma. Estas limitaciones han motivado múltiples estrategias para optimizar su uso clínico, como la introducción de modificaciones químicas, ciclación, conjugación lipofílica o la síntesis de derivados estructuralmente más estables.

A pesar de estos obstáculos, el número de péptidos aprobados como fármacos continúa en aumento, con aplicaciones que abarcan desde la endocrinología hasta la oncología y las enfermedades infecciosas. Esta trayectoria histórica y clínica consolida a los péptidos como una de las clases de PNs con mayor relevancia en el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas.

Lipopéptidos naturales: diversidad estructural y funcional

Dentro de la familia de los péptidos naturales, los lipopéptidos constituyen una subclase particularmente relevante por su marcada actividad biológica. Estos compuestos están formados por una secuencia peptídica —lineal o cíclica— unida covalentemente a un ácido graso, generalmente en su extremo N-terminal. Son producidos principalmente por bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y otros microorganismos,³²⁻³⁴ tanto por vías ribosomales³⁵ como no ribosomales.³¹ La conjugación entre dominios peptídicos y lipofílicos permite a estas moléculas insertarse en membranas, alterar su integridad y ejercer funciones antimicrobianas, antifúngicas o antivirales.^{36,37}

Una forma habitual de clasificar a los lipopéptidos es según la longitud de su cadena peptídica. En particular, los lipopéptidos cortos se definen como aquellos con hasta 15 aminoácidos. Estructuralmente, suelen incluir aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, unidos a ácidos grasos de distinta longitud y grado de insaturación. Esta variabilidad, tanto en la secuencia como en el dominio lipídico, es responsable de su diversidad estructural y funcional.

Entre los lipopéptidos naturales cortos mejor estudiados se encuentra, por ejemplo, la daptomicina, un péptido cíclico de 13 aminoácidos, producido por *Streptomyces roseosporus*, con potente actividad bactericida frente a bacterias Gram positivas y que se utiliza clínicamente para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA).³⁸

Otros ejemplos notables son la iturina, producida por *Bacillus subtilis* y con propiedades antibacterianas y antifúngicas,³⁹ las polimixinas⁴⁰ y las plipastinas,⁴¹ una familia de

lipopéptidos microbianos con actividad antifúngica y aplicaciones potenciales en agricultura como agentes biocontroladores.

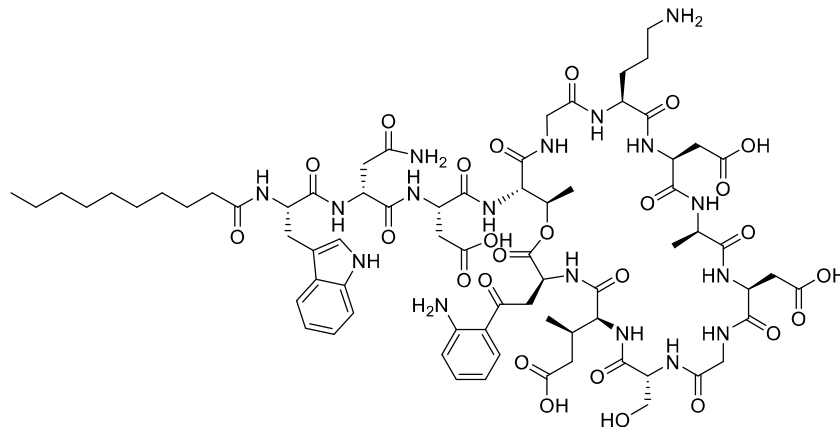


Figura 1.11: Estructura de daptomicina, un lipopéptido antibiótico.

Más recientemente, se ha comenzado a estudiar un grupo menos frecuente pero igualmente relevante: los lipopéptidos ultracortos, formados por apenas 3 a 6 aminoácidos conjugados a ácidos grasos de cadena larga.⁴² A pesar de su simplicidad estructural, estos compuestos han demostrado poseer actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* contra bacterias, hongos, levaduras y también contra fitopatógenos. Su acción suele estar mediada por la desestabilización de membranas celulares, un mecanismo eficaz incluso frente a microorganismos multirresistentes.

Un ejemplo de producto natural de esta subclase lo constituyen las gageotetrinas, una familia de lipopéptidos producidos por el género *Brevibacillus*.⁴³ Estos compuestos presentan un núcleo peptídico de pocos aminoácidos, con variaciones en la longitud de la cadena lipídica, y muestran actividad bactericida dependiente de la dosis frente a patógenos Gram positivos multirresistentes. Se ha descrito que su modo de acción incluye la desorganización de la membrana bacteriana, y que tienen menor toxicidad en comparación con otros lipopéptidos como la daptomicina, lo que los posiciona como candidatos terapéuticos prometedores.

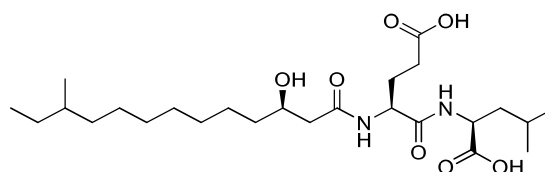


Figura 1.12: Estructura de gageotetrina A, lipopéptido ultracorto con actividad bactericida.

De la inspiración natural al diseño funcional *de novo*

La actividad biológica de los lipopéptidos naturales ha servido como punto de partida para el desarrollo de nuevas entidades bioactivas diseñadas sintéticamente. En lugar de replicar estructuras complejas o modificar PNs preexistentes, una estrategia alternativa consiste en identificar los motivos funcionales mínimos responsables de la bioactividad — como la anfipaticidad, la presencia de cargas positivas o la conjugación con dominios lipídicos— y utilizar esta información como inspiración para el diseño racional de moléculas nuevas.

Un ejemplo paradigmático de este enfoque fue propuesto por Shai y colaboradores en 2006, quienes diseñaron y sintetizaron una serie de péptidos ultracortos conjugados a ácidos grasos de cadena larga.⁴⁴ Estos compuestos, con estructuras tan simples como tetrapéptidos lineales con motivo KXXK, mostraron actividad antimicrobiana y antifúngica significativa sobre fitopatógenos, tanto *in vitro* como *in vivo*.⁴⁵ La incorporación de una cadena lipídica N-terminal permitió que las moléculas se insertaran en las membranas celulares de los microorganismos blanco, generando efectos membranólíticos responsables de su acción.

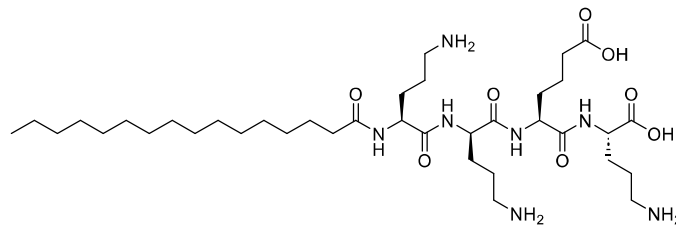


Figura 1.13: Ejemplo de un lipopéptido ultracorto sintetizado por Shai y colaboradores con actividad membranólítica.

Lo notable del trabajo de Shai es que no partió de la modificación progresiva de un producto natural, sino de una lógica funcional derivada de observaciones sobre compuestos como surfactina o daptomicina, para construir moléculas nuevas, no naturales, mediante una estrategia de diseño funcional *de novo*. En este enfoque, el objetivo no es conservar la estructura de los PNs, sino replicar o mejorar sus propiedades biológicas mediante una arquitectura propia, sintéticamente accesible, y con una complejidad estructural notablemente menor.

Este trabajo conjuga tanto el diseño *de novo* basado en fragmentos, pues emplea aminoácidos naturales como fragmentos modulares ensamblados en secuencias definidas que responden a criterios funcionales, como el diseño basado en reacciones, pues utiliza reacciones químicas robustas como la síntesis en fase sólida de péptidos y la acilación N-terminal. Aunque no se trata de un diseño exploratorio de alta diversidad, sí constituye un ejemplo claro de diseño *de novo* racional, con inspiración en PNs y buscando optimizar propiedades precisas.

Expansión del diseño funcional: nuestro trabajo de 2012

Inspirados por el enfoque minimalista de Shai, en nuestro grupo propusimos una serie de compuestos diseñados con el objetivo de conservar las propiedades esenciales de los lipopéptidos ultracortos naturales —estructura lineal, carácter anfipático, conjugación lipídica—, pero utilizando una arquitectura no peptídica: en lugar de secuencias de aminoácidos, utilizamos un esqueleto tipo peptoide, construido mediante dos reacciones de Ugi en secuencia, lo que permitió obtener moléculas del tipo tetramidas lineales N-sustituídas.⁴⁶

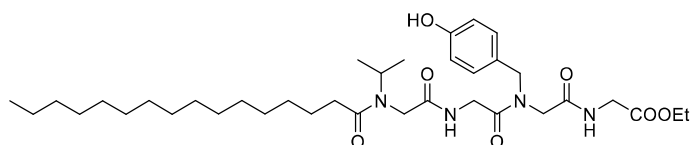


Figura 1.14: Ejemplo de un lipopeptoide ultracorto sintetizado por Ramírez y colaboradores con actividad antifúngica.

Una particularidad central de este diseño fue que los dos componentes de la reacción de Ugi - aminas e isonitrilos fueron elegidos intencionalmente para representar grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de aminoácidos naturales. De esta manera, cada posición lateral del esqueleto resultante refleja un patrón funcional que remite al repertorio químico de los péptidos naturales, aunque sobre un andamiaje no natural.

La estructura general de los compuestos obtenidos incluye una cadena lipofílica en el extremo N-terminal, un núcleo central pseudopeptídico, y cadenas laterales con diversidad funcional. Los compuestos fueron evaluados en ensayos *in vitro* contra hongos

fitopatógenos y mostraron actividad antifúngica significativa en varios casos, lo que validó la aproximación de diseño. La simplicidad sintética del sistema también permitió explorar variaciones estructurales en forma rápida y eficiente.

En contraste con el trabajo de Shai, nuestra propuesta se inscribe en un enfoque próximo al diseño estructural *de novo* de pPNs, ya que no solo se inspira en fragmentos presentes en PNs como las cadenas laterales de aminoácidos y dominios lipofílicos, sino que las combina sobre un andamiaje no natural, ensamblado mediante reacciones multicomponente. Este trabajo de Tesis propone explorar esta idea y eventualmente extenderla.

Criterios y herramientas para evaluar relevancia biológica

Para diseñar bibliotecas de pPNs no solo es necesario combinar fragmentos estructurales de forma creativa, sino también tener en cuenta un factor crucial: la relevancia biológica de los compuestos generados. Sin embargo, determinar qué combinaciones de fragmentos conducirán a moléculas biológicamente relevantes es un desafío que aún no tiene una solución consensuada. La falta de un criterio universalmente aceptado sobre cómo evaluar la relevancia biológica deja abierto el debate sobre cuáles son los mejores enfoques para seleccionar y diseñar estas bibliotecas.

En este sentido, las técnicas quimioinformáticas juegan un papel esencial en el análisis de grandes bibliotecas de compuestos.⁴⁷ El análisis de similitud estructural es una de las técnicas más comunes para predecir el potencial bioactivo de los compuestos. Esta técnica compara las estructuras de los compuestos de una biblioteca con las de moléculas bioactivas conocidas, especialmente PNs, lo que proporciona una indicación inicial de la relevancia biológica.

Otra técnica valiosa es el análisis de descriptores moleculares, que mide propiedades clave como el peso molecular, la lipofilicidad (LogP), o la polaridad de los compuestos. Existen distintas herramientas informáticas que permiten calcular estos descriptores y asegurar que los compuestos no se concentren en un solo tipo de estructura química, lo que incrementa las posibilidades de descubrir moléculas activas en distintos contextos biológicos.

Otro aspecto fundamental en la evaluación de la relevancia biológica es la diversidad química de la biblioteca. Una mayor diversidad estructural ofrece más oportunidades para

encontrar moléculas con actividades biológicas novedosas. Las técnicas quimioinformáticas permiten también cuantificar esta diversidad y asegurar que la biblioteca cubra un amplio rango del espacio químico, lo cual es particularmente importante en el campo del diseño *de novo* inspirado en PNs.⁴⁸

Todos estos temas se discutirán con mayor detalle en el Capítulo 2 de la Tesis.

Ensayos fenotípicos como vía de descubrimiento bioactivo

A pesar de que el diseño de bibliotecas biológicamente relevantes sigue siendo un desafío no completamente superado, los ejemplos discutidos anteriormente ofrecen perspectivas prometedoras para abordarlo. Sin embargo, incluso contando con una biblioteca que sea ideal en términos de relevancia biológica, el éxito en la identificación de compuestos activos está estrechamente vinculado a las estrategias utilizadas para descubrir dichas actividades.

Uno de los ejemplos documentados más antiguos de esta búsqueda es el trabajo de Paul Ehrlich, quien analizó 606 compuestos químicos antes de desarrollar la arsfenamina, el primer tratamiento eficaz para la sífilis. Su enfoque consistía en probar cada compuesto en modelos de ratones infectados, estableciendo un método de evaluación que dominó el campo del descubrimiento de fármacos hasta mediados del siglo XX, centrado casi exclusivamente en ensayos con animales.

Este enfoque tradicional tiene la ventaja de proporcionar resultados con alta relevancia biológica. Si un compuesto muestra, por ejemplo, capacidad para reducir la presión arterial en modelos animales, existe una razonable expectativa de que pueda tener efectos similares en humanos. Estos ensayos permiten obtener datos cruciales, como curvas dosis-respuesta, efectos a corto y largo plazo, y comparaciones entre diferentes vías de administración.

Sin embargo, los ensayos en animales, ahora conocidos como ensayos fenotípicos o fisiológicos, presentan limitaciones importantes, como los costos elevados, el tiempo requerido y la cantidad de compuesto necesaria para realizar los estudios. Estas limitaciones desalentaron el uso de ensayos basados en animales para el descubrimiento de nuevos fármacos, lo que se hizo evidente a principios de la década de 1990.⁴⁹

Con el auge de la genómica a principios del siglo XXI y la publicación del genoma humano, surgió una nueva perspectiva centrada en comprender los mecanismos moleculares subyacentes a las enfermedades. Este enfoque, conocido como descubrimiento de fármacos basado en blancos moleculares, ha predominado en las últimas dos décadas. Conceptualmente, parecía ofrecer una manera más racional y eficiente de descubrir nuevos compuestos, al basarse en la interacción directa de los compuestos con proteínas específicas o distintos blancos moleculares.⁵⁰

No obstante, es crucial considerar que los resultados obtenidos mediante este enfoque no deben interpretarse fuera de contexto. A pesar de que el paradigma predominante en el descubrimiento de fármacos se basa en la identificación de blancos moleculares específicos, su eficacia real en la práctica no ha sido completamente validada. Una revisión sistemática realizada por Sadri, que analizó alrededor de 32.000 artículos y patentes a lo largo de 150 años, reveló la falta de eficiencia en este enfoque.⁵¹ Según el análisis de los orígenes de los fármacos aprobados, solo el 9,4% de los medicamentos de moléculas pequeñas se descubrieron mediante ensayos centrados en blancos moleculares. Además, para esta pequeña fracción, los efectos terapéuticos no pueden atribuirse únicamente a los objetivos específicos, ya que dependen de múltiples mecanismos que pueden haber sido observados de manera inadvertida.

Por ejemplo, en oncología se ha invertido una considerable cantidad de recursos en el desarrollo de inhibidores específicos de quinasas, participantes en procesos de señalización intracelular. Sin embargo, se ha observado que los inhibidores no específicos que afectan múltiples quinasas suelen ser más efectivos *in vivo* que los inhibidores selectivos, lo que refleja la complejidad de las redes de señalización celular y la interconexión entre múltiples vías biológicas.⁵²

Además, distintos estudios sugieren que los fármacos aprobados por la FDA tienden a interactuar con un promedio de seis blancos moleculares distintos, lo que pone en entredicho la idea de que la acción farmacológica puede atribuirse a un único mecanismo molecular. Este fenómeno ha dado lugar al concepto emergente de polifarmacología, que subraya la necesidad de enfoques más integrales para comprender la acción de los fármacos.

Frente a esta complejidad, los ensayos fenotípicos emergen como una alternativa más flexible para evaluar los efectos biológicos, ya que no dependen de la identificación de un único blanco molecular. Como se mencionó anteriormente, en los inicios de la

investigación farmacológica, los ensayos fenotípicos dependían en gran medida del uso de animales de experimentación. Sin embargo, gracias a avances ocurridos en las últimas décadas, hoy en día contamos con métodos alternativos más éticos y eficientes. Estos incluyen ensayos basados en cultivos celulares y tejidos, que permiten un análisis detallado de la respuesta celular a los compuestos sin necesidad de utilizar animales vivos. Además, el desarrollo de organismos modelo ha proporcionado herramientas valiosas que replican más adecuadamente enfermedades humanas, ofreciendo plataformas de prueba que reducen la dependencia de animales tradicionales en la investigación.

Spear y Brown reconocen que los ensayos fenotípicos enfrentan limitaciones en su capacidad para adaptarse al estudio de colecciones extensas de compuestos, por lo que resaltan la importancia de contar con bibliotecas de alta calidad.⁵³ En este contexto, las bibliotecas de pPNs se presentan como valiosos puntos de partida, porque permiten, en principio, equilibrar la calidad de la colección con su accesibilidad sintética.

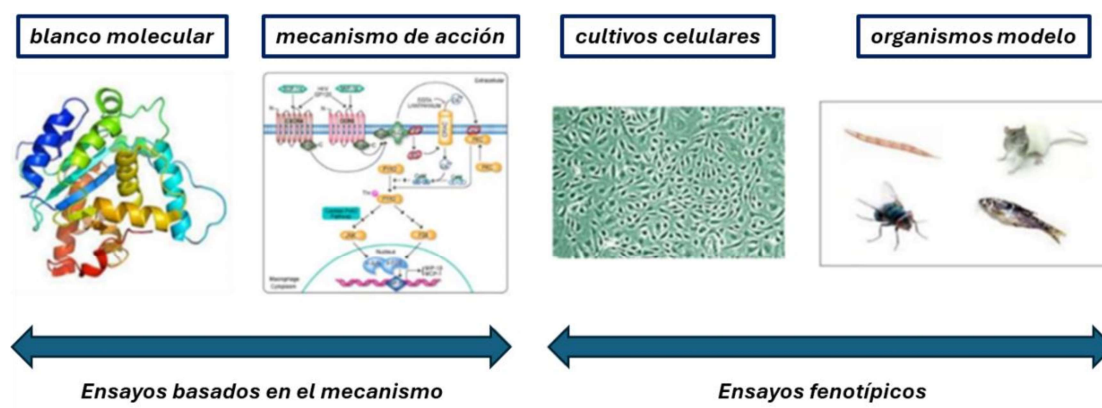


Figura 1.15: Las dos aproximaciones actuales para la búsqueda de moléculas bioactivas.

Sinopsis de este trabajo de tesis

En esta introducción se han esbozado de manera concisa algunos aspectos del desafío asociado al descubrimiento de nuevas entidades químicas con capacidad para modular procesos biológicos, con la intención de comprenderlos mejor y potencialmente aplicarlos en diversas esferas de la salud humana, animal y vegetal. Aunque no existe una ruta única y predefinida para alcanzar este propósito, en las últimas décadas han emergido estrategias que integran los progresos en Química Orgánica Sintética con un conocimiento más detallado de los procesos biológicos, delineando así posibles vías a seguir.

En este contexto, la propuesta de diseñar nuevas moléculas que sean miméticos de estructuras de compuestos orgánicos naturales y evaluar sus propiedades en ensayos fenotípicos emerge como una de las estrategias más prometedoras. Es por eso que en esta tesis se plantea explorar este enfoque, específicamente siguiendo las premisas de la síntesis orientada a obtener pPNs.

Con este objetivo se han diseñado distintas bibliotecas de compuestos utilizando bloques con relevancia biológica como punto de partida, que se han conectado mediante reacciones multicomponente (RMC), en particular la reacción Ugi Split.

En el Capítulo 2, se detallan los desafíos a la hora de analizar la eventual relevancia biológica de los compuestos describiendo los distintos enfoques actualmente disponibles y las herramientas básicas de quimioinformática que se emplearon a lo largo de la tesis para abordar este problema.

En los Capítulos 3, 4 y 5 se describe el diseño, síntesis y evaluación biológica de tres bibliotecas de pPNs inspirados en PNs, siempre utilizando RMC como paso central de las rutas sintéticas.

El Capítulo 6 sirve a modo de discusión y conclusión general de este trabajo, donde se evalúan en conjunto los resultados obtenidos. Finalmente, se incluye una sección que detalla minuciosamente todo el trabajo experimental realizado.

Referencias

- (1) Hacker, M. History of Pharmacology—From Antiquity to the Twentieth Century. In *Pharmacology*; Elsevier, 2009; pp 1–7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00001-4>.
- (2) Pina, A. S.; Hussain, A.; Roque, A. C. A. An Historical Overview of Drug Discovery. In *Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery*; Roque, A. C. A., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; Vol. 572, pp 3–12. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-244-5_1.
- (3) Raviña Rubira, E. The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs; Wiley-VCH: Weinheim, 2011.

- (4) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83* (3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- (5) Lallier, L. E.; McMeel, O.; Greiber, T.; Vanagt, T.; Dobson, A. D. W.; Jaspars, M. Access to and Use of Marine Genetic Resources: Understanding the Legal Framework. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31* (5), 612. <https://doi.org/10.1039/c3np70123a>.
- (6) Cragg, G. M.; Katz, F.; Newman, D. J.; Rosenthal, J. The Impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on Natural Products Research. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (12), 1407. <https://doi.org/10.1039/c2np20091k>.
- (7) Abramova, I.; Greer, A. Ethnochemistry and Human Rights. *Chem Biodivers* **2013**, *10* (9), 1724–1728. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300211>.
- (8) Wilhelm, S.; Carter, C.; Lynch, M.; Lowinger, T.; Dumas, J.; Smith, R. A.; Schwartz, B.; Simantov, R.; Kelley, S. Discovery and Development of Sorafenib: A Multikinase Inhibitor for Treating Cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, *5* (10), 835–844. <https://doi.org/10.1038/nrd2130>.
- (9) Feher, M.; Schmidt, J. M. Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43* (1), 218–227. <https://doi.org/10.1021/ci0200467>.
- (10) Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. The Re-Emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14* (2), 111–129. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>.
- (11) Christensen, S. B. Drugs That Changed Society: Microtubule-Targeting Agents Belonging to Taxanoids, Macrolides and Non-Ribosomal Peptides. *Molecules* **2022**, *27* (17), 5648. <https://doi.org/10.3390/molecules27175648>.
- (12) Sousa-Pimenta, M.; Estevinho, L. M.; Szopa, A.; Basit, M.; Khan, K.; Armaghan, M.; Ibrayeva, M.; Sönmez Güner, E.; Calina, D.; Hano, C.; Sharifi-Rad, J. Chemotherapeutic Properties and Side-Effects Associated with the Clinical Practice of Terpene Alkaloids: Paclitaxel, Docetaxel, and Cabazitaxel. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1157306. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1157306>.
- (13) Tkaczuk, K.; Yared, J. Update on Taxane Development: New Analogs and New Formulations. *DDDT* **2012**, 371. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S28997>.

- (14) Lee, A. Omaveloxolone: First Approval. *Drugs* **2023**, 83 (8), 725–729. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01874-9>.
- (15) Lynch, D. R.; Farmer, J.; Hauser, L.; Blair, I. A.; Wang, Q. Q.; Mesaros, C.; Snyder, N.; Boesch, S.; Chin, M.; Delatycki, M. B.; Giunti, P.; Goldsberry, A.; Hoyle, C.; McBride, M. G.; Nachbauer, W.; O’Grady, M.; Perlman, S.; Subramony, S. H.; Wilmot, G. R.; Zesiewicz, T.; Meyer, C. Safety, Pharmacodynamics, and Potential Benefit of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia. *Ann Clin Transl Neurol* **2019**, 6 (1), 15–26. <https://doi.org/10.1002/acn3.660>.
- (16) Goddard, Z. R.; Searcey, M.; Osbourn, A. Advances in Triterpene Drug Discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* **2024**, 45 (11), 964–968. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2024.10.003>.
- (17) Meyers, J.; Fabian, B.; Brown, N. De Novo Molecular Design and Generative Models. *Drug Discovery Today* **2021**, 26 (11), 2707–2715. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.019>.
- (18) Mouchlis, V. D.; Afantitis, A.; Serra, A.; Fratello, M.; Papadiamantis, A. G.; Aidinis, V.; Lynch, I.; Greco, D.; Melagraki, G. Advances in De Novo Drug Design: From Conventional to Machine Learning Methods. *IJMS* **2021**, 22 (4), 1676. <https://doi.org/10.3390/ijms22041676>.
- (19) Merk, D.; Grisoni, F.; Friedrich, L.; Gelzinyte, E.; Schneider, G. Computer-Assisted Discovery of Retinoid X Receptor Modulating Natural Products and Isofunctional Mimetics. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (12), 5442–5447. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00494>.
- (20) Hartenfeller, M.; Zettl, H.; Walter, M.; Rupp, M.; Reisen, F.; Proschak, E.; Weggen, S.; Stark, H.; Schneider, G. DOGS: Reaction-Driven de Novo Design of Bioactive Compounds. *PLoS Comput Biol* **2012**, 8 (2), e1002380. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002380>.
- (21) Reker, D.; Rodrigues, T.; Schneider, P.; Schneider, G. Identifying the Macromolecular Targets of de Novo-Designed Chemical Entities through Self-Organizing Map Consensus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, 111 (11), 4067–4072. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320001111>.

- (22) Grigalunas, M.; Brakmann, S.; Waldmann, H. Chemical Evolution of Natural Product Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (8), 3314–3329. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c11270>.
- (23) Alkubaisi, B. O.; Shahin, A. I.; Zenati, R. A.; Ravi, A.; Alchami, R.; Alkalla, M.; Khaled, R.; El-Gamal, M. I.; Al-Tel, T. H. Complexity-to-Diversity and Pseudo-Natural Product Strategies as Powerful Platforms for Deciphering Next-Generation Therapeutics. *ChemMedChem* **2023**, *18* (14), e202300117. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202300117>.
- (24) Grigalunas, M.; Burhop, A.; Christoforow, A.; Waldmann, H. Pseudo-Natural Products and Natural Product-Inspired Methods in Chemical Biology and Drug Discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2020**, *56*, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.10.005>.
- (25) Karageorgis, G.; Foley, D. J.; Laraia, L.; Brakmann, S.; Waldmann, H. Pseudo Natural Products—Chemical Evolution of Natural Product Structure. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (29), 15705–15723. <https://doi.org/10.1002/anie.202016575>.
- (26) Karageorgis, G.; Reckzeh, E. S.; Ceballos, J.; Schwalfenberg, M.; Sievers, S.; Ostermann, C.; Pahl, A.; Ziegler, S.; Waldmann, H. Chromopyrones Are Pseudo Natural Product Glucose Uptake Inhibitors Targeting Glucose Transporters GLUT-1 and -3. *Nature Chem* **2018**, *10* (11), 1103–1111. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0132-6>.
- (27) Alonso, F.; Galilea, A.; Mañez, P. A.; Acebedo, S. L.; Cabrera, G. M.; Otero, M.; Barquero, A. A.; Ramírez, J. A. Beyond Pseudo-natural Products: Sequential Ugi/Pictet-Spengler Reactions Leading to Steroidal Pyrazinoisoquinolines That Trigger Caspase-Independent Death in HepG2 Cells. *ChemMedChem* **2021**, *16* (12), 1945–1955. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100052>.
- (28) Wang, L.; Wang, N.; Zhang, W.; Cheng, X.; Yan, Z.; Shao, G.; Wang, X.; Wang, R.; Fu, C. Therapeutic Peptides: Current Applications and Future Directions. *Sig Transduct Target Ther* **2022**, *7* (1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>.
- (29) Marahiel, M. A. Working Outside the Protein-synthesis Rules: Insights into Non-ribosomal Peptide Synthesis. *Journal of Peptide Science* **2009**, *15* (12), 799–807. <https://doi.org/10.1002/psc.1183>.
- (30) Apostolopoulos, V.; Bojarska, J.; Chai, T.-T.; Elnagdy, S.; Kaczmarek, K.; Matsoukas, J.; New, R.; Parang, K.; Lopez, O. P.; Parhiz, H.; Perera, C. O.; Pickholz, M.; Remko, M.;

Saviano, M.; Skwarczynski, M.; Tang, Y.; Wolf, W. M.; Yoshiya, T.; Zabrocki, J.; Zielenkiewicz, P.; AlKhazindar, M.; Barriga, V.; Kelaidonis, K.; Sarasia, E. M.; Toth, I. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules* **2021**, *26* (2), 430. <https://doi.org/10.3390/molecules26020430>.

(31) Agrawal, S.; Adholeya, A.; Deshmukh, S. K. The Pharmacological Potential of Non-Ribosomal Peptides from Marine Sponge and Tunicates. *Frontiers in pharmacology* **2016**, *7*, 195336.

(32) Cochrane, S. A.; Vederas, J. C. Lipopeptides from Bacillus and Paenibacillus Spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal Research Reviews* **2016**, *36* (1), 4–31. <https://doi.org/10.1002/med.21321>.

(33) Théâtre, A.; Hoste, A. C. R.; Rigolet, A.; Benneceur, I.; Bechet, M.; Ongena, M.; Deleu, M.; Jacques, P. Bacillus Sp.: A Remarkable Source of Bioactive Lipopeptides. In *Biosurfactants for the Biobased Economy*; Hausmann, R., Henkel, M., Eds.; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer International Publishing: Cham, 2021; Vol. 181, pp 123–179. https://doi.org/10.1007/10_2021_182.

(34) Zhang, S.; Chen, Y.; Zhu, J.; Lu, Q.; Cryle, M. J.; Zhang, Y.; Yan, F. Structural Diversity, Biosynthesis, and Biological Functions of Lipopeptides from *Streptomyces*. *Nat. Prod. Rep.* **2023**, *40* (3), 557–594. <https://doi.org/10.1039/D2NP00044J>.

(35) Hubrich, F.; Bösch, N. M.; Chepkirui, C.; Morinaka, B. I.; Rust, M.; Gugger, M.; Robinson, S. L.; Vagstad, A. L.; Piel, J. Ribosomally Derived Lipopeptides Containing Distinct Fatty Acyl Moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2022**, *119* (3), e2113120119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113120119>.

(36) Hamley, I. W. Lipopeptides: From Self-Assembly to Bioactivity. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (41), 8574–8583. <https://doi.org/10.1039/C5CC01535A>.

(37) Sreelakshmi, K. P.; Madhuri, M.; Swetha, R.; Rangarajan, V.; Roy, U. Microbial Lipopeptides: Their Pharmaceutical and Biotechnological Potential, Applications, and Way Forward. *World J Microbiol Biotechnol* **2024**, *40* (4), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03908-0>.

(38) Baltz, R. H.; Miao, V.; Wrigley, S. K. Natural Products to Drugs: Daptomycin and Related Lipopeptide Antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22* (6), 717. <https://doi.org/10.1039/b416648p>.

- (39) Wan, C.; Fan, X.; Lou, Z.; Wang, H.; Olatunde, A.; Rengasamy, K. R. R. Iturin: Cyclic Lipopeptide with Multifunction Biological Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2022**, *62* (29), 7976–7988. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1922355>.
- (40) Yang, S.; Wang, H.; Zhao, D.; Zhang, S.; Hu, C. Polymyxins: Recent Advances and Challenges. *Front. Pharmacol.* **2024**, *15*, 1424765. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1424765>.
- (41) Zhou, J.; Wu, G.; Zheng, J.; Abdalmegeed, D.; Wang, M.; Sun, S.; Sedjoah, R.-C. A.-A.; Shao, Y.; Sun, S.; Xin, Z. Research on the Regulation of Plipastatin Production by the Quorum-Sensing ComQXPA System of *Bacillus Amyloliquefaciens*. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71* (28), 10683–10692. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c03120>.
- (42) Clements-Decker, T.; Kode, M.; Khan, S.; Khan, W. Underexplored Bacteria as Reservoirs of Novel Antimicrobial Lipopeptides. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 1025979. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1025979>.
- (43) Tareq, F. S.; Lee, M. A.; Lee, H.-S.; Lee, Y.-J.; Lee, J. S.; Hasan, C. M.; Islam, Md. T.; Shin, H. J. Gageotetrins A–C, Noncytotoxic Antimicrobial Linear Lipopeptides from a Marine Bacterium *Bacillus Subtilis*. *Org. Lett.* **2014**, *16* (3), 928–931. <https://doi.org/10.1021/ol403657r>.
- (44) Makovitzki, A.; Avrahami, D.; Shai, Y. Ultrashort Antibacterial and Antifungal Lipopeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103* (43), 15997–16002. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606129103>.
- (45) Makovitzki, A.; Viterbo, A.; Brotman, Y.; Chet, I.; Shai, Y. Inhibition of Fungal and Bacterial Plant Pathogens In Vitro and In Planta with Ultrashort Cationic Lipopeptides. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73* (20), 6629–6636. <https://doi.org/10.1128/AEM.01334-07>.
- (46) Galetti, M. D.; Cirigliano, A. M.; Cabrera, G. M.; Ramírez, J. A. Multicomponent Synthesis of Acylated Short Peptoids with Antifungal Activity against Plant Pathogens. *Mol Divers* **2012**, *16* (1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s11030-011-9334-1>.
- (47) Chen, Y.; Kirchmair, J. Cheminformatics in Natural Product-based Drug Discovery. *Molecular Informatics* **2020**, *39* (12), 2000171. <https://doi.org/10.1002/minf.202000171>.
- (48) Rodrigues, T. Harnessing the Potential of Natural Products in Drug Discovery from a Cheminformatics Vantage Point. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (44), 9275–9282. <https://doi.org/10.1039/C7OB02193C>.

- (49) Vogel, H. G.; Vogel, W. H. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*; Springer: Berlin, 1997.
- (50) Sams-Dodd, F. Is Poor Research the Cause of the Declining Productivity of the Pharmaceutical Industry? An Industry in Need of a Paradigm Shift. *Drug Discovery Today* **2013**, *18* (5–6), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.010>.
- (51) Sadri, A. Is Target-Based Drug Discovery Efficient? Discovery and “Off-Target” Mechanisms of All Drugs. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (18), 12651–12677. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01737>.
- (52) Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Möbitz, H.; Martiny-Baron, G. Targeting Cancer with Small-Molecular-Weight Kinase Inhibitors. In *Kinase Inhibitors*; Kuster, B., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; Vol. 795, pp 1–34. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-337-0_1.
- (53) Spear, K. L.; Brown, S. P. The Evolution of Library Design: Crafting Smart Compound Collections for Phenotypic Screens. *Drug Discovery Today: Technologies* **2017**, *23*, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.05.001>.

Capítulo 2

Diseño de Pseudo Productos Naturales

CAPÍTULO 2: Diseño de Pseudo Productos

Naturales

En el Capítulo 1 discutimos cómo los productos naturales (PNs) son una fuente inagotable de compuestos bioactivos y cómo su estructura y funcionalidad, optimizadas a lo largo de millones de años de evolución, los convierten en modelos ideales para la generación de nuevas moléculas orgánicas.

En este segundo capítulo, profundizaremos en los criterios que guían la decisión de cuándo un compuesto diseñado *de novo* puede ser considerado un pseudo producto natural (pPN). Esta decisión no depende únicamente de la presencia de elementos estructurales derivados de PNs, sino también de la capacidad del compuesto para exhibir características que le permitan interactuar eficazmente con sistemas biológicos, de manera similar a los PNs. Esto implica intentar predecir si la nueva molécula puede desencadenar respuestas biológicas específicas y relevantes, lo cual es clave para que un compuesto se clasifique como un pPN. Al explorar estos criterios, se discutirá cómo la combinación de fragmentos biológicamente validados y las herramientas sintéticas utilizadas permiten crear moléculas que, aunque nuevas y no presentes en la naturaleza, pueden alcanzar un nivel de relevancia biológica comparable al de los PNs. De esta forma, el capítulo busca definir con precisión los límites y posibilidades del diseño de pPNs, conectando estas ideas con las estrategias modernas de descubrimiento y evaluación de compuestos bioactivos.

El problema de la similitud y la diversidad en Química

Es habitual encontrar compuestos con estructuras similares que exhiben una variedad de propiedades biológicas en un sistema dado, especialmente en el campo de la Química Medicinal. Sin un modelo del mecanismo de acción específico del compuesto, como la identificación del blanco molecular, resulta difícil racionalizar estas diferencias en comportamiento biológico. Por otro lado, se han documentado numerosos casos en los que una pequeña colección de compuestos diseñados a partir de pseudo productos naturales (pPNs) produce varios compuestos bioactivos. Esto sugiere que la estrategia de seleccionar subestructuras biológicamente relevantes como punto de partida para el

diseño de moléculas diversas puede aumentar las posibilidades de éxito en la obtención de compuestos con actividad biológica.

Estas observaciones nos remiten nuevamente a los conceptos de similitud, diversidad y relevancia biológica, que han sido discutidos anteriormente. La noción de similitud ha sido un tema de reflexión en la filosofía. David Hume, en su "Tratado de la naturaleza humana", planteó que las ideas de similitud provienen del hábito de asociar ciertas impresiones basadas en la experiencia. Ludwig Wittgenstein, por su parte, introdujo la idea de "parecidos de familia", donde las cosas que pertenecen a una categoría no comparten necesariamente una única característica común, sino una serie de similitudes superpuestas. Este concepto es particularmente relevante en Química, donde las moléculas pueden compartir ciertas características sin ser idénticas, permitiendo clasificaciones como "productos naturales" o "pseudo productos naturales".

Definición y alcance de la quimiinformática

A mediados del siglo XIX, los trabajos pioneros de Kopp y Richardson sentaron las bases para el estudio de las relaciones entre la estructura de los compuestos orgánicos y sus propiedades fisicoquímicas, al demostrar que los compuestos que comparten grupos funcionales poseen características químicas similares. Sin embargo, durante mucho tiempo, el concepto de similitud en Química fue subjetivo. Solo en las últimas dos décadas, gracias a los avances en capacidad computacional y la aplicación de métodos estadísticos para analizar grandes conjuntos de datos, se ha progresado hacia el desarrollo de modelos cuantitativos que abordan este aspecto.

El estudio de estos problemas se sitúa en un campo relativamente nuevo de la Química conocido como **Quimiinformática**, que, en una de sus definiciones más amplias, abarca el diseño, la creación, la organización, la gestión, la recuperación, el análisis y la visualización de información química.

Si bien la cuestión de la similitud o diversidad entre los miembros de una colección de compuestos es fundamental en Química, es un tema no resuelto y que ha sido abordado desde distintos enfoques. La naturaleza del problema se puede entender a partir de un ejemplo intuitivo: consideremos dos colecciones de datos: una colección "A" con diez compuestos que comparten un núcleo común, pero difieren en sus cadenas laterales, y otra "B" con diez compuestos que tienen esqueletos significativamente diferentes. A

primera vista, podría parecer que la biblioteca "B" es más diversa, pero es necesario definir los atributos a considerar para determinar la diversidad. Por ejemplo, al calcular el rango de masas molares, encontramos que "A" tiene un rango de 250 a 900 g/mol y "B" de 500 a 600 g/mol, lo que sugiere que "A" es más diversa en términos de masas molares, pero posiblemente menos diversa en cuanto a la presencia de subestructuras.

En principio, se pueden definir diferentes propiedades fisicoquímicas, como carga, número y tipo de átomos, u otras características topológicas. Estas propiedades se conocen como **descriptores moleculares**, y pueden basarse tanto en la estructura molecular (su constitución, configuración o conformación) o en sus propiedades (físicas, químicas o biológicas).¹

Aunque algunos descriptores pueden derivarse de mediciones experimentales, generalmente se estiman utilizando algoritmos computacionales específicos. Los descriptores estructurales basados en la fórmula del compuesto, como la masa molecular o el número de donantes de enlace de hidrógeno, son calculables fácilmente, pero proporcionan poca información. En contraste, los descriptores centrados en las propiedades requieren normalmente cálculos más complejos que, aunque aumentan el tiempo necesario para el análisis, pueden proporcionar una representación precisa de las moléculas de la colección analizada.

La selección adecuada de descriptores moleculares es crucial para caracterizar un conjunto de moléculas de manera efectiva y así poder analizar su diversidad y comprender sus propiedades. La cantidad de descriptores p elegidos debe ser suficiente como para capturar las propiedades estructurales y características relevantes que se deseen contrastar. Estos descriptores definen lo que se conoce como un **espacio** o **universo químico** p -dimensional, donde cada molécula ocupa una posición única determinada por los valores de sus descriptores correspondientes.

$$\text{Compuesto } a = [\text{descriptor}_1(a); \text{descriptor}_2(a); \text{descriptor}_3(a); \dots; \text{descriptor}_p(a)]$$

$$\text{Compuesto } b = [\text{descriptor}_1(b); \text{descriptor}_2(b); \text{descriptor}_3(b); \dots; \text{descriptor}_p(b)]$$

$$\text{Compuesto } c = [\text{descriptor}_1(c); \text{descriptor}_2(c); \text{descriptor}_3(c); \dots; \text{descriptor}_p(c)]$$

...

$$\text{Compuesto } n = [\text{descriptor}_1(n); \text{descriptor}_2(n); \text{descriptor}_3(n); \dots; \text{descriptor}_p(n)]$$

Para ilustrar estos conceptos, se ejemplificará con las moléculas de aspirina (ácido acetilsalicílico) y colesterol (Figura 2.1:). Se pueden seleccionar diversos descriptores para caracterizar sus propiedades, como la masa molar (MW), el número de aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA), la fracción de átomos de carbono sp^3 (fsp^3), el coeficiente de partición octanol-agua ($LogP$) y la superficie total polar ($tPSA$). Como se dijo antes, los descriptores estructurales, como MW , HBA y fsp^3 , se derivan fácilmente del grafo molecular, mientras que otros, como $LogP$ y $tPSA$, requieren algoritmos más complejos para su estimación.

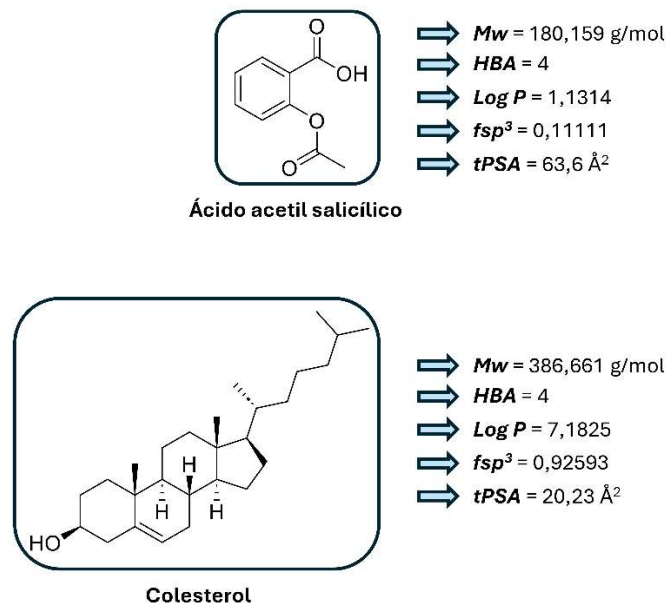


Figura 2.1: Ejemplos de las moléculas de ácido acetil salicílico y colesterol con sus respectivos descriptores.

Pero, por otro lado, la elección de los descriptores es un proceso relativamente arbitrario y no hay un consenso general sobre cuáles son los más apropiados. Sin embargo, es importante seleccionar un conjunto que refleje diversos aspectos de la estructura molecular y contemple propiedades fisicoquímicas relevantes. Por ejemplo, el logaritmo del coeficiente de partición octanol / agua ($LogP$) puede indicar la lipofilidad y la capacidad de permeabilidad a través de membranas biológicas, la fracción de carbonos con hibridación sp^3 (fsp^3) codifica la planaridad relativa de la molécula,² mientras que otros descriptores como el número de aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA) o la superficie topológica polar ($tPSA$) pueden relacionarse con la capacidad de interactuar con otras moléculas, especialmente macromoléculas biológicas, a través de interacciones intermoleculares.

Análisis exploratorio de datos: Análisis de Componentes

Principales (PCA)

La alta dimensionalidad de estos conjuntos de datos, definida como el número de descriptores que caracteriza a cada objeto, destaca la necesidad de técnicas que simplifiquen el análisis, la visualización de los resultados, y que resalten tendencias subyacentes. En este contexto, el **análisis de componentes principales** (PCA), emerge como un método ampliamente utilizado para reducir la dimensionalidad y facilitar la interpretación de conjuntos de datos complejos. Basándose en la premisa de que frecuentemente existe una correlación estadística significativa entre descriptores, este método genera nuevas variables conocidas como **componentes principales** (PC). Estas componentes se diseñan de manera que capturen de manera eficiente la varianza total observada en los datos, permitiendo una representación más compacta sin una pérdida sustancial de información.

$$PC_1 = c_{11}x_1 + c_{12}x_2 + \dots + c_{1p}x_p$$

$$PC_2 = c_{21}x_1 + c_{22}x_2 + \dots + c_{2p}x_p$$

$$PC_i = c_{i1}x_1 + c_{i2}x_2 + \dots + c_{ip}x_p = \sum_{j=1}^p c_{ij}x_j$$

donde PC_i es el i -ésimo componente principal, y c_{ij} es el coeficiente para el descriptor x_j , con la suma extendida a los p descriptores.

El primer componente principal maximiza la varianza de los datos, el segundo componente explica parte de la varianza no contemplada por el primero, en el tercero la varianza no explicada por los dos primeros, y así para cada uno de los siguientes componentes. Estos componentes principales se calculan a partir de una matriz de varianza-covarianza. Si \mathbf{A} es la matriz con n filas (correspondientes a n moléculas) y p columnas (una para cada descriptor), entonces la matriz de varianza-covarianza es la matriz de $n \times n$ calculada como el producto entre \mathbf{A} y la matriz transpuesta de \mathbf{A} .

Los autovalores de esta matriz son los coeficientes c_{ij} de los componentes principales: el primer componente principal (el que explica en mayor medida la varianza observada),

corresponde al mayor autovalor, el segundo componente principal al segundo autovalor, y así sucesivamente.

Los autovalores indican también qué proporción de la varianza es explicada por cada uno de los componentes principales. Si los autovalores se denotan como λ_{ij} , los primeros m componentes principales permiten describir una fracción f de la varianza dada por:

$$f = \frac{\sum_{i=1}^m \lambda_i}{\sum \lambda_i}$$

De esta manera, se puede elegir el número m de componentes principales que permiten capturar las características más significativas de los datos, transformando así el conjunto de datos original, altamente dimensional, en uno de menor dimensionalidad. Este nuevo conjunto de datos reducido conserva las propiedades esenciales, facilitando así análisis más eficientes y la visualización. PCA es particularmente útil para descubrir patrones ocultos, identificar correlaciones entre variables y realizar otros análisis exploratorios de datos, todo ello mientras se minimiza la pérdida de información relevante.

En el contexto de esta tesis, dado que el objetivo central es el diseño *de novo* de pPNs biológicamente relevantes e inspirados en péptidos pequeños, nos planteamos explorar este enfoque quimioinformático partiendo de un análisis comparativo de diversas colecciones de compuestos.

Caracterización de colecciones moleculares mediante PCA

A pesar del origen natural de los péptidos, su inclusión dentro del universo de los PNs ha sido tradicionalmente limitada, especialmente en los estudios quimioinformáticos centrados en la caracterización de la diversidad estructural de bibliotecas moleculares. En general, los análisis de este tipo se han enfocado en metabolitos especializados de plantas, hongos y microorganismos, privilegiando compuestos no poliméricos, de bajo peso molecular y estructuras carbonadas complejas —como alcaloides, terpenoides y polifenoles— que han constituido lo que históricamente se consideran PNs en química medicinal. En contraste, los péptidos suelen asociarse a otro dominio, más cercano al de las biomoléculas, en parte por su tamaño, sus estructuras oligoméricas y sus propiedades

farmacocinéticas distintivas. Este sesgo clasificatorio hace que frecuentemente sean excluidos de los análisis de diversidad que buscan definir el espacio químico ocupado por los PNs pequeños. Es una práctica común que en diversos estudios quimioinformáticos se haya optado por filtrar compuestos peptídicos y macrocíclicos, con el objetivo de evitar sesgos derivados del tamaño o la flexibilidad estructural.³ Por ejemplo, Medina-Franco *et al.* aclaran que, aunque los péptidos y proteínas terapéuticas son relevantes en química medicinal, su representación y análisis se sitúan en una zona liminal entre la quimioinformática y la bioinformática. En consecuencia, sus estudios se enfocan en visualizar el espacio químico de moléculas pequeñas, excluyendo a los péptidos de forma deliberada.⁴

Estas decisiones metodológicas, aunque comprensibles desde el punto de vista técnico, han contribuido a reforzar la noción de que los péptidos constituyen una categoría separada dentro del universo de los PNs, menos representativa del paradigma clásico que inspira el diseño de nuevas entidades químicas. En esta tesis optamos por una estrategia inclusiva: los péptidos se consideran parte integral del conjunto de PNs, sin aplicar filtros que los excluyan. Esta decisión permite evaluar comparativamente su distribución estructural y su afinidad relativa con otras clases de PNs, bajo distintas métricas quimioinformáticas. Asimismo, se incluirá en los análisis la colección de compuestos sintéticos inspirados en lipopéptidos cortos previamente desarrollados por nuestro grupo para examinarlos tanto en el contexto de los péptidos naturales como frente al conjunto general de PNs.

En esta dirección, en primer lugar recopilamos una biblioteca virtual de PNs a partir de la base de datos *COLlection of Open Natural ProDUcTs* (COCONUT).⁵ Distintos estudios han demostrado que los fragmentos de PN presentes en COCONUT exhiben una alta diversidad y complejidad estructural,^{6,7} lo que la convierte en una valiosa fuente de información.

COCONUT es una base de datos gratuita que al momento de redactarse esta tesis contaba con más de 600.000 moléculas. Esta base tiene una interfaz web que permite realizar diversas búsquedas simples (por molécula, InChI, SMILES, estructura, fórmula molecular), así como búsquedas avanzadas por características moleculares, subestructuras y similitudes. Además, ofrece la opción de descargar todo el conjunto de datos o los resultados de búsqueda en varios formatos.

La distinción fundamental de los PNs con respecto a las moléculas sintéticas, predominantes en las bases de datos químicas, radica en su origen biológico. Por lo tanto, además de su estructura y propiedades estructurales computables, los PNs requieren ser acompañados por al menos una referencia bibliográfica que indique dónde, cuándo y desde qué organismo se aisló el PN. Esto implica que cada entrada de PN debe estar asociada al menos a un organismo, de preferencia con un identificador de taxonomía. Desafortunadamente, estos metadatos a menudo se omiten en las bases de datos públicas de las cuales se compiló COCONUT.

Por todo lo explicado anteriormente, y con el objetivo de contar con una base de datos sólida, representativa y confiable, se filtró la información de COCONUT para seleccionar aquellos compuestos que reportaban su origen, garantizando así la relevancia de los datos seleccionados. Este enfoque riguroso condujo a la construcción de una base de datos de 180.399 PNs, seleccionados para los análisis realizados en esta tesis, a la que llamamos **PN-T**, que proporciona un conjunto esencial para establecer el espacio químico de trabajo.

De esta colección, se identificaron 10.829 compuestos clasificados en COCONUT como aminoácidos y péptidos.

Finalmente, se incluyeron en la base de datos los 36 compuestos sintéticos con estructuras inspiradas en lipopéptidos cortos, obtenidos en nuestro laboratorio y mencionados en el Capítulo 1.⁸

Luego elegimos un conjunto de 22 descriptores moleculares que se utilizaron para caracterizar a los compuestos de la base a través de propiedades fisicoquímicas y estructurales. Estos descriptores, que son los que suelen emplearse en este tipo de análisis para reflejar la diversidad y complejidad de colecciones de compuestos, se calcularon mediante el programa DataWarrior⁹ y el paquete RDKit (<http://www.rdkit.org>), y su listado aparece detallado en la Sección Experimental de esta tesis. En algunos casos los descriptores fueron normalizados por tamaño molecular, con el objetivo de relativizar el efecto del peso o volumen sobre la estructura del espacio químico.

Al aplicar un análisis de componentes principales (PCA) sobre los 22 descriptores moleculares seleccionados, se obtiene el gráfico conocido como *scree plot*, que muestra la proporción de varianza explicada por cada componente. El análisis del *scree plot* revela un quiebre claro en la pendiente de la curva a partir de la sexta componente, lo que sugiere un punto de corte natural según el criterio del codo (*elbow criterion*). Esta observación permite reducir de manera justificada la dimensionalidad del conjunto de datos, pasando

de los 22 descriptores originales a tan solo cinco componentes principales. Estas cinco PCs retienen en conjunto el 67,31 % de la varianza total del sistema, con aportes individuales de 25,28 % (PC1), 14,44 % (PC2), 9,75 % (PC3), 8,99 % (PC4) y 8,84 % (PC5). Esta reducción conserva una porción sustancial de la información relevante de la base de datos, al tiempo que simplifica el análisis y la visualización del espacio químico.

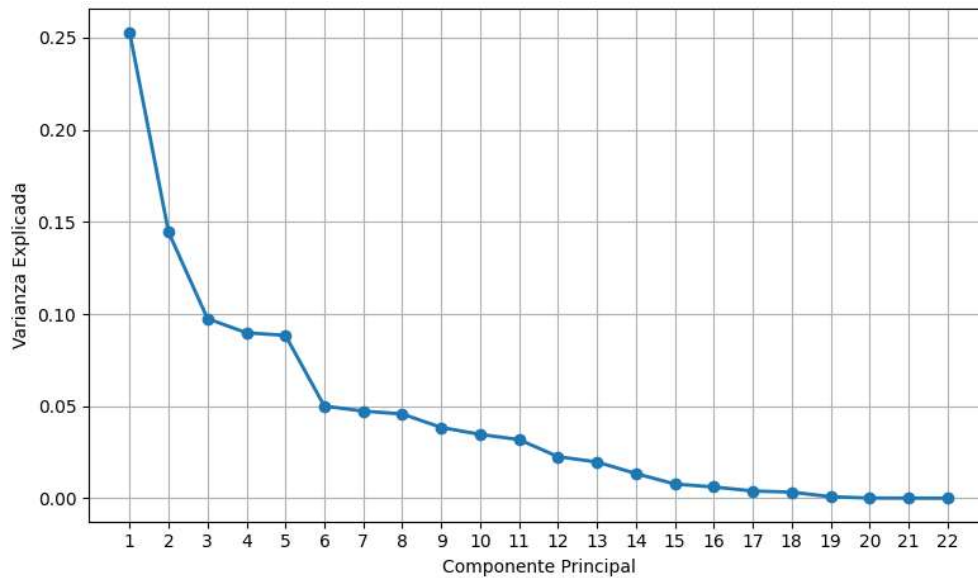


Figura 2.2: Scree plot de los componentes principales.

Para comprender en mayor profundidad la distribución observada en el espacio PCA, es necesario analizar la composición de las componentes principales en términos de sus descriptores moleculares constituyentes. Cada componente principal corresponde a una combinación lineal de las variables originales, ponderadas según su contribución relativa (cargas o *loadings*) al eje correspondiente. Estas combinaciones reflejan direcciones de máxima varianza en el espacio multidimensional y permiten interpretar estructuralmente los ejes del análisis. Examinar los descriptores que aportan significativamente a cada PC permite, por tanto, vincular la posición relativa de los compuestos con propiedades fisicoquímicas concretas, facilitando la interpretación química de los agrupamientos observados y las diferencias entre clases.

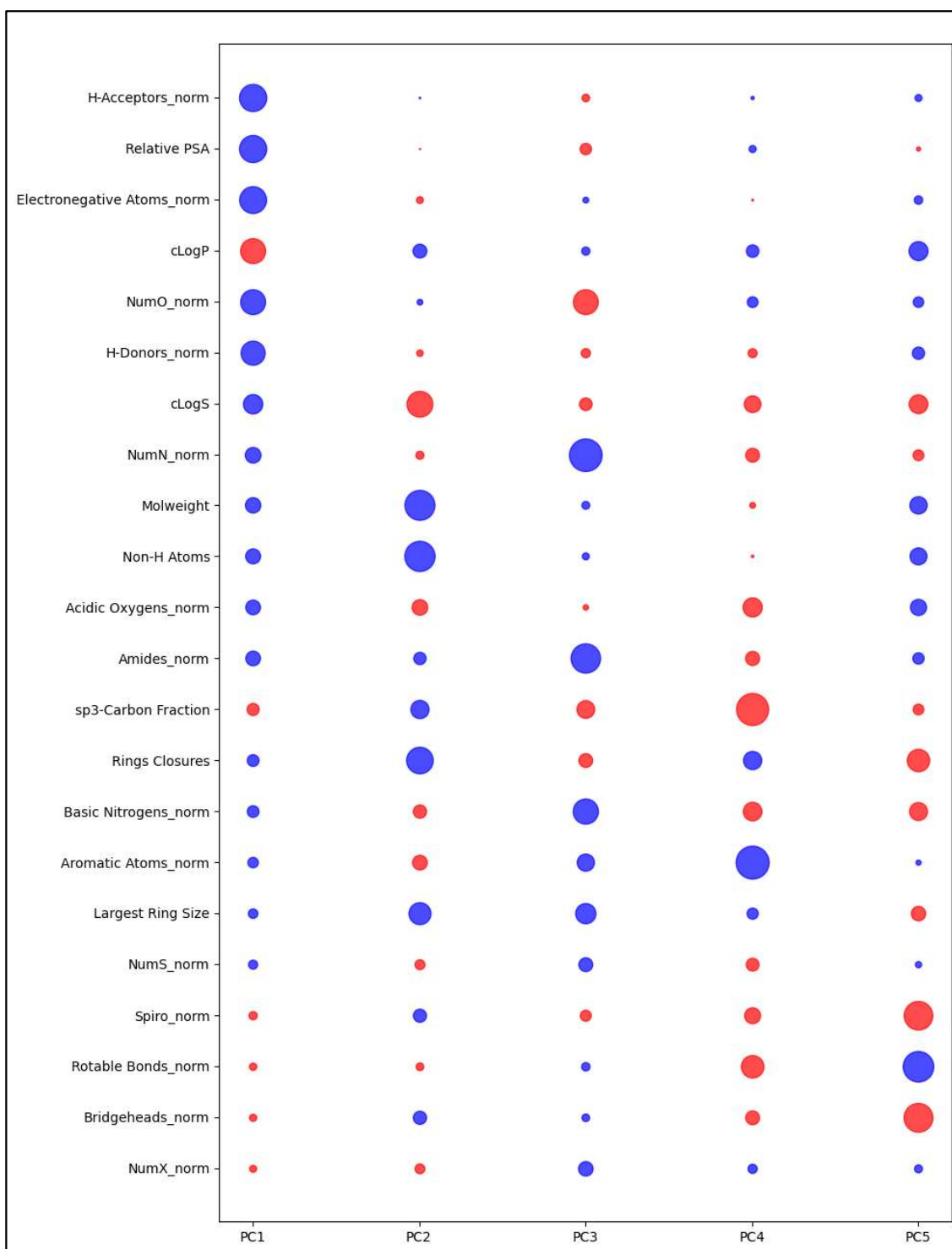


Figura 2.3: Aportes de los descriptores moleculares seleccionados a las primeras cinco componentes principales.

Puede observarse que PC1 está fuertemente influenciada por la presencia de dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, así como por la proporción de átomos de oxígeno, de átomos electronegativos y la superficie polar relativa. Además, muestra contribuciones

relevantes de los descriptores de hidrofobicidad y solubilidad, como cLogP y cLogS, con signos opuestos. Esta combinación sugiere que PC1 refleja un eje de polaridad versus hidrofobicidad, diferenciando compuestos según su capacidad para establecer interacciones polares y su perfil lipofílico.

PC2 está dominada en mayor medida por descriptores globales de tamaño molecular y arquitectura cíclica: el peso molecular, el número de átomos no hidrógeno, la solubilidad calculada (cLogS), el número de cierres de anillo y el tamaño del anillo más grande. Esta componente puede interpretarse como un eje relacionado con la complejidad topológica y la masa molecular, que distingue compuestos más grandes y cíclicos de estructuras más pequeñas o lineales.

PC3 presenta cargas elevadas para la proporción de átomos de nitrógeno, en particular nitrógenos básicos, grupos amida, y también oxígenos. Esta combinación sugiere que la componente captura aspectos de funcionalización nitrogenada, en especial estructuras peptidomiméticas o con alto contenido de heteroátomos funcionales, lo cual puede vincularse con propiedades como basicidad, capacidad de formar enlaces de hidrógeno y participación en interacciones específicas con blancos biológicos.

PC4 está determinada por dos variables estructurales con cargas de signo opuesto: la fracción de carbonos sp^3 y la proporción de átomos aromáticos, con aportes de distinto signo. Esto refleja un eje que distingue compuestos más alifáticos y saturados de aquellos más aromáticos y conjugados, y puede asociarse con diferencias en flexibilidad conformacional, planaridad y densidad electrónica.

Finalmente, PC5 está influida principalmente por características de la topología molecular compleja, como la proporción de átomos espiro, átomos puenteados y el número de enlaces rotables. En este caso, los enlaces rotables presentan carga de signo opuesto a los demás, lo que sugiere un eje que contrapone rigidez estructural (asociada a motivos espiro y puenteados) frente a flexibilidad (enlaces rotables).

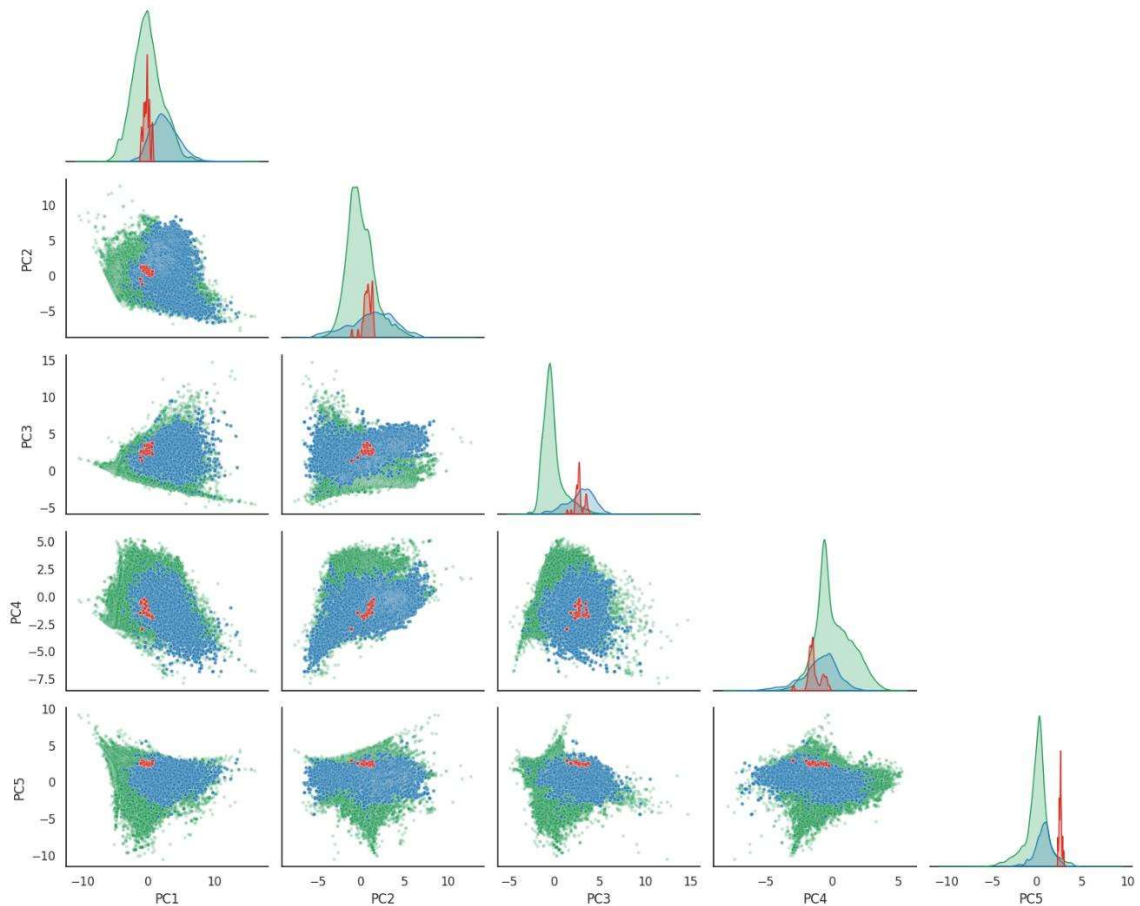


Figura 2.4: *Pair plot*: lipopeptoides sintéticos (rojo), aminoácidos y péptidos de la base PN-T (azul) y PNs no peptídicos de PN-T (verde)

La Figura 2.4 muestra un *pair plot* triangular inferior que combina las cinco primeras componentes principales (PC1 a PC5) obtenidas por análisis de componentes principales (PCA) sobre el conjunto de 22 descriptores moleculares. Cada subgráfico bidimensional muestra la proyección de los compuestos sobre un par de componentes, mientras que las distribuciones univariadas en la diagonal permiten visualizar la densidad relativa de cada grupo en cada eje. Los compuestos están agrupados en tres clases: lipopeptoides sintéticos (rojo), aminoácidos y péptidos de la base PN-T (azul) y PNs no peptídicos de PN-T (verde), con la escala de cada clase adaptada para compensar el desbalance numérico relativo.

El análisis de las distribuciones univariadas representadas en la diagonal del *pair plot* permite comparar cómo se proyectan los PNs peptídicos y los no peptídicos a lo largo de cada una de las cinco primeras componentes principales. En general, se observa que los péptidos presentan distribuciones más concentradas en la mayoría de las PCs, lo que

sugiere una mayor homogeneidad estructural en comparación con los compuestos no peptídicos, que tienden a ocupar rangos más amplios. En PC2, sin embargo, ambas clases muestran una dispersión similar, lo que indica que péptidos y no péptidos cubren un rango comparable en términos de tamaño y solubilidad y, que por lo tanto PC2 refleja una dimensión común al espacio químico de los compuestos naturales. En PC3, en cambio, se evidencia una separación clara entre ambos grupos, con los péptidos desplazados hacia valores positivos, en correspondencia con su mayor contenido de nitrógeno, grupos básicos y amidas, lo que confirma que esta componente captura propiedades relevantes para distinguirlos. En términos generales, los péptidos tienden a ocupar regiones preferenciales del espacio PCA, especialmente en PC1 y PC3, aunque las distribuciones se solapan en todos los ejes, sin vacíos que permitan trazar una frontera estricta. Las diferencias en posición y forma de las curvas respaldan la idea de que los péptidos constituyen un subconjunto coherente dentro del universo químico más amplio de los PNs, pero no un grupo estructuralmente disjunto.

Por otro lado, los lipopeptoides sintéticos presentan un comportamiento que los ubica, en términos generales, dentro del mismo dominio que los péptidos naturales en el espacio PCA. En componentes como PC1 y especialmente PC3, sus distribuciones se superponen con las del conjunto peptídico, reflejando similitudes en polaridad, proporción de nitrógenos y presencia de grupos amida. Sin embargo, en PC5 se observa un desplazamiento sistemático hacia valores negativos, lo que sugiere mayor flexibilidad conformacional, posiblemente asociada a la contribución de sus cadenas alifáticas largas. A pesar de este desplazamiento parcial, los lipopeptoides no se separan netamente del universo general de PNs, sin evidencias claras de que constituyan una clase estructural discontinua o fácilmente distinguible por PCA de los compuestos naturales.

El análisis de las proyecciones bidimensionales entre pares de componentes principales permite evaluar si los distintos conjuntos de compuestos — PNs no peptídicos, péptidos naturales y lipopeptoides sintéticos— ocupan regiones distinguibles dentro del espacio PCA. En general, los gráficos muestran un grado considerable de solapamiento entre las clases, especialmente entre los PNs no peptídicos y los demás grupos, lo que refleja la diversidad estructural del conjunto general y su intersección parcial con dominios más restringidos.

Los péptidos naturales tienden a agruparse en regiones más compactas del espacio, particularmente en aquellas proyecciones que involucran las componentes PC1, PC3 y

PC5, lo que sugiere una coherencia estructural interna, derivada de su estructura oligomérica repetitiva. No obstante, no forman un clúster aislado: su dominio se solapa ampliamente con el universo general de PNs. Por su parte, los lipopeptidos sintéticos se proyectan de manera sistemática dentro del dominio peptídico, aunque en algunas combinaciones —notablemente en el gráfico PC3 vs PC5— presentan un desplazamiento parcial, lo que podría reflejar diferencias en flexibilidad o topología molecular con respecto a los péptidos naturales.

Entre todas las proyecciones, la combinación PC3 vs PC5 se destaca como la más informativa. En ese plano, los péptidos aparecen bien definidos en la región positiva de PC3, asociada a la presencia de nitrógeno, amidas y grupos básicos, mientras que los lipopeptoides sintéticos, si bien comparten ese dominio, se ubican preferentemente en regiones más negativas de PC5, lo que podría asociarse a una menor rigidez estructural. Los PNs no peptídicos, en cambio, se distribuyen ampliamente y de forma continua en todo el espacio, incluyendo las zonas ocupadas por los otros dos grupos.

Identificando diferencias clave: El Análisis Discriminante Lineal (LDA)

Aunque el análisis por PCA mostró que los lipopeptoides sintéticos no forman un grupo estructuralmente separado del universo de PNs, es pertinente preguntarse si presentan diferencias sistemáticas en determinadas propiedades moleculares. Para explorar esta posibilidad, se aplicó un **análisis discriminante lineal (LDA)** como herramienta supervisada que permite identificar qué descriptores contribuyen más a diferenciarlos del resto de los PNs. A diferencia del PCA, que organiza los datos según su varianza global sin considerar clases, el LDA construye un eje de máxima discriminación (LD1) entre dos grupos definidos *a priori*, revelando así qué variables estructurales marcan una separación potencial. Más que establecer una frontera de clasificación, este enfoque permite examinar si los lipopeptoides presentan un perfil químico característico, con valores significativamente distintos en propiedades específicas respecto del conjunto general de PNs.

Dado que el modelo discriminante se basa en combinaciones lineales de los descriptores incluidos, resulta necesario considerar el efecto de la colinealidad entre variables, que puede afectar la estabilidad e interpretabilidad de los coeficientes obtenidos. A diferencia

del PCA —que puede incorporar redundancias y absorberlas en sus componentes principales sin comprometer la validez del resultado—, el LDA es más sensible a la presencia de descriptores altamente correlacionados, ya que estos tienden a repartirse la información de manera arbitraria, generando coeficientes poco confiables o incluso contradictorios. Por este motivo, antes de aplicar el modelo se identificaron los pares de variables con correlación de Pearson superior a un umbral de 0.90, dado que eso significa que existe una relación lineal muy fuerte y directa entre dos propiedades moleculares que se están midiendo, y se eliminaron aquellas consideradas redundantes dentro de cada par (*Non-H Atoms* por redundancia con *Molweight* y *Electronegative Atoms_norm* por redundancia con *Relative PSA*).

La Figura 2.5 muestra la proyección de los compuestos sobre el eje discriminante (LD1), donde se ve una separación clara entre los lipopeptoides sintéticos (en rojo) y el resto de los PNs (en verde).

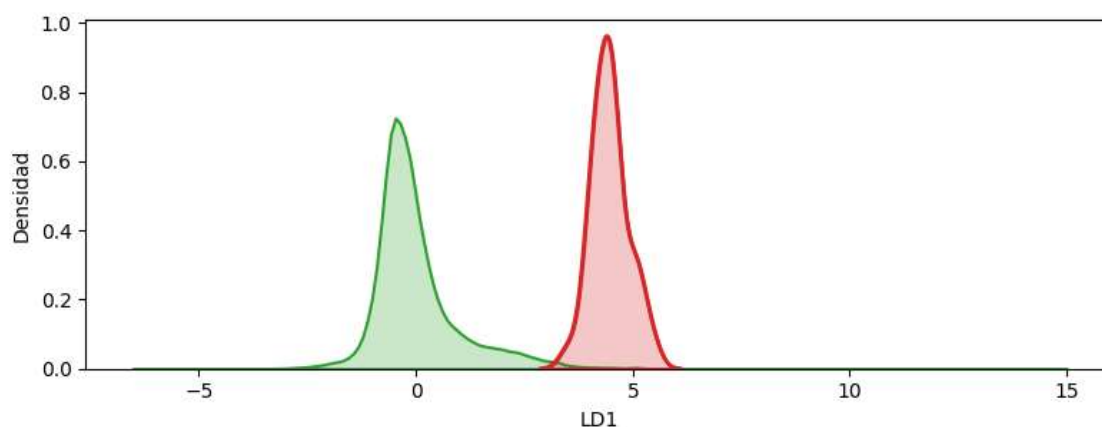


Figura 2.5: Distribución de los PNs y los lipopeptoides sintéticos sobre el eje discriminante (LD1): lipopeptoides sintéticos (en rojo) y el resto de los PNs (en verde).

Esta separación se explica por un conjunto reducido de descriptores que exhiben diferencias sistemáticas entre ambos grupos. Entre los descriptores con coeficientes positivos más altos —es decir, aquellos más abundantes en este grupo— se destacan el contenido de grupos amida, los valores de cLogP y cLogS, el contenido de átomos aromáticos, la fracción de carbonos sp^3 , el peso molecular y la proporción de enlaces rotables.

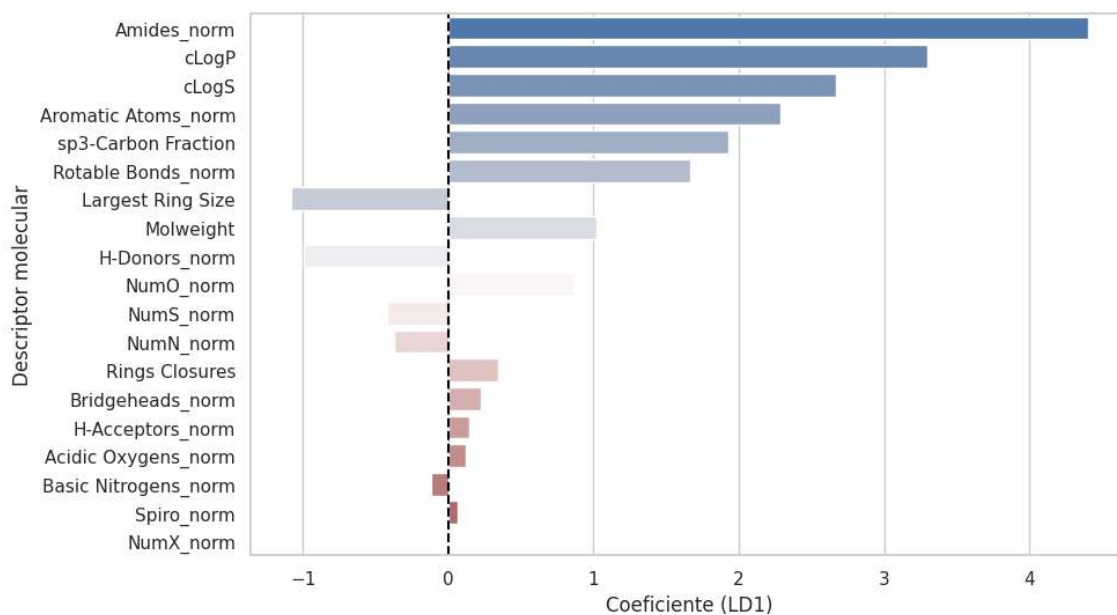


Figura 2.6: Aportes de los descriptores moleculares al eje discriminante.

Los *boxplots* de esos descriptores para las dos familias de compuestos permiten apreciar las diferencias en propiedades.

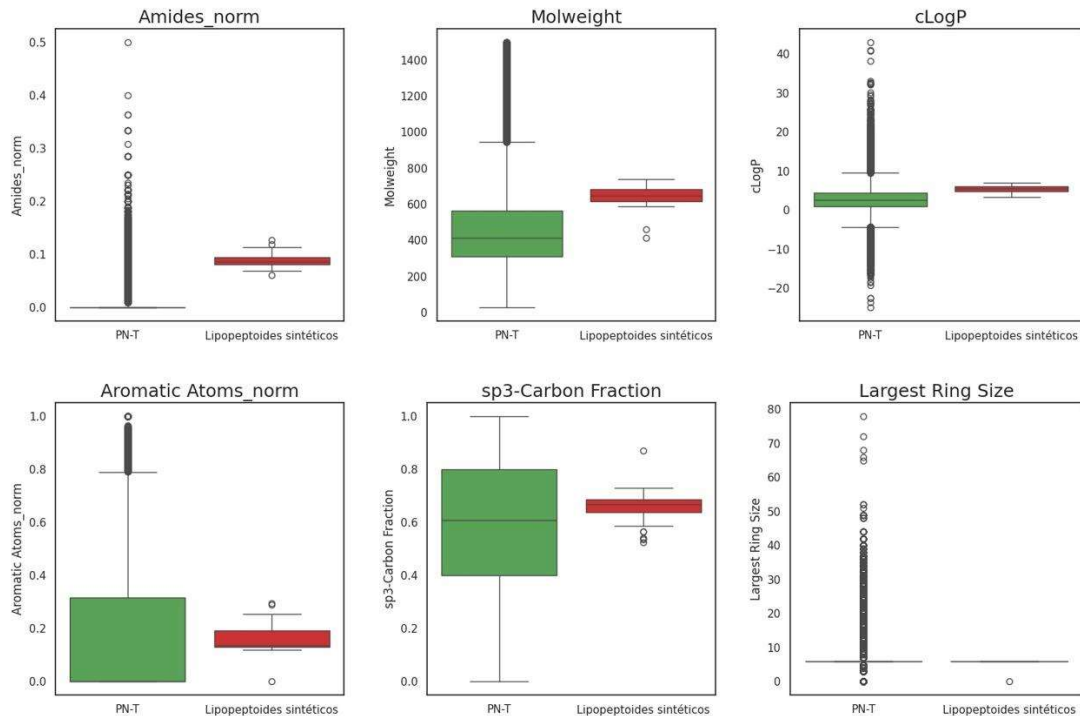


Figura 2.7: *Boxplots* de los descriptores moleculares que aportan el mayor coeficiente en el eje discriminante.

Los *boxplots* muestran que los lipopeptoides sintéticos presentan valores sistemáticamente más altos en varios descriptores clave. Se destaca en primer lugar el número de grupos amida, lo cual refleja su diseño estructural. También presentan valores promedio más elevados de peso molecular (645 g/mol vs. 469 g/mol) y de lipofiliidad (cLogP: 5.4 de los lipopeptoides sintéticos vs. 2.7 para los PNs), en línea con la presencia de una cadena alifática larga que les da, además, valores más altos para el promedio de la fracción de carbonos sp^3 . En conjunto, estos resultados refuerzan que los descriptores identificados por el LDA como discriminantes reflejan directamente las características diferenciales de esta familia sintética.

A partir de los resultados obtenidos, resulta claro que los análisis PCA y LDA son herramientas exploratorias muy útiles para representar conjuntos moleculares de alta dimensionalidad en espacios reducidos, facilitando su visualización y comparación, y permitiendo examinar la variabilidad estructural interna de las tres bibliotecas moleculares de interés: PNs no peptídicos, PNs peptídicos, y lipopeptoides sintéticos. Este tipo de análisis logró identificar relaciones relativas entre compuestos, detectar agrupamientos, regiones de solapamiento o separación, y explorar si ciertas clases químicas ocupan regiones similares o diferenciadas del espacio químico definido por los descriptores.

La fortaleza del PCA radica en su capacidad para resumir la información contenida en múltiples variables estructurales en un número reducido de componentes no correlacionadas entre sí. Sin embargo, esta reducción se basa exclusivamente en criterios estadísticos: las componentes principales se construyen para maximizar la varianza total explicada, sin incorporar ningún tipo de conocimiento externo sobre las moléculas analizadas. Esto significa que las posiciones relativas de los compuestos en el espacio PCA (o LDA) son útiles para comparaciones internas, pero no permiten inferir de forma directa el grado de similitud con clases químicas específicas, como los PNs conocidos. Por ejemplo, dos compuestos pueden quedar cercanos en el espacio PCA simplemente porque comparten propiedades cuantitativas dominantes (como peso molecular o polaridad), aunque pertenezcan a orígenes muy diferentes o tengan estructuras no comparables desde un punto de vista químico o biológico.

Evaluación de la “naturalidad”: NP-likeness score

En este contexto, donde las técnicas de reducción de dimensionalidad como el PCA no permiten establecer vínculos directos con el origen natural o sintético de una molécula, ha cobrado especial relevancia la cuestión de cuán semejantes son estructuralmente los compuestos sintéticos a los PNs. Esta inquietud, vinculada a la hipótesis de que ciertos patrones estructurales frecuentes en los PNs pueden correlacionarse con propiedades biológicas deseables, motivó el desarrollo de herramientas quimioinformáticas específicas para evaluar dicha similitud. Así, surgieron enfoques alternativos al PCA y al LDA, diseñados para cuantificar la "naturalidad" de una molécula a partir de criterios entrenados o extraídos del universo de PNs reales.

Por ejemplo, el grupo de Ertl desarrolló uno de los sistemas de puntuación para determinar la similitud entre un dado compuesto y un conjunto de PNs más relevantes en el tema, llamado **NP-likeness score**, el cual utiliza un enfoque bayesiano para identificar subestructuras dentro de las moléculas que son frecuentes en los PNs, pero menos comunes en las moléculas sintéticas. Este descriptor permite estimar cuán alineada está una molécula con el espacio químico natural, no en función de su posición en un espacio de propiedades arbitrarias, sino en términos de la presencia de fragmentos estructurales que caracterizan a los compuestos obtenidos de fuentes naturales.¹⁰⁻¹² Esta aproximación resulta especialmente relevante pues la hipótesis subyacente al diseño de pseudo productos naturales (pPNs) es que al construir moléculas a partir de fragmentos naturales se lograría aumentar la probabilidad de retener propiedades biológicamente deseables.

Para el desarrollo de este método, estos investigadores generaron dos bases de datos de estructuras químicas de distinto origen: una colección de PNs contenidos en la base de datos ChemBL (compilada por el Laboratorio Europeo de Biología Molecular, EMBL),¹³ y otra biblioteca de compuestos de origen sintético, no hallados en la naturaleza, extraída de la base de datos ZINC (mantenida por el Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de California).¹⁴

Para describir las subestructuras presentes en todos los compuestos analizados, se utilizan códigos HOSE (*Hierarchical Organisation of Spherical Environments*), que proporcionan una forma de describir la estructura química centrada en un átomo particular dentro de una molécula, generando un resumen codificado de su entorno molecular en varias capas concéntricas o "esferas", y donde cada átomo en cada capa se codifica según su tipo (carbono, oxígeno, nitrógeno), su estado de hibridación, y otros

atributos químicos relevantes.¹⁵ De esta manera, cada molécula se descompone en subestructuras cuya prevalencia se establece según la fórmula:

$$Score = \log \left(\frac{n(NP)/N(NP)}{n(SM)/N(SM)} \right)$$

donde $n(NP)$ y $n(SM)$ representan el número de productos naturales y moléculas sintéticas que contienen el fragmento específico identificado por el código HOSE, y $N(NP)$ y $N(SM)$ corresponden al total de productos naturales y moléculas sintéticas en las bases de datos, respectivamente. Conceptualmente, este score indica la probabilidad relativa de que un fragmento sea más común en PNs que en moléculas sintéticas.

Finalmente, la puntuación total (*NP-likeness*) para una molécula se calcula sumando los scores de todos sus fragmentos y luego normalizando este valor por el número de átomos en la molécula, proporcionando una medida que indica qué tan similar es una molécula a los PNs conocidos. Este score se convirtió en una herramienta ampliamente utilizada, y de hecho la base COCONUT describe el valor correspondiente para todos los compuestos que se recopilaron.

La Figura 2.8 muestra la distribución relativa del *NP-likeness score* para las tres bibliotecas: PNs no peptídicos (verde), péptidos y aminoácidos (azul), y lipopeptoides sintéticos (rojo). Para cada grupo se emplearon curvas suavizadas de frecuencia relativa.

Los PNs no peptídicos exhiben una distribución ancha, con un máximo en torno a 2, que se extiende hacia valores elevados del score. Los péptidos y aminoácidos, en cambio, muestran una distribución desplazada hacia valores más bajos, con un máximo relativo cercano a 1. Esta posición intermedia sugiere una afinidad estructural parcial con el espacio químico característico de los PNs no peptídicos, pero también revela diferencias en su perfil de fragmentos.

En este punto, cabe destacar que el *NP-likeness score* utilizado fue desarrollado originalmente a partir de fragmentos frecuentes en el CRC *Dictionary of Natural Products* (DNP), que incluye tanto metabolitos secundarios como péptidos naturales. Sin embargo, la representación de los péptidos en ese conjunto de referencia es minoritaria frente a otras clases, lo que explica que el *NP-likeness score* para los compuestos peptídicos

resulte intermedio: si bien comparten algunos fragmentos comunes con los PNs clásicos, no reflejan con igual fuerza los patrones que predominan en el DNP.

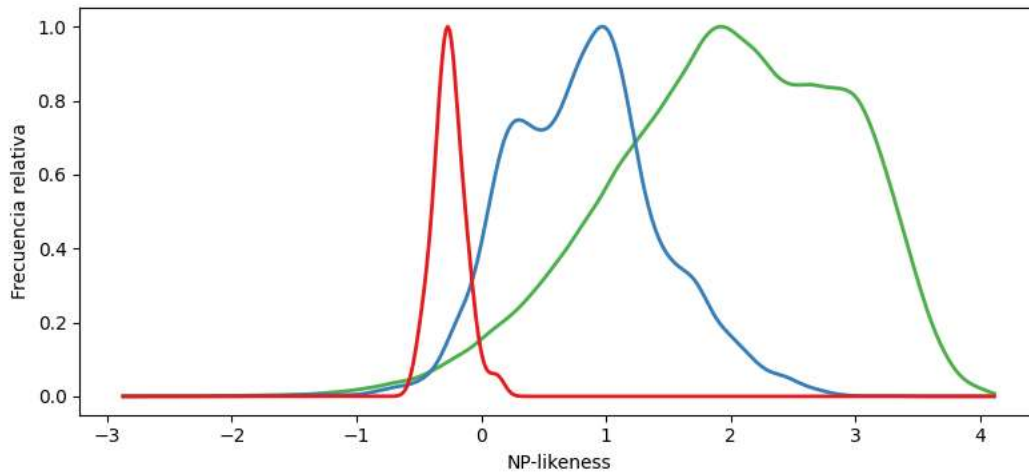


Figura 2.8: Distribución relativa de NP-likeness de cada biblioteca: PNs no peptídicos (verde), péptidos y aminoácidos (azul), y lipopeptoides sintéticos (rojo).

Por su parte, los lipopeptoides sintéticos muestran una distribución mucho más estrecha y definida, con un pico agudo centrado apenas por debajo de cero. Esta concentración sugiere que, desde la perspectiva del *NP-likeness score*, estos compuestos se alejan del patrón estructural predominante en los PNs. No obstante, su distribución se superpone parcialmente con la cola izquierda de la distribución de los PNs, lo que indica que algunos lipopeptoides comparten fragmentos o subestructuras también presentes —aunque con menor frecuencia— en esta colección de compuestos.

Hacia una definición cuantitativa del concepto de pseudo producto natural

En resumen, el uso de estas herramientas computacionales permite avanzar hacia una definición más operativa de qué entendemos por pseudo producto natural (pPN). Si bien el concepto ha sido formulado desde una perspectiva estructural y funcional —como una reorganización de fragmentos naturales en arquitecturas nuevas, no accesibles por biosíntesis conocidas—, no existe en la literatura un criterio cuantitativo consensuado que permita identificar, de forma inequívoca, qué tipo de moléculas pueden considerarse efectivamente como pPNs. Esta ambigüedad metodológica limita la posibilidad de evaluar

comparativamente distintas bibliotecas de compuestos inspirados en PNs. En esta tesis proponemos una vía posible para abordar ese problema: considerar que un compuesto puede ser clasificado como pPN cuando, por un lado, comparte propiedades fisicoquímicas y topológicas globales con los PNs (como se refleja en el análisis por PCA), pero por otro, exhibe un patrón de fragmentos estructurales que se distingue de aquellos que predominan en el universo natural, tal como lo revelan *scores* entrenados. Esta combinación de afinidad global y diferenciación a nivel de subestructuras constituye, a nuestro juicio, una forma razonable de cuantificar el concepto de pPN desde una perspectiva quimioinformática. A la luz de este criterio, los primeros compuestos analizados —descritos en 2012 en nuestro grupo y diseñados por analogía funcional con lipopéptidos cortos bioactivos— pueden ser reubicados conceptualmente como pPNs. Esta hipótesis será el punto de partida sobre el cual se construirán y evaluarán las nuevas bibliotecas desarrolladas a lo largo de los capítulos siguientes.

Referencias

- (1) Nikolova, N.; Jaworska, J. Approaches to Measure Chemical Similarity – a Review. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22* (9–10), 1006–1026. <https://doi.org/10.1002/qsar.200330831>.
- (2) Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6752–6756. <https://doi.org/10.1021/jm901241e>.
- (3) Wenderski, T. A.; Stratton, C. F.; Bauer, R. A.; Kopp, F.; Tan, D. S. Principal Component Analysis as a Tool for Library Design: A Case Study Investigating Natural Products, Brand-Name Drugs, Natural Product-Like Libraries, and Drug-Like Libraries. In *Chemical Biology*; Hempel, J. E., Williams, C. H., Hong, C. C., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1263, pp 225–242. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_18.
- (4) Medina-Franco, J. L.; Sánchez-Cruz, N.; López-López, E.; Díaz-Eufracio, B. I. Progress on Open Chemoinformatic Tools for Expanding and Exploring the Chemical Space. *J Comput Aided Mol Des* **2022**, *36* (5), 341–354. <https://doi.org/10.1007/s10822-021-00399-1>.

- (5) Sorokina, M.; Merseburger, P.; Rajan, K.; Yirik, M. A.; Steinbeck, C. COCONUT Online: Collection of Open Natural Products Database. *J Cheminform* **2021**, *13* (1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00478-9>.
- (6) Chávez-Hernández, A. L.; Sánchez-Cruz, N.; Medina-Franco, J. L. A Fragment Library of Natural Products and Its Comparative Chemoinformatic Characterization. *Molecular Informatics* **2020**, *39* (11), 2000050. <https://doi.org/10.1002/minf.202000050>.
- (7) Chávez-Hernández, A. L.; Sánchez-Cruz, N.; Medina-Franco, J. L. Fragment Library of Natural Products and Compound Databases for Drug Discovery. *Biomolecules* **2020**, *10* (11), 1518. <https://doi.org/10.3390/biom10111518>.
- (8) Galetti, M. D.; Cirigliano, A. M.; Cabrera, G. M.; Ramírez, J. A. Multicomponent Synthesis of Acylated Short Peptoids with Antifungal Activity against Plant Pathogens. *Mol Divers* **2012**, *16* (1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s11030-011-9334-1>.
- (9) Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Rufener, C. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (2), 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>.
- (10) Ertl, P.; Roggo, S.; Schuffenhauer, A. Natural Product-Likeness Score and Its Application for Prioritization of Compound Libraries. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48* (1), 68–74. <https://doi.org/10.1021/ci700286x>.
- (11) Vanij Jayaseelan, K.; Ertl, P.; Moreno, P.; Truszkowski, A.; Steinbeck, C. Natural Product-Likeness Score Revisited: An Open-Source, Open-Data Implementation. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13* (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-106>.
- (12) Ertl, P.; Roggo, S.; Schuffenhauer, A. Natural Product-Likeness Score and Its Applications in the Drug Discovery Process. *Chemistry Central Journal* **2008**, *2* (S1), S2. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-2-S1-S2>.
- (13) Mendez, D.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Chambers, J.; De Veij, M.; Félix, E.; Magariños, M. P.; Mosquera, J. F.; Mutowo, P.; Nowotka, M.; Gordillo-Marañón, M.; Hunter, F.; Junco, L.; Mugumbate, G.; Rodriguez-Lopez, M.; Atkinson, F.; Bosc, N.; Radoux, C. J.; Segura-Cabrera, A.; Hersey, A.; Leach, A. R. ChEMBL: Towards Direct Deposition of Bioassay Data. *Nucleic Acids Research* **2019**, *47* (D1), D930–D940. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1075>.

- (14) Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (7), 1757–1768. <https://doi.org/10.1021/ci3001277>.
- (15) Bremser, W. Hose — a Novel Substructure Code. *Analytica Chimica Acta* **1978**, *103* (4), 355–365. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)83100-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)83100-7).

Capítulo 3

Biblioteca PIP1

CAPÍTULO 3: Biblioteca PIP1

Introducción

Como se discutió en los capítulos anteriores, los pseudo productos naturales (pPNs) constituyen una clase conceptual de compuestos diseñados a partir de fragmentos estructurales presentes en productos naturales (PNs), pero reorganizados en arquitecturas nuevas, no accesibles por vías biosintéticas conocidas. Esta idea, que combina inspiración evolutiva con herramientas de síntesis moderna, permite explorar regiones del espacio químico con potencial biológico relevante. En este contexto, resulta pertinente reinterpretar una serie de compuestos desarrollada por nuestro grupo en 2012 como un ejemplo temprano de pPNs: una familia de lipopeptoides sintéticos construidos mediante reacciones multicomponente (RMC) y que resultaron poseer actividad antifúngica. El primer objetivo experimental de esta tesis es retomar y ampliar esa estrategia, evaluando nuevas variantes estructurales y metodológicas dentro del marco general de los pPNs.

La reacción multicomponente de Ugi

En este punto es pertinente discutir algunos aspectos sobre el antecedente en que se basa el presente trabajo. Como se mencionó en el Capítulo 1, la estrategia empleada para la síntesis de esta familia de compuestos se basó en la **reacción de Ugi** como paso clave.

La reacción de Ugi es probablemente el ejemplo más importante de las RMC, que se definen como aquellas en la que tres o más compuestos reaccionan en un solo paso para formar un único producto que contiene esencialmente todos los átomos presentes en los materiales de partida, excluyendo productos de condensación como el agua.

En particular, el descubrimiento de la reacción de Ugi en 1959 revolucionó la química orgánica al permitir la construcción en un solo paso de α -aminoacilamidas a partir de cuatro componentes (U-4CR): isonitrilos, ácidos carboxílicos, aminas y compuestos carbonílicos (aldehídos o cetonas).¹

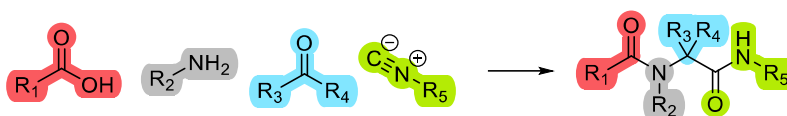


Figura 3.1: Reacción multicomponente de Ugi, U-4CR.

Esta reacción es posible gracias a la reactividad dual de los isonitrilos, ya que puede reaccionar tanto con nucleófilos como con electrófilos, generando α -aductos intermediarios altamente reactivos.

La reacción de Ugi ha sido ampliamente estudiada debido a su capacidad para formar múltiples enlaces en un solo paso y su versatilidad para incorporar diversos fragmentos en la estructura final. Su simplicidad operativa la convierte en una herramienta ideal para la síntesis de bibliotecas de compuestos con una gran diversidad estructural.

Dado que la colisión de tres o más moléculas es altamente improbable, las RMC generalmente involucran una serie secuencial de subreacciones que, en la mayoría de los casos, conducen a intermediarios que están en equilibrio, y donde un paso final irreversible determina el proceso global. La reacción de Ugi no es una excepción, y actualmente se propone un mecanismo donde la imina formada por la reacción entre el compuesto carbonílico y la amina es atacada nucleofílicamente por el isonitrilo, lo que da lugar a un imidato intermediario² que finalmente sufre un reordenamiento de Mumm (acilación intramolecular) para formar el producto final.³

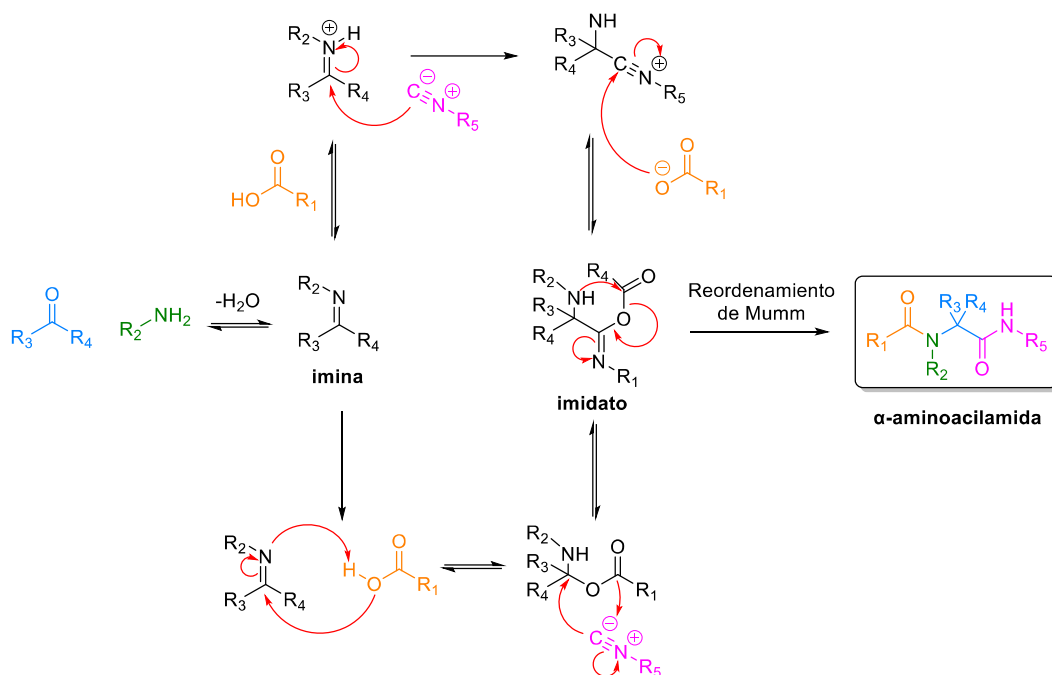
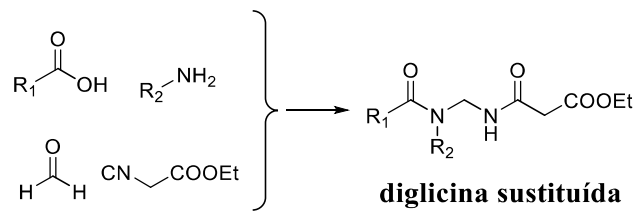


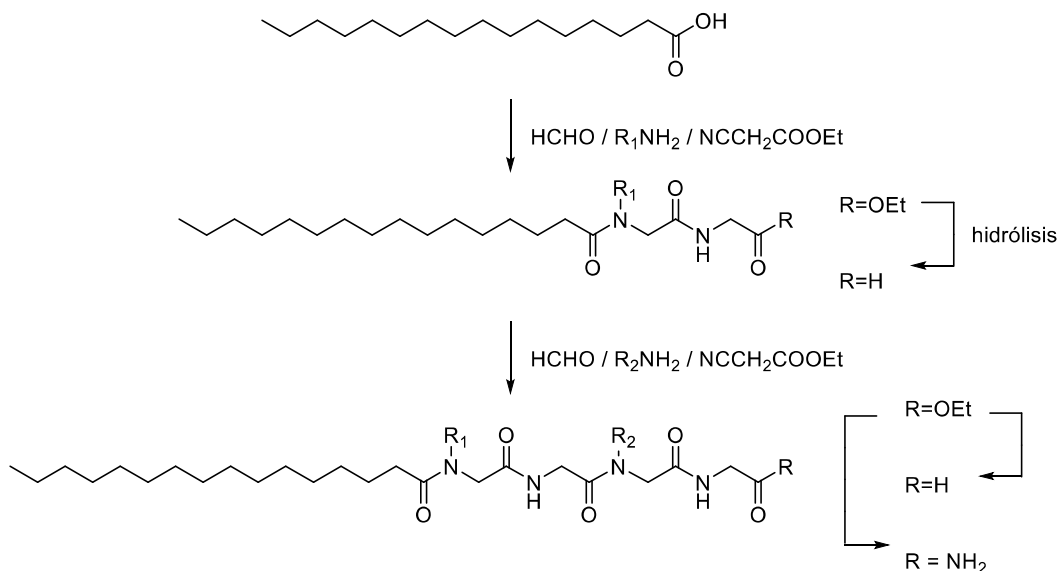
Figura 3.2: Mecanismo propuesto para la reacción de Ugi.

Como se comentó anteriormente, esta reacción genera una α -aminoacil amida y puede verse que, si se utiliza formaldehído como compuesto carbonílico e isocianoacetato de etilo como isonitrilo, el producto final es una diglicina N-sustituída.



Esquema 3.1: Producto Ugi si se utiliza formaldehído como compuesto carbonílico e isocianoacetato de etilo como isonitrilo.

Resulta entonces que, si se hidroliza el grupo éster terminal, se genera un nuevo ácido carboxílico que puede participar como componente en una nueva condensación de Ugi, permitiendo la elongación de la cadena de la oligoglicina. Es precisamente esta idea la que se utilizó para construir los lipopeptoides en cuestión. Partiendo de un ácido graso y de una variedad de aminas se formaron diversas diacilglicinas N-sustituídas, que luego de ser hidrolizadas se sometieron a una segunda reacción de Ugi, nuevamente con formaldehído e isocianoacetato de etilo. Una vez más, el empleo de distintas aminas en esta segunda etapa llevó a la construcción de los compuestos finales.



Esquema 3.2: Ruta sintética aplicada previamente por el grupo de Ramírez.

Los ésteres finales resultantes de la segunda reacción de Ugi se hidrolizaron, o alternativamente, se convirtieron en las correspondientes amidas. Se construyó así una colección de 37 compuestos miméticos de lipopéptidos con esqueleto de tetraglicina acilada con un resto palmitoílo en el extremo N-terminal. La evaluación de la actividad biológica mostró que algunos de ellos, por ejemplo, el compuesto mostrado en la Figura 3.3, son capaces de inhibir la proliferación de *Fusarium in vitro*.

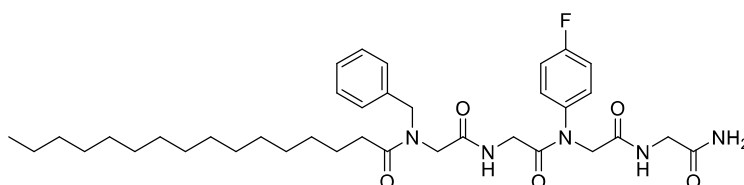


Figura 3.3: Ejemplo de compuesto capaz de inhibir la proliferación de *Fusarium in vitro* sintetizado por el grupo de Ramírez.

La reacción de Ugi Split como variación atractiva

El estudio del mecanismo de la reacción de Ugi permitió el desarrollo de numerosas adaptaciones,⁴ incluyendo reemplazos de los componentes participantes, generando derivados con estructuras sustancialmente distintas a las α -aminoacilamidas originales.⁵⁻⁷ Las modificaciones más estudiadas son aquellas en las que el ácido carboxílico es reemplazado por otros componentes ácidos (por ejemplo, agua,⁸ alcoholes,⁹⁻¹¹ ácido hidrazoico^{12,13}), o bien el bloque amina, ya que los demás componentes se adaptan menos a cambios.

Como se ha discutido previamente, en la reacción de Ugi clásica la amina primaria desempeña un papel dual en el mecanismo de la reacción, experimentando tanto una alquilación como una acilación, resultando en la pérdida de los dos átomos de hidrógeno unidos al nitrógeno. Por el contrario, cuando una amina secundaria reacciona en una reacción de tipo Ugi, el átomo de nitrógeno de la amina no puede sufrir transacilación y la reacción no procede.

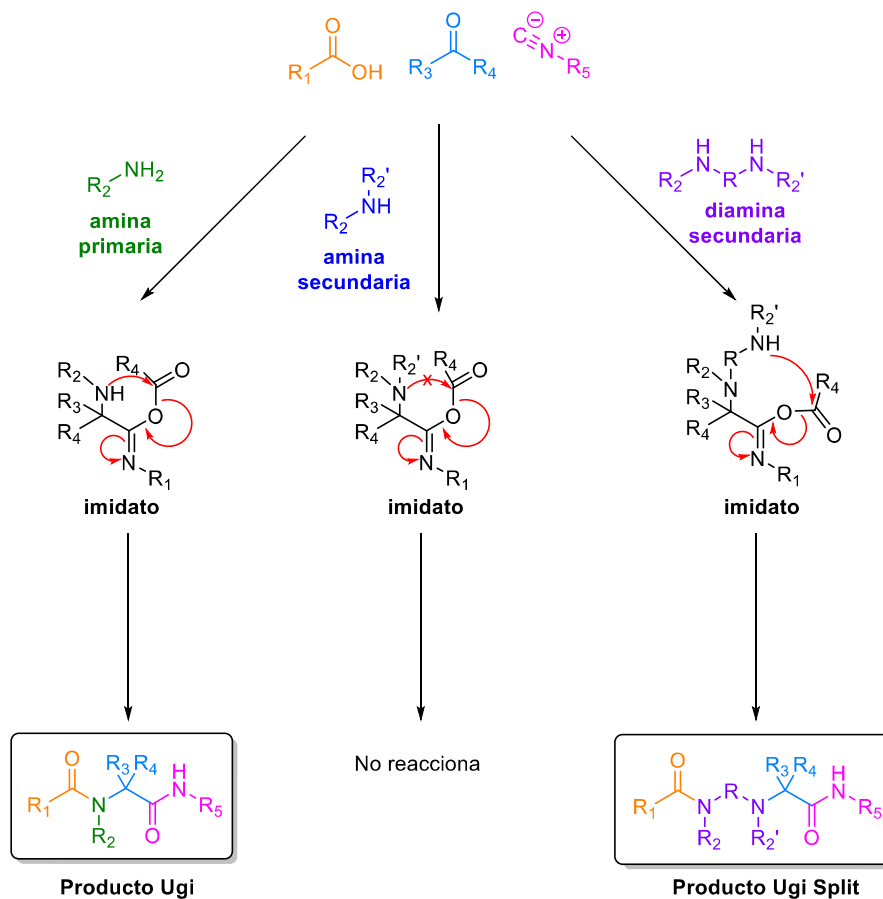


Figura 3.4: Variaciones de la reacción de Ugi con distintas aminas.

Sin embargo, si se utiliza una diamina simétrica como componente, y en condiciones adecuadas, ocurre primero la alquilación en uno de los nitrógenos (vía la formación de la imina), mientras que el segundo átomo de nitrógeno se acila durante el reordenamiento de Mumm. En este enfoque modificado de la reacción de Ugi, la diamina queda “intercalada” dentro del esqueleto del producto final, y por esto la reacción se denominó como **Ugi Split**.¹⁴

Por lo tanto, esta adaptación introduce al esqueleto una amina terciaria y carbonos sp^3 , enriqueciendo significativamente la complejidad del aducto resultante.

La selección de estas aminas como reactivo en la Ugi Split ofrece la posibilidad de generar productos con propiedades y características estructurales distintivas, ampliando así las aplicaciones y la diversidad de los productos obtenidos mediante esta estrategia modificada.

Aunque este enfoque estratégico resulta muy prometedor para explorar nuevas rutas sintéticas y ampliar la diversidad de moléculas disponibles para evaluación biológica, su aplicación ha sido hasta ahora escasamente estudiada. Por este motivo, en esta tesis se emplea dicha reacción para la construcción de bibliotecas de pPNs, en el marco del interés de nuestro laboratorio por profundizar en el uso de distintas RMC en la síntesis de moléculas complejas y biológicamente relevantes.

En este sentido, como primera etapa exploratoria decidimos reversionar la estrategia sintética antes mencionada, incorporando una reacción de Ugi Split como segundo paso de construcción en la secuencia.

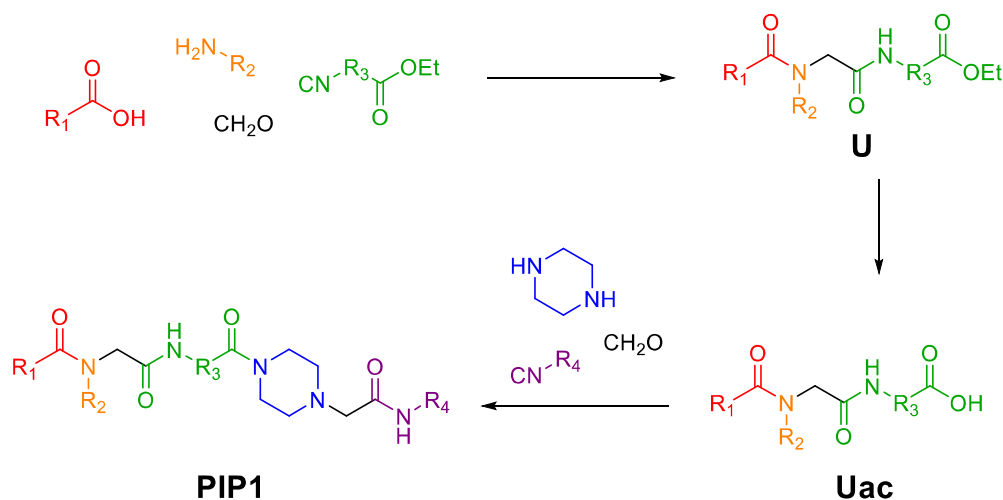
Diseño de la biblioteca a sintetizar

Selección de los bloques

La cuidadosa selección de los componentes en la síntesis se basó en los principios de construcción de los pPNs, es decir, se seleccionaron fragmentos presentes en PNs para luego unirlos en combinaciones novedosas. Luego de analizar distintas posibilidades, se optó por utilizar piperazina como diamina simétrica en este segundo paso. Esta elección se basó en varios criterios: por un lado, este heterociclo se encuentra presente como un fragmento relevante en numerosos PNs,^{15,16} un requerimiento importante a la hora de diseñar pPNs. Por otro lado, se sabe que los nitrógenos básicos presentes en muchos PNs peptídicos generalmente confieren actividad biológica asociada con el estado protonado resultante a pH fisiológicos; sin embargo, en la mayoría de los casos estos átomos de N son parte de cadenas laterales que decoran la columna vertebral peptídica.¹⁷ Por el contrario, en el compuesto diseñado, el nitrógeno se incorpora dentro de la columna vertebral, una característica improbable en péptidos naturales.

En el Esquema 3.3 se representa la estrategia sintética general planteada para la construcción de la biblioteca de pPNs. El diseño, como se discutió previamente, se basó en la aplicación de tres reacciones secuenciales, todas ellas articuladas en torno a un esqueleto común al que se le asignó un código con el fin de facilitar la lectura de la tesis. En primer lugar, se llevó a cabo una reacción multicomponente de Ugi, cuyo producto intermedio se denominó esqueleto general **U**. Posteriormente, este intermediario fue sometido a una hidrólisis para generar el ácido libre correspondiente, designado como esqueleto general **Uac**. Finalmente, dicho ácido se utilizó como sustrato en una reacción

multicomponente de Ugi Split, en la cual se incorporó piperazina como bloque clave, dando lugar a la familia de compuestos sintetizados en este capítulo, que comparten el esqueleto general **PIP1**.



Esquema 3.3: Ruta sintética genérica planteada para la obtención de los productos de esqueleto general **PIP1**.

Para la elección de las aminas que participan en la primera reacción de Ugi, al igual que los isonitrilos empleados en la reacción de Ugi Split, se llevó a cabo un proceso de selección meticuloso, orientado a incorporar fragmentos específicos presentes en péptidos naturales, aprovechando la rica diversidad estructural de estos compuestos. Para orientar esta selección, se exploró la base de datos NORINE, que alberga información detallada sobre estructuras de péptidos naturales.¹⁸⁻²⁰

Mediante búsquedas en dicha base de datos, se identificaron subestructuras representativas tanto de aminoácidos proteínogénicos como no proteínogénicos que están presentes en péptidos naturales (Figura 3.5) y que pudieran ser incorporados a partir de bloques de construcción accesibles.

En cuanto a la elección del isonitrilo que participa en la primera reacción de Ugi —el cual, como se discutió, debe poseer un carboxiéster terminal—, en este punto se planteó incrementar la diversidad estructural con respecto al trabajo que sirvió de inspiración. Además del uso de isocianoacetato de etilo, se decidió incorporar también como alternativa el isocianocaproato de etilo, con el objetivo de conservar la estructura básica general de poliamida característica de los péptidos naturales, pero incorporando fragmentos menos habituales.

Finalmente, se eligieron cuatro ácidos carboxílicos saturados e insaturados de distinta longitud de cadena, para lograr así una mayor variedad de cadenas lipofílicas que las utilizadas en el trabajo previo.

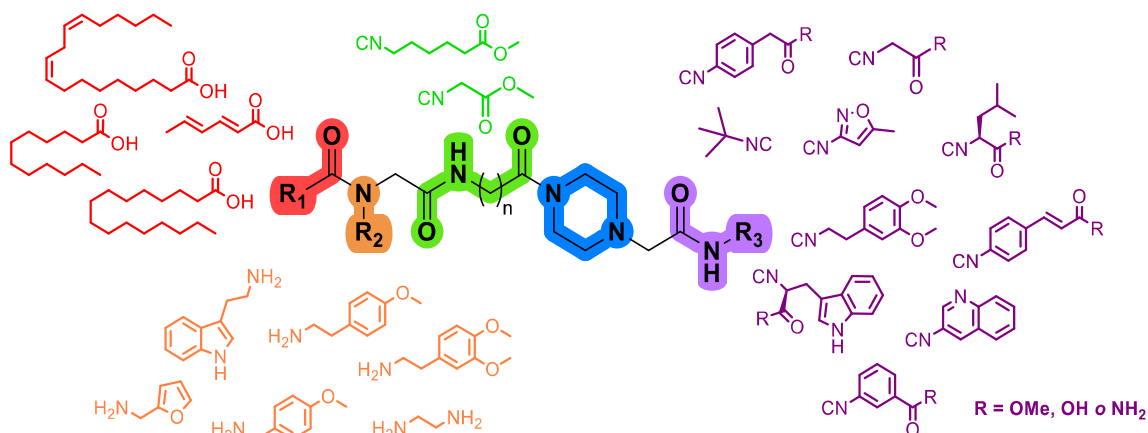


Figura 3.5: Bloques seleccionados.

Caracterización y análisis

Teniendo en mente los bloques de construcción básicos anteriormente mencionados, se procedió a generar una biblioteca combinatoria que abarcó a todos los compuestos potencialmente sintetizables y que resultó tener un total de 1056 miembros.

Con el objetivo de analizar la diversidad estructural de esa biblioteca combinatoria, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) empleando los mismos 22 descriptores moleculares utilizados en el Capítulo 2. Este análisis incluyó, además de los compuestos de la biblioteca, el conjunto de productos naturales PN-T provenientes de la base COCONUT, que permiten definir el espacio químico de los productos naturales. También se incorporaron los lipopeptoides sintéticos reportados por nuestro grupo en 2012 que, como ya vimos, pueden ser considerados como ejemplos de pPNs. La Figura 3.6 muestra el *pair plot* correspondiente a las cinco primeras componentes principales. Se observa que la biblioteca combinatoria de compuestos PIP1 ocupa una región del espacio químico que se solapa parcialmente con la de los PNs, y que se extiende en un espacio relativamente más amplio que el ocupado por los compuestos que sirvieron como base para su diseño.

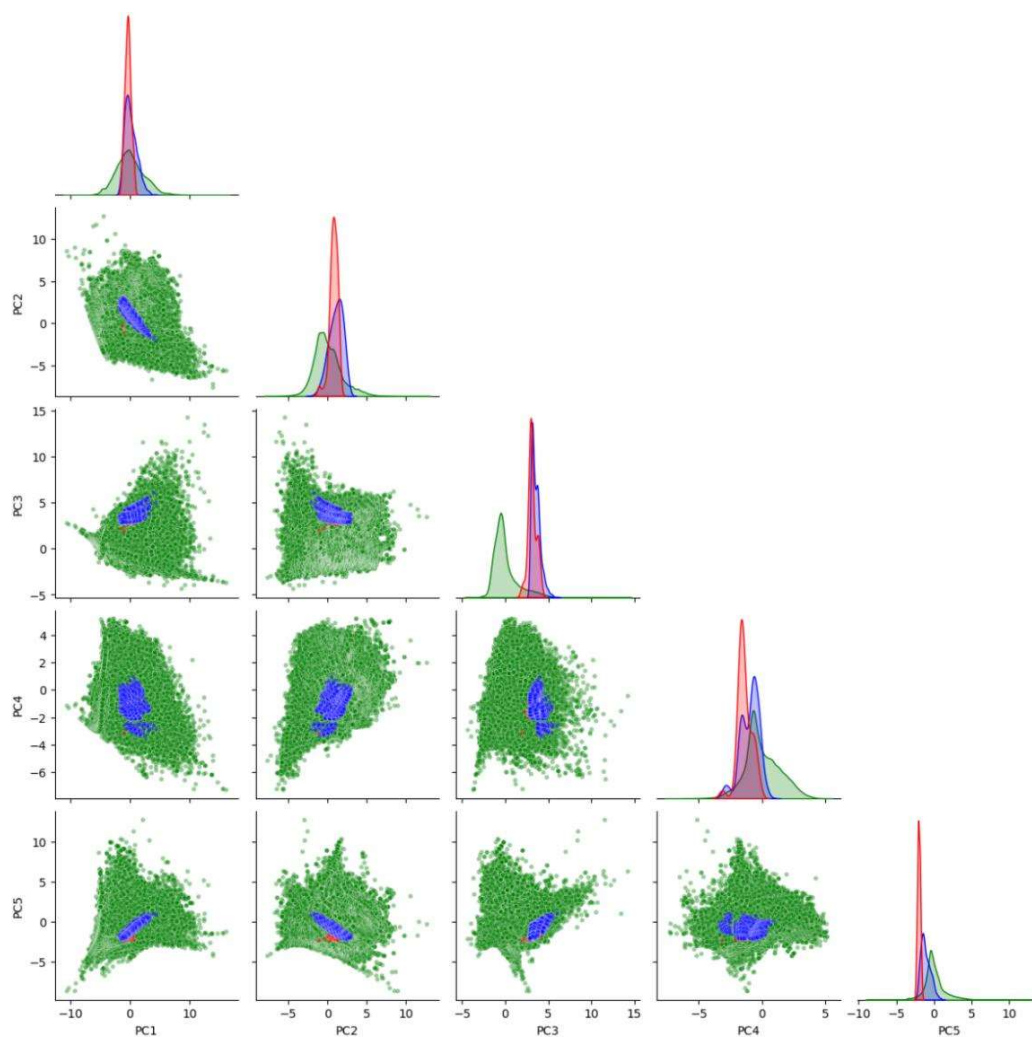


Figura 3.6: Pair plot: PN-T (verde), lipopeptoides sintetizados en 2012 por el grupo (rojo), biblioteca combinatoria de compuestos potencialmente sintetizables **PIP1** (azul).

En las proyecciones univariadas sobre cada componente principal (diagonales del gráfico), se observan diferencias claras en la distribución de los tres grupos. Como vimos en el capítulo anterior, los PNs exhiben densidades amplias en todas las componentes, reflejando su alta diversidad. Nuevamente, los lipopeptoides sintéticos muestran distribuciones mucho más concentradas y simétricas, evidenciando una gran homogeneidad en sus propiedades. Por otro lado, la biblioteca combinatoria, foco de este capítulo, presenta distribuciones más extendidas, lo que sugiere que logra explorar mayores regiones del espacio químico a pesar del patrón estructural común a todos sus miembros.

Aunque la diversidad relativa en cuanto a ocupación del espacio químico es evidente de las proyecciones del PCA, esta extensión se cuantificó para cada conjunto de compuestos

mediante el cálculo del volumen de un elipsoide robusto (MCD) en cinco dimensiones. Este elipsoide corresponde a la forma geométrica que mejor resume la dispersión de los datos en el espacio de las PCs, definiendo una región central que encierra aproximadamente el 99% de los compuestos. De esta manera, se obtiene una comparación del espacio efectivamente recorrido por cada familia. Los PNs de **PN-T** presentaron un volumen de 4339.9 unidades arbitrarias, lo que refleja su elevada diversidad estructural. La biblioteca combinatoria ocupó un volumen considerablemente menor, de 23.9 unidades, mientras que los lipopeptoides sintéticos quedaron restringidos a un volumen de apenas 2.64 unidades. Pero estas comparaciones no consideran el número de compuestos en cada grupo, por lo que se calculó también el cociente entre el número de compuestos y el volumen ocupado, es decir, la densidad de moléculas en el espacio PCA. Este valor fue de 41.6 para los PNs (180 399 compuestos / 4339.9), 44.2 para la biblioteca combinatoria (1056 / 23.9) y 14.0 para los lipopeptoides (37 / 2.64). Estos resultados indican que, aunque la biblioteca basada en piperazinas explora un espacio mucho más reducido que el conjunto de PNs, lo hace con una densidad muy similar, lo cual sugiere que logra una cobertura eficiente del espacio accesible.

En cuanto a la posición relativa en el espacio químico, el análisis PCA permite ver que los lipopeptoides originales y los compuestos de la biblioteca combinatoria diseñada en este trabajo parecen ocupar regiones parcialmente separadas, sin un solapamiento completo. Para evaluar si estas diferencias son estadísticamente relevantes, se realizó un análisis discriminante lineal (LDA) utilizando los mismos 22 descriptores moleculares. La proyección sobre la primera dirección discriminante (LD1) mostró una separación clara entre ambos grupos (Figura 3.7), lo que confirma que presentan perfiles estructurales sistemáticamente distintos.

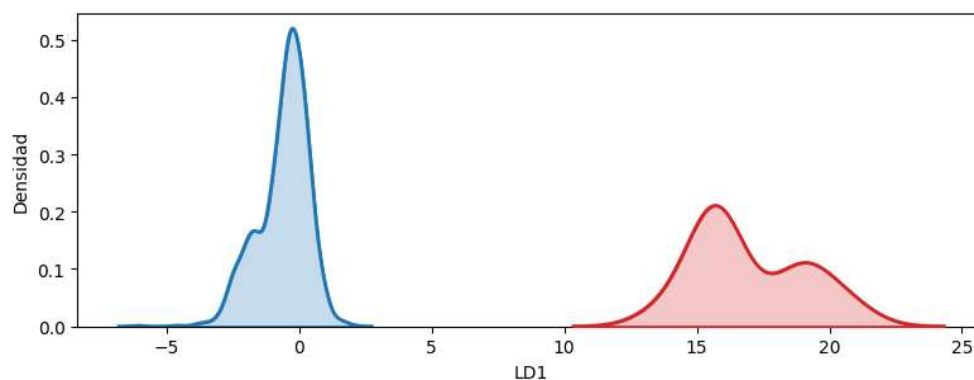


Figura 3.7: Proyección sobre la primera dirección discriminante (LD1) de los lipopeptoides sintéticos originales (rojo) y de la biblioteca combinatoria propuesta **PIP1** (azul).

Al observar cuáles son los descriptores que más contribuyen a distinguir ambas familias, se encontró que los compuestos de la biblioteca combinatoria diseñados en este trabajo contienen mayor proporción de fragmentos cíclicos, pero fundamentalmente mayor solubilidad, polaridad y nitrógenos básicos, posiblemente a raíz de la incorporación del anillo de piperazina. Por otro lado, los lipopeptoides originales presentan más carácter aromático.

Sin embargo, cuando se comparan ambas familias en cuanto a la presencia de arquitecturas moleculares típicas de productos naturales, tal como refleja el *NP-likeness score* de Ertl, no se observan diferencias marcadas entre los lipopeptoides originales y la nueva biblioteca combinatoria. Ambas distribuciones presentan valores centrados cerca de cero y un solapamiento importante, lo que indica que comparten una proporción similar de subestructuras asociadas a compuestos naturales. Si bien esto puede interpretarse como una limitación en su “naturalidad” según este descriptor, también respalda su clasificación como pPNs: estructuras diseñadas racionalmente que incorporan elementos del espacio natural sin replicarlo por completo. En este punto podría decirse que la estrategia de diseño empleada en este trabajo lograría en principio explorar regiones del espacio químico distintas a las de las moléculas originales, incluso si el *NP-likeness* no logra capturar completamente esa cualidad.

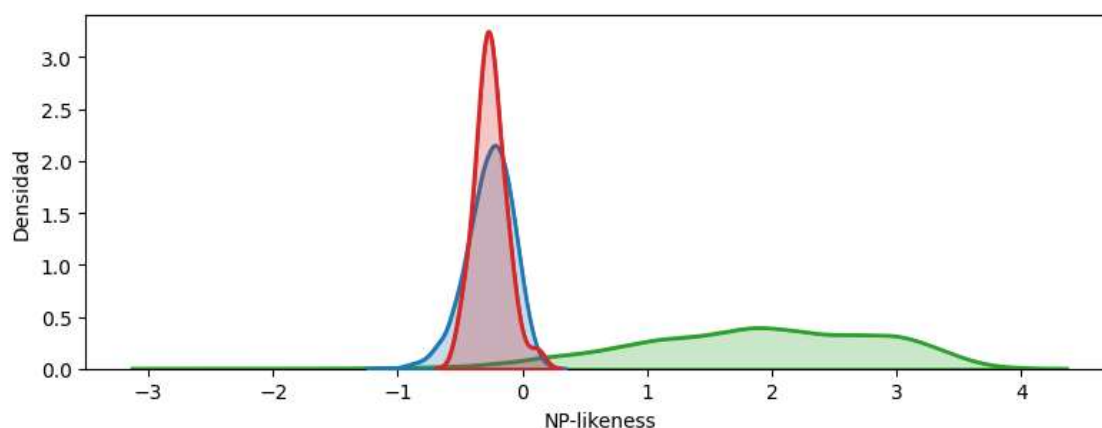


Figura 3.8: Distribución de *NP-likeness* por grupo: PN-T (verde), lipopeptoides sintetizados por el grupo (rojo), biblioteca combinatoria de compuestos potencialmente sintetizables **PIP1** (azul).

Selección de los compuestos a sintetizar

La síntesis de los 1056 compuestos que conforman la biblioteca virtual resulta impracticable desde el punto de vista experimental. Frente a esta limitación, se vuelve

necesario seleccionar una fracción reducida que sea representativa del conjunto. Esta estrategia se justifica por la observación previa de que la biblioteca, aunque diversa, se encuentra distribuida de manera relativamente compacta en el espacio definido por los descriptores moleculares. Esa compacidad sugiere cierto grado de redundancia estructural, lo que abre la posibilidad de capturar la variabilidad relevante mediante un número acotado de compuestos. El desafío, entonces, consiste en identificar una muestra que conserve la heterogeneidad fisicoquímica del conjunto original, maximizando así el valor exploratorio de los compuestos seleccionados. Para ello, se recurrió a herramientas computacionales que permiten evaluar la distribución y representatividad de subconjuntos en función de sus propiedades moleculares.

Con el objetivo de estimar el tamaño mínimo de muestra necesario para preservar la diversidad estructural de la biblioteca virtual combinatoria, se implementó una estrategia basada en la comparación de matrices de covarianza. La premisa subyacente es que una muestra representativa debe reflejar no solo la media de las propiedades moleculares, sino también su variabilidad conjunta.

Para implementar este enfoque, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) empleando los mismos 22 descriptores moleculares utilizados en el Capítulo 2. En este caso, el análisis se restringió exclusivamente al conjunto de compuestos generados mediante la combinatoria de los bloques de construcción, con el objetivo de evaluar la variabilidad intrínseca de dicha colección. La reducción de dimensionalidad obtenida mediante el PCA permitió representar los 1056 compuestos en un espacio tridimensional que retiene aproximadamente el 75 % de la varianza total (Figura 3.9a). Esta representación compacta no solo facilita la visualización y la interpretación de las relaciones entre compuestos, sino que también constituye una base sólida para el análisis estadístico posterior, permitiendo trabajar en un espacio reducido, pero altamente informativo.

Posteriormente se calcularon las matrices de covarianza de las coordenadas PCA de la biblioteca completa y de múltiples muestras aleatorias de tamaños crecientes (entre 5 y 150 compuestos, en incrementos de 5). Para cada tamaño muestral se generaron 5000 muestras aleatorias independientes, y para cada una se aplicó la prueba multivariada de Box M, que permite evaluar si dos matrices de covarianza pueden considerarse estadísticamente equivalentes. Este test contrasta la hipótesis nula de igualdad de covarianzas, y un valor de $p < 0.05$ indica que la muestra difiere significativamente de la biblioteca completa en su estructura de covarianza.

Se registró, para cada tamaño de muestra, la proporción de casos de entre esos 5000 en los que se rechazó dicha hipótesis nula. Como se muestra en la Figura 3.9c, esta proporción disminuye a medida que aumenta el tamaño muestral, reflejando una mayor capacidad de las muestras grandes para capturar la diversidad de la biblioteca. Según este análisis, se consideró que una muestra era representativa cuando la tasa de rechazo de la hipótesis nula era inferior al 5%, criterio que se cumplió cuando la muestra contenía al menos 20 compuestos.

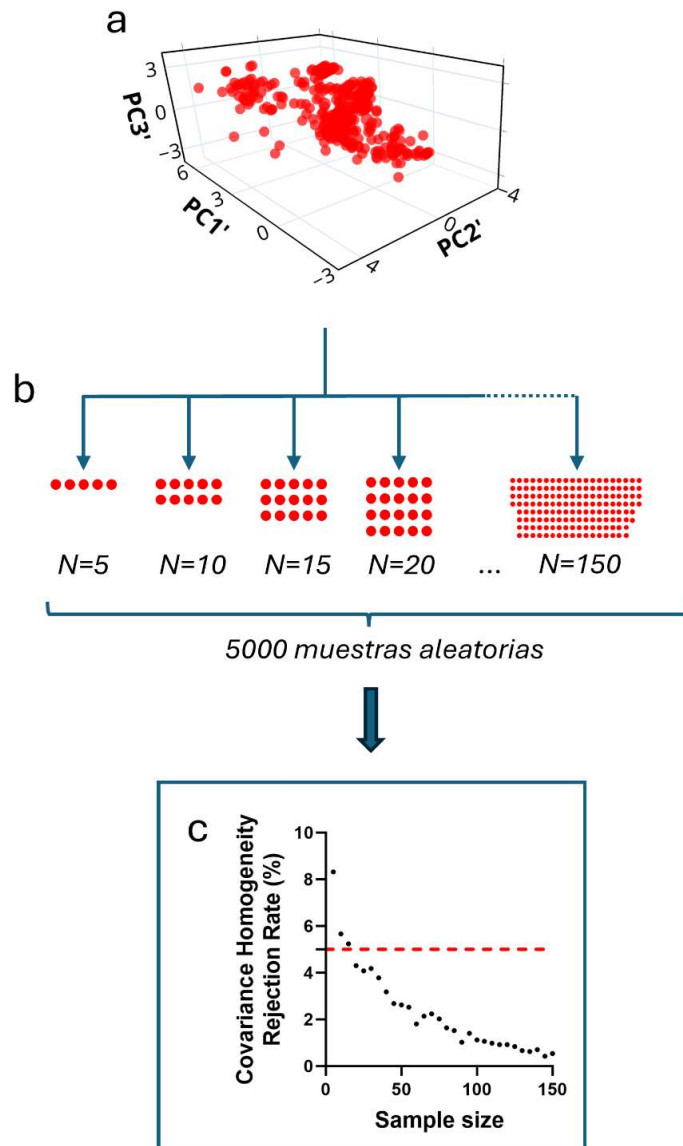


Figura 3.9: Representación de la prueba estadística multivariada de Box M.

Ahora surge el problema concreto de la selección de esos 20 compuestos a sintetizar: en lugar de seleccionarlos al azar dentro de la biblioteca virtual, se optó por utilizar el algoritmo min/max (también conocido como *farthest point sampling*). El procedimiento comienza con un compuesto inicial elegido al azar y, en cada paso siguiente, incorpora el compuesto que se encuentra a la mayor distancia mínima respecto del conjunto ya seleccionado, en el espacio de descriptores reducido por PCA. Es decir, el segundo compuesto seleccionado es aquel que maximiza la distancia con respecto al primero, mientras que el tercer compuesto es el que maximiza la distancia con respecto a los primeros dos compuestos, y así sucesivamente. De este modo, cada nuevo elemento se escoge por ser el más “lejano” a los anteriores, lo que garantiza que los veinte compuestos finales queden lo más dispersos posible dentro del espacio químico de referencia. Este enfoque permite construir una muestra pequeña que preserva de manera razonable la diversidad estructural de la biblioteca completa de 1056 miembros, evitando la redundancia que pueda surgir al realizar selecciones puramente aleatorias.

Por razones prácticas vinculadas a la estrategia sintética, tras la selección inicial mediante el algoritmo min/max se introdujo un ajuste adicional. En los casos en que el conjunto incluía compuestos que presentaban un ácido carboxílico libre o una amida terminal, bloques incorporados a partir de los isonitrilos utilizados en la reacción Ugi Split, se decidió incluir en la colección al precursor correspondiente con grupo éster, para reducir así el esfuerzo sintético. Sin embargo, para que esta decisión no tuviera impacto sobre la diversidad de la muestra final, cada incorporación del correspondiente éster se acompañó de la eliminación de un compuesto del set original que presentara redundancia en alguno de los otros fragmentos (por ejemplo, el ácido carboxílico o la amina de la primera reacción de Ugi). En cada caso se verificó que métricas de dispersión en el espacio PCA, como la distancia media entre compuestos y el volumen del elipsoide robusto (99%), no se redujeran de forma significativa, asegurando que el ajuste sintético no comprometiera la representatividad química del subconjunto final.

A modo ilustrativo, la Figura 3.10 muestra la proyección de la biblioteca combinatoria completa (gris) en el espacio definido por las dos primeras componentes principales del PCA, destacando en rojo los veinte compuestos finalmente seleccionados tras el proceso de muestreo y ajuste. Puede observarse que los compuestos elegidos se distribuyen de manera amplia dentro de la nube de la biblioteca, evitando concentrarse en una sola región y reflejando así la preservación de la diversidad global

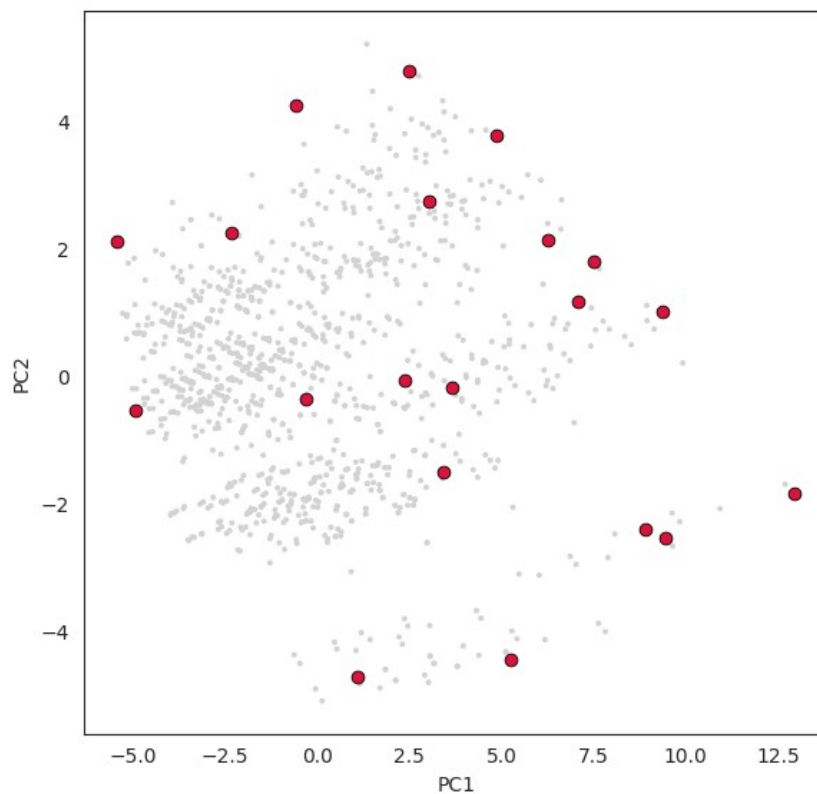


Figura 3.10: Proyección bidimensional del PCA de la biblioteca combinatoria (gris) con los veinte compuestos seleccionados (rojo).

Síntesis

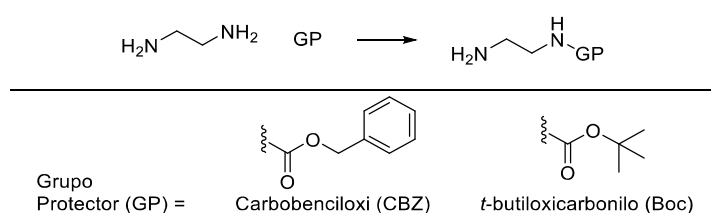
Preparación de bloques de construcción

Una vez definidos los compuestos a sintetizar, resultó necesario preparar aquellos bloques que no estaban disponibles comercialmente. Con el fin de facilitar la lectura de la presente tesis, dichos bloques fueron codificados como **AM** (aminas) e **IS** (isonitrilos), abarcando tanto a los intermediarios como a los productos finales de cada bloque, junto con los esqueletos generales **U** y **Uac**, presentados en el Esquema 3.3.

Preparación de aminas (AM)

Si bien todas las aminas seleccionadas eran comerciales, el uso de la etilendiamina en la primera reacción de Ugi implicaba la protección de uno de sus grupos amino, para evitar así que procediera una reacción de Ugi Split, que quedaba exclusivamente reservada para el segundo paso.

A pesar de que en la bibliografía se han propuesto diversas estrategias para la protección del grupo amino en reacciones tipo Ugi, resulta fundamental considerar las condiciones requeridas para su posterior eliminación. En particular, estas condiciones deben ser ortogonales respecto de aquellas empleadas en la etapa de hidrólisis que sigue a la Ugi, necesaria para desproteger el grupo carboxilo aportado por el isonitrilo (ver Esquema 3.3), y que constituye el paso clave que permite la posterior elongación de la poliamida. Para abordar este tema, se eligieron los protectores mostrados en el Esquema 3.4, y se realizaron ensayos bajo condiciones variadas, cuyos resultados se detallan en la Tabla 3.1.



Esquema 3.4: Monoprotección de etilendiamina.

Entrada	Grupo protector	Solvente	Equivalentes GP	Temperatura	Rendimiento
1	Carbobenciloxi (Cbz)	CH ₂ Cl ₂	1,5	25 °C	68 %
2	Carbobenciloxi (Cbz)	Tolueno	1,5	50 °C	59 %
3	t-butiloxicarbonilo (Boc)	EtOH	2,2	50 °C	86 %
4	t-butiloxicarbonilo (Boc)	CH ₂ Cl ₂	2,2	25°C	99 %

Tabla 3.1: Condiciones probadas para protección de EDA.

La evaluación de los resultados obtenidos permitió concluir que las mejores condiciones, tanto en términos de rendimiento como de simplicidad técnica, correspondían a las especificadas en la entrada **4** de la Tabla 3.1 para la obtención de la etilendiamina monoprotegida, compuesto denominado **AM-1**.

Preparación de isonitrilos (IS)

La segunda fase en la preparación de los bloques esenciales implicó la síntesis de isonitrilos. A lo largo de los años, se han desarrollado numerosos métodos para la obtención de isonitrilos. La síntesis pionera de estos compuestos se atribuye a Lieke quien, en 1859,²¹ llevó a cabo una sustitución nucleofílica utilizando un ioduro de alquilo y cianuro de plata, estableciendo así el denominado método Gautier. En 1868 Hofmann presentó otro método relevante al emplear aminas primarias y cloroformo en presencia de álcalis,

estableciendo la conocida síntesis de carbilamina de Hofmann.²² Este método, popularmente denominado el método Hofmann, ha perdurado en la historia de la química como una ruta destacada para la generación de isonitrilos y, además, ha sido empleado como una prueba de la presencia de aminas primarias, debido al característico olor de los isonitrilos formados (Figura 3.11).

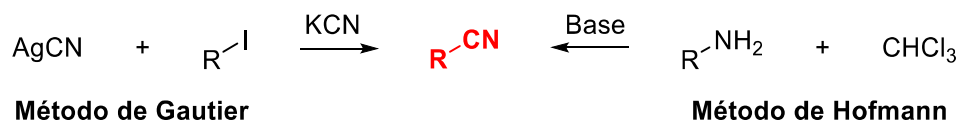
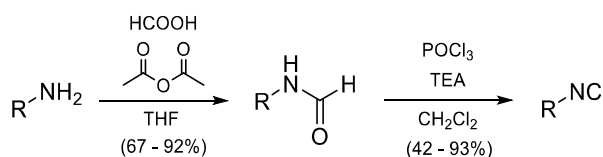


Figura 3.11: Primeras técnicas para síntesis de isonitrilos.

Ambos métodos históricos para la síntesis de isonitrilos sentaron las bases para el estudio de las aplicaciones de estos interesantes compuestos. La síntesis de isonitrilos experimentó un desarrollo lento hasta principios del siglo XX, en parte atribuido al olor desagradable y distintivo de estos compuestos, lo que los hacía poco atractivos para la investigación. No obstante, el interés en los isonitrilos resurgió con la aparición de las primeras RMC, impulsando la mejora continua de las metodologías para su preparación.

En la actualidad, el método más general para la síntesis de isonitrilos implica la deshidratación de formamidas utilizando oxiclórico de fósforo²³ o trifosgeno.⁵ Por ende, se optó por la síntesis de isonitrilos mediante esta metodología, considerada ventajosa en términos de rendimiento y costos. En este punto se debió sintetizar primero estas formamidas a partir de las aminas primarias correspondientes, como se muestra en el Esquema 3.5.



Esquema 3.5: Ruta sintética genérica para la obtención de isonitrilos.

De entre las numerosas técnicas descritas para la formilación de aminas primarias²⁴, se seleccionó un método que utiliza ácido fórmico y anhídrido acético en tetrahidrofurano (THF), debido a su eficacia y a la simplicidad operativa que presenta, obteniendo excelentes rendimientos (Figura 3.12).

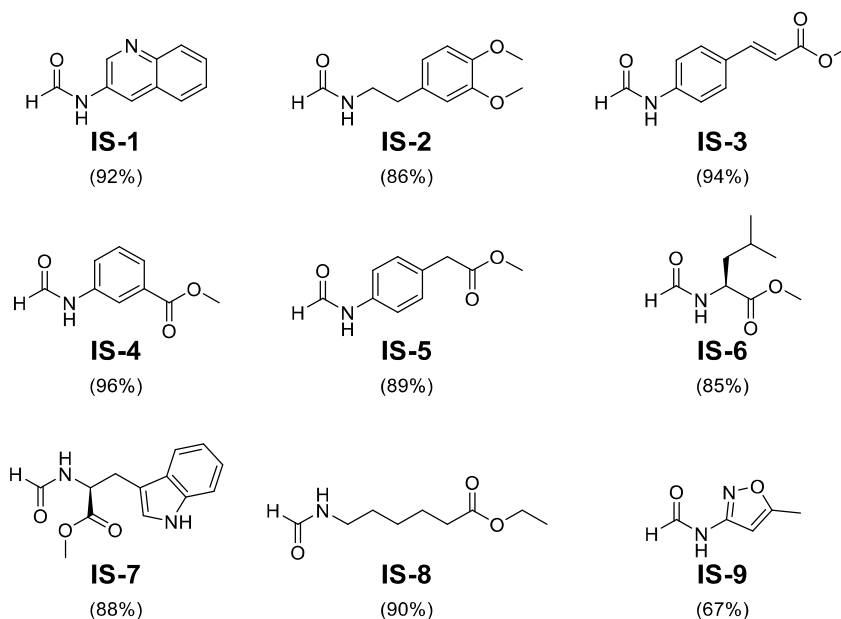
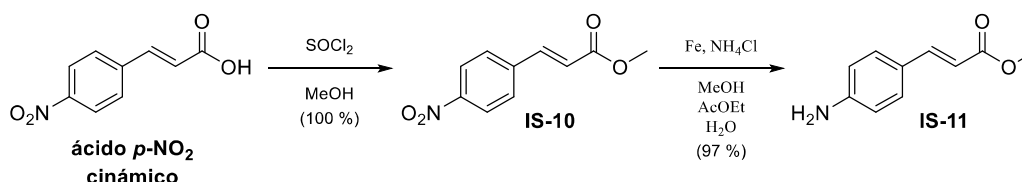


Figura 3.12: Rendimientos de formilación.

Es importante remarcar que para los casos de las formamidas **IS-3** – **IS-8** fue necesario realizar transformaciones previas a la formilación. Considerando que se partió de los ácidos libres, para los casos de **IS-3** – **IS-7** fue indispensable protegerlos mediante el tratamiento de estos con SOCl_2 en metanol, obteniendo los metil ésteres correspondientes con rendimientos cuantitativos.

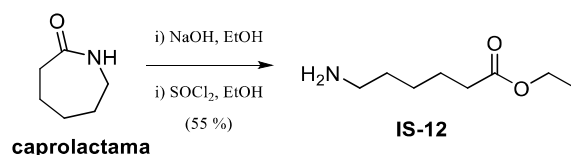
Existieron dos casos para los cuales fue necesario realizar modificaciones a la ruta sintética genérica planteada. Puntualmente, para el caso de la obtención de la formamida **IS-3**, se partió de ácido *p*-nitro cinámico, cuyo grupo nitro se redujo²⁵ para generar la amina precursora **IS-11** (Esquema 3.6).



Esquema 3.6: Ruta sintética para la obtención de **IS-11**.

La segunda excepción fue la síntesis de la formamida **IS-8**. Dado que en el laboratorio contábamos con caprolactama como material de partida, se realizó primero la apertura de la misma en condiciones suaves generando *in situ* el aminoácido libre, que se esterificó

durante el proceso con rendimientos moderados²⁶ para dar la amina **IS-12** que luego sería formilada para dar **IS-8** (Esquema 3.7).



Esquema 3.7: Ruta sintética para la obtención de **IS-12**.

En el contexto de las reacciones de formilación, se puede observar la eficacia de la transformación química mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Un fenómeno distintivo que evidencia esta alteración es la presencia de dos rotámeros característicos en los productos, los cuales se deben a las configuraciones *E* (trans) y *Z* (cis) de la formamida (Figura 3.13). Estas configuraciones suelen estar presentes en proporciones comparables. La existencia de una barrera rotacional significativa alrededor de la unión N–C(O), derivada del carácter de doble enlace, es fundamental en este fenómeno. Esta barrera, a su vez, conlleva a una rotación generalmente lenta en la escala temporal de la RMN a temperatura ambiente. Esta lentitud en la rotación permite la distinción clara de los rotámeros *Z* y *E* en los espectros de RMN.²⁷

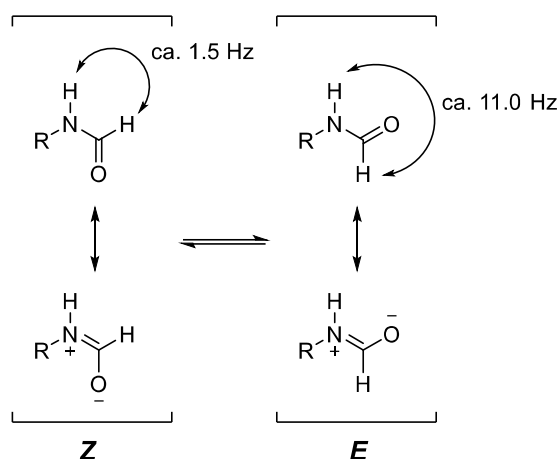


Figura 3.13: Equilibrio conformacional en formamidas con constante de acoplamiento *J* para cada rotámero, con estructuras de resonancia principales.

Por este motivo, es común observar que todas las señales, tanto en el espectro de RMN ¹H como en el de ¹³C, se encuentran duplicadas. Un aspecto destacado de esta duplicación

radica en la notoria diferencia entre las señales de los hidrógenos CHO de uno y otro conformero. Estas señales, además de manifestarse en distintos desplazamientos químicos, típicamente en la región de 8–9 ppm, exhiben constantes de acoplamiento claramente diferenciadas. Específicamente, el acoplamiento $J_{H,H}$ CHO–NH es aproximadamente de 11,0 Hz para el isómero *E*, mientras que para el *Z* es de alrededor de 1,5 Hz.

Este fenómeno se evidenció de manera significativa en todos los espectros obtenidos a partir de las reacciones de formilación de las aminas, como se ejemplifica con el caso de la formamida **8** (Figura 3.14).

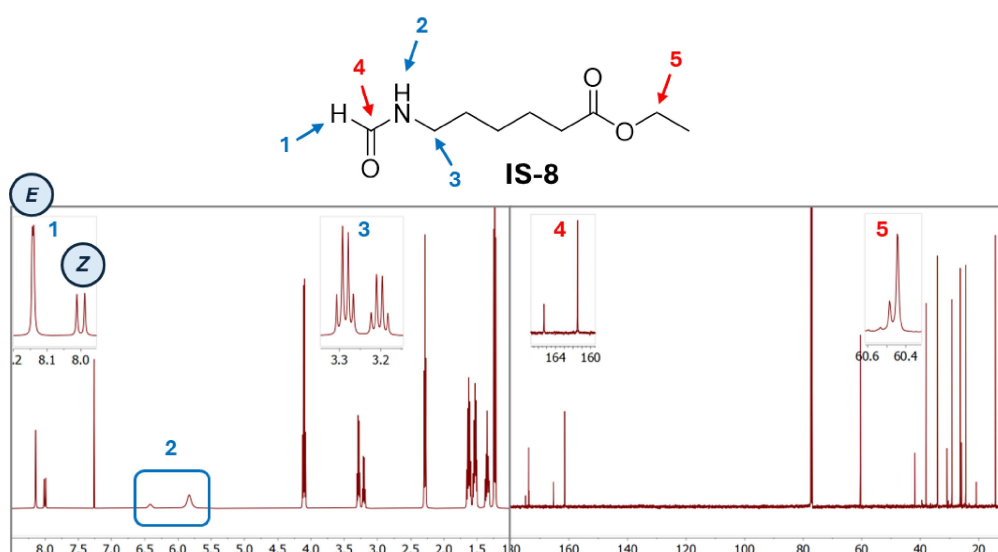


Figura 3.14: Espectro de RMN ^1H (izquierda) y RMN ^{13}C (derecha) de **IS-8**.

Se observó duplicidad de señales, como se ejemplifica en las regiones ampliadas, que indica el equilibrio conformacional mencionado.

Posteriormente, las formamidas obtenidas fueron transformadas en los isonitrilos correspondientes mediante deshidratación con oxiclорuro de fósforo.^{28,29} La aplicación de esta metodología sencilla implica la adición gradual del reactivo deshidratante a una solución fría de formamida en diclorometano anhidro con trietilamina, ya que la reacción es fuertemente exotérmica. Este enfoque permitió alcanzar conversiones completas en un lapso de hasta 2 h, logrando rendimientos de hasta 93%, como se muestra en la Figura 3.15.

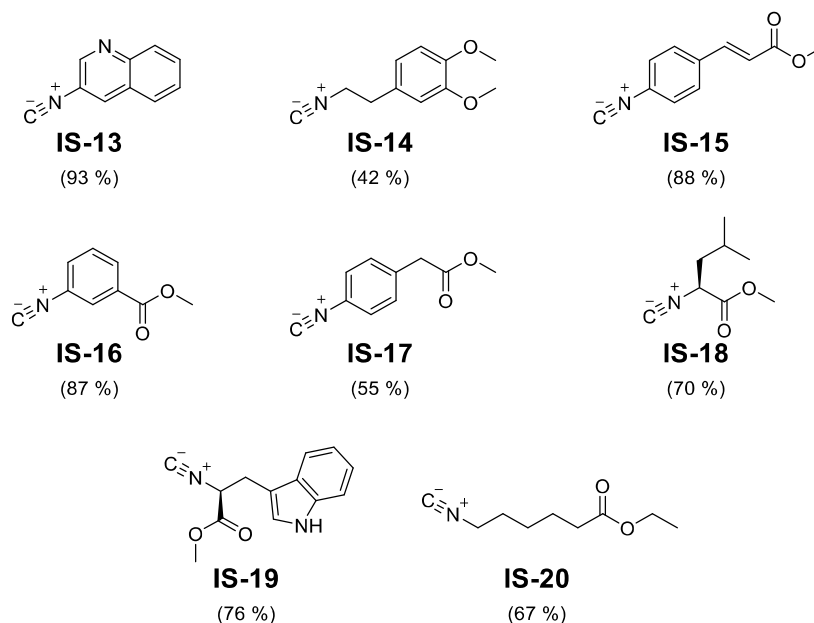


Figura 3.15: Rendimientos de deshidratación.

Cabe destacar que no fue posible obtener el isonitrilo correspondiente a partir de la formamida **IS-9** mediante esta vía, posiblemente debido a las condiciones fuertes de deshidratación, sumadas a la inestabilidad del heterociclo en medio ácido. En este punto se planteó generar el isonitrilo *in situ* en condiciones más suaves con trifosgeno sin necesidad de aislarlo, como se detallará más adelante.

La identificación y caracterización de los isonitrilos sintetizados se realizó mediante espectroscopía de RMN. La evidencia de la deshidratación por RMN está dada fundamentalmente por la simplificación de los espectros, ya que no existe un equilibrio conformacional como el mencionado previamente. Una particularidad del grupo isonitrilo es el comportamiento en RMN ^{13}C , puesto que los C unidos al átomo de nitrógeno se presentan como tripletes debido al acoplamiento con ^{14}N , un núcleo con espín 1.

En la Figura 3.16 se presentan los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del isonitrilo **IS-20**, que permite analizar la naturaleza del compuesto obtenido. En el espectro RMN ^1H puede notarse la ausencia de las señales provenientes de los H de la amida, tanto CHO como NH .

En el caso del espectro de ^{13}C de **IS-20** se observan los acoplamientos entre el nitrógeno y los C vecinos, con constantes $J_{\text{C,N}}$ de 5,74 Hz para el C terminal y 6,22 Hz para el C alifático, consistentes con los encontrados en otros isonitrilos.³⁰

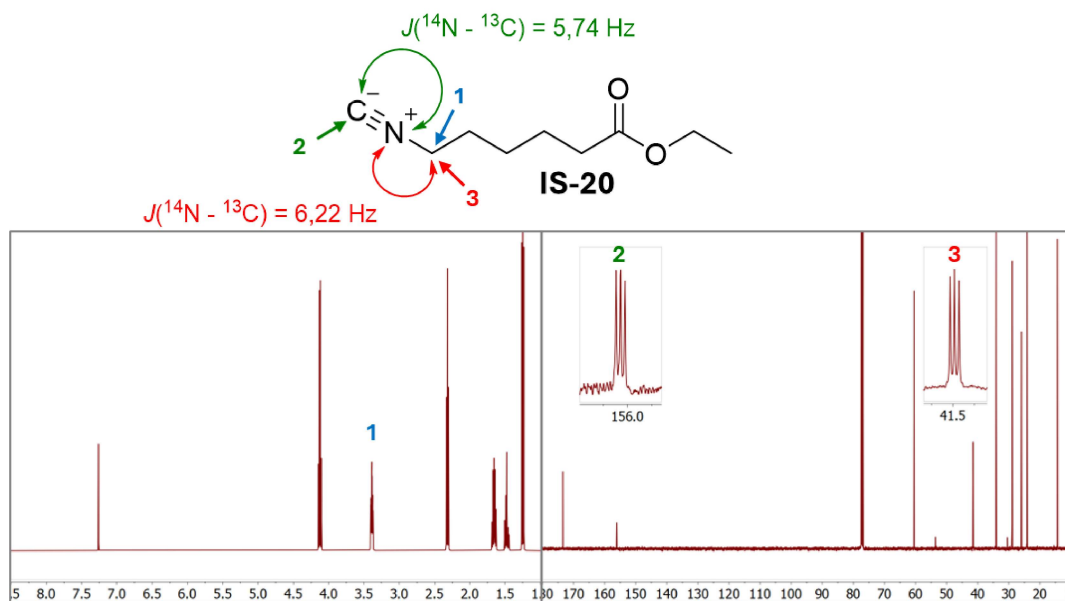
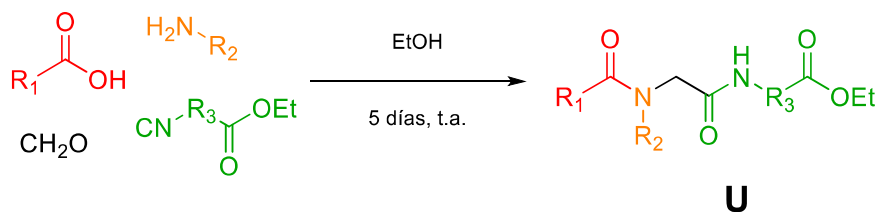


Figura 3.16: Espectro de RMN ^1H (izquierda) y RMN ^{13}C (derecha) de **IS-20**.

Preparación de ácidos carboxílicos (**Uac**)

Con la etilendiamina monoprottegida y los isonitrilos ya sintetizados, se encaró entonces la primera reacción de Ugi para la obtención de los productos con esqueleto general **U** (primer paso del Esquema 3.3).

En cuanto a la metodología de síntesis, se consideraron las condiciones óptimas para la obtención del aducto Ugi.³¹ Las reacciones se llevaron a cabo en etanol, aprovechando su capacidad de actuar como un solvente polar que facilita la solubilización de todos los reactivos. Además, los productos generados típicamente presentan baja solubilidad en etanol, lo que contribuye a obtener rendimientos superiores y facilita los procesos de aislamiento. En relación con el orden de adición de reactivos, se inició la reacción mezclando la amina con el formaldehído para formar la imina, y después de 30 minutos se incorporaron a la mezcla de reacción el isonitrilo y el ácido carboxílico. Se trabajó a temperatura ambiente y en una concentración elevada de reactivos (1 M), ya que se ha informado que estas condiciones favorecen la reacción de Ugi.⁴ Una vez que la reacción alcanzó la completitud, generalmente en un lapso de 4-5 días, se llevó a cabo el aislamiento del producto mediante la evaporación del etanol, seguido de la purificación subsiguiente mediante cromatografía en columna.



Esquema 3.8: Reacción multicomponente de Ugi.

Para cada una de estas reacciones, que se pueden resumir en el Esquema 3.8, se combinaron los bloques necesarios para generar los precursores de esqueleto general **U** (Figura 3.5) que conducirían a los productos finales seleccionados a partir de la biblioteca combinatoria. Los rendimientos de las reacciones fueron muy buenos considerando que en esta reacción se combinan cuatro componentes y se generan 3 enlaces en un solo paso.

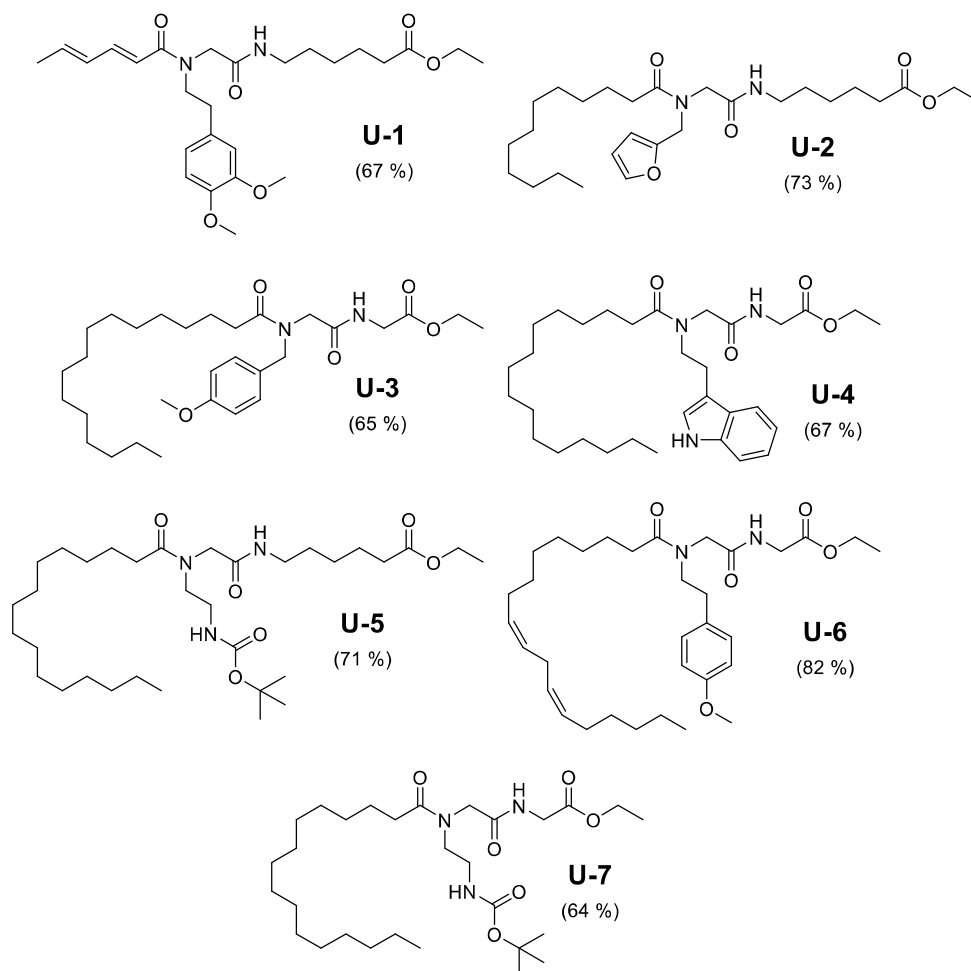


Figura 3.17: Estructuras de los productos Ugi **U** con sus rendimientos.

La caracterización de estos intermediarios se realizó mediante espectroscopía de RMN encontrándose las señales esperadas para estas estructuras, aunque se encontró que estos eran más complejos de lo esperado. Por ejemplo, en el espectro RMN ^1H de **U-4** se observaron tres regiones diferentes mostradas en la Figura 3.18 con sus respectivas ampliaciones: la zona de 0,5 – 2,5 ppm (campo alto), la zona de 2,7 – 4,5 ppm (campo intermedio) y la zona de 6,8 – 8,5 ppm (campo bajo).

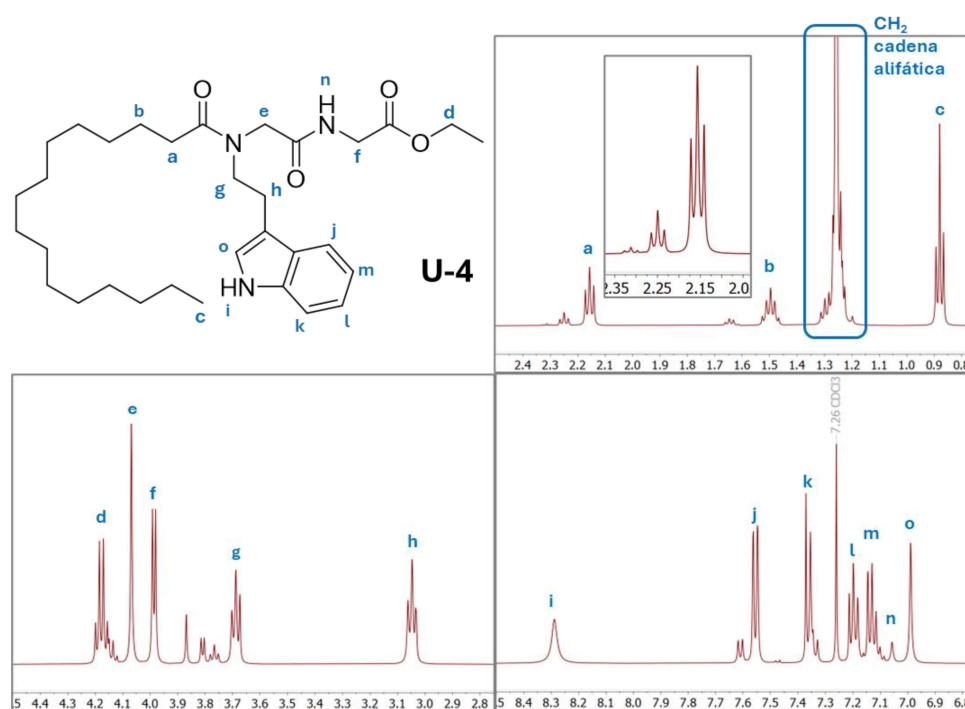


Figura 3.18: Espectro de RMN ^1H de **U-4**.

Inicialmente, en la región de campo alto, únicamente se identificaron las señales atribuibles a la cadena alifática proveniente del ácido carboxílico. Se destacaron como señales diagnósticas los metilenos cercanos al carbonilo (**a** y **b**), así como también el metilo terminal (**c**), resaltando su importancia en la interpretación del espectro. Por otro lado, en la ampliación a campos más bajos las señales típicas que se distinguen son los metilenos procedentes de la amina (**g** y **h**), del formaldehído (**e**) y los metilenos incorporados por el isonitrilo (**d** y **f**). Por último, el análisis de la zona de H aromáticos del espectro de RMN ^1H permitió identificar netamente los protones del indol introducido en la estructura (**i**, **j**, **k**, **l**, **m** y **o**), con señales claras y bien resueltas, como así también el H de la amida NH (**n**).

Es importante destacar que se trató de muestras con espectros complejos, que presentaban señales duplicadas, o incluso a veces triplicadas (como en el caso de la señal **a**), en una proporción de 3:1 aproximadamente, respectivamente. Este efecto parece acentuarse en los H cercanos al enlace amida (**a**, **b**, **e**, **f** y **g**), aunque también se observa en algunas señales aromáticas (**j** y **k**).

Asimismo, en el espectro heteronuclear bidimensional HSQC (Figura 3.19) se evidencian más claramente las señales duplicadas, tanto en la proyección del espectro de ^1H como en el de ^{13}C .

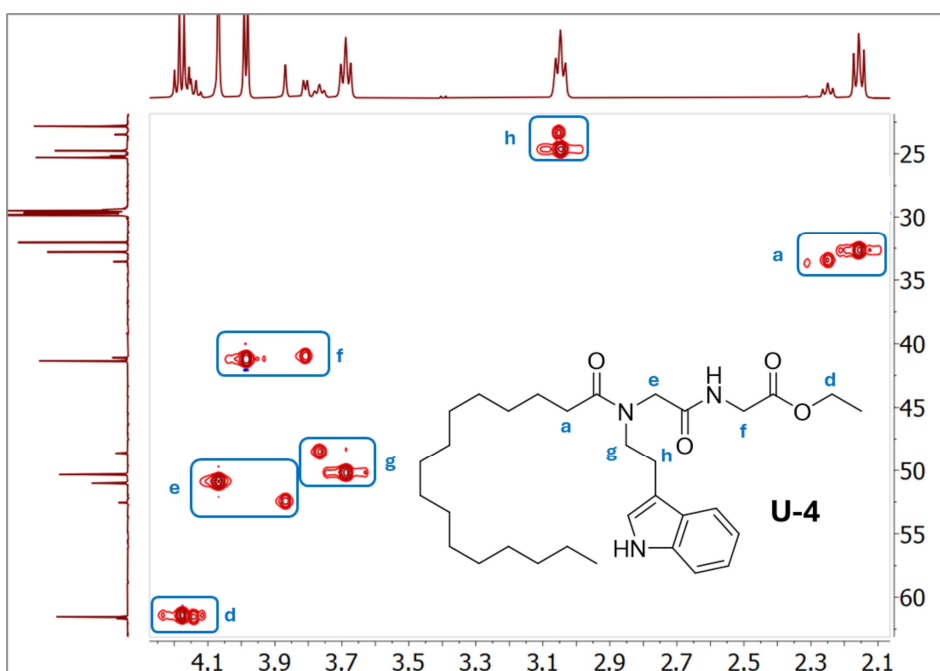


Figura 3.19: Espectro de RMN HSQC de **U-4**.

Este fenómeno fue observado en diversos grados en todos los compuestos sintetizados, planteando así un desafío considerable en la asignación completa e inequívoca de cada molécula. Dado que los productos resultantes de la reacción de Ugi carecen de C asimétricos, se excluyó la posibilidad de que este comportamiento en la RMN se debiera a la presencia de estereoisómeros. En cambio, se consideró como hipótesis plausible que las conformaciones *E* y *Z* de la amida *N,N*-disustituida podrían ser la fuente de dicho comportamiento (Figura 3.20). Esta consideración ofrece una perspectiva interesante para entender la complejidad estructural y conformacional de los productos resultantes de las reacciones de Ugi, y destaca la necesidad de una evaluación detallada y cuidadosa de la

información espectral para lograr una asignación adecuada en estos sistemas moleculares.

Dado que la barrera energética de rotación en el enlace C-N es relativamente elevada, entre 15 y 20 kcal/mol, la rotación se encuentra restringida, lo que plantea la posibilidad de la existencia de dos isómeros geométricos, *E* y *Z*. A diferencia de las amidas *N*-sustituídas, donde la repulsión entre el sustituyente del nitrógeno y el oxígeno del carbonilo favorece la conformación *E*, en los productos sintetizados, donde uno de los nitrógenos posee dos sustituyentes, ambas conformaciones pueden coexistir en proporciones similares.

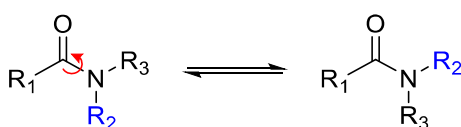


Figura 3.20: La rotación del enlace C-N de una amida da lugar a conformeros.

En resumen, este fenómeno se explica mediante la presencia de conformeros de la molécula en solución.³² Además, aparentemente la barrera energética de interconversión entre conformeros es lo suficientemente alta como para que cada uno de ellos, a pesar del fenómeno de intercambio químico, pueda ser detectado en el espectro.

Dicha hipótesis se confirmó realizando espectros NOESY. En la Figura 3.21 se muestra una ampliación de aquel espectro bidimensional, donde pueden encontrarse las correlaciones asociadas a los nOe de los H cercanos espacialmente. Así se encontraron correlaciones entre los H que complementan y confirman la caracterización estructural.

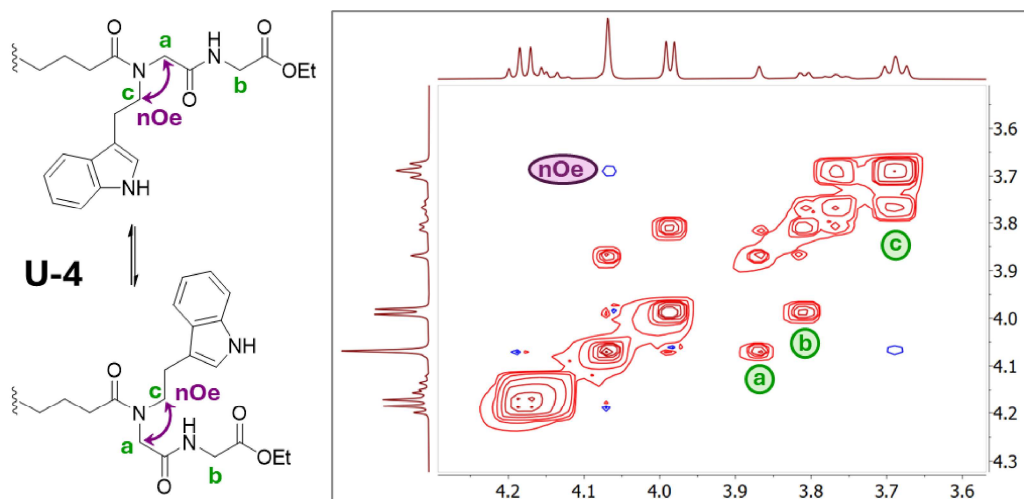


Figura 3.21: Espectro de RMN NOESY de **U-4**. Rojo: intercambio químico (EXSY); azul: efecto Overhauser nuclear (NOE)

No obstante, lo interesante radica en que, mediante la misma secuencia de experimentos NOESY, donde la transferencia de polarización se relaciona con la distancia entre los núcleos sometidos a relajación cruzada, es factible detectar intercambio químico. Esto se debe a que, si un núcleo oscila entre dos entornos químicos diferentes con una frecuencia comparable a la frecuencia con la que resuena durante el experimento, pueden surgir señales de correlación asociadas a estos distintos entornos.³⁹ En otras palabras, es viable identificar correlaciones entre un mismo núcleo en distintos conformeros, como se muestra en la Figura 3.21, lo que respalda experimentalmente la hipótesis de que la multiplicidad de señales se origina según lo propuesto.

Los resultados obtenidos de la primera serie de compuestos obtenidos a partir de la reacción multicomponente de Ugi demostraron ser favorables, pudiéndose aislar el aducto de interés como el producto principal en la mezcla de reacción. Sin embargo, en algunos casos, la progresión de la reacción no fue tan clara como se anticipaba, evidenciándose en su lugar la formación de productos secundarios. Dada la complejidad inherente a este tipo de reacciones, en las cuales los componentes iniciales están involucrados en múltiples equilibrios, es razonable esperar que el resultado global de estas transformaciones químicas conduzca a la formación de productos alternativos. En esta investigación, en ocasiones específicas, se observó la formación de productos en una proporción lo suficientemente significativa como para permitir su aislamiento a partir del medio de reacción y su análisis estructural. Por ejemplo, durante el proceso de

purificación de **U-3**, se identificó y caracterizó un producto secundario (**U-3'**), cuya estructura se muestra en la Figura 3.22.

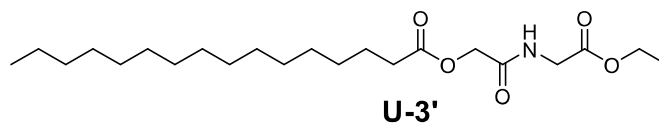


Figura 3.22: Estructura del producto Passerini **U-3'**.

El espectro de RMN ^1H de **U-3'** es notablemente similar al de otros productos obtenidos de esta familia. La principal distinción radica en la ausencia del residuo de amina en esta molécula, ya que no se incorporó en su estructura. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se presentan en la Figura 3.23, destacando algunas señales importantes para su identificación y caracterización.

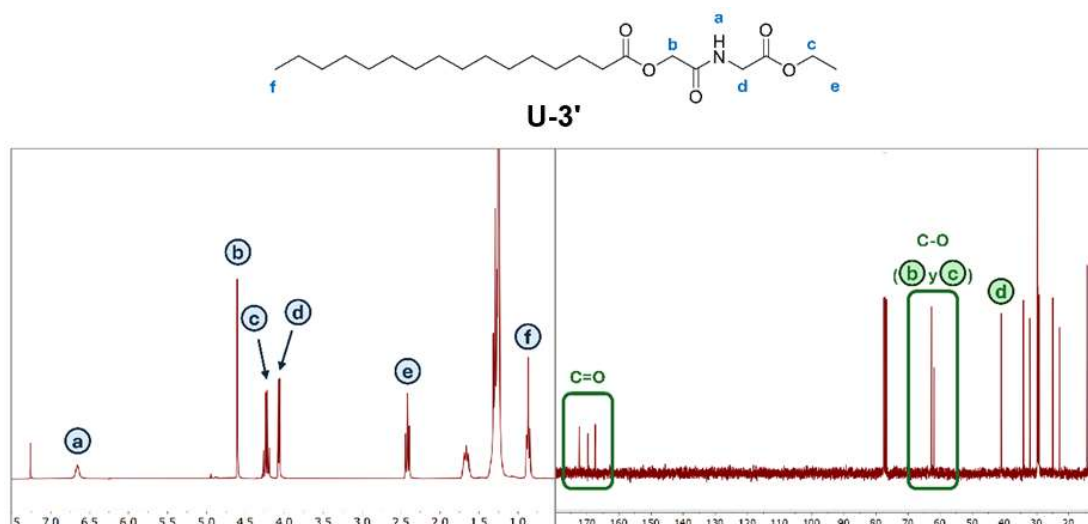


Figura 3.23: Espectro de ^1H y ^{13}C de **U-3'**.

Es evidente que este producto se formó a través de la otra RMC de la que pueden participar los isonitrilos: la reacción de Passerini. En el contexto de la reacción de Passerini, se combina un isonitrilo, un ácido carboxílico y un aldehído o cetona, dando como resultado una α -acilcarboxamida. A pesar de que se han propuesto varios mecanismos para esta reacción, los más ampliamente aceptados implican la formación de un imidato, seguido por la transformación subsiguiente en el producto final mediante la transferencia de un grupo acilo en acilimidatos (reordenamiento de Mumm)³⁴ (Figura 3.24).

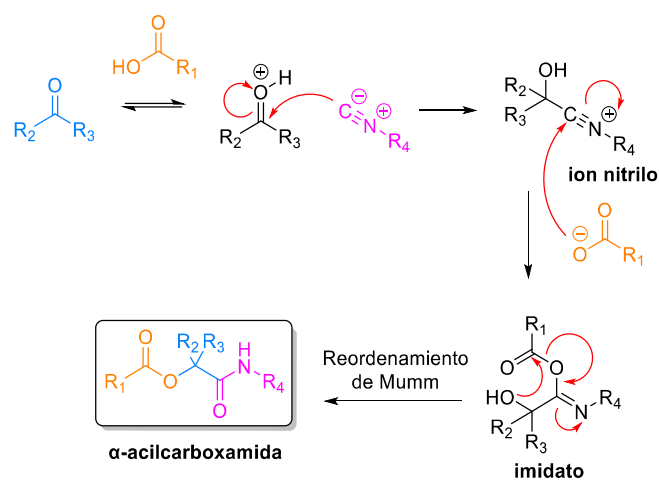
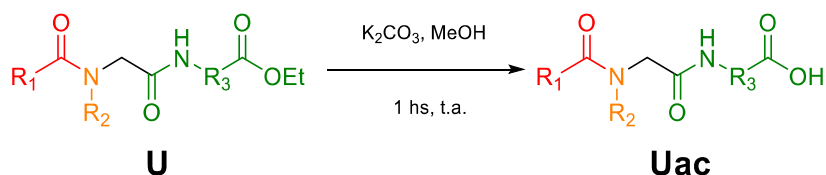


Figura 3.24: Mecanismo en etapas propuesto para la reacción de Passerini.

La reacción de Passerini se presenta como una competencia directa a la reacción de Ugi. En situaciones en las que la amina carece de la suficiente nucleofilia para formar la imina con el compuesto carbonílico, como ocurre en el primer paso de la reacción de Ugi, el isonitrilo reaccionará con este último, conduciendo finalmente a la formación del producto Passerini. La imposibilidad de obtener el producto deseado al emplear aminas con baja nucleofilia constituye una limitación sustancial de la U-4CR, la cual ya fue identificada y comunicada por el propio Ugi en un estudio sobre la reactividad de β -aminoacrilatos en 1964.³⁵

Este fenómeno subraya la importancia de considerar la naturaleza de la amina en la reacción multicomponente y del solvente empleado, ya que su capacidad para formar la imina con el compuesto carbonílico dicta el curso de la reacción, influyendo directamente en la obtención de los productos deseados. Afortunadamente en nuestro caso, todas las aminas fueron suficientemente reactivas como para conducir a los productos Ugi, a pesar de que fueron seleccionadas a partir de consideraciones vinculadas a su relevancia biológica y no a su naturaleza química.

Continuando con la síntesis, se prosiguió con la hidrólisis de los productos Ugi **U** para obtener los ácidos **Uac** buscados según el Esquema 3.9.

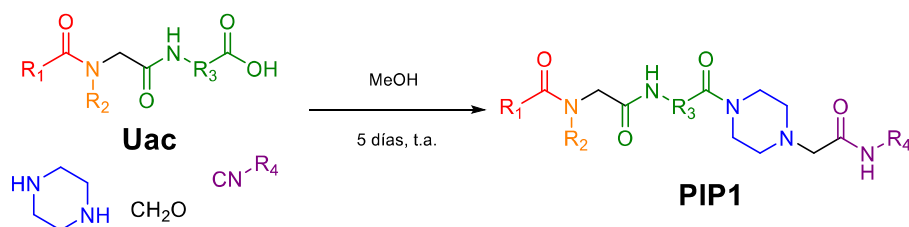


Esquema 3.9: Reacción de hidrólisis para obtener los ácidos precursores.

El procedimiento de hidrólisis empleado consistió en la preparación de una solución de éster en metanol, seguido de la adición de K_2CO_3 a temperatura ambiente. El progreso de la reacción fue monitoreado mediante cromatografía en capa fina (TLC). Al finalizar, la solución fue acidificada con una solución de HCl al 5 % hasta que el pH alcanzó 2, lo que resultó en la precipitación del correspondiente ácido con rendimientos cuantitativos y alta pureza, eliminando la necesidad de procedimientos adicionales.

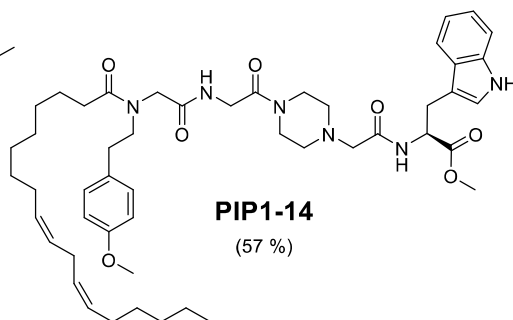
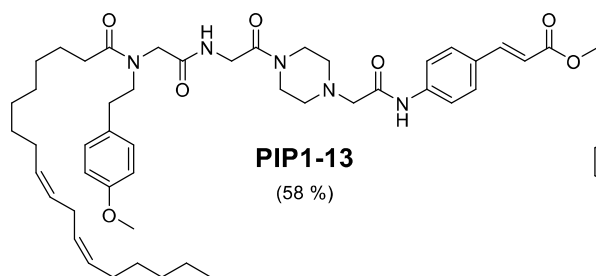
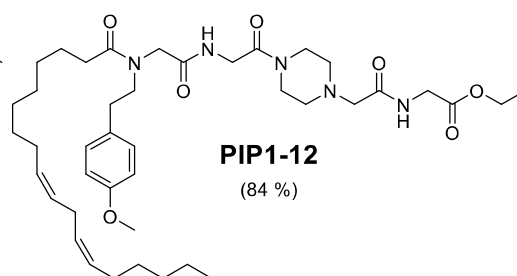
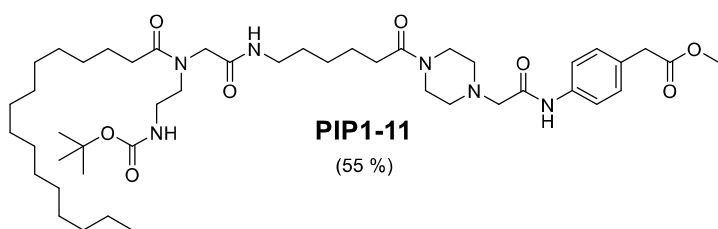
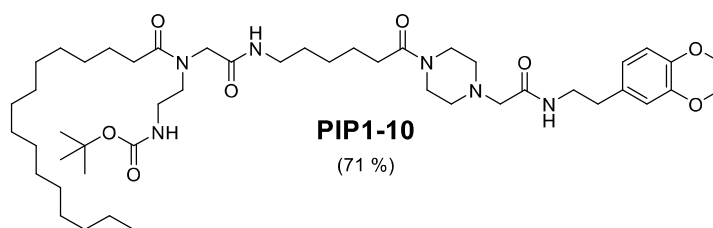
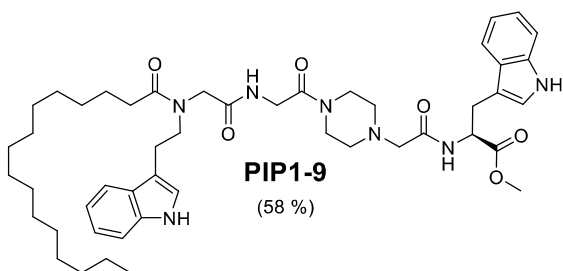
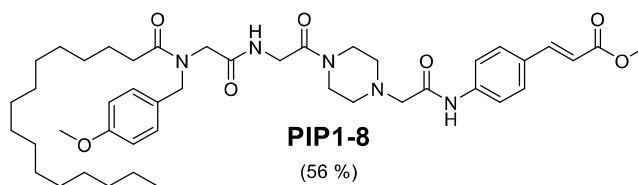
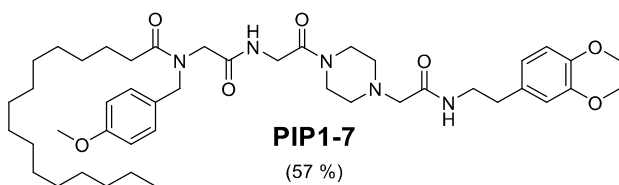
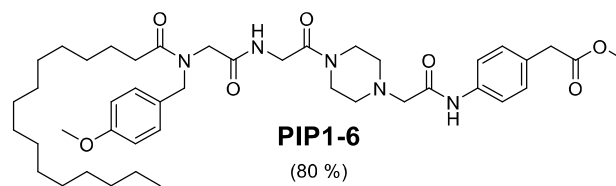
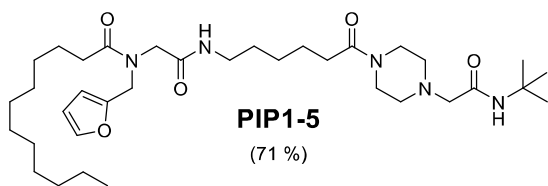
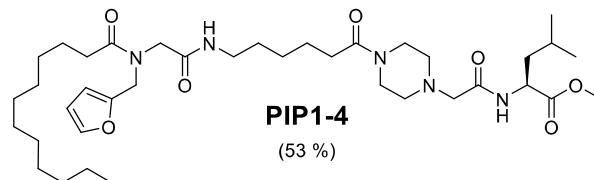
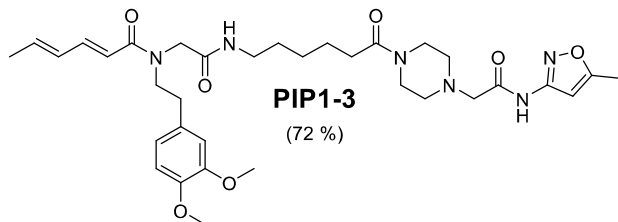
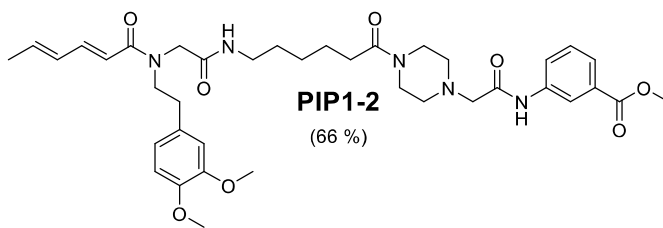
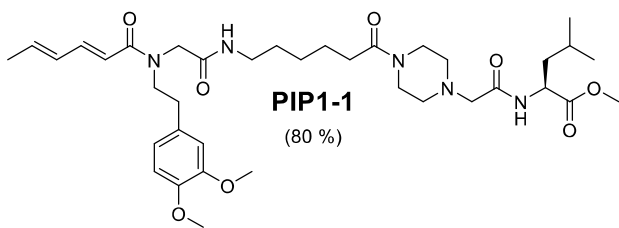
Síntesis de los productos Ugi Split (PIP1)

Para finalizar con la ruta sintética propuesta originalmente se llevó a cabo la reacción multicomponente de Ugi Split sobre los ácidos obtenidos previamente (Esquema 3.10).



Esquema 3.10: Reacción multicomponente de Ugi Split.

Como se mencionó previamente, la implementación de esta variación de la clásica reacción multicomponente de Ugi resulta interesante, ya que introduce al esqueleto molecular una amina terciaria, enriqueciendo la complejidad del aducto. En consecuencia, se empleó esta variante sintética para la síntesis de pPNs con carácter catiónico, utilizando la piperazina como elemento clave. Esta estrategia permitió obtener rendimientos que oscilaron entre moderados y buenos (Figura 3.25).



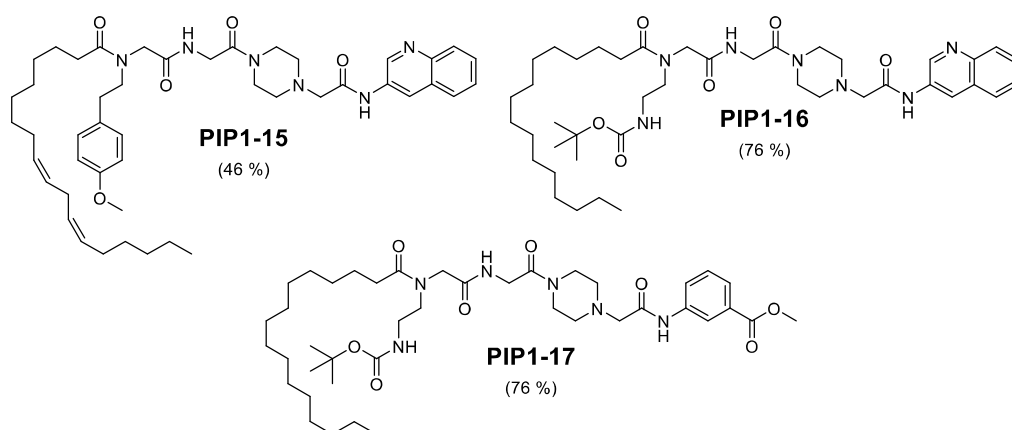
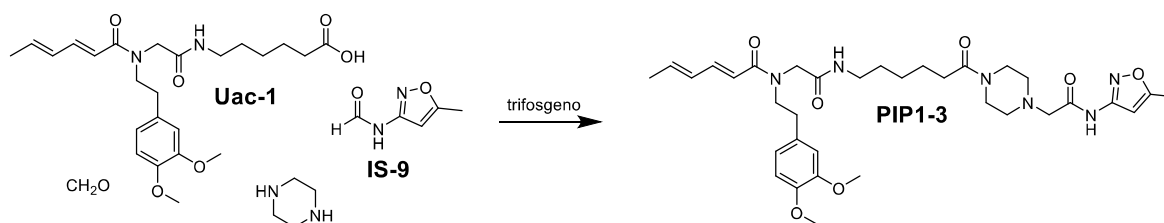


Figura 3.25: Rendimientos de la reacción de Ugi Split.

La única excepción destacable es la relacionada con la síntesis del compuesto **PIP1-3**. Como se mencionó anteriormente, no fue posible obtener el isonitrilo requerido para la segunda condensación a partir de su formamida **IS-9**. Se intentó entonces una metodología que implicó la formación *in situ* del mismo, usando trifosgeno como deshidratante según se muestra en el Esquema 3.11.



Esquema 3.11: Síntesis de **PIP1-3** empleando trifosgeno como reactivo para generar el isonitrilo *in situ*.

Como siempre, la caracterización inicial se realizó a través de la espectroscopía de RMN. A modo de ejemplo, se muestra en las Figura 3.26 y Figura 3.27 diferentes ampliaciones del espectro de RMN ^1H del producto **PIP1-6**.

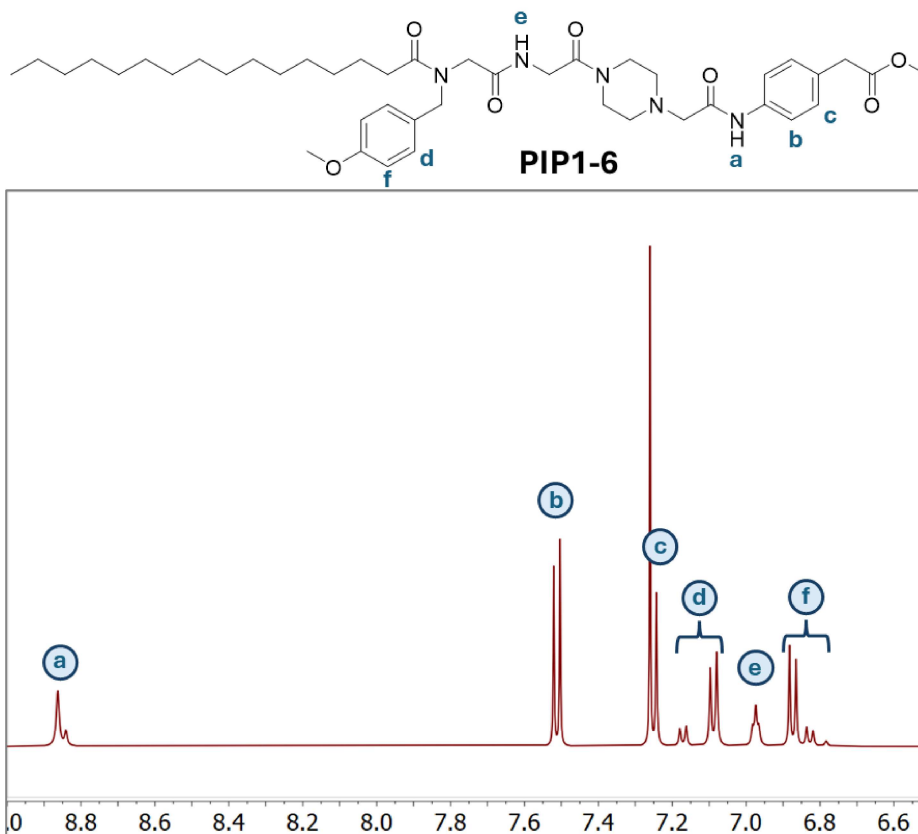


Figura 3.26: Ampliación del espectro de RMN ^1H en la zona de campo bajo de **PIP1-6**.

Se evidencian las señales aromáticas correspondientes al sistema *para*-sustituido del anillo proveniente del isonitrilo, que aparecen como dos dobletes con $J = 8,50$ Hz (**b** y **c**), así como también los dos dobletes que provienen de la *p*-metoxibencilamina con acoplamiento con valores de $J = 8,61$ Hz (**d** y **f**). En la zona de campo bajo, además de los sistemas aromáticos, pueden observarse las diferentes señales de H de amidas NH , ya sea un singulete para la señal **a**, o un triplete ($J = 4,26$ Hz) para **e**.

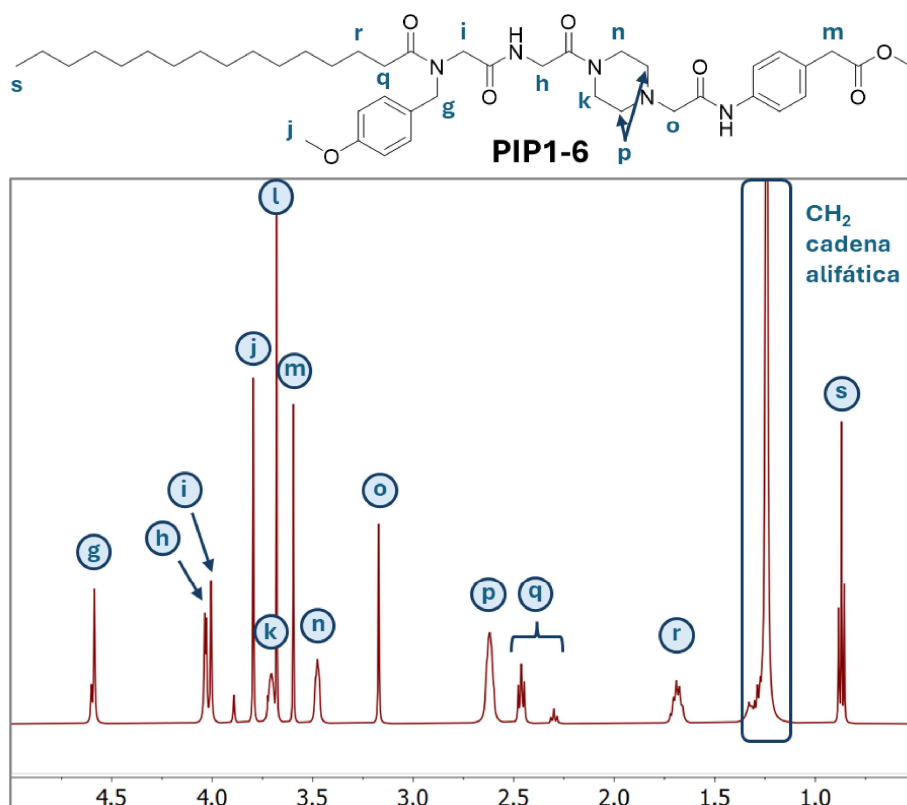


Figura 3.27: Ampliación del espectro de RMN ^1H en la zona de campo alto de **PIP1-6**.

En la zona de campo alto, además de las señales características del bloque proveniente del ácido graso (**q**, **r** y **s**), pueden verse claramente las señales de singuletes de todos los CH_2 cercanos a grupos desprotectores (**g**, **h**, **i**, **m** y **o**), salvo la señal **h** que se presenta como un doblete de $J = 4,18$ Hz, ya que acopla con el H de la amida **e**. En aquella ampliación también se observan singuletes de los metilos unidos a oxígeno (**j** y **l**) y tres señales anchas del bloque proveniente de la piperazina (**k**, **n** y **p**), las dos primeras que integran para dos H, mientras que la última integra para cuatro. También resulta importante destacar que las señales **a**, **d**, **f**, **g**, **i** y **q** se encuentran duplicadas, dado que **PIP1-6** presenta confórmeros en solución.

Para la caracterización completa de todos los productos Ugi Split también se llevó a cabo la asignación de los espectros de ^{13}C , como se ejemplifica para el caso de **PIP1-6** (Figura 3.28). En el mismo se observaron tres regiones muy marcadas: la zona de carbonilos (donde pueden verse claramente 5 señales), una zona de C aromáticos y una de C alifáticos. Se puede remarcar que de la zona de C aromáticos se diferencian dos C más desprotegidos (**t** y **u**), que son aquellos unidos a los heteroátomos de O y N, respectivamente.

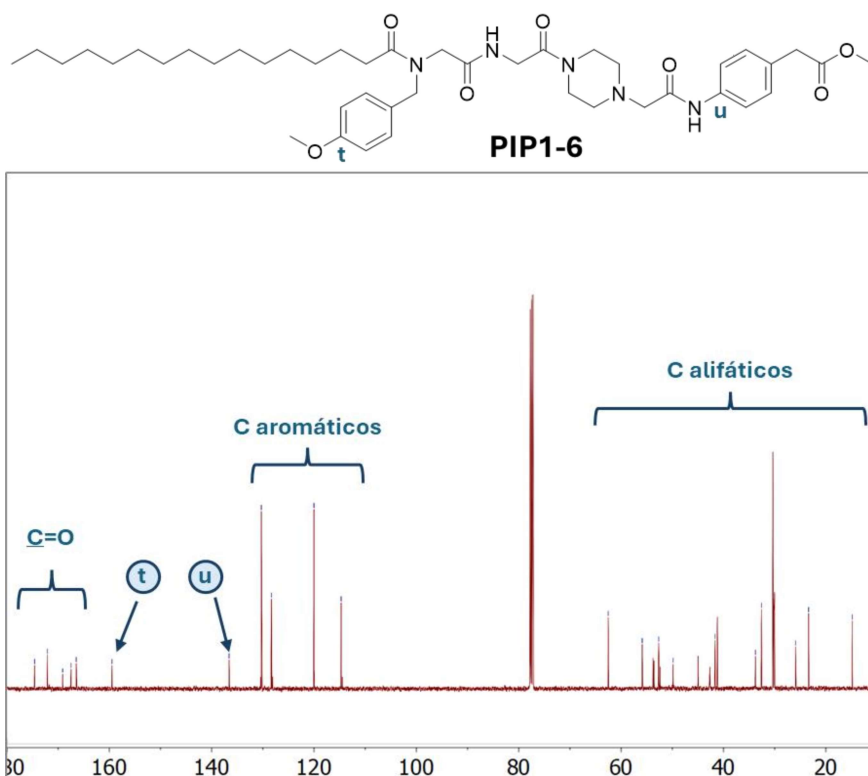


Figura 3.28: Espectro de RMN ^{13}C de PIP1-6.

Para lograr una asignación inequívoca de todas las señales, fue necesario recurrir a espectros bidimensionales, como el HSQC (Figura 3.29). El mismo muestra las correlaciones heteronucleares a un enlace de distancia, permitiendo la caracterización completa de todos los productos. Además, también permite la visualización clara de señales provenientes de conformeros, incluso si las mismas se encuentran superpuestas como es el caso de la señal **g**.

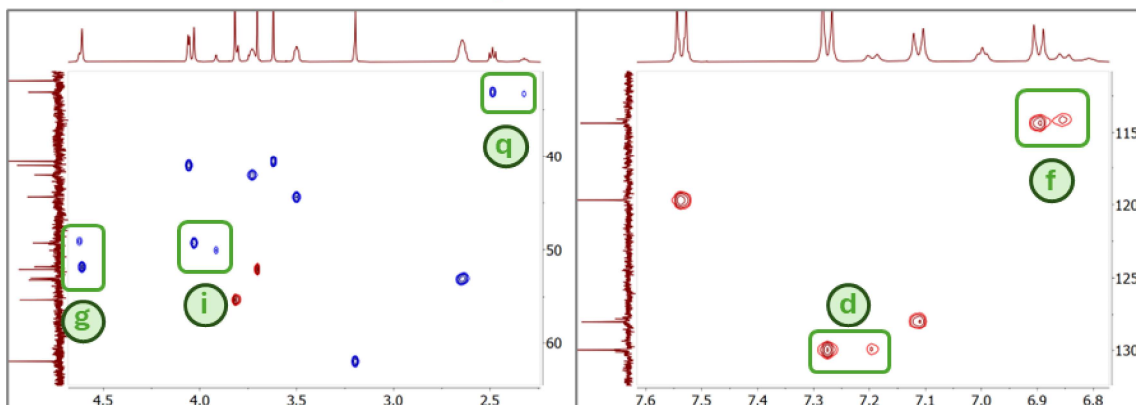
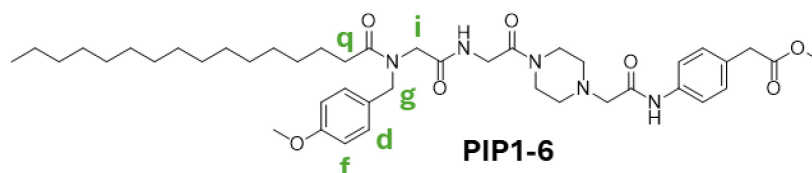


Figura 3.29: Ampliaciones del espectro RMN HSQC de **PIP1-6**.

Para confirmar que la multiplicación de señales observada en el espectro de RMN ^1H se debía a procesos dinámicos lentos en la escala del RMN, se realizaron experimentos a distintas temperaturas. Como se muestra en la Figura 3.30, los cambios en la forma y el desplazamiento químico de las señales (protones **g**, **i** y **j**) al aumentar la temperatura, son compatibles con un intercambio conformacional progresivamente más rápido, esperable en casos donde hay rotación restringida o intercambios conformacionales.

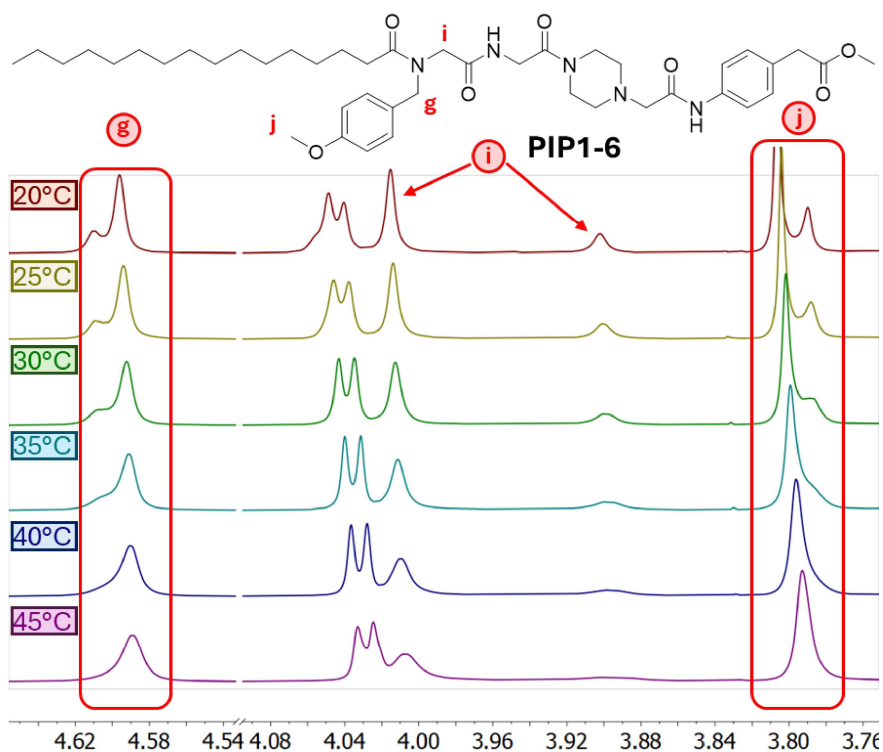


Figura 3.30: Ampliaciones de espectros de RMN ^1H variando la temperatura de **PIP1-6**.

Además, un experimento NOESY llevado a cabo con **PIP1-6** (Figura 3.31) mostró correlaciones cruzadas entre señales duplicadas correspondientes al mismo ^1H , lo que respalda la hipótesis de que las multiplicidades observadas se deben a la existencia de especies conformacionales en intercambio lento.

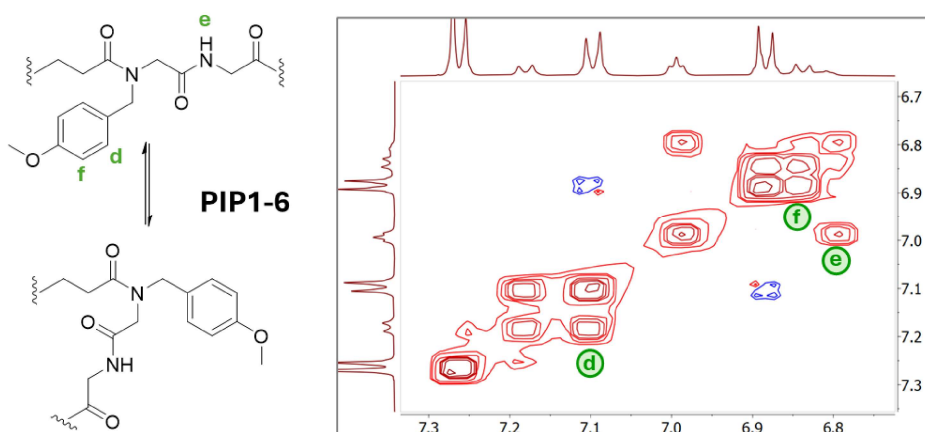


Figura 3.31: Ampliación del espectro NOESY de **PIP1-6**.

Una peculiaridad que destacó durante la asignación del RMN ^1H fue la presencia, en algunos casos, de señales procedentes de H unidos a C sp^3 con entornos químicos distintos. Este fenómeno se originó siempre en los H del formaldehído incorporado en la reacción de Ugi Split. Este fenómeno, donde los dos protones metilénicos se vuelven químicamente no equivalentes, tiene su origen en la diastereotopía inducida por la presencia del centro quiral del isonitrilo terminal, incorporado en la reacción de Ugi-Split. La cercanía espacial del centro quiral con el grupo metileno hace que los dos protones se encuentren en entornos diastereoméricos. Por lo tanto, exhiben diferentes desplazamientos químicos y se acoplan mutuamente con una constante de acoplamiento geminal fuerte. Un ejemplo ilustrativo es el caso de la molécula **PIP1-1**, donde esta constante de acoplamiento geminal tiene un valor de $J = 16,17$ Hz (Figura 3.32).

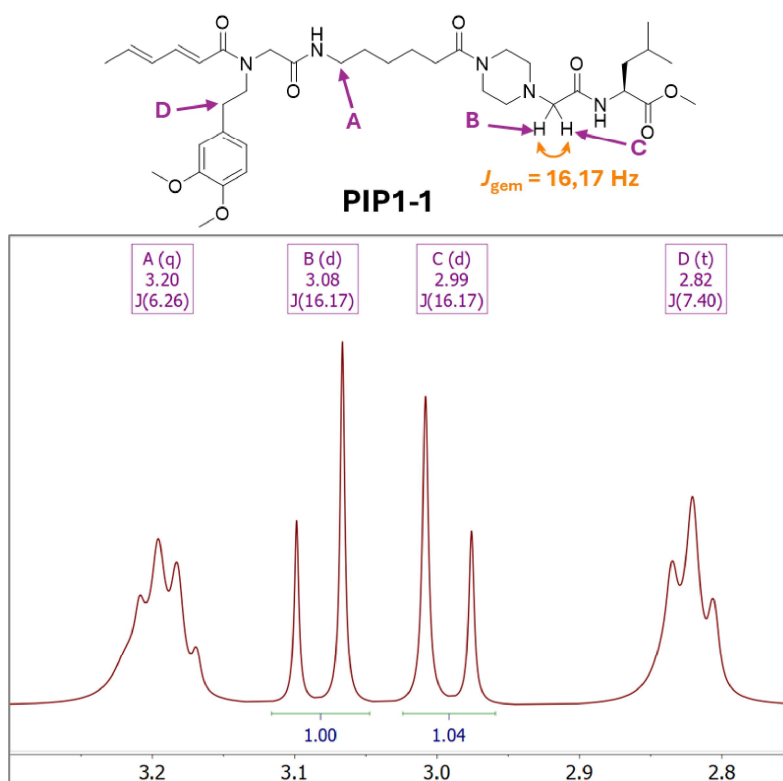


Figura 3.32: Ampliación del espectro RMN ^1H de **PIP1-1**.

Para la asignación inequívoca de todas las señales fue necesario apoyarse en espectros bidimensionales para obtener información adicional, como el espectro COSY (Figura 3.33) y el HMBC (Figura 3.34). El primero confirmó la asignación de aquellos H geminales, mientras que el segundo espectro bidimensional asistió para la asignación de C a distancia.

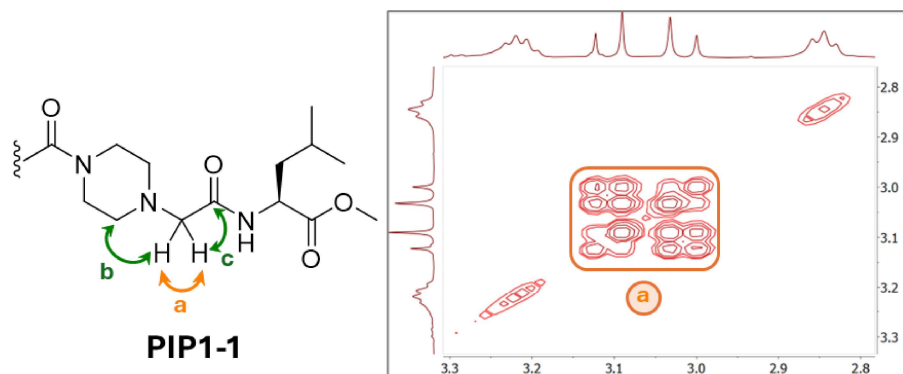


Figura 3.33: Ampliación del espectro COSY de **PIP1-1**.

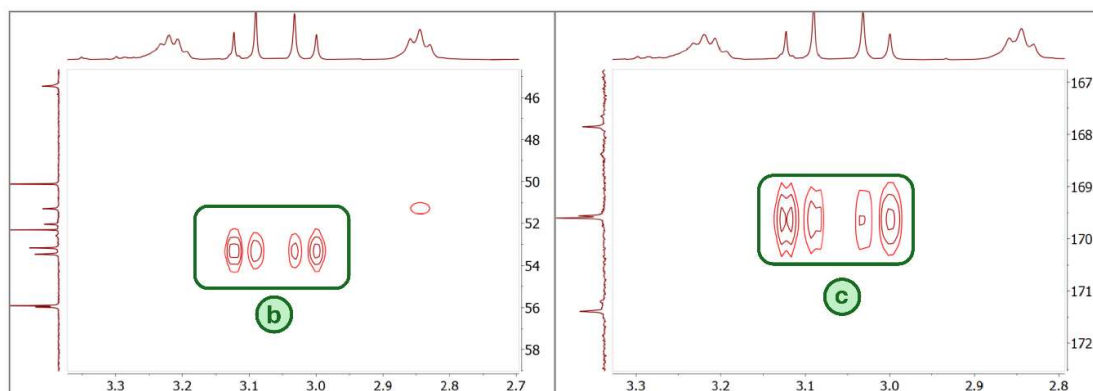


Figura 3.34: Ampliación del espectro HMBC de **PIP1-1**.

Finalmente, se completó la caracterización de todos los productos mediante espectrometría de masa (ESI-MS). En todos los casos se hallaron los picos correspondientes al ion molecular $[M+H]^+$ y, muchas veces también $[M+Na]^+$. Este análisis se llevó a cabo realizando espectrometría de masa tándem a partir del ion molecular $[M+H]^+$, con el fin de encontrar e identificar los posibles fragmentos y establecer así la posible secuencia de fragmentaciones que justifiquen los picos encontrados. Se ejemplifica a continuación el análisis del espectro de masa-masa (MS-MS) con el compuesto **PIP1-7** (Figura 3.35).

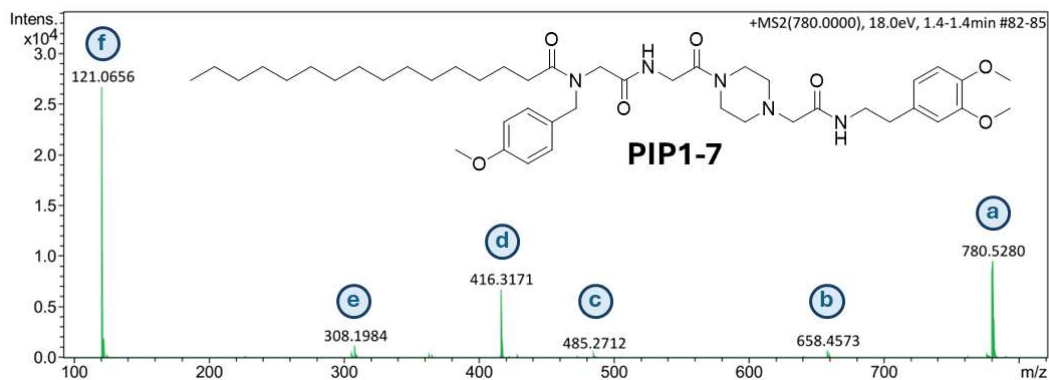


Figura 3.35: Espectro de MS-MS de **PIP1-7**.

Fórmula molecular	m/z	m/z encontrado	Error [ppm]	Ion
C ₄₄ H ₇₀ N ₅ O ₇	780,5270	780,5280	-1,0	(a) [M+H] ⁺
C ₃₆ H ₆₀ N ₅ O ₆	658,4544	658,4573	-2,9	(b)
-	-	485,2712	-	(c)
C ₂₆ H ₄₂ N ₃ O ₃	416,3165	416,3171	-0,6	(d)
C ₁₆ H ₂₆ N ₃ O ₃	308,1969	308,1984	-1,5	(e)
C ₈ H ₉ O	121,0653	121,0656	-0,3	(f)

Tabla 3.2: Resumen fragmentaciones del ion [M+H]⁺ de **PIP1-7**.

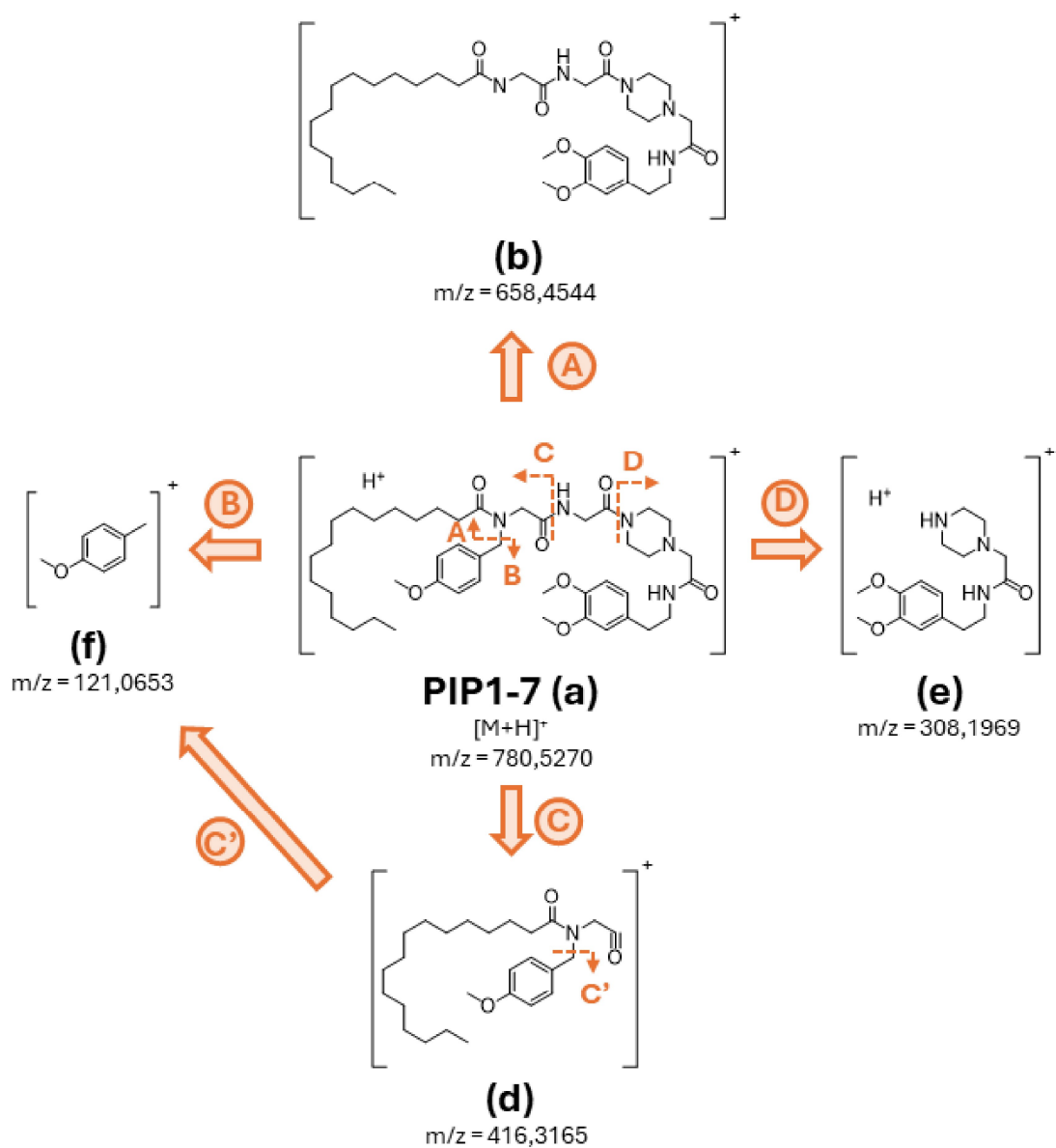


Figura 3.36: Análisis fragmentaciones del ion $[M+H]^+$ de PIP1-7.

Es interesante notar que, dentro de los iones encontrados, las fragmentaciones de tipo C y D fueron comunes a todos los productos analizados, puesto que todos comparten el mismo esqueleto estructural y se originan por la escisión de distintos enlaces amida (Figura 3.37). Por otro lado, las fragmentaciones de tipo A, B y C' son características de cada compuesto, ya que estos contienen diferentes grupos amino e isonitrilos que los diferencia.

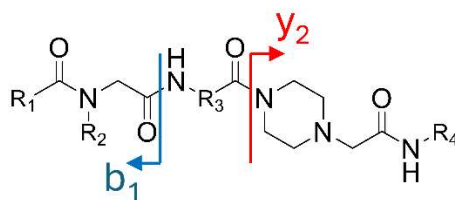
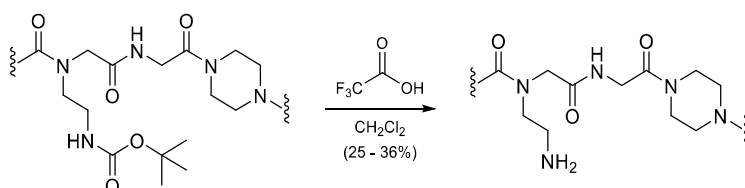


Figura 3.37: Fragmentaciones típicas para los productos Ugi Split.

Modificaciones post condensación de Ugi Split

Finalmente, como último paso sintético necesario para obtener algunos de los productos finales planteados originalmente, fue indispensable la desprotección de las moléculas **PIP1-10**, **PIP1-11**, **PIP1-16** y **PIP1-17** para así obtener los productos con la amina libre **PIP1-18**, **PIP1-19**, **PIP1-20** y **PIP1-21** según el Esquema 3.12. Para la hidrólisis del grupo protector Boc, y consecuente liberación de la amina, se siguió la técnica descrita en bibliografía.³⁶ Para ello se preparó una solución del producto Ugi Split en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ de proporción 1:1, y se dejó agitando 2 h a temperatura ambiente, siguiendo la misma por TLC.



Esquema 3.12: Desprotección de Boc.

Una vez completada, se removió el exceso de TFA mediante coevaporaciones con tolueno. Luego, el producto se purificó mediante cromatografía en columna usando un gradiente de EtOAc/MeOH con la adición de trietilamina al 1%, obteniendo rendimientos moderados (Figura 3.38).

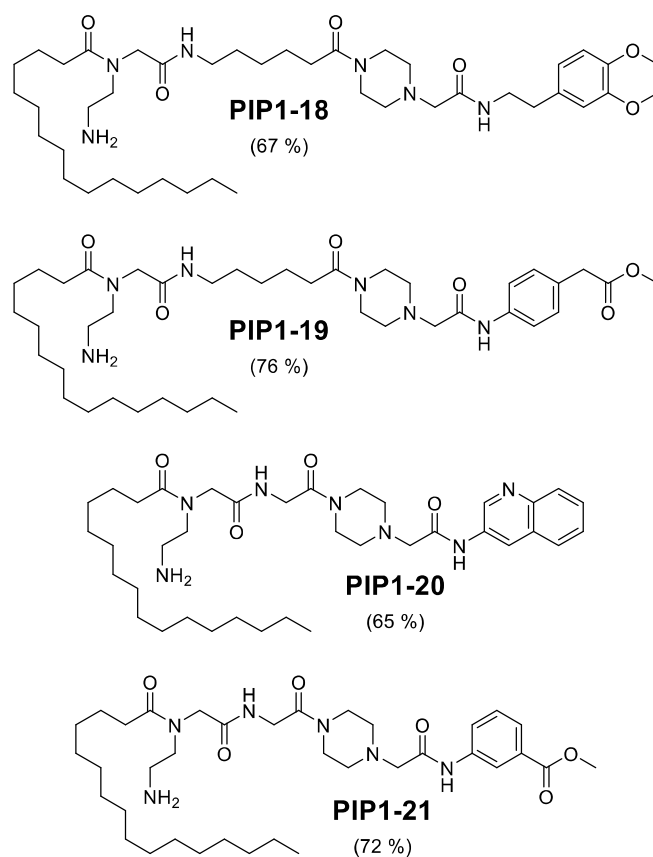


Figura 3.38: Rendimientos de la desprotección de Boc.

Si bien los rendimientos no fueron tan buenos, pudieron aislarse y caracterizarse todos los productos desprotegidos mediante espectroscopía RMN ^1H , ^{13}C y MS-MS. Como verificación de que la reacción había transcurrido satisfactoriamente, se analizó la desaparición de señales diagnósticas de referencia. Para ejemplificar dichas señales, se muestran ampliaciones de los espectros de ^1H y ^{13}C de **PIP1-11** y **PIP1-19** (Figura 3.39), señalando las señales diagnósticas: el singulete en 1,42 ppm en el espectro de ^1H , el C cuaternario del *t*-butilo a 79,6 ppm y el carbonilo del Boc a 156,2 ppm.

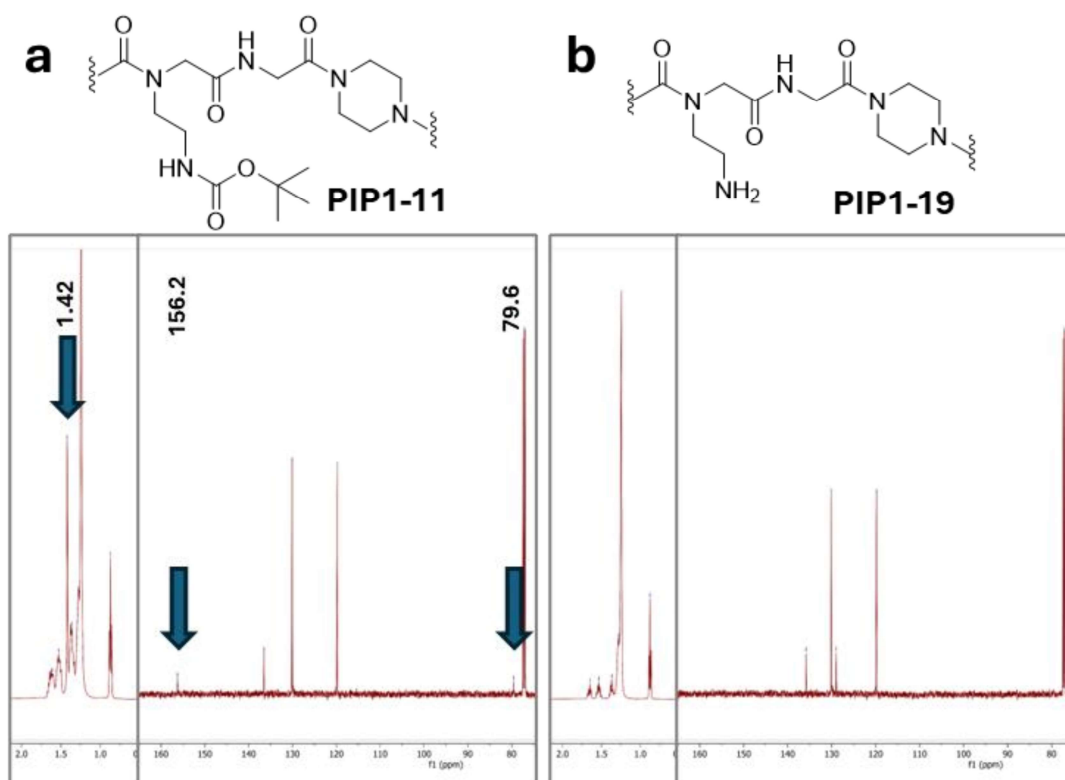
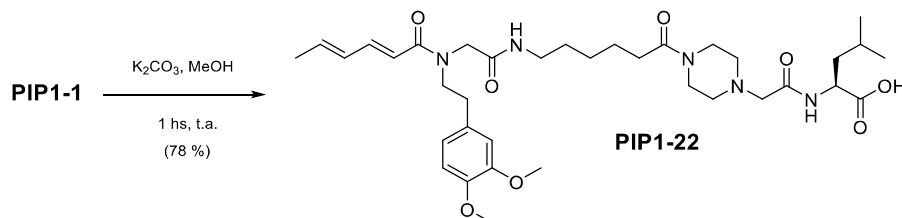


Figura 3.39: Espectros de RMN ¹H (izquierda) y ¹³C (derecha) de **PIP1-11** (a) y **PIP1-19** (b).

Además, en algunos casos el isonitrilo empleado en la reacción de Ugi Split contenía un éster, que fue necesario modificar para generar el ácido libre o la amina, en función de la estructura del compuesto final seleccionado.

Un ejemplo consistió en hidrolizar dicho grupo éster redisolviendo el producto **PIP1-1** en metanol junto con solución saturada de K₂CO₃ hasta observar la desaparición del material de partida mediante TLC (Esquema 3.13). Para su purificación, se evaporó el solvente orgánico y se llevó la solución acuosa a pH 7 agregando lentamente HCl (5%). Por último, se extrajo con éter etílico para obtener el producto ácido **PIP1-22** con buen rendimiento.



Esquema 3.13: Hidrólisis de **PIP1-1**.

Al igual que todos los compuestos anteriores, el ácido **PIP1-22** fue aislado y caracterizado exitosamente por RMN y MS, prestando particular atención a la señal diagnóstica del singulete proveniente del éster metílico a 3,72 ppm que desaparece al hidrolizarlo (Figura 3.40).

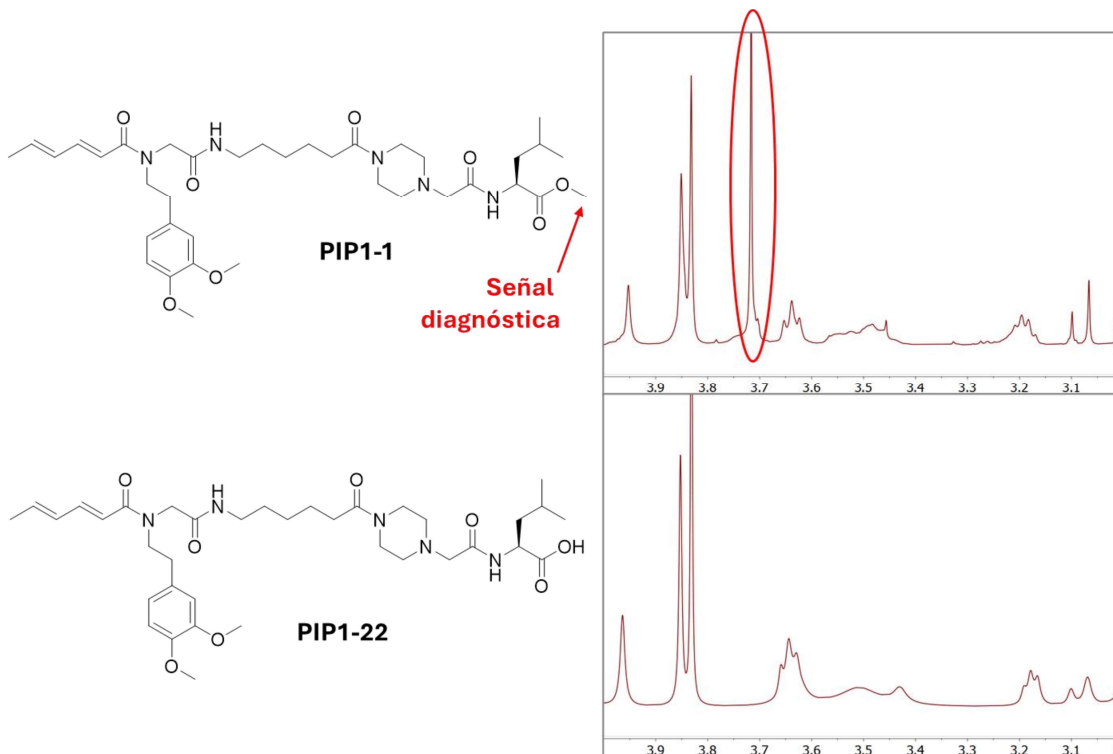


Figura 3.40: Ampliación del espectro RMN ^1H de **PIP1-1** (arriba) y **PIP1-22** (abajo).

La otra modificación estructural realizada consistió en transformar el grupo éster de algunos compuestos en las correspondientes amidas, por tratamiento con una solución saturada de amoníaco en metanol. La metodología empleada para esta conversión fue relativamente simple: se disolvió el producto Ugi Split en la solución preparada previamente, y se dejó agitar durante 24 horas a temperatura ambiente, observándose la precipitación del producto deseado. Tras este período, se verificó la desaparición del material de partida mediante cromatografía en capa delgada y, posteriormente, se filtró el precipitado, lavando con metanol frío. Este proceso resultó en la obtención de las respectivas amidas con rendimientos satisfactorios (Figura 3.41).

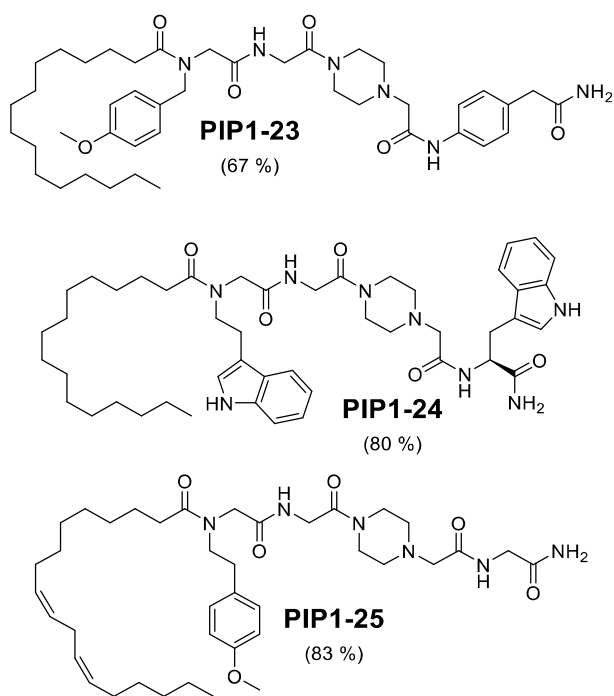


Figura 3.41: Productos y rendimientos de la amidación de algunos productos Ugi Split.

Dado que la transformación química que dio lugar a estos productos fue altamente selectiva, su confirmación mediante RMN y MS resultó necesaria. Para ejemplificar, se muestran las Figura 3.42 y Figura 3.43 con distintas zonas del espectro RMN ^1H de **PIP1-24**.

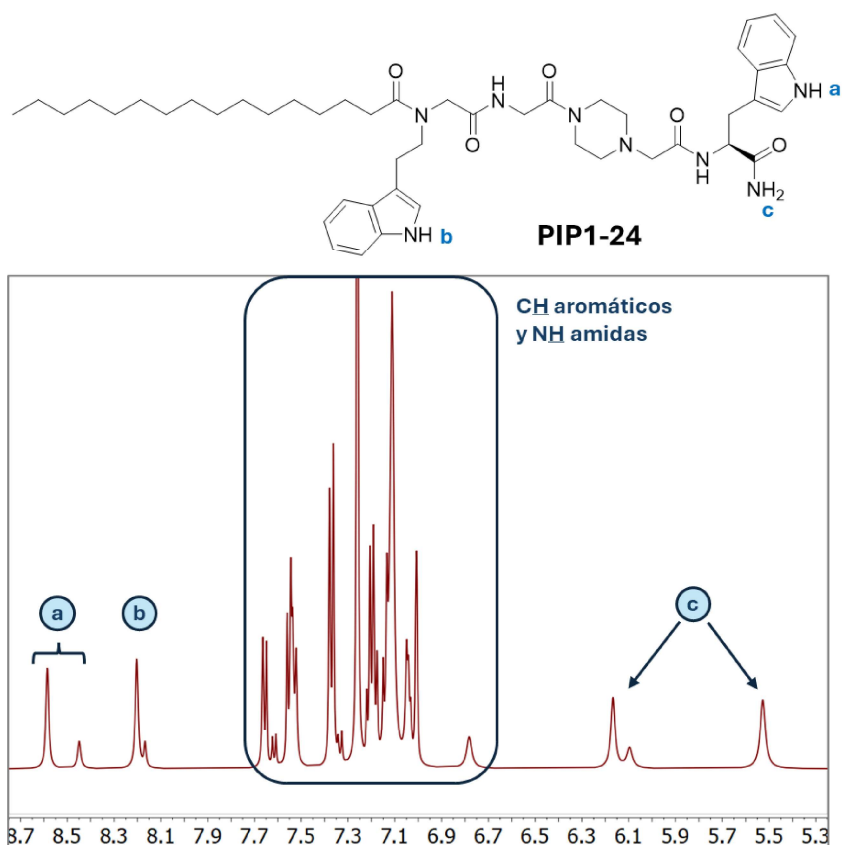


Figura 3.42: Ampliación del espectro de RMN ^1H en la zona de campo bajo de **PIP1-24**.

Las señales más desprotegidas correspondieron a los protones NH de los indoles, cada una acompañada por su confórmero de menor intensidad, ubicado hacia la derecha (**a** y **b**). Luego se encontró una región con todas las señales aromáticas superpuestas con aquellas originadas en las amidas NH . Por último, en aquella ampliación del espectro se destacó la presencia del nuevo grupo funcional amida generado en el paso sintético final (**c**).

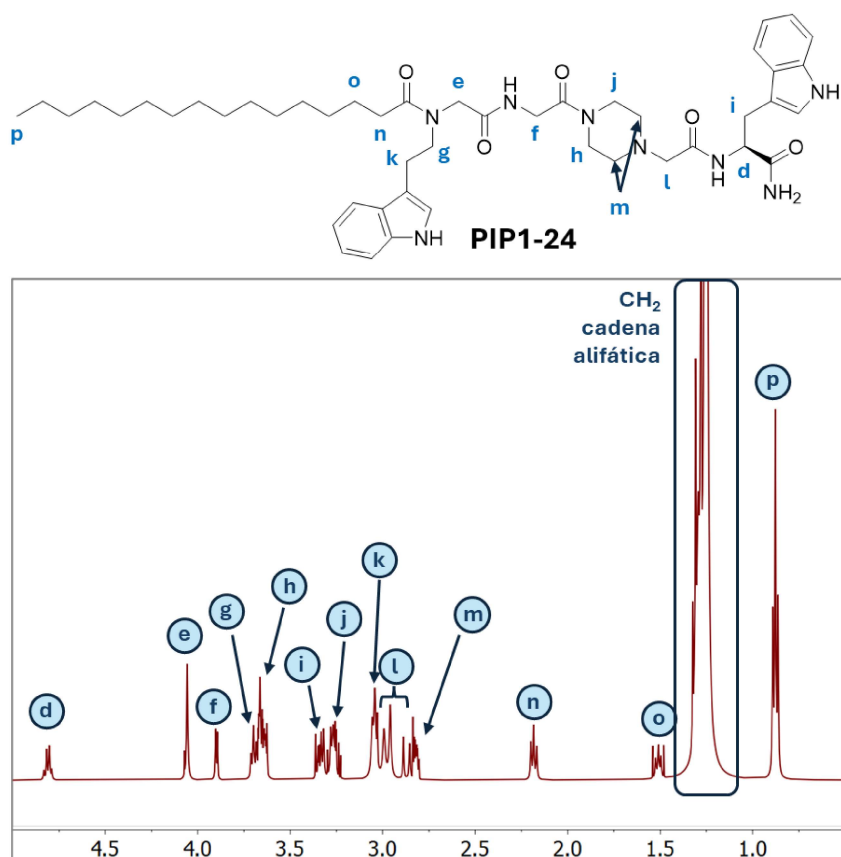


Figura 3.43: Ampliación del espectro de RMN ¹H en la zona de campo alto de **PIP1-24**.

En la Figura 3.43 se apreció la señal **d** del H unido al C asimétrico como un cuarteto con una constante de acoplamiento $J = 7,2$ Hz, seguida del singulete **e**, un doblete **f** de $J = 5,7$ Hz y un triplete **g** de constante $7,4$ Hz superpuesto con señales provenientes de la piperazina (**h**). Además, el bloque proveniente de la piperazina presentó otros multipletes alrededor de 3 ppm (**j** y **m**), que también se superpusieron parcialmente con la señal del metileno incorporado con el último isonitrilo (**i**) y los dos dobletes del bloque del formaldehído integrado en la reacción de Ugi Split (**l**) con un valor de la constante de acoplamiento geminal de $16,5$ Hz. Cercano a 3 ppm también se observó la señal **k**, asignada a uno de los metilenos presentes en la amina empleada para la primera reacción multicomponente de Ugi. Por último, se distinguieron todas las señales características de la cadena alifática (**n**, **o** y **p**).

Para la asignación de las señales aromáticas de **PIP1-24** se muestra una ampliación de dicha zona (Figura 3.44). Para esta tarea fue indispensable recurrir a los espectros bidimensionales que asistan y complementen la información necesaria, dado que todas

las señales aromáticas provienen de indoles con entornos químicos similares y, además, presentan duplicados debido a la presencia de conformeros.

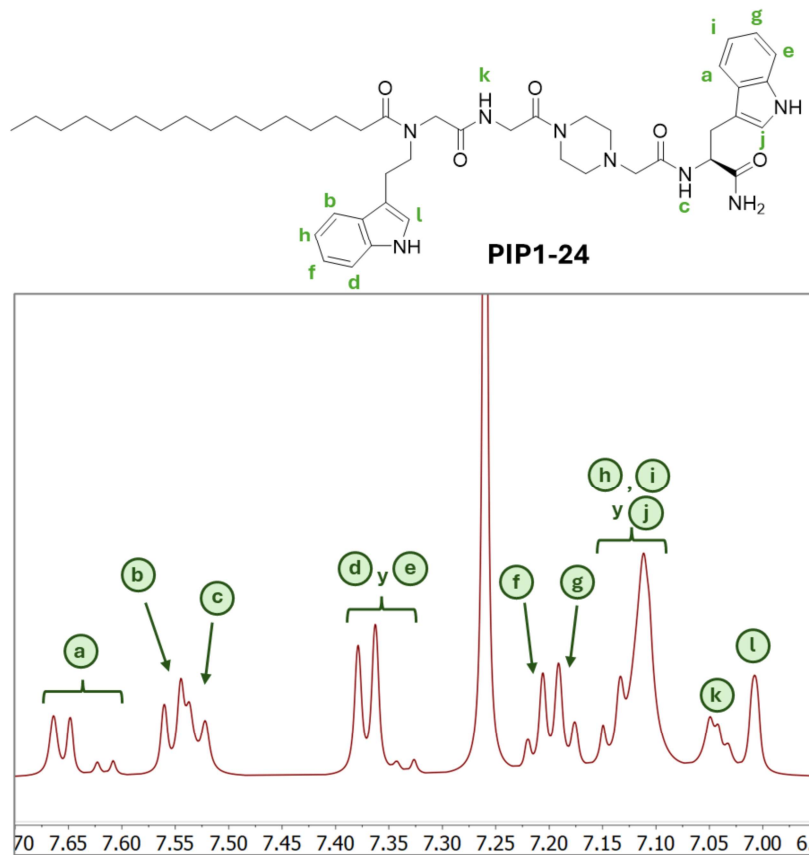


Figura 3.44: Ampliación del espectro de RMN ^1H en la zona aromática de **PIP1-24**.

Cabe destacar que al momento de realizar la asignación de las señales del espectro de RMN ^1H se presentó una peculiaridad en esta molécula que llamó la atención. Se destacó la señal del nuevo grupo amida NH_2 generado en el último paso de síntesis, dado que se vio que aquellos H tenían entornos químicos no equivalentes, confirmando su asignación con el espectro bidimensional COSY (Figura 3.45).

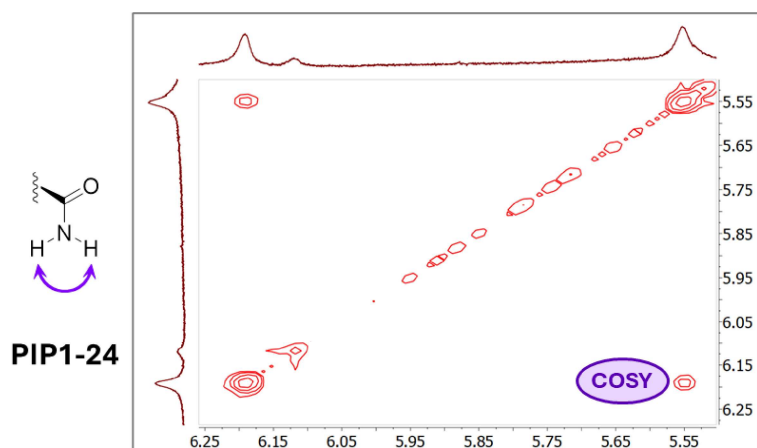


Figura 3.45: Ampliación RMN COSY de **PIP1-24**.

Ensayos biológicos

Dado que los pPNs recientemente sintetizados no fueron diseñados con un propósito específico de bioactividad, se sometieron a diversos ensayos biológicos fenotípicos. Esta estrategia se emplea de manera habitual para evaluar compuestos naturales recién descubiertos y, en este caso, se ha extendido también a los pPNs.³⁷ Este enfoque experimental implica la evaluación de los efectos observables de los compuestos en sistemas biológicos complejos, lo que permite identificar cualquier actividad biológica inherente.

La elección de los ensayos fenotípicos se basa en la capacidad de los compuestos para inducir respuestas observables en células u organismos vivos. Estos ensayos proporcionan una visión integral de las interacciones biológicas, considerando múltiples aspectos como la viabilidad celular, la proliferación, la morfología celular y otros fenotipos relevantes. A través de esta evaluación, se busca comprender cómo los pPN interactúan con sistemas biológicos complejos, lo que puede revelar posibles propiedades bioactivas, aunque no hayan sido previamente diseñados con un objetivo específico.

Este enfoque amplio en los ensayos fenotípicos permite explorar y descubrir propiedades biológicas de los pPN, ofreciendo información valiosa sobre su potencial actividad biológica y sus posibles aplicaciones en distintos contextos, incluyendo la investigación farmacológica y la búsqueda de compuestos con propiedades terapéuticas. Es una estrategia versátil que se adapta a la naturaleza exploratoria de la investigación de nuevos compuestos, especialmente cuando se trata de PN modificados artificialmente.

Ensayos antifúngicos

En esta fase, con la biblioteca ya consolidada, se dio comienzo a su evaluación biológica. En línea con los criterios planteados en capítulos previos, se decidió implementar ensayos fenotípicos, orientados principalmente a la detección de nuevas moléculas con potencial actividad antifúngica. Esta elección se fundamentó en que los compuestos sintetizados por nuestro grupo de investigación, empleados para el diseño de la biblioteca, habían demostrado previamente la capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium* en condiciones *in vitro*.

En este contexto, todos los compuestos sintetizados fueron sometidos a ensayos *in vitro* con el objetivo de evaluar su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos patógenos, experimentos realizados por la Dra. María Fernanda D’Jonsiles de UMYMFOR. Se llevaron a cabo pruebas cualitativas de bioautografía, una técnica en la cual se siembra una solución del compuesto a evaluar en una placa de sílica, sobre la cual se promueve el crecimiento de una película de hongo. En los casos en los que el compuesto exhibió actividad, se observó un halo de inhibición del crecimiento alrededor del punto de siembra.

Para aquellos compuestos que presentaron halos significativos en la bioautografía, se procedió a determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) contra *Fusarium solani* (FS), *Fusarium tucumaniae* (FT) y *Fusarium graminearum* (FG), utilizando la metodología estándar descrita en la sección experimental de la tesis.

Los resultados de estos ensayos revelaron que algunos compuestos de esta familia exhiben una notable actividad antifúngica contra diversas especies patógenas de importancia tanto humana como agronómica. Por ejemplo, los compuestos **PIP1-15** y **PIP1-18** demostraron actividad selectiva contra *Fusarium tucumaniae*, causante del síndrome de muerte súbita en la soja. Además, el compuesto **PIP1-13** no sólo inhibió el crecimiento de esta especie, sino también el de *Fusarium solani* y *Fusarium graminearum*, siendo este último el agente causal de la fusariosis de la espiga en cereales como el trigo, el maíz y la cebada (Figura 3.46). Estos resultados destacan el potencial de algunos compuestos de la colección como agentes antifúngicos, sugiriendo aplicaciones significativas tanto en la agricultura como en la investigación relacionada con patógenos fúngicos específicos.

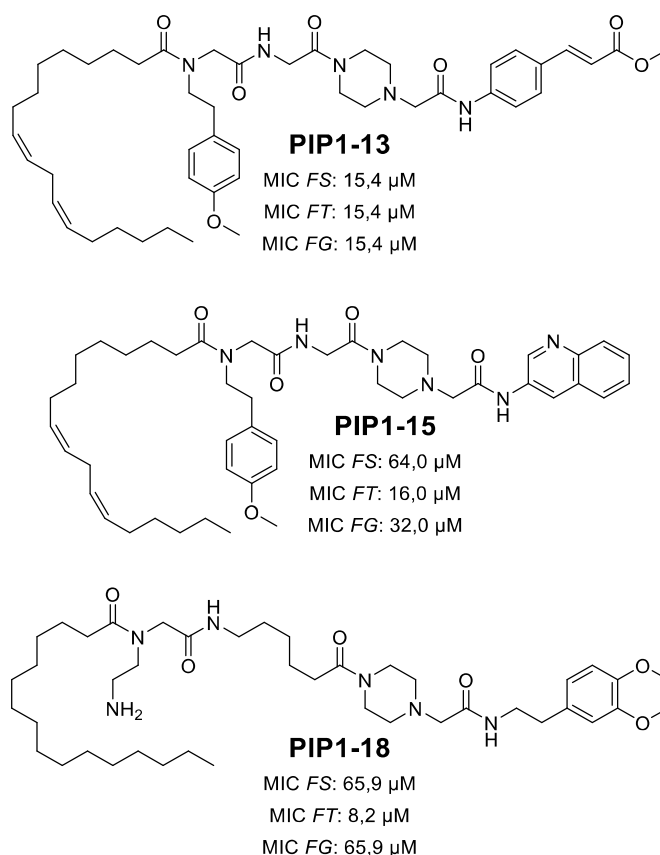


Figura 3.46: Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de **PIP1-13**, **PIP1-15** y **PIP1-18**.

Aunque los compuestos obtenidos no permiten realizar un análisis exhaustivo de las relaciones entre estructura y actividad, es posible extraer algunas conclusiones reveladoras. Por ejemplo, el compuesto **PIP1-13**, al igual que **PIP1-15**, fueron sintetizados con un primer paso que involucró ácido linoleico, *p*-metoxifenetilamina y el isonitrilo de la glicina en la primera reacción multicomponente, pero varió únicamente el bloque de isonitrilo en la Ugi Split. Ambos compuestos poseen valores de MICs comparables contra *Fusarium tucumaniae*. Sin embargo, la actividad de **PIP1-15** es significativamente menor en comparación contra las otras dos especies de hongos.

En contraste, el compuesto **PIP1-18**, donde se empleó una cadena de ácido graso más corta y totalmente saturada, etilendiamina y el isonitrilo proveniente de la caprolactama en la Ugi, resultando en una estructura con mayor flexibilidad y menor aromaticidad, exhibió un aumento sustancial en la actividad antifúngica contra *Fusarium tucumaniae*. Estas observaciones destacan el papel determinante que ejerce la variación en la composición estructural sobre la actividad antifúngica de estos compuestos.

Por otro lado, entre los resultados obtenidos se puede destacar la variación en la actividad antifúngica al hidrolizar el éster **PIP1-1** obteniendo su respectivo ácido **PIP1-22** (Figura 3.47). Inicialmente, se observaron MICs para el compuesto **PIP1-1** que no descendían de 35,7 μM , sin discriminación significativa entre *Fusarium solani* (FS) y *Fusarium graminearum* (FG). Sin embargo, al llevar a cabo la hidrólisis del grupo terminal, se evidenció un aumento en el valor calculado del MIC para *Fusarium tucumaniae* (FT), acompañado de un incremento en la actividad antifúngica contra el hongo FS. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que el grupo funcional modificado podría estar involucrado en un mecanismo diferencial entre los distintos hongos patógenos.

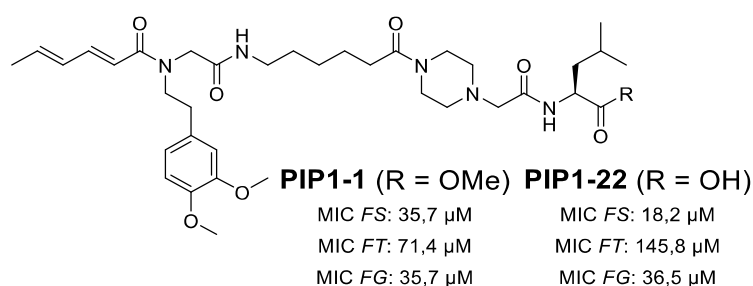


Figura 3.47: Valores de MICs de la actividad antifúngica de **PIP1-1** y **PIP1-22**.

La modificación estructural, mediante la hidrólisis del grupo terminal, generó respuestas distintas en la actividad antifúngica frente a diferentes especies de hongos. Este fenómeno podría sugerir una interacción específica entre el grupo funcional alterado y los mecanismos biológicos particulares de cada patógeno. La observación de que *Fusarium tucumaniae* (FT) experimentó un aumento en la MIC tras la modificación, mientras que *Fusarium solani* (FS) mostró un incremento en la actividad antifúngica, destaca la complejidad de las interacciones moleculares en la inhibición de estos patógenos. Estos resultados abren interrogantes sobre la especificidad y la selectividad de la actividad antifúngica, señalando la importancia de considerar las interacciones moleculares específicas al diseñar compuestos con propiedades bioactivas.

Ensayos antiproliferativos

Como el grupo de investigación también tiene contactos fluidos con la Dra. Andrea Barquero, investigadora del Departamento de Química Biológica de la FCEN, y especialista

en Virología y Biología Celular, se decidió entonces analizar la biblioteca descrita en otros ensayos fenotípicos, buscando nuevas actividades biológicas.

En primer lugar, y dada la relevancia que tiene la búsqueda de compuestos citotóxicos, se comenzó estudiando una posible acción *in vitro* como inhibidores de la proliferación de distintas líneas celulares. Para determinar el perfil de citotoxicidad de la biblioteca de compuestos, se evaluó el efecto de los 21 candidatos sobre la morfología celular mediante observación con microscopio óptico invertido. Se seleccionó una concentración arbitraria de 50 μM y se evaluó la viabilidad de las diferentes líneas celulares utilizando el método de MTT, tal como se describe en la Sección Experimental. Se aplicó durante 72 h. a las líneas celulares Vero (epitelial de riñón de mono verde africano), A549 (epitelial alveolar basal humano) y CRFK (epitelial de riñón felino), que posteriormente se utilizaron en ensayos de actividad antiviral.

Durante esta selección inicial, se observó que sólo 15 compuestos no inducían cambios morfológicos perceptibles en los cultivos celulares. Por el contrario, los compuestos **PIP1-4**, **PIP1-5**, **PIP1-6**, **PIP1-7**, **PIP1-18** y **PIP1-19** (Figura 3.48) se identificaron como citotóxicos a las dosis evaluadas en todos los sistemas celulares, como se ejemplifica en la Figura 3.49 para el caso de las células CRFK.

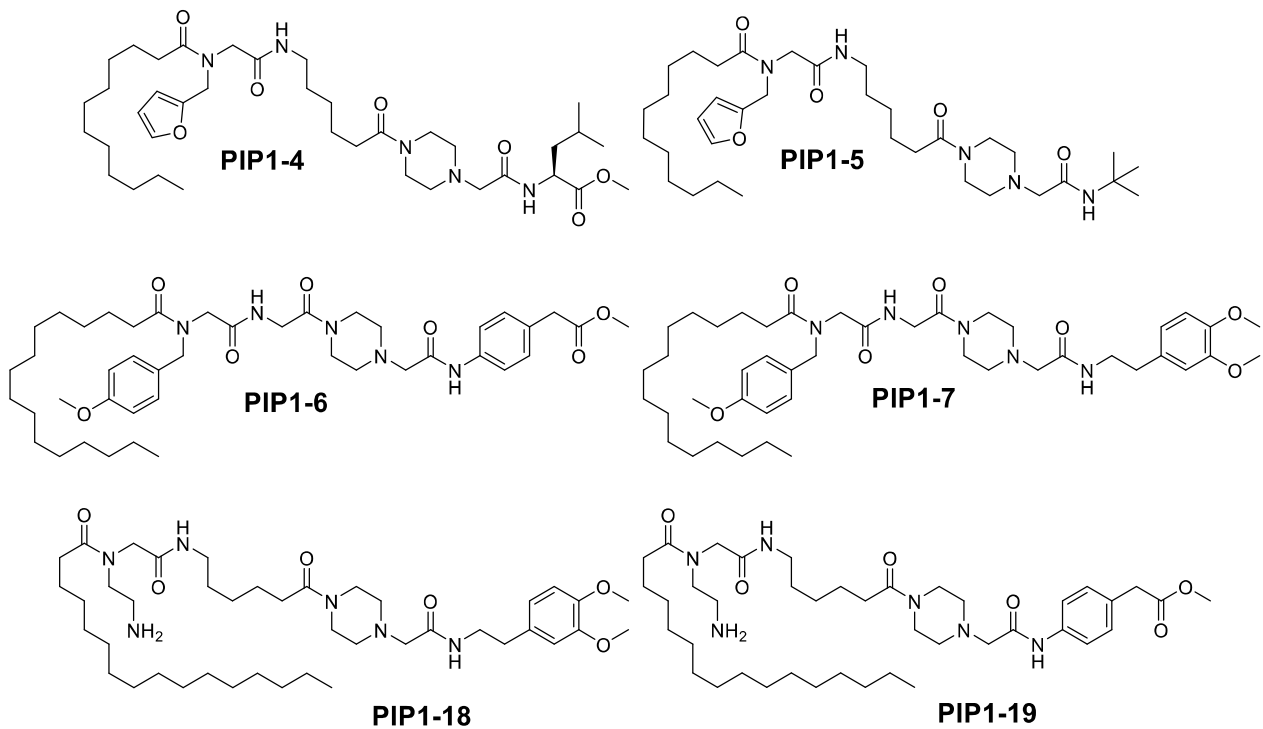


Figura 3.48: Estructuras con actividad citotóxica.

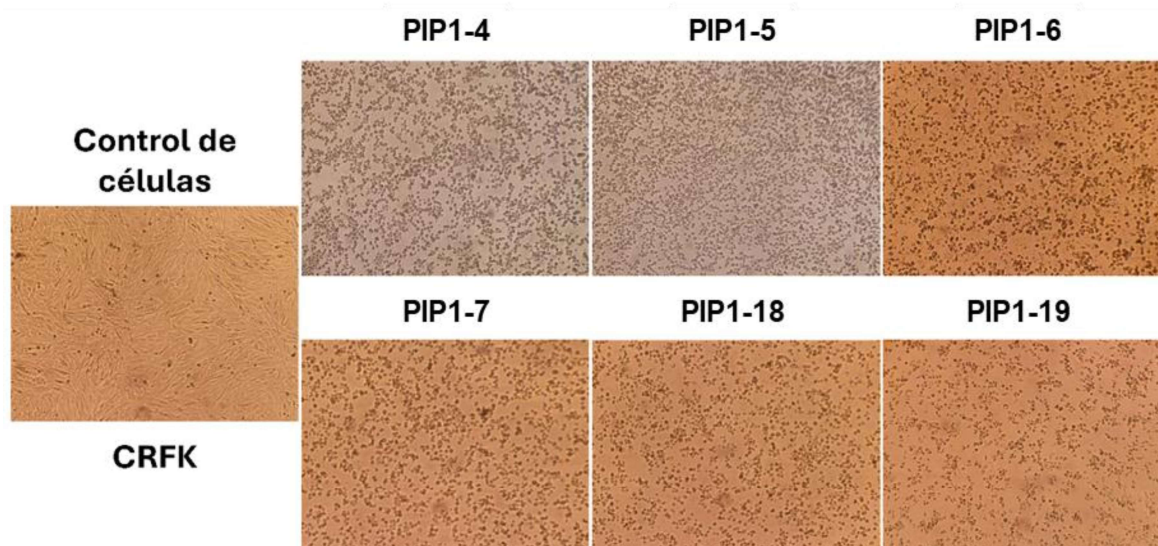


Figura 3.49: Imágenes tomadas a través del microscopio de las células tratadas con los compuestos citotóxicos.

Si bien en este *screening* de citotoxicidad no se planteó realizar un estudio estructura-actividad, al observar las estructuras llama la atención que los seis compuestos que resultaron activos comparten, de a parejas, sólo tres orígenes de ácidos Ugi distintos, siempre con ácidos grasos totalmente saturados. Además, cuatro de ellos poseen en su estructura el isonitrilo **IS-20** sintetizado a partir de la caprolactama en la primera reacción multicomponente. Y, por último, se destaca que se repiten los isonitrilos **IS-14** proveniente de la 3,4-dimetoxifenetilamina e **IS-17** del ácido *p*-aminofenilacético.

En particular, el compuesto **PIP1-18** presentó un IC_{50} (concentración necesaria para inhibir el 50% de la viabilidad celular comparado con el control) de 2.5 μM en células Caco-2, un resultado que merece estudios adicionales ya que este valor es un orden de magnitud inferior al de cisplatino ($IC_{50} = 37 \mu M$), un fármaco comúnmente utilizado en el tratamiento clínico del cáncer colorrectal.

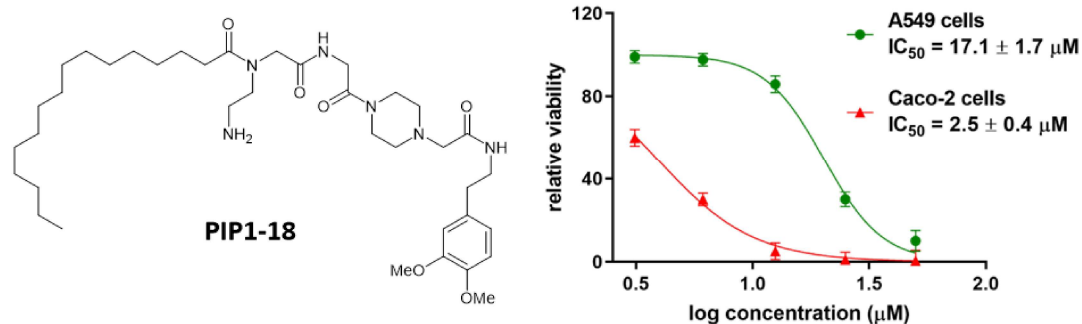


Figura 3.50: Curva para el cálculo del IC_{50} de **PIP1-18**.

Ensayos antivirales

Los 15 compuestos no citotóxicos restantes fueron evaluados frente a virus con genomas de ADN y ARN; adenovirus 5 (AdV 5), herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y tipo 2 (HSV-2) fueron seleccionados como representantes de virus ADN, mientras que el virus Zika (ZIKV) y el coronavirus canino (CCoV) se utilizaron como modelos de virus ARN. La actividad antiviral potencial de los compuestos no citotóxicos se evaluó mediante un ensayo fenotípico basado en la protección frente a efectos citopáticos inducidos por virus en cultivos celulares, lo cual fue confirmado posteriormente mediante cuantificación del rendimiento viral.

En particular, cuando se ensayaron a una dosis única de 50 μM , cuatro compuestos mostraron actividad antiviral: el compuesto **PIP1-8** frente a ZIKV, los compuestos **PIP1-14** y **PIP1-15** frente a CCoV, y el compuesto **PIP1-13** frente a ambos virus. Se determinaron curvas dosis-respuesta, y se calcularon los valores correspondientes de CC_{50} e IC_{50} , que fueron comparados con el fármaco de referencia ribavirina.

Además, para descartar que la actividad antiviral observada se debiera a una inactivación directa del virus liberado, se realizaron ensayos virucidas en los que suspensiones de ZIKV y CCoV se incubaron con los compuestos a 100 μM durante 60 minutos a 37°C (usando dodecilsulfato de sodio como control positivo). Luego se tituló la infectividad remanente. Los resultados mostraron que ninguno de los compuestos ejerció un efecto virucida bajo las condiciones ensayadas.

Compuesto	CC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)		Índice de Selectividad	
	Vero	CRFK	ZIKV (Vero)	CCoV (CRFK)	ZIKV (Vero)	CCoV (CRFK)
PIP1-8	> 200	> 200	9.8 ± 0.3	Inactivo	> 20	-
PIP1-13	> 200	> 200	12.3 ± 0.3	10.5 ± 0.4	> 16	> 20
PIP1-14	> 200	> 200	Inactivo	43.5 ± 0.6	-	> 4
PIP1-15	> 200	> 200	Inactivo	32.6 ± 0.5	-	> 6
Ribavirina	> 400	> 400	48 ± 0.4	ND	>8	ND

Tabla 3.3: Valores de IC₅₀ (a partir de tres experimentos independientes en cada caso) de los compuestos que mostraron actividad antiviral. ND: no determinado.

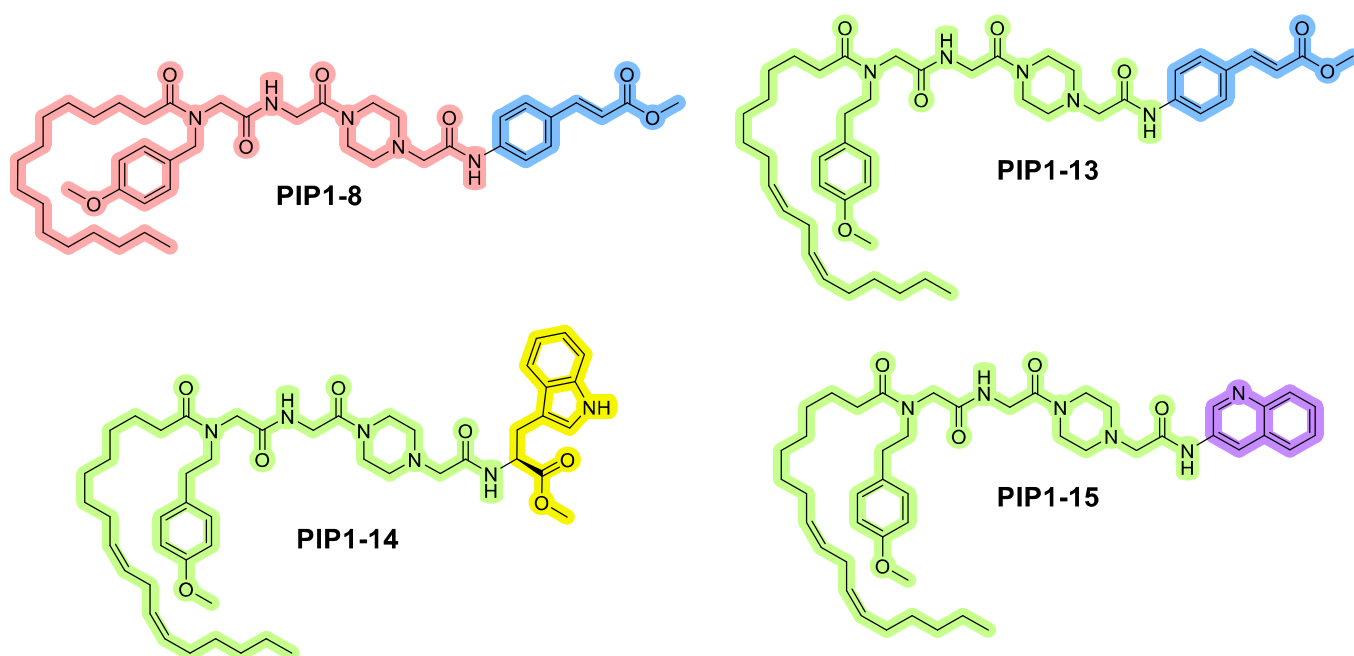


Figura 3.51: Compuestos con actividad antiviral.

Se puede establecer una comparación estructural a partir de la arquitectura modular de los compuestos, que, como se describió anteriormente, proviene de la estrategia sintética empleada. La primera reacción de Ugi define tanto la cadena lipofílica como una porción de diglicina, donde la primera unidad de glicina lleva un *N*-sustituyente variable derivado de la amina seleccionada. La segunda etapa, una reacción de Ugi Split, introduce el núcleo de piperazina y el fragmento terminal. Dentro de este marco, los compuestos **PIP1-8** y **PIP1-13** comparten la misma unidad terminal introducida en el paso final, pero difieren en los elementos incorporados durante la primera reacción de Ugi. En particular, los *N*-

sustituyentes del residuo de glicina en ambos compuestos están estrechamente relacionados, diferenciándose únicamente por un grupo metileno, el grado de saturación y la longitud de la cadena lipofílica. En contraste, los compuestos **PIP1-14** y **PIP1-15** comparten todos los elementos estructurales con **PIP1-13** excepto por el fragmento terminal introducido en el segundo paso. Estas sutiles variaciones estructurales se correlacionan con perfiles antivirales distintos, particularmente en lo que respecta a la selectividad hacia diferentes virus, lo que resalta la sensibilidad de las respuestas biológicas a cambios químicos menores.

Esta tendencia se hace aún más evidente cuando se compara el compuesto **PIP1-8** con los análogos **PIP1-6** y **PIP1-7**, ambos de los cuales mostraron citotoxicidad. Estos compuestos comparten la misma cadena lipofílica, la porción de diglicina *N*-sustituida y el núcleo de piperazina. En particular, **PIP1-6** difiere ligeramente de **PIP1-8** solo en el fragmento terminal. Este análisis preliminar sugiere que las modificaciones estructurales menores asociadas con la actividad antiviral también pueden afectar la citotoxicidad, insinuando una posible conexión entre ambas propiedades.

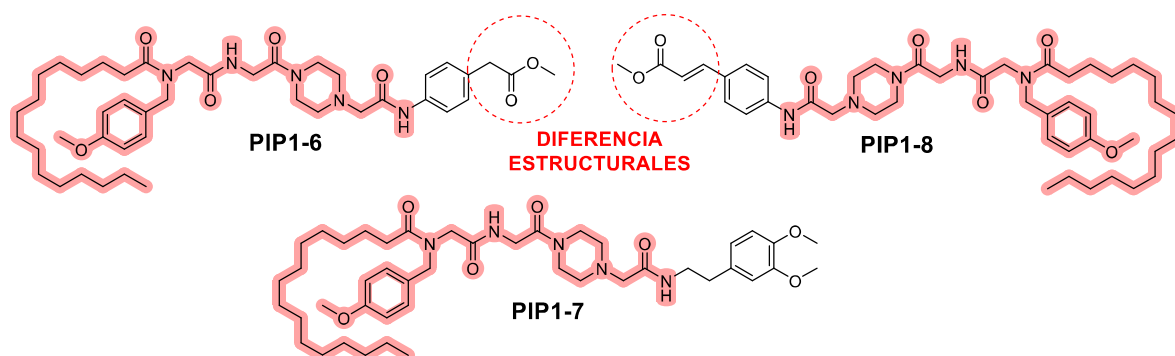


Figura 3.52: Ejemplos de moléculas con distintas bioactividades y sus diferencias estructurales.

En función de los resultados previamente alcanzados, el equipo de investigación dirigido por la Dra. Barquero consideró pertinente dar continuidad al estudio de los compuestos en cuestión. La solidez de los datos obtenidos en las etapas anteriores constituyó un fundamento suficiente para justificar la ampliación del trabajo, orientándolo hacia una exploración más profunda de sus posibles aplicaciones y propiedades.

En las secciones siguientes se presentará una descripción detallada de algunos de los hallazgos más relevantes obtenidos en esta nueva fase de la investigación, los cuales

aportan información significativa para comprender mejor el comportamiento de los compuestos analizados y, a su vez, permiten delinear futuras líneas de estudio.

Considerando que **PIP1-13** también demostró una considerable reducción en la multiplicación de CCoV, decidimos evaluar su efecto sobre el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 en cultivos de células pulmonares humanas (Calu-3). Similar a las otras células estudiadas, el compuesto **PIP1-13** no mostró toxicidad significativa en las células Calu-3 (hasta una concentración de 200 μM); sin embargo, fueron capaces de reducir la producción de partículas infecciosas de SARS-CoV-2 con una IC_{50} de 9.3 μM (con un índice de selectividad > 20). La Figura 3.53 muestra una reducción marcada en el número de células infectadas que expresan la proteína de la espícula (*spike*) de la envoltura en los cultivos celulares tratados con **PIP1-13**, en comparación con el control de virus no tratado. Por lo tanto, el compuesto **PIP1-13** exhibe un espectro más amplio de actividad antiviral, considerando su capacidad para obstaculizar la replicación tanto de ZIKV como de los coronavirus.

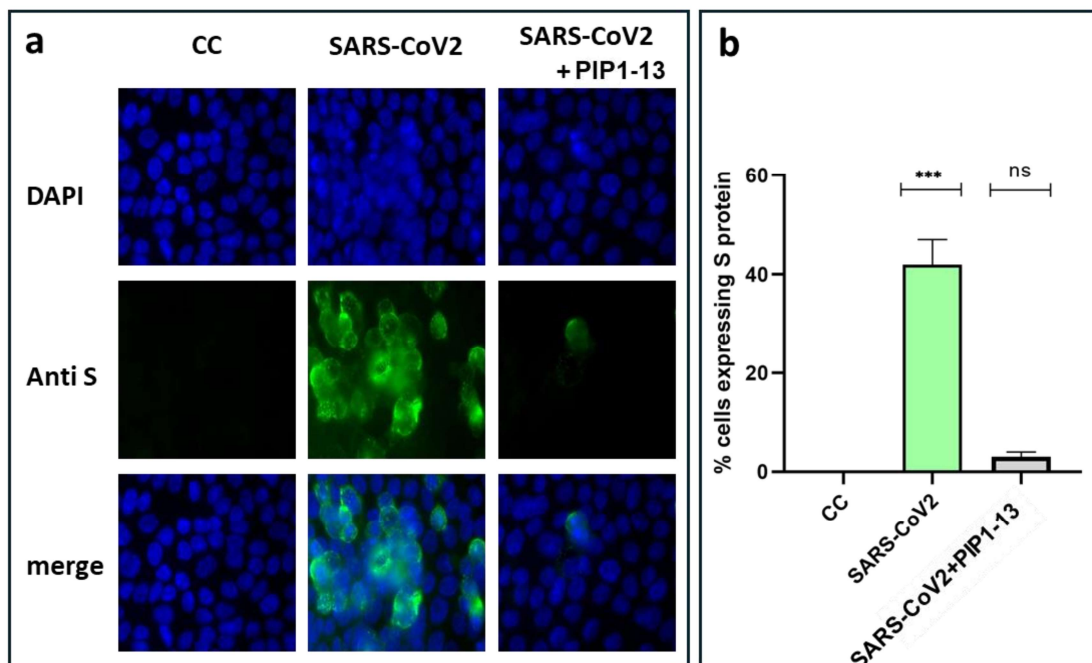


Figura 3.53: (a) IFI con un anticuerpo anti-S en células Calu-3. (b) Número relativo de células que expresan el antígeno NS1. CC: células Calu-3 no tratadas; SARS-CoV-2: células Calu-3 infectadas con SARS-CoV-2 ($m.o.i = 0.1$); SARS-CoV-2 + **PIP1-13**: células Calu-3 infectadas y tratadas con los compuestos **PIP1-13** a 50 μM . DAPI: tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol para visualizar los núcleos celulares. La significancia estadística se refiere a las diferencias en comparación con CC, con $*p^{***} < 0.001$.

Para confirmar aún más la actividad antiviral de los compuestos **PIP1-8** y **PIP1-13** frente a la propagación del virus Zika (ZIKV), se investigó su efecto sobre la expresión de dos proteínas virales involucradas en diferentes etapas del ciclo de multiplicación viral. Se evaluaron la proteína no estructural NS1, implicada en varios mecanismos que contribuyen a la patogénesis viral, y la proteína de envoltura E, que desempeña un papel crucial en la entrada del virus a la célula, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Western blot, respectivamente. Tal como se muestra en las Figura 3.54a y Figura 3.54b, tanto el número de células que expresan el antígeno NS1 como la intensidad de fluorescencia mostraron una reducción significativa en los cultivos tratados con los compuestos **PIP1-8** y **PIP1-13**, en comparación con el control viral no tratado. Además, la cuantificación de las bandas en el Western blot reveló disminuciones del 99% y 90% en la expresión de la proteína E tras el tratamiento con **PIP1-8** y **PIP1-13**, respectivamente (Figura 3.54c). Estos hallazgos confirmaron que ambos compuestos poseen propiedades antivirales contra ZIKV.

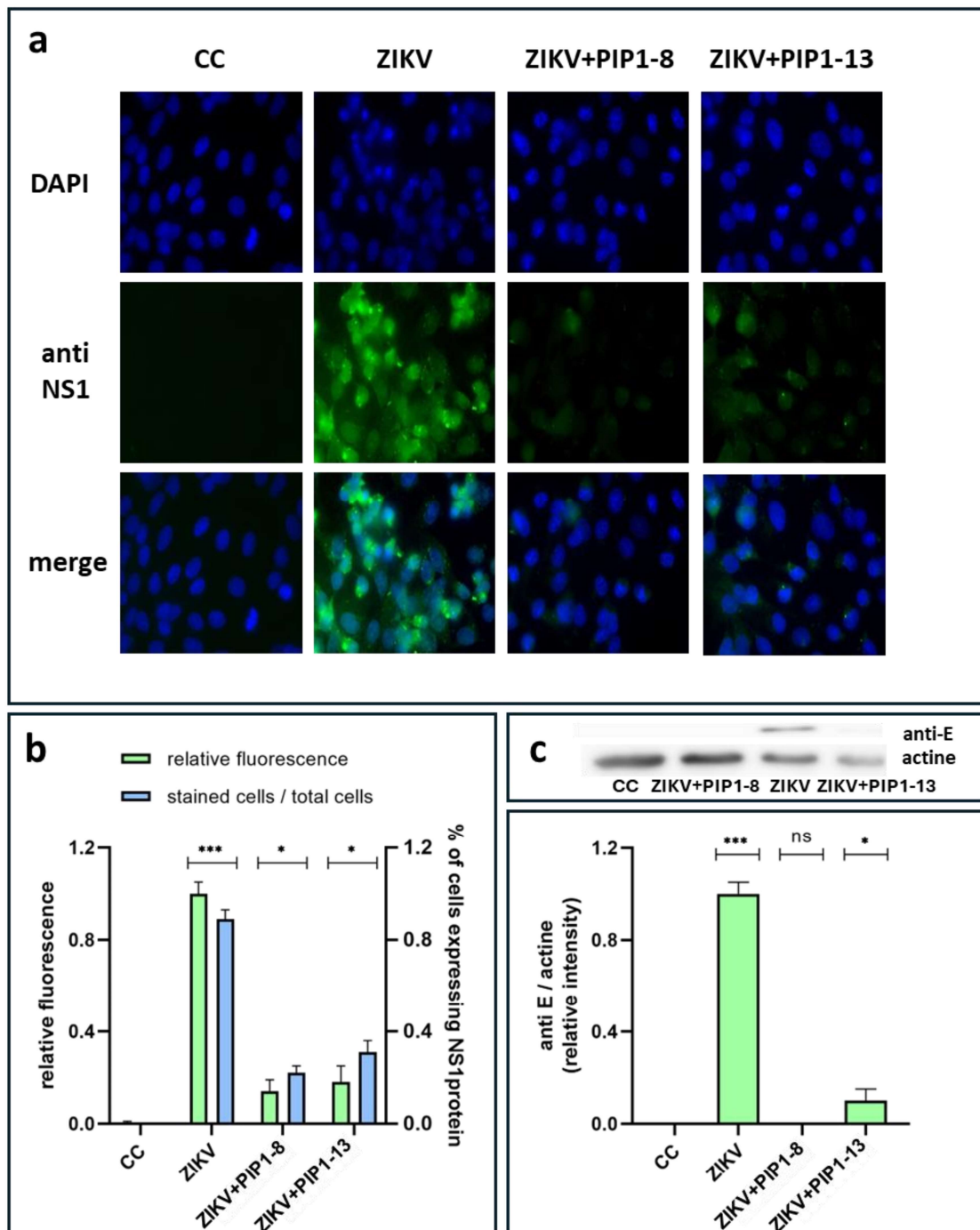


Figura 3.54: (a) IFI con un anticuerpo anti-NS1 en células Vero. (b) Intensidad de fluorescencia relativa y número de células que expresan el antígeno NS1. (c) Western blotting de la expresión de la proteína E de ZIKV. (d) Intensidad relativa de las bandas anti-E en el Western Blot. CC: células Vero no tratadas; ZIKV: células Vero infectadas con el virus del Zika ($m.o.i = 0.1$); ZIKV + 3-3 y ZIKV + PIP1-13: células infectadas tratadas con los compuestos PIP1-8 y PIP1-13 a $50 \mu\text{M}$, respectivamente. DAPI: tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol para visualizar los núcleos celulares. La significancia estadística se refiere a las diferencias en comparación con CC, con * $p < 0.02$ y *** $p < 0.001$.

Para investigar más a fondo el mecanismo de acción antiviral, se realizó un ensayo de tiempo de adición con los compuestos **PIP1-8** y **PIP1-13** en células Vero infectadas con ZIKV. Los compuestos se agregaron 2 h. antes de la infección (pretratamiento), al momento de la inoculación viral (cotratamiento) o 1 h. después de la infección (postratamiento). Como se muestra en la Figura 3.55a, se observó una reducción significativa en la producción viral solo cuando los compuestos se administraron después de la infección, lo que sugiere que la etapa objetivo ocurre después de la adsorción e internalización viral.

Dado que la actividad antiviral de los compuestos **PIP1-8** y **PIP1-13** se ejerció en etapas posteriores a la entrada, se evaluó la posibilidad de que interfirieran con procesos celulares del hospedador involucrados en la replicación viral. Recientemente, se ha asociado a ZIKV y SARS-CoV2 con alteraciones en las gotículas lipídicas (LD) dentro de las células hospedadoras. Estas organelas celulares son responsables del almacenamiento de lípidos neutros, principalmente triglicéridos y ésteres de colesterol, y su manipulación por parte de los virus está relacionada con varios aspectos de su replicación y patogénesis. Por lo tanto, para poner a prueba esta hipótesis, se evaluó el efecto del compuesto **PIP1-13** sobre la distribución de LD en células Huh-7 infectadas con ZIKV, dado que las células hepáticas poseen naturalmente una mayor cantidad de LD.³⁸

La cuantificación de LD se realizó en células infectadas con ZIKV a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 y se analizó a las 72 h. posinfección mediante tinción doble. Las LD se marcaron con la sonda fluorescente BODIPY 493/503, y las células infectadas se identificaron con un anticuerpo anti-NS1. Las microfotografías confocales (Figura 3.55b) revelaron que, bajo nuestras condiciones de ensayo, las células infectadas presentaron un aumento en el número de LD en comparación con las células no infectadas. En contraste, en las células tratadas con el compuesto **PIP1-13** se observó una disminución significativa en la cantidad de LD, tanto en células infectadas como no infectadas, en comparación con sus respectivos controles no tratados. Estos resultados sugieren que el compuesto **PIP1-13** podría estar afectando la biogénesis de gotículas lipídicas como parte de su mecanismo antiviral.

Nuestro hallazgo de que el efecto inhibitorio del compuesto **PIP1-13** se manifiesta cuando se administra en etapas tardías del ciclo viral es consistente con un posible mecanismo que involucra la alteración de la formación o función de las LD, ya que estas organelas favorecen la replicación genómica y el ensamblaje de viriones en varios virus de ARN de cadena positiva, incluido el virus Zika. De hecho, se ha demostrado que la infección por

ZIKV estimula el metabolismo lipídico y promueve la acumulación de LD en células neuronales, y que la interferencia farmacológica con su síntesis —particularmente a través de la inhibición de DGAT1 (diacilglicerol *O*-aciltransferasa 1), una enzima clave en la biogénesis de LD— reduce la replicación de ZIKV tanto *in vitro* como *in vivo*.^{39,40} Cabe destacar que la inhibición de DGAT1 también se ha asociado con una menor viabilidad celular en otros modelos, lo que sugiere que la citotoxicidad observada para ciertos análogos en nuestra serie podría estar vinculada a una disrupción excesiva de la homeostasis lipídica.^{41,42}

Hasta donde sabemos, no se han reportado pequeñas moléculas sintéticas que modulen directamente la biogénesis de LD. Sin embargo, ciertos lípidos neutros —como los ésteres de retinol— han demostrado inducir la formación de LD.⁴³ En este contexto, no puede descartarse que la naturaleza lipofílica de nuestros compuestos contribuya, al menos en parte, a la actividad observada, una posibilidad que podría ser interesante explorar en mayor profundidad.

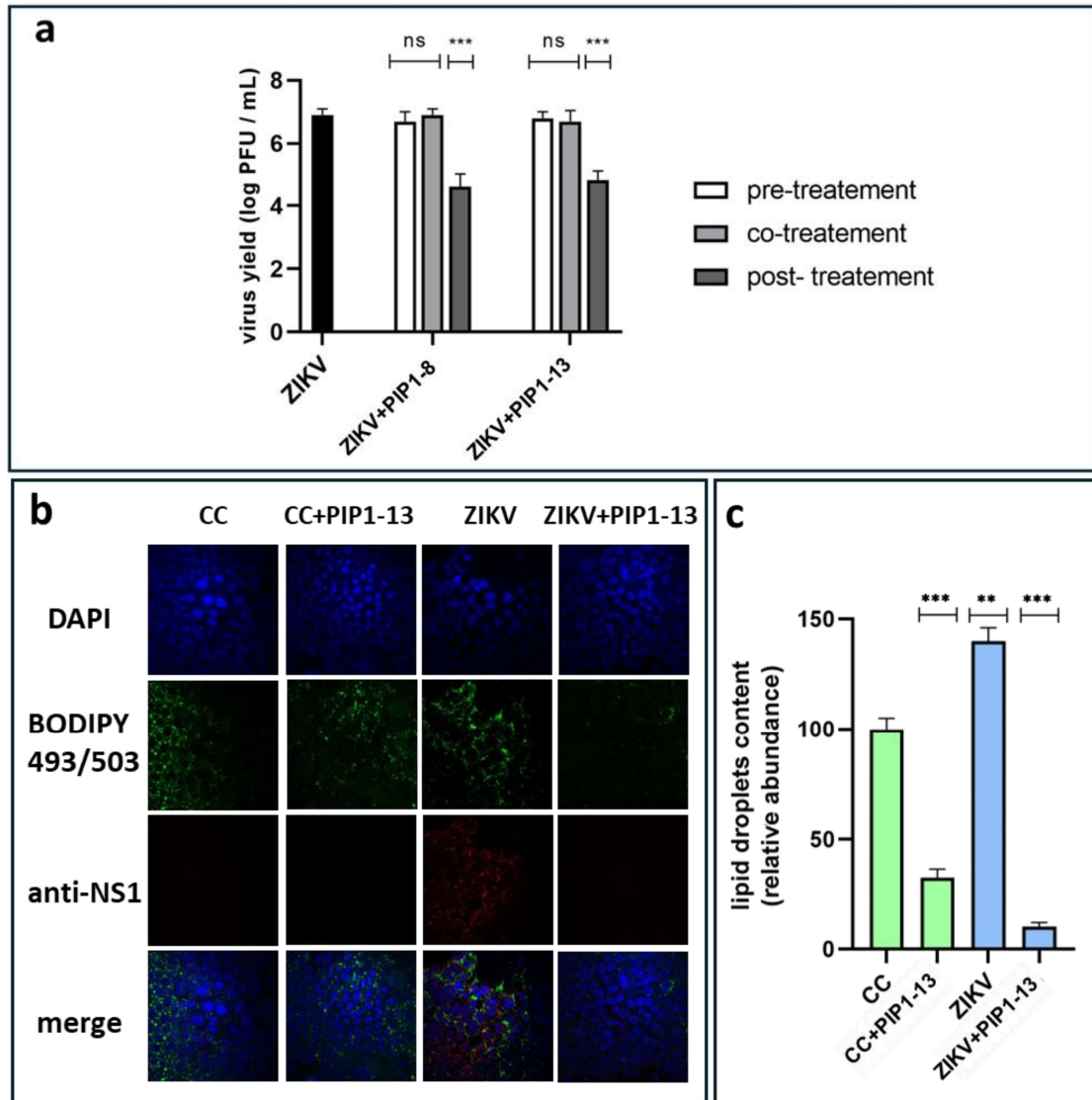


Figura 3.55: (a) Ensayo de tiempo de adición. Producción viral en células Vero infectadas con ZIKV y tratadas con los compuestos **PIP1-8** o **PIP1-13** en diferentes momentos: pretratamiento (2 h. antes de la infección), cotratamiento (en el momento de la inoculación viral) o postratamiento (1 h. después de la infección). Los títulos virales se determinaron 48 h. después de la infección. (b) Microfotografías de células teñidas con BODIPY 493/503 y anticuerpo anti-NS1. DAPI: tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol para visualizar los núcleos celulares. (c) Contenido relativo de gotas lipídicas. CC: células Huh-7 no tratadas. Las células Huh-7 fueron tratadas con el compuesto **PIP1-13** (50 μ M); ZIKV: células Huh-7 infectadas con el virus del Zika ($m.o.i = 0.1$); ZIKV + **PIP1-13**: células infectadas ($m.o.i = 0.1$) tratadas con el compuesto **PIP1-13** a 50 μ M. La significancia estadística se refiere a las diferencias en comparación con CC, con ** $p < 0.002$ y *** $p < 0.0005$.

Referencias

- (1) Ugi, I. The α -Addition of Immonium Ions and Anions to Isonitriles Accompanied by Secondary Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, *1* (1), 8–21. <https://doi.org/10.1002/anie.196200081>.
- (2) Faggi, C.; García-Valverde, M.; Marcaccini, S.; Menchi, G. Isolation of Ugi Four-Component Condensation Primary Adducts: A Straightforward Route to Isocoumarins. *Org. Lett.* **2010**, *12* (4), 788–791. <https://doi.org/10.1021/ol9028622>.
- (3) Ugi, I.; Offermann, K. Asymmetric 1,3-Induction during the α -Addition of Immonium Ions and Carboxylate Anions onto Isonitriles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 624–624. <https://doi.org/10.1002/anie.196306241>.
- (4) Dömling, A.; Ugi, I. Multicomponent Reactions with Isocyanides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (18), 3168–3210. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20000915\)39:18<3168::AID-ANIE3168>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000915)39:18<3168::AID-ANIE3168>3.0.CO;2-U).
- (5) Armstrong, R. W.; Combs, A. P.; Tempest, P. A.; Brown, S. D.; Keating, T. A. Multiple-Component Condensation Strategies for Combinatorial Library Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29* (3), 123–131. <https://doi.org/10.1021/ar9502083>.
- (6) Weber, L. The Application of Multi-Component Reactions in Drug Discovery. *CMC* **2002**, *9* (23), 2085–2093. <https://doi.org/10.2174/0929867023368719>.
- (7) Hulme, C.; Gore, V. “Multi-Component Reactions : Emerging Chemistry in Drug Discovery” ‘from Xylocain to Crixivan.’ *CMC* **2003**, *10* (1), 51–80. <https://doi.org/10.2174/0929867033368600>.
- (8) Ugi, I.; Steinbrückner, C. Patent DE-B 1,103,337, 1959.
- (9) Ugi, I.; Steinbrückner, C. Isonitrile, IX. α -Addition von Immonium-Ionen Und Carbonsäure-Anionen an Isonitrile. *Chem. Ber.* **1961**, *94* (10), 2802–2814. <https://doi.org/10.1002/cber.19610941032>.
- (10) Keating, T. A.; Armstrong, R. W. The Ugi Five-Component Condensation Using CO₂, CS₂, and COS as Oxidized Carbon Sources. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (3), 867–871. <https://doi.org/10.1021/jo971463z>.
- (11) Hulme, C.; Ma, L.; Romano, J. J.; Morton, G.; Tang, S.-Y.; Cherrier, M.-P.; Choi, S.; Salvino, J.; Labaudiniere, R. Novel Applications of Carbon Dioxide/MeOH for the Synthesis

of Hydantoins and Cyclic Ureas via the Ugi Reaction. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (12), 1889–1893. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00053-8).

(12) Ugi, I.; Meyr, R. Isonitrile, V. Erweiterter Anwendungsbereich Der Passerini-Reaktion. *Chem. Ber.* **1961**, *94* (8), 2229–2233. <https://doi.org/10.1002/cber.19610940844>.

(13) Bienaymé, H.; Bouzid, K. Synthesis of Rigid Hydrophobic Tetrazoles Using an Ugi Multi-Component Heterocyclic Condensation. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (18), 2735–2738. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)00283-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)00283-4).

(14) Zhao, G.; Sun, X.; Bienaymé, H.; Zhu, J. Activation of a Terminal Carboxylic Acid by an Internal Oxazole: A Novel Synthesis of Macrocyclodepsipeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (27), 6700–6701. <https://doi.org/10.1021/ja015854d>.

(15) Wang, R.; Piggott, A. M.; Chooi, Y.-H.; Li, H. Discovery, Bioactivity and Biosynthesis of Fungal Piperazines. *Nat. Prod. Rep.* **2023**, *40* (2), 387–411. <https://doi.org/10.1039/D2NP00070A>.

(16) Yuan, B.; Liu, D.; Guan, X.; Yan, Y.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Yang, D.; Ma, M.; Lin, W. Piperazine Ring Formation by a Single-Module NRPS and Cleavage by an α -KG-Dependent Nonheme Iron Dioxygenase in Brasiliamide Biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **2020**, *104* (14), 6149–6159. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10678-w>.

(17) Kundu, R. Cationic Amphiphilic Peptides: Synthetic Antimicrobial Agents Inspired by Nature. *ChemMedChem* **2020**, *15* (20), 1887–1896. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000301>.

(18) Caboche, S.; Pupin, M.; Leclere, V.; Fontaine, A.; Jacques, P.; Kucherov, G. NORINE: A Database of Nonribosomal Peptides. *Nucleic Acids Research* **2007**, *36* (Database), D326–D331. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm792>.

(19) Pupin, M.; Esmael, Q.; Flissi, A.; Dufresne, Y.; Jacques, P.; Leclère, V. Norine: A Powerful Resource for Novel Nonribosomal Peptide Discovery. *Synthetic and Systems Biotechnology* **2016**, *1* (2), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2015.11.001>.

(20) Flissi, A.; Ricart, E.; Campart, C.; Chevalier, M.; Dufresne, Y.; Michalik, J.; Jacques, P.; Flahaut, C.; Lisacek, F.; Leclère, V.; Pupin, M. Norine: Update of the Nonribosomal Peptide Resource. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48* (D1), D465–D469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1000>.

- (21) Lieke, W. 19. Ueber Das Cyannllyl. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1859, 112 (3), 316–321.
- (22) Hofmann, A. W. Ueber Eine Neue Reihe von Homologen Der Cyanwasserstoffsäure. *Ann. Der Chemie Und Pharm.* 1868, 146 (1), 107–119.
- (23) Casanova, J.; Werner, N. D.; Schuster, R. E. The Isonitrile—Nitrile Isomerization ¹. *J. Org. Chem.* **1966**, 31 (11), 3473–3482. <https://doi.org/10.1021/jo01349a003>.
- (24) Gerack, C.; McElwee-White, L. Formylation of Amines. *Molecules* **2014**, 19 (6), 7689–7713. <https://doi.org/10.3390/molecules19067689>.
- (25) Yao, L.; Mustafa, N.; Tan, E. C.; Poulsen, A.; Singh, P.; Duong-Thi, M.-D.; Lee, J. X. T.; Ramanujulu, P. M.; Chng, W. J.; Yen, J. J. Y.; Ohlson, S.; Dymock, B. W. Design and Synthesis of Ligand Efficient Dual Inhibitors of Janus Kinase (JAK) and Histone Deacetylase (HDAC) Based on Ruxolitinib and Vorinostat. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (20), 8336–8357. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00678>.
- (26) Menezes, R.; Smith, M. B. A Mild and Facile Route to ω -Amino Esters. *Synthetic Communications* **1988**, 18 (14), 1625–1636. <https://doi.org/10.1080/00397918808081323>.
- (27) Abraham, R. J.; Griffiths, L.; Perez, M. ¹ H NMR Spectra. Part 30: ¹ H Chemical Shifts in Amides and the Magnetic Anisotropy, Electric Field and Steric Effects of the Amide Group. *Magnetic Reson in Chemistry* **2013**, 51 (3), 143–155. <https://doi.org/10.1002/mrc.3920>.
- (28) Škoch, K.; Císařová, I.; Štěpnička, P. Selective Gold-Catalysed Synthesis of Cyanamides and 1-Substituted 1 H -Tetrazol-5-Amines from Isocyanides. *Chemistry A European J* **2018**, 24 (52), 13788–13791. <https://doi.org/10.1002/chem.201803252>.
- (29) Rivera, D. G.; Wessjohann, L. A. Supramolecular Compounds from Multiple Ugi Multicomponent Macrocyclizations: Peptoid-Based Cryptands, Cages, and Cryptophanes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (22), 7122–7123. <https://doi.org/10.1021/ja060720r>.
- (30) Stephany, R. W.; De Bie, M. J. A.; Drenth, W. A ¹³ C-NMR and IR Study of Isocyanides and Some of Their Complexes. *Org. Magn. Reson.* **1974**, 6 (1), 45–47. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270060112>.
- (31) Marcaccini, S.; Torroba, T. The Use of the Ugi Four-Component Condensation. *Nat Protoc* **2007**, 2 (3), 632–639. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.71>.

- (32) Galetti, M. D.; Cirigliano, A. M.; Cabrera, G. M.; Ramírez, J. A. Multicomponent Synthesis of Acylated Short Peptoids with Antifungal Activity against Plant Pathogens. *Mol Divers* **2012**, *16* (1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s11030-011-9334-1>.
- (33) Bain, A. D. Chemical Exchange in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2003**, *43* (3–4), 63–103. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2003.08.001>.
- (34) Mumm, O. Umsetzung von Säureimidchloriden Mit Salzen Organischer Säuren Und Mit Cyankalium. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, *43* (1), 886–893. <https://doi.org/10.1002/cber.191004301151>.
- (35) Ugi, I.; Offermann, K. Isonitrile, XIX. Die Kondensation von Carbonsäuren, Aldehyden Und Isonitrilen Mit Primären Aliphatischen Aminen, Die Einen Abspaltbaren Alkyl- Oder Alkenyl-Rest Tragen. *Chem. Ber.* **1964**, *97* (11), 2996–3007. <https://doi.org/10.1002/cber.19640971105>.
- (36) Vercillo, O. E.; Andrade, C. K. Z.; Wessjohann, L. A. Design and Synthesis of Cyclic RGD Pentapeptoids by Consecutive Ugi Reactions. *Org. Lett.* **2008**, *10* (2), 205–208. <https://doi.org/10.1021/ol702521g>.
- (37) Foley, D. J.; Zinken, S.; Corkery, D.; Laraia, L.; Pahl, A.; Wu, Y.; Waldmann, H. Phenotyping Reveals Targets of a Pseudo-Natural-Product Autophagy Inhibitor. *Angew Chem Int Ed* **2020**, *59* (30), 12470–12476. <https://doi.org/10.1002/anie.202000364>.
- (38) García, C. C.; Vázquez, C. A.; Giovannoni, F.; Russo, C. A.; Cordo, S. M.; Alaimo, A.; Damonte, E. B. Cellular Organelles Reorganization During Zika Virus Infection of Human Cells. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1558. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01558>.
- (39) Stoyanova, G.; Jabeen, S.; Landazuri Vinueza, J.; Ghosh Roy, S.; Lockshin, R. A.; Zakeri, Z. Zika Virus Triggers Autophagy to Exploit Host Lipid Metabolism and Drive Viral Replication. *Cell Commun Signal* **2023**, *21* (1), 114. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-01026-8>.
- (40) Teixeira, L.; Temerozo, J. R.; Pereira-Dutra, F. S.; Ferreira, A. C.; Mattos, M.; Gonçalves, B. S.; Sacramento, C. Q.; Palhinha, L.; Cunha-Fernandes, T.; Dias, S. S. G.; Soares, V. C.; Barreto, E. A.; Cesar-Silva, D.; Fintelman-Rodrigues, N.; Pão, C. R. R.; De Freitas, C. S.; Reis, P. A.; Hottz, E. D.; Bozza, F. A.; Bou-Habib, D. C.; Saraiva, E. M.; De Almeida, C. J. G.; Viola, J. P. B.; Souza, T. M. L.; Bozza, P. T. Simvastatin Downregulates the SARS-CoV-2-Induced Inflammatory Response and Impairs Viral Infection Through

Disruption of Lipid Rafts. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 820131.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.820131>.

(41) Danielli, M.; Perne, L.; Jarc Jovičić, E.; Petan, T. Lipid Droplets and Polyunsaturated Fatty Acid Trafficking: Balancing Life and Death. *Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, *11*, 1104725.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1104725>.

(42) Fernandes, T.; Domingues, M. R.; Moreira, P. I.; Pereira, C. F. A Perspective on the Link between Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) and Lipid Droplets Metabolism in Neurodegenerative Diseases. *Biology* **2023**, *12* (3), 414.
<https://doi.org/10.3390/biology12030414>.

(43) Molenaar, M. R.; Yadav, K. K.; Toulmay, A.; Wassenaar, T. A.; Mari, M. C.; Caillon, L.; Chorlay, A.; Lukmantara, I. E.; Haaker, M. W.; Wubbolts, R. W.; Houweling, M.; Vaandrager, A. B.; Prieur, X.; Reggiori, F.; Choudhary, V.; Yang, H.; Schneiter, R.; Thiam, A. R.; Prinz, W. A.; Helms, J. B. Retinyl Esters Form Lipid Droplets Independently of Triacylglycerol and Seipin. *Journal of Cell Biology* **2021**, *220* (10), e202011071.
<https://doi.org/10.1083/jcb.202011071>.

Capítulo 4

Biblioteca PIP2

CAPÍTULO 4: Biblioteca PIP2

Introducción

En la naturaleza, los productos naturales (PNs) se originan a partir de un conjunto limitado de rutas biosintéticas principales —como las de poliquétidos (PKS), péptidos no ribosomales (NRPS), terpenos o alcaloides—, cada una mediada por maquinaria enzimática especializada. Tradicionalmente, estas rutas se han tratado como compartimentos independientes. De hecho, bases de datos como COCONUT o el *Dictionary of Natural Products* aún clasifican los compuestos de acuerdo con estas categorías biosintéticas tradicionales. Sin embargo, en numerosos casos se ha demostrado que la evolución ha favorecido la combinación de módulos de distinto origen biosintético, dando lugar a moléculas que, bajo esta lógica, pueden considerarse híbridas.

Estos productos naturales híbridos integran en una sola estructura fragmentos derivados de dos o más rutas biosintéticas no relacionadas, lo que da lugar a arquitecturas químicas únicas. Ejemplos paradigmáticos incluyen:

- Híbridos PKS–NRPS, en los que módulos policetídicos y peptídicos se ensamblan en una misma cadena de síntesis. La micosubtilina es un caso bien estudiado, con una porción lipídica policetídica y un segmento peptídico que confieren propiedades antimicrobianas.
- Alcaloides terpenoides, formados por la unión de un núcleo terpénico —derivado de la vía del mevalonato (MEV) o la vía del fosfato de metileritritol (MEP)— con una porción nitrogenada propia de alcaloides, como en la panicudina.
- Meroterpenoides, que combinan un esqueleto terpénico con un fragmento de policétido; el lolitrem B es un ejemplo típico producido por hongos endofíticos de gramíneas.

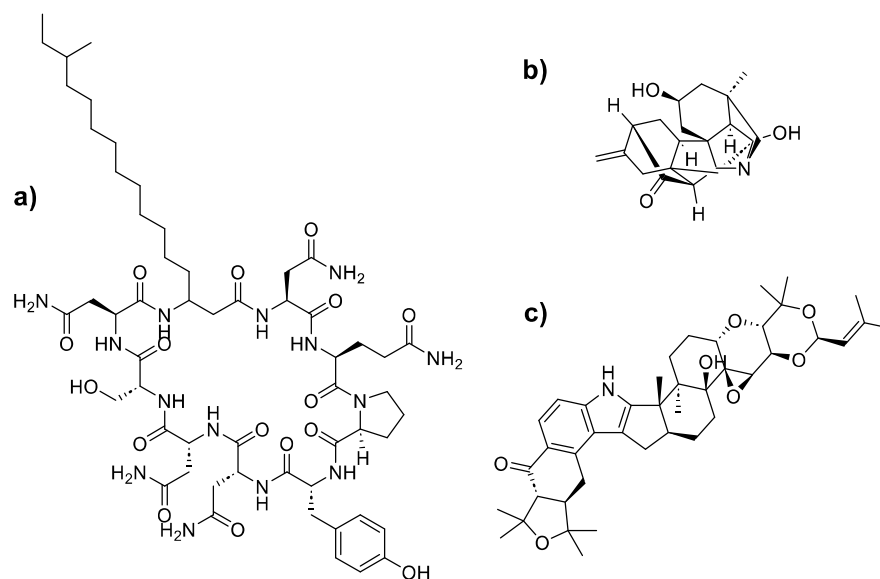


Figura 4.1: Ejemplos de productos naturales "híbridos": (a) *micosubtilina*, (b) *panicudina*, (c) *lolitrem B*.

La biosíntesis de estos híbridos implica la coordinación de enzimas pertenecientes a rutas distintas, con el consiguiente acoplamiento de intermediarios y adaptación de especificidades enzimáticas. El resultado son moléculas que integran la diversidad estructural y funcional de ambas clases, con perfiles biológicos a menudo inéditos.

Tal como se introdujo en el Capítulo 1, el concepto de pseudo productos naturales (pPNs), propuesto por Herbert Waldmann y colaboradores, se inspira directamente en la existencia de estos híbridos naturales. Se trata de un enfoque de diseño *de novo* en el que fragmentos de PNs procedentes de rutas biosintéticas no relacionadas se combinan deliberadamente en el laboratorio con el objetivo de explorar regiones del espacio químico que, en principio, la naturaleza no ha generado.

En este punto, resulta interesante señalar que algunas combinaciones diseñadas originalmente como pPNs —sin antecedentes conocidos en la naturaleza— fueron posteriormente identificadas en organismos. Las pirroloquinolinonas constituyen un ejemplo claro: originalmente, Waldmann obtuvo estas estructuras como pPNs a partir de la combinación de fragmentos de pirrolidina y quinolinona. Años más tarde, compuestos con esta misma arquitectura fueron aislados de *Streptomyces albogriseolus*. Este tipo de hallazgos resaltan la eficacia del principio pPN para proporcionar compuestos biológicamente relevantes.

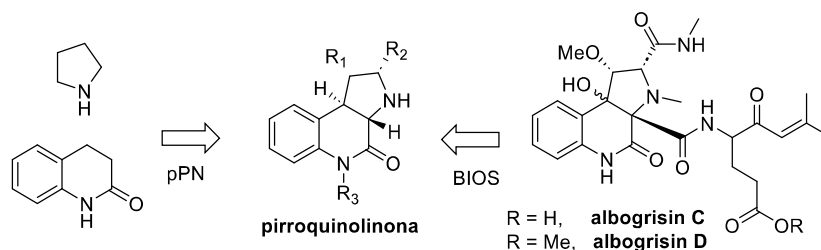


Figura 4.2: La lógica pPN conduciendo al mismo andamio de las pirroloquinolinonas naturales.

La potencialidad del diseño *de novo* de pPNs fue explorada en el Capítulo 3. Allí se mostró cómo la combinación, mediante reacciones multicomponente (RMC), de fragmentos presentes en distintos PNs y provenientes de diferentes rutas biosintéticas dio lugar a compuestos biológicamente activos que ejemplifican el alcance de esta estrategia. En este sentido, la biblioteca del Capítulo 3 puede entenderse como un ejercicio de diseño basado en fragmentos —al seleccionar y combinar unidades estructurales de orígenes diversos— y también de diseño basado en reacciones, al aprovechar la versatilidad de la variante Ugi Split para ensamblarlos de manera eficiente.

Desde una perspectiva biosintética, central en el diseño de pPNs, los compuestos presentados pueden considerarse ensamblajes híbridos donde el motivo central es una tetraamida formada por unidades de glicina o de ácido ϵ -aminocaproico, emulando un tetrapéptido. Sobre esta base se incorporan restos acilo lipofílicos que, en la naturaleza, se originan a partir de malonil-CoA mediante distintas rutas biosintéticas, como la de los ácidos grasos o la de los policétidos. La tetraamida está sustituida con residuos presentes en las cadenas laterales de aminoácidos proteínogénicos y no proteínogénicos, lo que aporta diversidad estructural y funcional. Finalmente, el anillo de piperazina que se intercala en el paso Ugi Split introduce un heterociclo característico de numerosos PNs y cuya biosíntesis varía según la clase de metabolito.

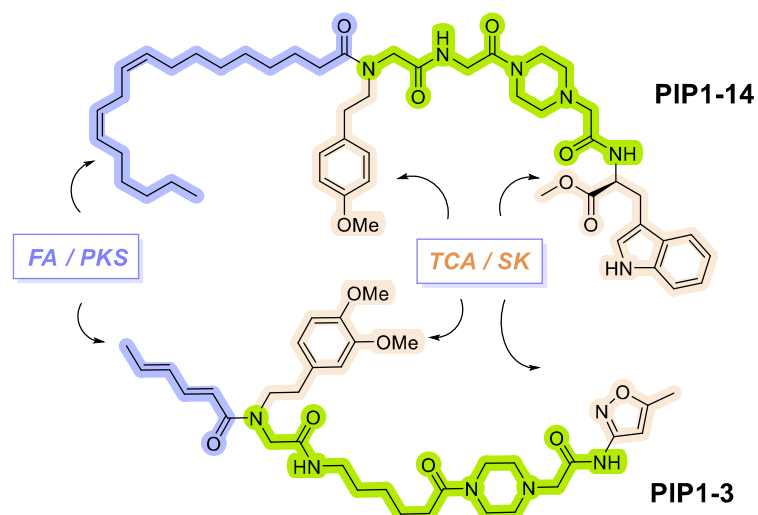


Figura 4.3: Ejemplos de moléculas sintetizadas en el Capítulo 3. Los fragmentos usados se encuentran en PNs y provienen de rutas biosintéticas variadas (FA: vía ácidos grasos, PKS: vía policétidos, TCA: vía ácido cítrico, SK: vía shikimato).

En conjunto, esta biblioteca refleja cómo el diseño *de novo* de pPNs permite combinar de manera creativa fragmentos de origen natural mediante estrategias sintéticas modernas. Lo que en el trabajo de 2012 se manifestó de forma latente y en el Capítulo 3 se consolidó en una primera expansión, se retomará ahora como punto de partida para seguir explorando con mayor libertad las posibilidades de esta aproximación.

Diseño de la nueva biblioteca

El diseño *de novo* se distingue por su amplia flexibilidad, ya que permite tomar diversas decisiones a lo largo del proceso. Es necesario seleccionar los fragmentos a incorporar y definir la estrategia de ensamblaje, ya sea basada en la lógica de los fragmentos o en la reacción elegida como herramienta de construcción. A su vez, el diseño puede orientarse según criterios diversos, como la diversidad estructural, la semejanza con productos naturales, la factibilidad sintética, entre otros. En conjunto, estas posibilidades muestran que el diseño *de novo* no responde a una trayectoria única, sino que constituye un espacio deliberado de exploración.

A continuación, se discutirá brevemente los criterios y premisas que guiaron el diseño de esta nueva biblioteca de pPNs. En primer lugar, se explica por qué se decidió continuar con la reacción de Ugi Split como paso clave. Dentro del diseño *de novo* basado en reacciones,

la elección de la transformación química es central, ya que debe ser robusta, modular y capaz de generar motivos funcionales con relevancia biológica. En este sentido, la reacción Ugi Split resulta especialmente adecuada: como variante de las RMC basadas en isonitrilos, admite una amplia diversidad de fragmentos, produce enlaces amida de manera directa, y posibilita la construcción rápida de bibliotecas estructuralmente variadas. Tal como se demostró en el Capítulo anterior, esta reacción reúne en la práctica todas las cualidades que se esperan de una transformación empleada en el diseño *de novo*.

En este punto es interesante destacar que, en el ámbito de la Química Medicinal, el enlace amida suele asociarse sobre todo a moléculas sintéticas, ya que está presente en alrededor del 25% de los fármacos aprobados y en dos tercios de los candidatos en desarrollo clínico.¹ Sin embargo, el análisis estadístico de bases de datos de PNs revela que su prevalencia también es significativa en este tipo de compuestos. En particular, en la base PN-T extraída de COCONUT para esta Tesis se observó que cerca del 15% de los PNs contienen al menos un grupo amida. Si bien este motivo funcional constituye la base estructural de péptidos y depsipéptidos, el análisis mostró, además, que aproximadamente un 9% de los compuestos con amidas no pertenecen a estas familias, y que dichos compuestos contienen, en promedio, 1,5 grupos amida por molécula. Estos resultados sugieren que, lejos de ser un rasgo exclusivo de compuestos diseñados en el laboratorio, el enlace amida es también un motivo funcional relevante en metabolitos especializados.

En segundo lugar, se aborda el uso de la piperazina como componente. Como también se discutió anteriormente, la reacción de Ugi Split requiere una diamina secundaria como componente. Para esta biblioteca decidimos continuar con el uso de piperazina, por los motivos que se mencionaron en el Capítulo 3. Más allá de los efectos que este heterociclo pueda ejercer sobre las propiedades fisicoquímicas de los productos finales, en la naturaleza los anillos de piperazina representan un importante motivo estructural y han sido reconocidos como la estructura central de productos conocidos como alcaloides que contienen piperazina, los cuales abarcan una amplia gama de compuestos²⁻⁴ (Figura 4.4).

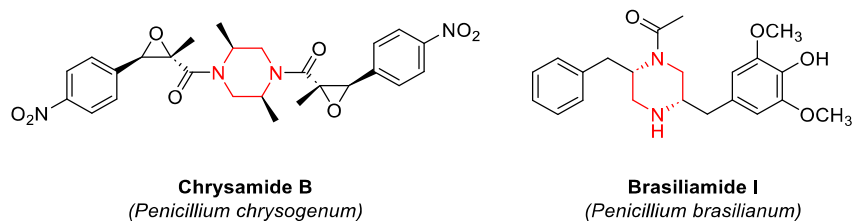


Figura 4.4: Ejemplos de PNs que contienen un anillo de piperazina.

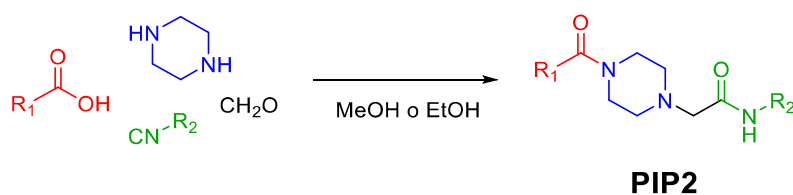
Por otro lado, y al provenir de rutas biosintéticas poco frecuentes, el anillo de piperazina introduce motivos estructurales que difícilmente se puedan encontrar en PNs si se combinan con fragmentos de distintos orígenes. Esto plantea la interrogante de qué otros fragmentos podrían incorporarse.

Si bien la lógica del diseño de pPNs plantea lineamientos claros, su aplicación particular abre un gran abanico de posibilidades. Nuestra selección se basó en las siguientes premisas:

- Todos los fragmentos debían estar presentes en PNs, aunque con distinta prevalencia. De este modo, se buscó combinar bloques que aparecen con frecuencia en diversas familias —lo que aporta cierta validación biológica y una conexión reconocible con metabolitos especializados— con otros menos frecuentes, ofreciendo así la posibilidad de generar arquitecturas menos probables en PNs para poder explorar regiones menos pobladas del espacio químico.
- Los fragmentos debían provenir de rutas biosintéticas distintas. La combinación de bloques derivados de caminos metabólicos no relacionados refleja un principio central del diseño, como ya se discutió para el caso de la piperazina. Este criterio se puede extender al resto de los bloques.
- Los fragmentos debían cubrir una amplia diversidad química. Se buscó incluir bloques de distinto tamaño y forma, con carácter alifático y aromático, y con variaciones en cuanto a heteroátomos y grupos funcionales. Este criterio favorece la generación de una biblioteca con mayor riqueza estructural y la posibilidad de explorar interacciones biológicas variadas.
- Los fragmentos seleccionados debían ser accesibles desde el punto de vista práctico. Se priorizó el uso de bloques de partida disponibles comercialmente o que pudieran obtenerse mediante síntesis sencilla y confiable. Este criterio asegura la

viabilidad experimental de la biblioteca y permite un equilibrio entre la ambición del diseño y la factibilidad de su implementación en el laboratorio.

Con esto en mente, se planteó una síntesis general para los compuestos finales mediante una reacción multicomponente Ugi Split empleando formaldehído como compuesto carbonílico, piperazina como diamina y los distintos fragmentos seleccionados como ácidos carboxílicos e isonitrilos para dar lugar a la familia de compuestos sintetizados en este capítulo, que comparten el esqueleto general **PIP2** (Esquema 4.1).



*Esquema 4.1: Ruta sintética genérica planteada para la obtención de los productos de esqueleto general **PIP2**.*

Preparación de bloques de construcción

Con el propósito de optimizar la claridad y la comprensión a lo largo de la presente tesis, se estableció un sistema de codificación para los diferentes bloques estructurales. De este modo, los fragmentos correspondientes a los ácidos fueron identificados con la sigla **AC**, mientras que aquellos vinculados a los isonitrilos se designaron como **IS**. Esta nomenclatura se aplicó de manera uniforme tanto a los intermediarios como a los productos finales derivados de cada bloque, y se complementó con la inclusión de los esqueletos generales **PIP2**, que constituyen un marco común dentro del análisis desarrollado.

Preparación de ácidos carboxílicos (**AC**)

Los ácidos carboxílicos elegidos pueden catalogarse a grandes rasgos en dos grupos: los accesibles comercialmente y los que se prepararon específicamente para este trabajo. Entre los primeros, se eligieron los compuestos mostrados en la Figura 4.5.

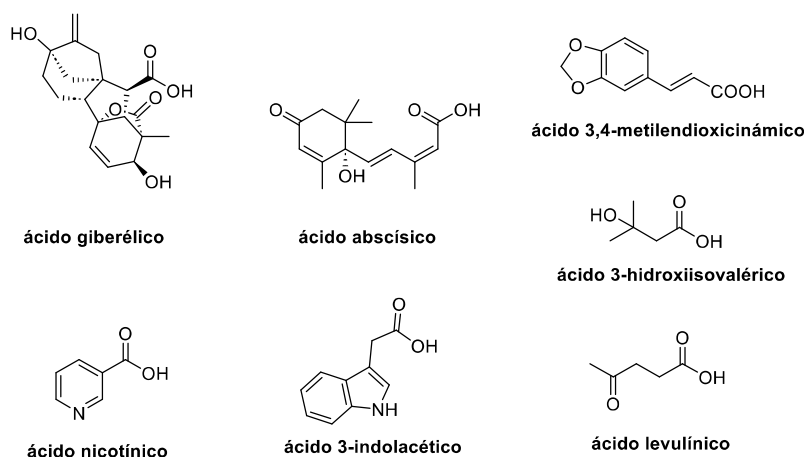
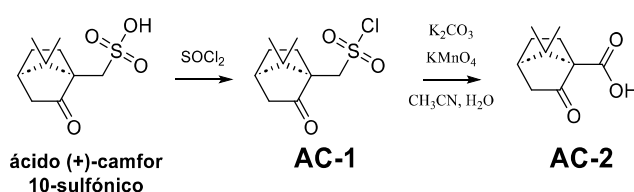


Figura 4.5: Bloques ácidos accesibles comercialmente.

Tanto el ácido giberélico como el abscísico son en sí mismos PN de la familia de los terpenoides provenientes de la vía del MEV⁵ y MEP/DOXP⁶, respectivamente, mientras que los ácidos nicotínico, 3-indolacético, 3-hidroxiisovalérico y 3,4-metilendioxicinámico se originan principalmente a partir de aminoácidos por distintas rutas dependientes de la especie.⁷ Estos ácidos fueron empleados sin transformaciones previas como componentes carboxílicos en distintas reacciones de Ugi Split.

Posteriormente se decidió preparar bloques de complejidad estructural creciente. En primer lugar, se eligieron terpenos accesibles que, aunque no contuvieran el grupo carboxílico necesario para la RMC, se pueden transformar en bloques adecuados mediante procedimientos sencillos. Por ejemplo, a partir de ácido (+)-camfor-10-sulfónico, y tal como se muestra en el Esquema 4.2, se preparó el ácido **AC-2**.



Esquema 4.2: Síntesis de **AC-2**.

Aquella síntesis se llevó a cabo *in situ* con un excelente rendimiento global de 90% siguiendo la técnica descrita en bibliografía.⁸ El producto **AC-2** fue obtenido como un sólido blanco que fue caracterizado mediante espectroscopía de RMN (Figura 4.6). En el espectro RMN ¹H se marcaron señales diagnósticas para destacar la presencia de H unidos

al mismo C, pero con entornos químicos diferentes debido la rotación impedida del ciclohexano (señales **a** y **b**). Además, se resaltaron las señales de los metilos que aparecen como singuletes no equivalentes (señales **c** y **d**).

Por otro lado, se destacaron algunas señales de C que resultaron imprescindibles para su asignación. Entre ellas puede destacarse la señal **e** perteneciente a la cetona cercana a 215 ppm, la señal **f** proveniente del C carboxílico por encima de 170 ppm y los dos C cuaternarios (señales **g** y **h**).

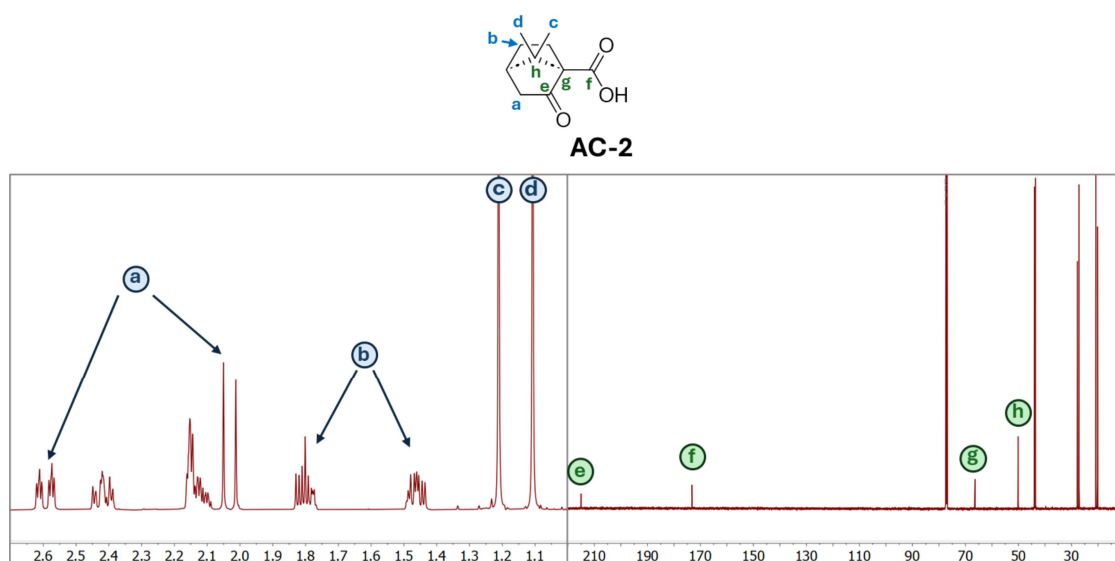
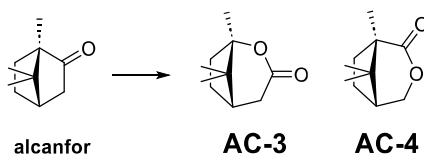


Figura 4.6: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C de **AC-2**.

De manera similar se partió de alcanfor, que se transformó en las lactonas **AC-3** y **AC-4** (Esquema 4.3), para lo cual fue necesario probar diversas condiciones con el fin de mejorar la selectividad de la reacción (Tabla 4.1).



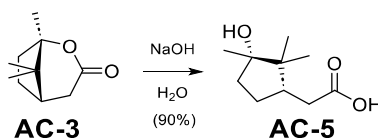
Esquema 4.3. Síntesis de **AC-3** y **AC-4**.

Reactivos	Solvente	t (día)	Conversión (%)	% AC-3	% AC-4
<i>m</i> -CPBA + <i>p</i> -TsOH	DCM	1	20	59	41
<i>m</i> -CPBA + <i>p</i> -TsOH	DCM	7	79	63	37
Anhídrido trifluoroacético + H ₂ O ₂	DCM	1	37	72	28
Anhídrido trifluoroacético + H ₂ O ₂	DCM	3	84	77	23

Tabla 4.1: Condiciones probadas para la oxidación de Baeyer-Villiger de alcanfor.

En la Tabla 4.1 se observa que las condiciones de reacción en las cuales se utilizó anhídrido trifluoroacético y H₂O₂ en diclorometano durante 3 días fueron las mejores para obtener la lactona de interés **AC-3** en mayor proporción. En estas condiciones se obtuvo la mayor conversión del material de partida y el mayor rendimiento relativo del producto de interés.

El segundo paso consistió en la hidrólisis de dicha lactona en condiciones básicas (Esquema 4.4). Se saponificó en hidróxido de sodio acuoso al 5% agitando la mezcla a 70 °C durante 3 horas. Luego, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se acidificó cuidadosamente con ácido sulfúrico hasta alcanzar un pH de 4-5, y obtener así el ácido sin mayor purificación.

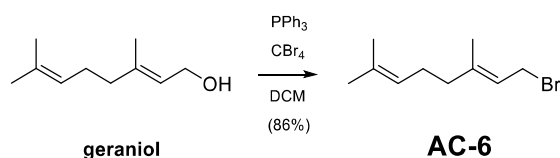


Esquema 4.4: Síntesis de **AC-5**.

Cabe destacar que se intentó llevar a cabo la hidrólisis de la lactona **AC-4** bajo las mismas condiciones previamente aplicadas a la lactona **AC-3**, sin éxito. Aunque durante los ensayos experimentales se observaba la desaparición del reactivo **AC-4** en la placa de TLC, al proceder al aislamiento del producto se recuperaba nuevamente la lactona de partida. Este comportamiento sugiere que dicho sistema cíclico presenta una gran estabilidad termodinámica que no permite obtener fácilmente el producto hidrolizado.

En una tercera etapa, se decidió generar una serie de ácidos carboxílicos más complejos por acoplamiento de bloques más pequeños y presentes en PNs. A continuación, se describen estos bloques y sus correspondientes síntesis.

El primero de ellos se sintetizó a partir de geraniol (un terpeno que puede generarse por las vías MEV y MEP), que se acopló con ácido siríngico, proveniente de la vía del shikimato.⁹ Para ello fue necesario transformar en un buen grupo saliente el hidroxilo del geraniol. Por lo tanto, se llevó a cabo un primer paso de formación de bromuro de geraniol mediante la reacción de Appel, haciéndolo reaccionar con CBr_4 y trifenilfosfina, con muy buen rendimiento (Esquema 4.5).



Esquema 4.5: Síntesis de AC-6.

La reacción de Appel se caracteriza por ser un método de halogenación que se lleva a cabo en condiciones suaves y es aplicable a alcoholes primarios, secundarios y terciarios. Empleando CBr_4 o bromo elemental como agentes halogenantes, se obtienen bromuros de alquilo, y se observan resultados similares para la halogenación con yoduros. El mecanismo de esta reacción (Figura 4.7) puede dividirse en cuatro pasos distintos:

1. Se inicia con la formación de la sal tribromometiluro de bromotrifenilfosfonio.
2. Luego, el alcohol se desprotona, generando un anión alcóxido que actúa como contraión del catión bromotrifenilfosfonio.
3. A continuación, se produce la sustitución nucleofílica del bromo por el alcóxido, resultando en la formación del bromuro de alcoxitrifenilfosfonio.
4. Los alcoholes primarios y secundarios reaccionan con el bromuro a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$), mientras que los alcoholes terciarios siguen un mecanismo de sustitución nucleofílica unimolecular ($\text{S}_\text{N}1$).

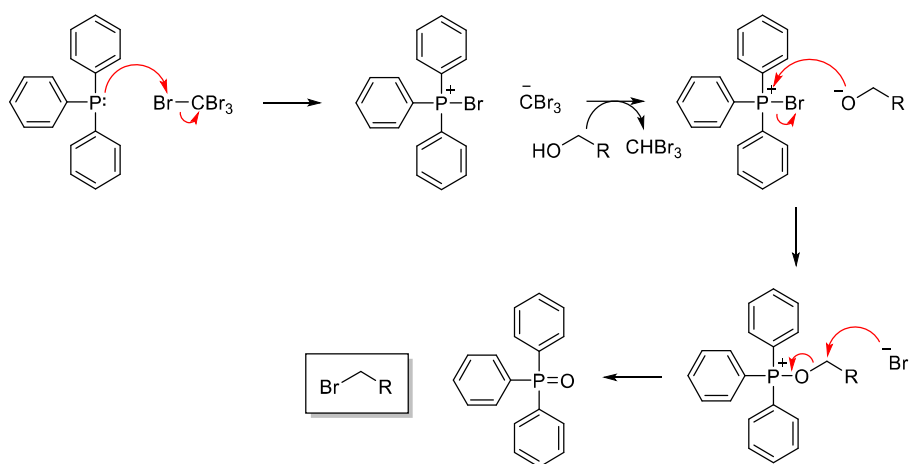


Figura 4.7: Mecanismo de la reacción de Appel.

Es importante destacar que la formación del óxido de trifenilfosfina juega un papel crucial en esta reacción, ya que proporciona la fuerza impulsora necesaria. El óxido de trifenilfosfina se presenta como una fase sólida independiente en la mezcla de reacción, lo cual es consistente con el Principio de Le Châtelier.

El bromuro de geranilo fue aislado y caracterizado mediante RMN. En la Figura 4.8 se muestra el espectro de RMN ¹H en el que se pueden ver todas las señales del intermediario **AC-6**.

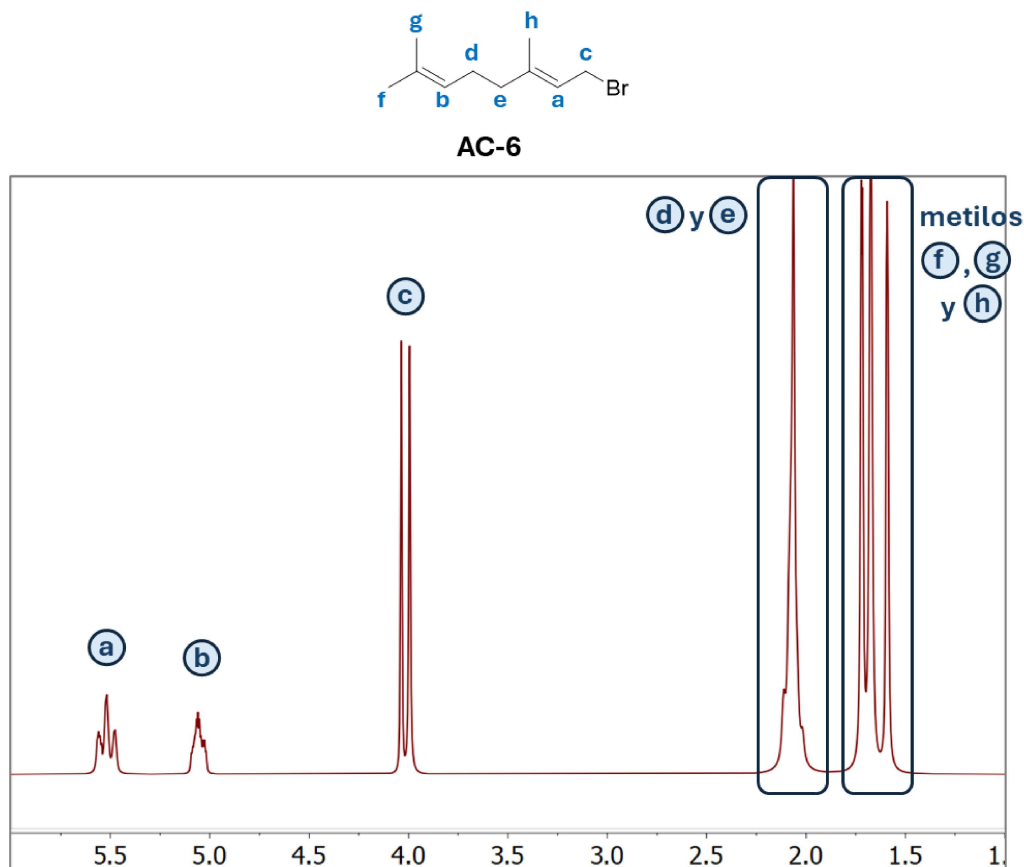
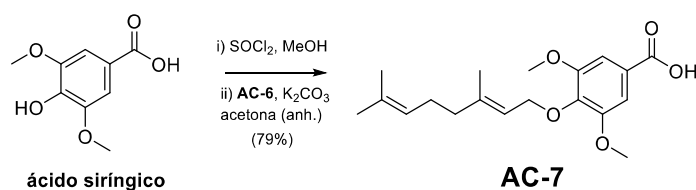


Figura 4.8: Espectro RMN ^1H de **AC-6**.

El segundo paso para la formación de **AC-7** consistió en hacer reaccionar en medio básico bromuro de geranilo (**AC-6**) sintetizado previamente con el éster metílico del ácido siríngico (Esquema 4.6). El medio básico suave fue necesario para ayudar a la formación del fenóxido, el nucleófilo que atacaría al grupo saliente del bromuro de geranilo.



Esquema 4.6: Síntesis de **AC-7**.

En la Figura 4.9 se presenta el espectro RMN ^1H de **AC-7**, donde pueden identificarse todas las señales del bloque terpenoide. Se puede observar un singulete en la zona aromática (señal **a**) proveniente de los dos H equivalentes del benceno tetrasustituído. Luego, se

puede notar una zona de señales correspondientes a dobles enlaces (señales **b** y **c**), y H unidos a C enlazados a O (señales **d** y **e**).

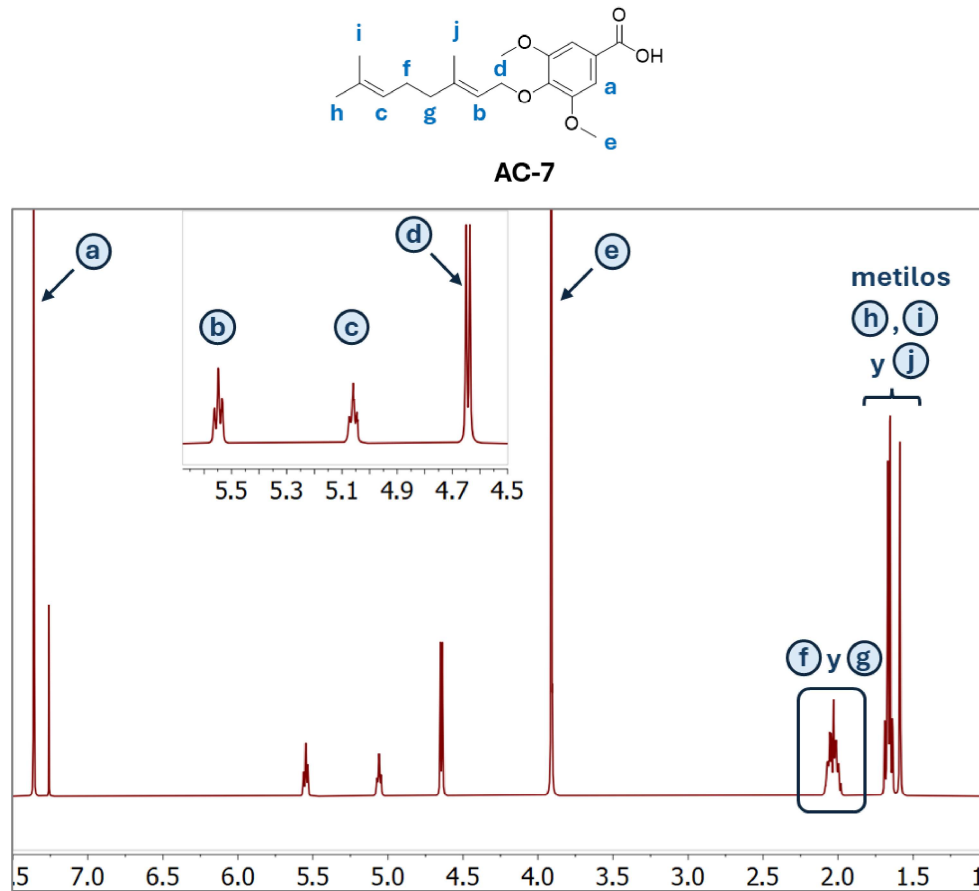
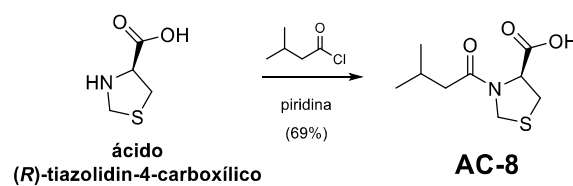


Figura 4.9: Espectro de RMN ^1H de AC-7.

En la misma línea con el enfoque sintético adoptado, se diseñó un bloque adicional a partir del ácido (*R*)-tiazolidin-4-carboxílico, un metabolito natural derivado de la cisteína en ciertas bacterias. Con el objetivo de funcionalizar su grupo amino, se llevó a cabo una reacción de acilación con una cadena de isovaleroilo en medio de piridina. Tras el proceso de purificación convencional, se obtuvo el producto **AC-8** con un rendimiento moderado. (Esquema 4.7).



Esquema 4.7: Síntesis de AC-8.

Finalmente, y luego de una búsqueda detallada de posibles fragmentos para la construcción de los nuevos pPNs, encontramos una familia de PNs que suelen englobarse bajo la categoría de oligoamidas aromáticas naturales, caracterizadas por la repetición de unidades aromáticas, principalmente derivados del ácido *p*-aminobenzoico, enlazadas mediante amidas. Este motivo estructural da lugar a arquitecturas lineales o parcialmente cíclicas que, a diferencia de los péptidos clásicos, se construyen a partir de monómeros aromáticos en lugar de aminoácidos α -alifáticos. Entre los ejemplos conocidos se encuentran las cystobactamidas¹⁰ y las coralmycinas¹¹, ambas con potentes actividades biológicas, especialmente como agentes antibacterianos frente a patógenos Gram negativos. Desde el punto de vista biosintético, se originan a partir de sistemas enzimáticos tipo NRPS o híbridos PKS–NRPS, que incorporan bloques aromáticos poco comunes y generan ensamblajes lineales mediante enlaces amida.

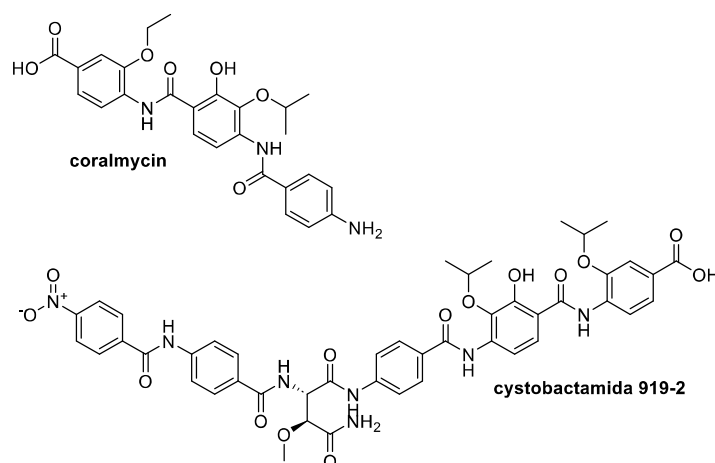
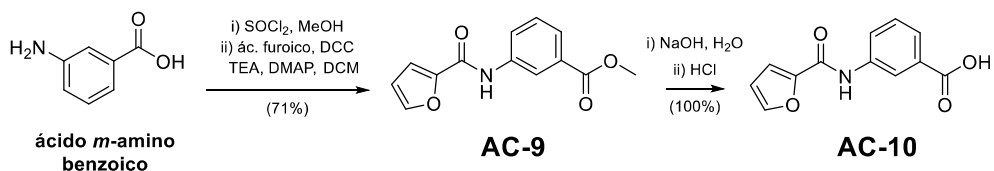


Figura 4.10: Ejemplos de oligoamidas aromáticas naturales con potentes actividades antibacterianas.

Considerando el interés particular que en el contexto de esta Tesis presenta la incorporación de grupos amida en los compuestos finales, decidimos preparar algunos bloques específicos inspirados en estos motivos estructurales.

Por ejemplo, para la síntesis del compuesto **AC-10** fue necesario acoplar ácido *m*-aminobenzoico con ácido furoico, según la reacción ilustrada en el Esquema 4.8. Dado que las condiciones clásicas de acoplamiento entre una amina y un ácido mediante SOCl_2 arrojaron un rendimiento extremadamente bajo, se recurrió al uso de un agente acoplante que facilitara la formación del enlace amida.



Esquema 4.8: Síntesis de **AC-10**.

La caracterización mediante RMN se realizó sobre el éster **AC-9**, debido a su mayor solubilidad en los solventes deuterados disponibles en el laboratorio. La Figura 4.11 muestra la zona aromática de **AC-9** en el que pueden observarse perfectamente los distintos acoplamientos de H aromáticos.

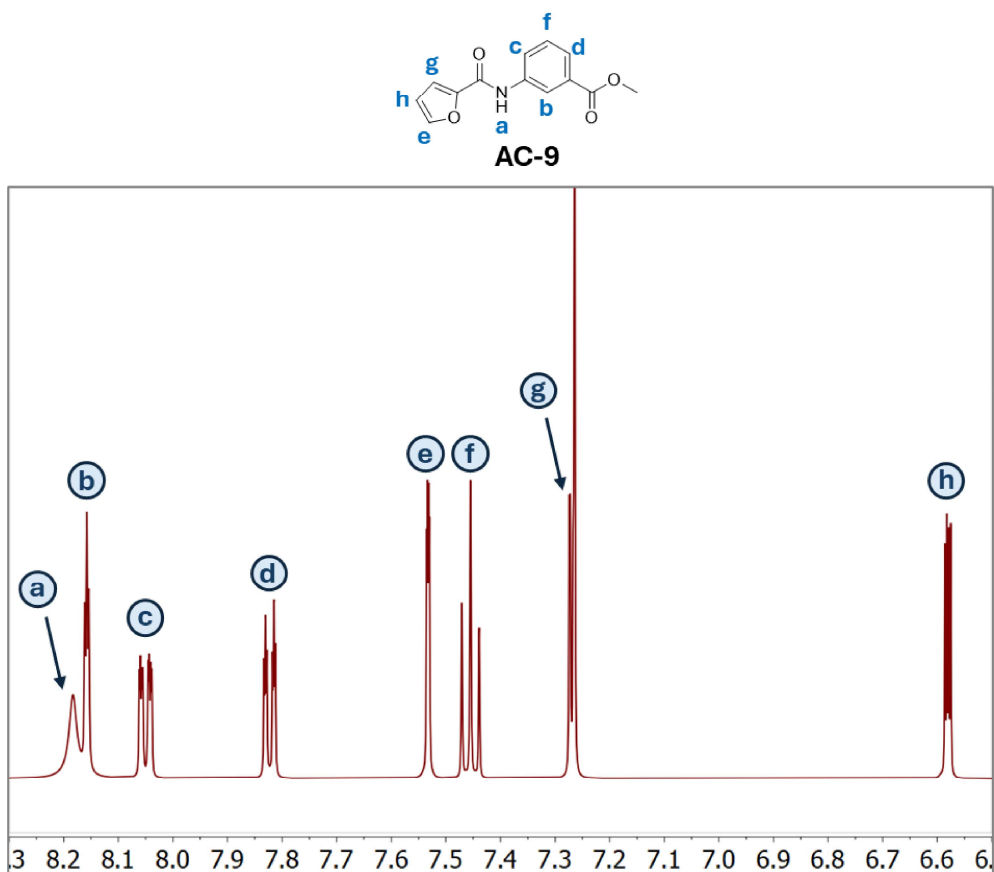
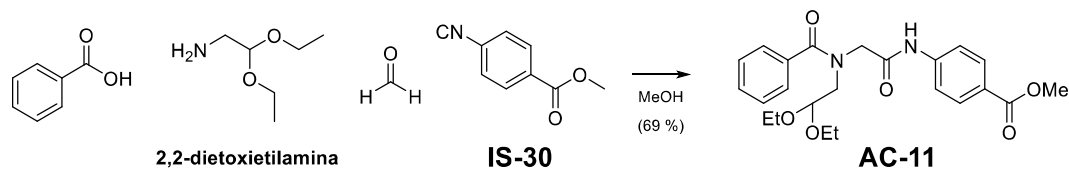


Figura 4.11: Ampliación del espectro de RMN ^1H de **AC-9**.

Finalmente, el último bloque ácido fue sintetizado mediante reacciones secuenciales de Ugi/Pictet-Spengler.¹⁰ Para ello, el primer paso consistió en llevar adelante la reacción de Ugi utilizando ácido benzoico, formaldehído, el isonitrilo **IS-30** (obtenido a su vez de ácido

p-aminobenzoico, cuya síntesis se mostrará en la sección siguiente) y 2,2-dietoxietilamina, una amina que posee un grupo aldehído enmascarado como un acetal (Esquema 4.9).



Esquema 4.9: Síntesis de **AC-11**.

El producto de condensación de Ugi fue purificado mediante una columna cromatográfica, y luego caracterizado por RMN. En el espectro de RMN ^1H (Figura 4.12) se pueden observar diferentes regiones ocupadas por señales de H, entre las cuales puede verse la señal **a** del NH de la amida, una zona con todas las señales provenientes de los H aromáticos, otra área donde se encuentran todas las señales de H desprotegidos y, por último, un triplete en la zona alifática originado por los metilos que forman el acetal (señal **g**). En la región intermedia se observa un triplete con $J = 4.97$ Hz proveniente del CH del aldehído enmascarado (señal **b**), dos singuletes del metileno y metilo **c** y **d**, respectivamente, y las señales **e** y **f** de los CH_2 . Además, se puede destacar que algunas de las señales se encuentran duplicadas debido al fenómeno que ocurre cuando existe la presencia de confórmeros en solución (señales **a** y **b**).

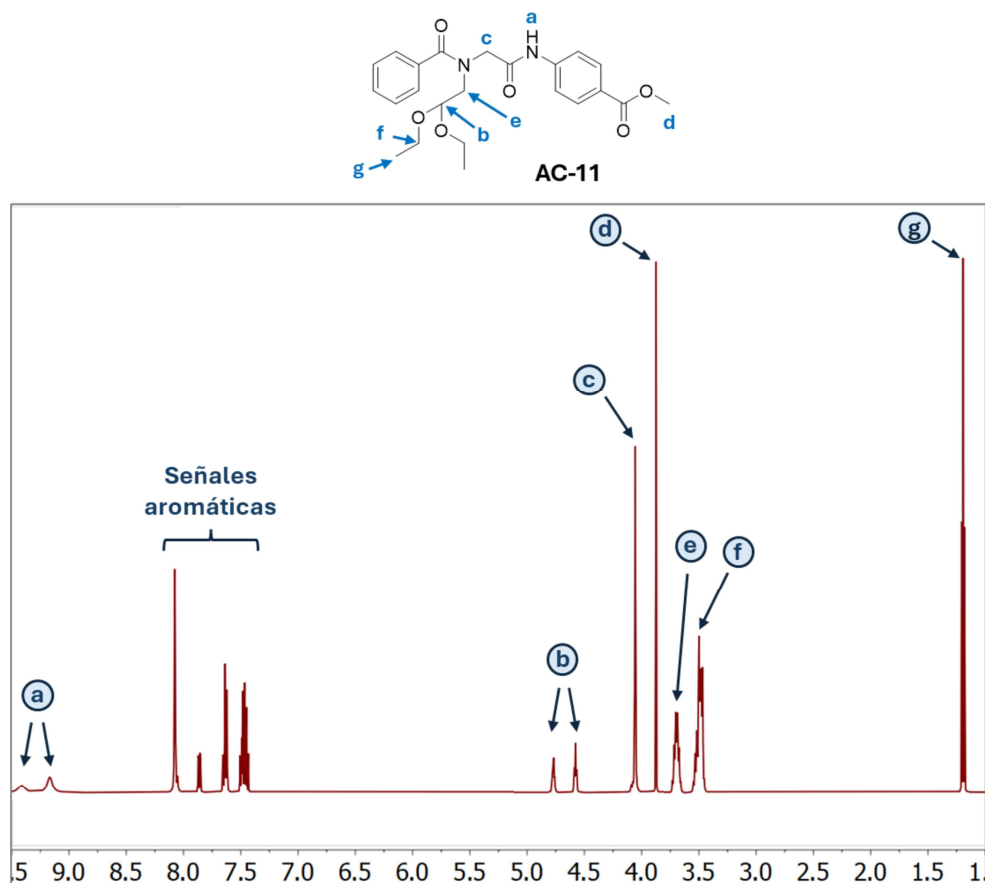
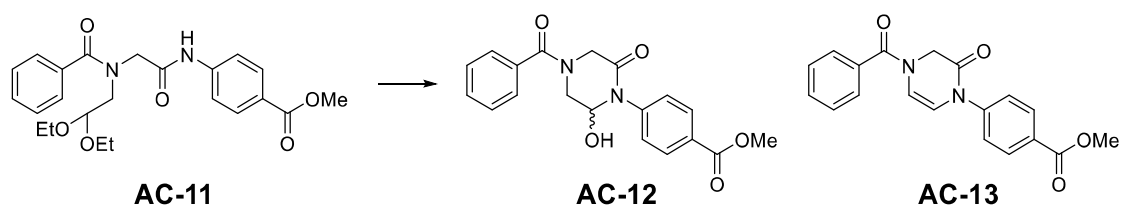


Figura 4.12: Espectro de RMN ^1H de AC-11.

Para obtener el bloque deseado era necesario exponer al producto Ugi a medio ácido para poder generar un nuevo ciclo del tipo cetopiperazina (Esquema 4.10). En bibliografía existen diversas técnicas para alcanzar dicho cometido, siendo las más comunes con ácido fórmico¹² o bien con ácido metansulfónico,¹³ por lo que se probaron varias condiciones (Tabla 4.2).



Esquema 4.10: Síntesis de AC-12 y AC-13.

Ácido	Solvente	t (h.)	Conversión (%)	% AC-12	% AC-13
HCOOH	-	12 (ta)	19	-	100
HCOOH	-	12 (reflujo)	67	-	100
CH ₃ COOH	-	12 (ta)	-	-	-
HCl (37%)	H ₂ O/dioxano	12 (ta)	-	-	-
H ₂ SO ₄ (49%)	H ₂ O/dioxano	12 (ta)	23	-	100
CH ₃ SO ₃ H	ACN	2 (ta)	47	73	27
CH ₃ SO ₃ H	ACN	12 (ta)	99	2	98
CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₃ H (<i>p</i> -TsOH)	acetona	12 (ta)	15	-	100
CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₃ H (<i>p</i> -TsOH)	acetona	12 (reflujo)	36	-	100

Tabla 4.2: Condiciones probadas para la ciclación de Pictet-Spengler.

La Tabla 4.2 presenta un resumen detallado de las diversas condiciones experimentales evaluadas con el objetivo de maximizar el rendimiento en la reacción de ciclación de Pictet-Spengler sobre el aducto **AC-11**. Se consideró además la optimización del paso adicional de deshidratación para obtener el producto deseado **AC-13**. Si bien las condiciones ensayadas con ácido fórmico y ácido *p*-toluensulfónico mostraban tener mejor selectividad para la obtención del producto deshidratado, finalmente se optó por emplear las condiciones con ácido metansulfónico, dado que eran las que mejor rendimiento global exhibían.

Los espectros RMN ¹H de **AC-12** y **AC-13** principalmente se diferenciaban en las señales provenientes de los H del nuevo ciclo formado (Figura 4.13). En ambos casos se observó la presencia de señales anchas, lo que puede deberse a efectos conformacionales.

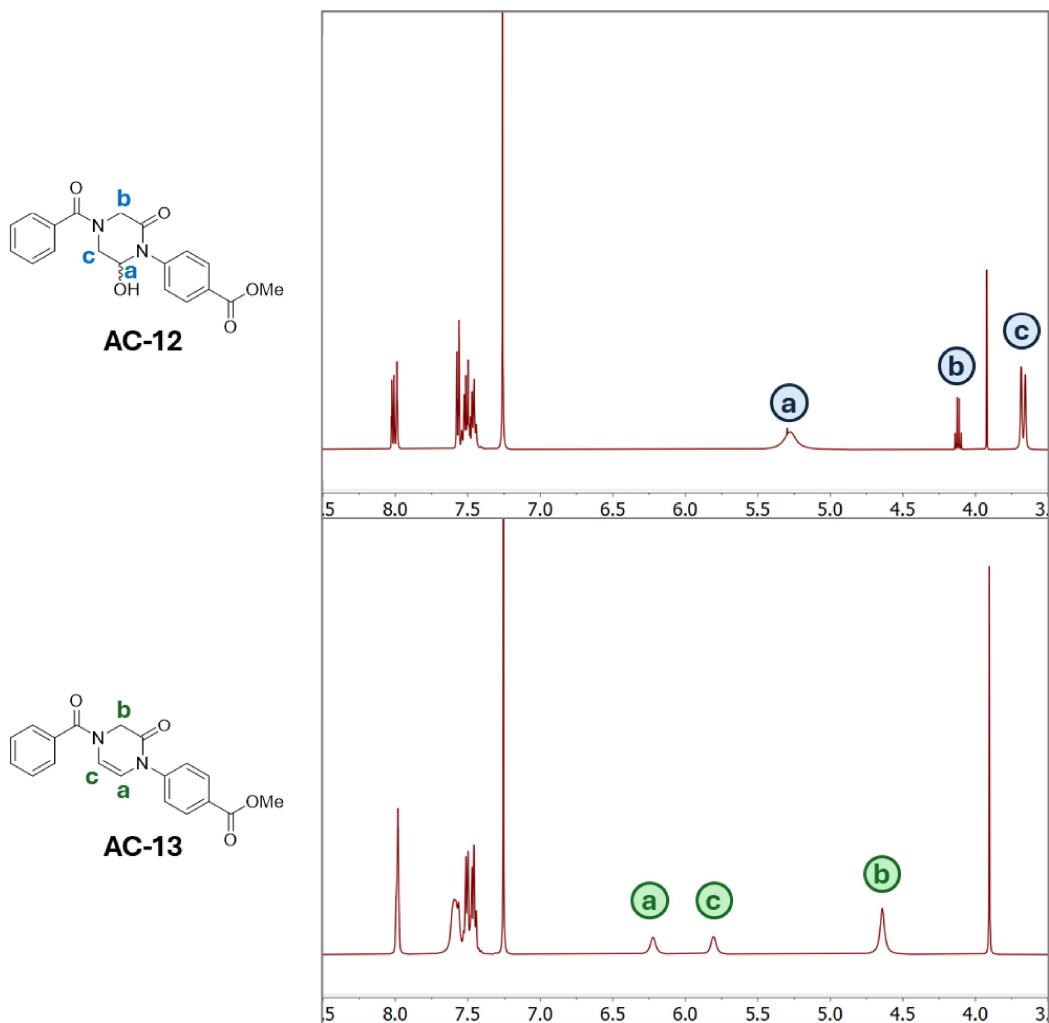


Figura 4.13: Espectros de RMN ¹H de **AC-12** y **AC-13**.

Sin embargo, no sólo se utilizaron las discrepancias entre las señales en el espectro de RMN ¹H, sino que también se pudo llevar a cabo la asignación exhaustiva de los dos productos de Pictet-Spengler empleando las señales distintivas y características presentes en los espectros de RMN ¹³C. En la Figura 4.14 se muestra una ampliación donde se ilustra claramente las diferencias esenciales de dichos espectros.

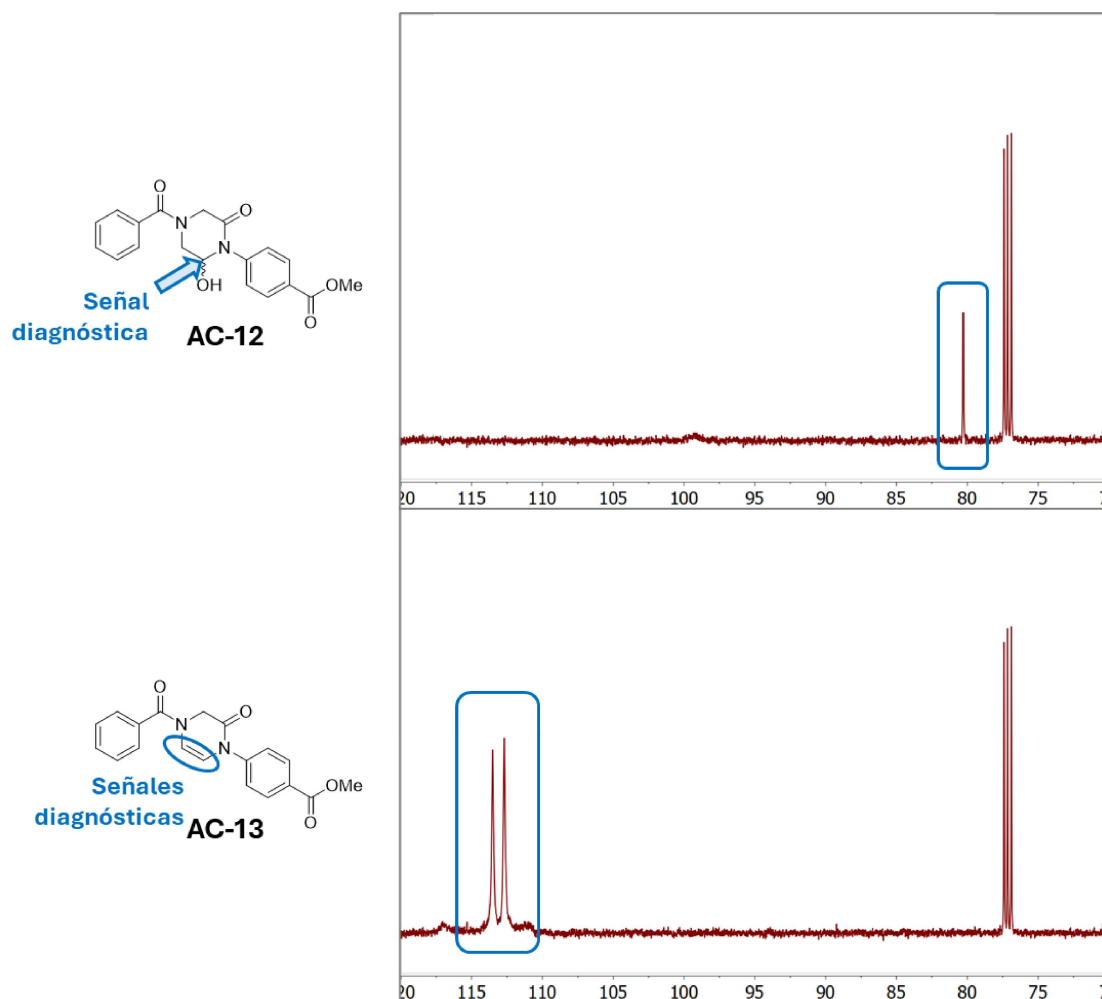
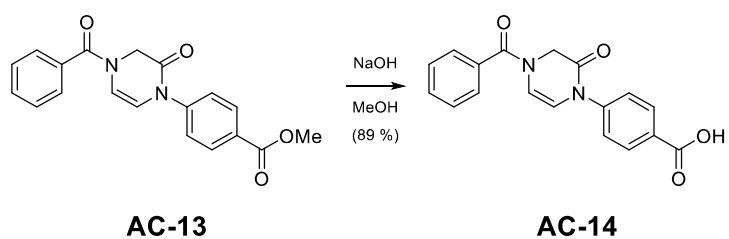


Figura 4.14: Espectros de RMN ^{13}C de **AC-12** y **AC-13**.

Por último, para obtener el bloque ácido destinado a la reacción Ugi Split, el éster **AC-13** fue sometido a condiciones clásicas de hidrólisis en medio básico con NaOH acuoso, según se muestra en el Esquema 4.11.



Esquema 4.11: Síntesis de **AC-14**.

Preparación de isonitrilos (IS)

La selección de los bloques respondió a un razonamiento análogo al aplicado para los componentes ácidos. En ciertos casos se recurrió al empleo de isonitrilos disponibles comercialmente, aunque su oferta en el mercado es muy limitada y se trata, en general, de estructuras de gran simplicidad (Figura 4.15).

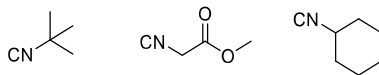
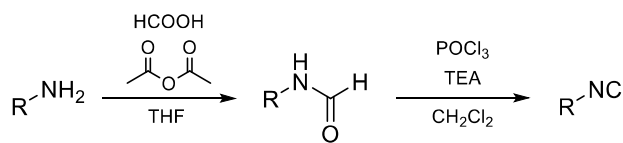


Figura 4.15: Isonitrilos accesibles comercialmente.

En otros casos se prepararon a partir de precursores comerciales, tal como se describió en el Capítulo anterior. Para ello era necesario disponer de las aminas primarias, para luego sintetizar la formamida y finalmente deshidratarla para obtener los respectivos isonitrilos (Esquema 4.12).



Esquema 4.12: Ruta sintética genérica para la obtención de isonitrilos.

De esta manera se obtuvieron los isonitrilos mostrados en la Figura 4.16 a partir de las formamidas correspondientes.

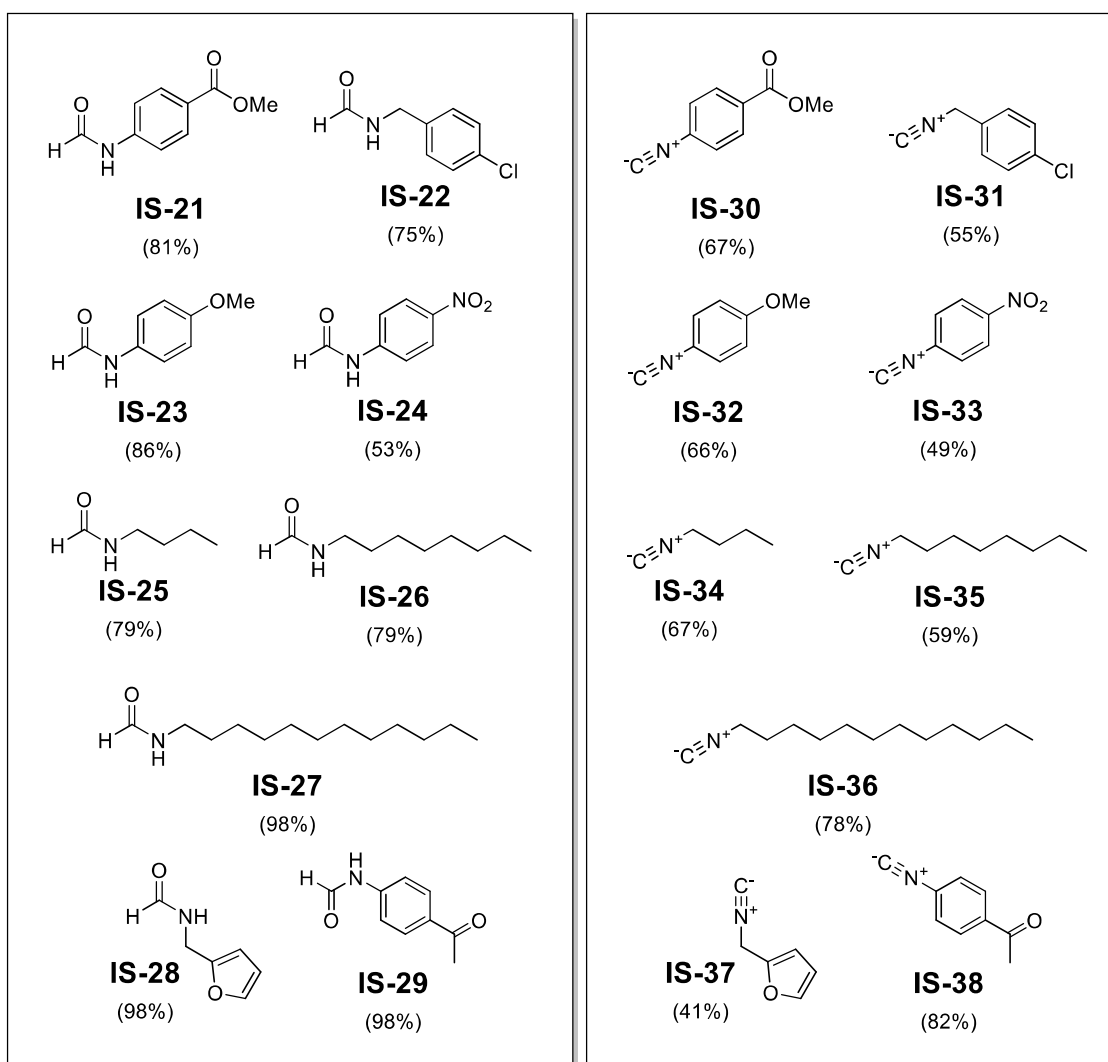


Figura 4.16: Formamidas e isonitrilos sintetizados.

Cabe destacar que para la síntesis de la formamida **IS-21**, primero fue requerido un paso de protección en condiciones de cloruro de tionilo en metanol, dado que se partió del ácido libre. Una vez aislado el éster, se procedió por la síntesis y caracterización de su respectiva formamida, obteniendo el espectro de RMN ^1H y ^{13}C que se muestra en la Figura 4.17. En la misma se encuentran asignadas señales que permitieron su correcta caracterización, y donde, además, se observa el fenómeno de duplicación de señales debido a la presencia de los rotámeros *E* y *Z* explicado en el Capítulo anterior.

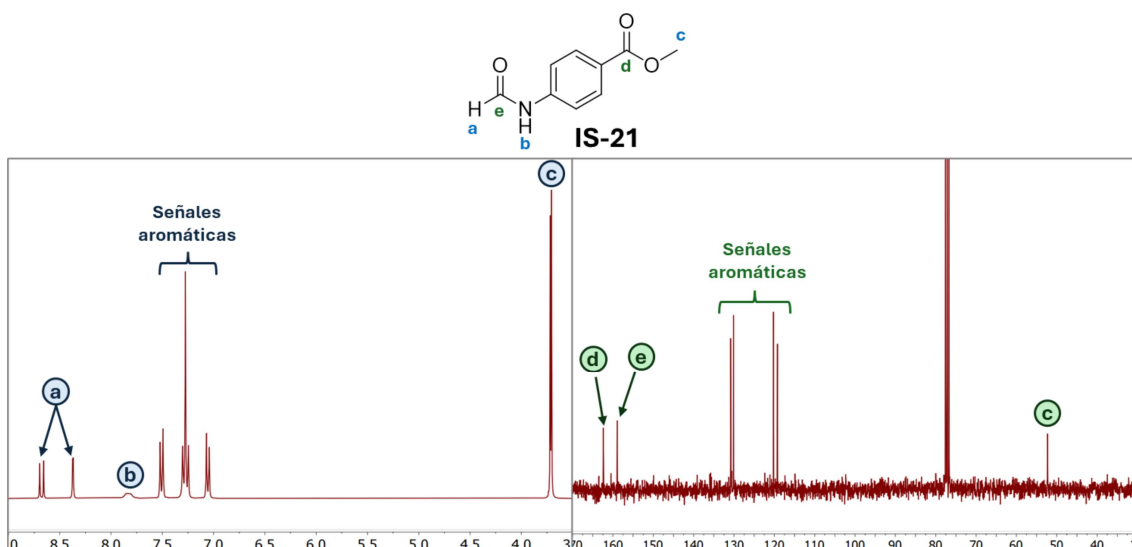
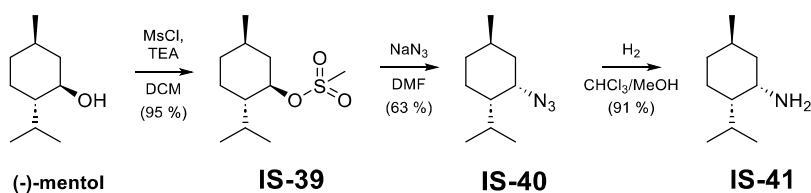


Figura 4.17: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C de **IS-21**.

En otros casos el bloque de interés no contenía un grupo amina, que debió ser incorporado previamente, como por ejemplo el derivado de mentol **IS-41**.

Para lograr dicho cometido se siguió la secuencia sintética descrita en el Esquema 4.13.¹⁴ El primer paso consistió en transformar el grupo hidroxilo en un buen grupo saliente mediante su conversión a mesilato. Una vez aislado y purificado, el mesilato fue tratado con azida de sodio, que actuó como nucleófilo, provocando la inversión de la configuración en el carbono correspondiente. Finalmente, la azida fue reducida bajo condiciones suaves de hidrogenación a presión atmosférica, obteniéndose la correspondiente amina con excelente rendimiento.



Esquema 4.13: Síntesis de **IS-41**.

Todos los pasos de reacción se siguieron mediante RMN prestando especial atención a las señales que diferenciaban a los productos. En la Figura 4.18 se muestran como ejemplo los espectros de ^{13}C para **IS-40** y **IS-41** remarcando la señal diagnóstica del C directamente unido al grupo funcional que fue modificado.

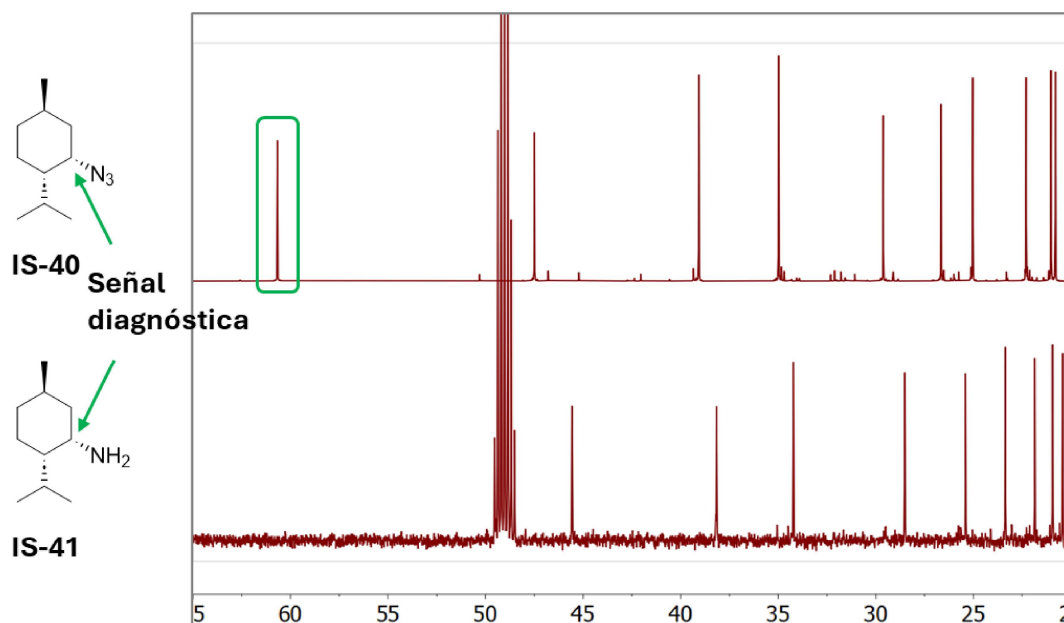
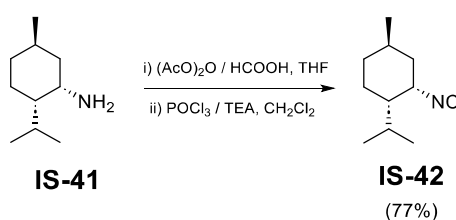


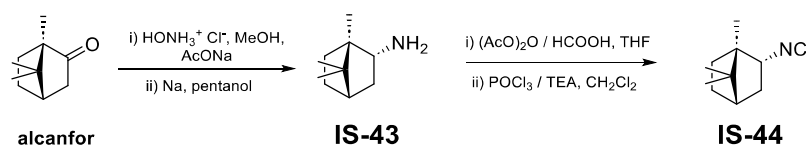
Figura 4.18: Espectros de RMN ^{13}C de **IS-40** y **IS-41**.

Esta amina se transformó en el isonitrilo deseado mediante la ruta sintética habitual (Esquema 4.14).



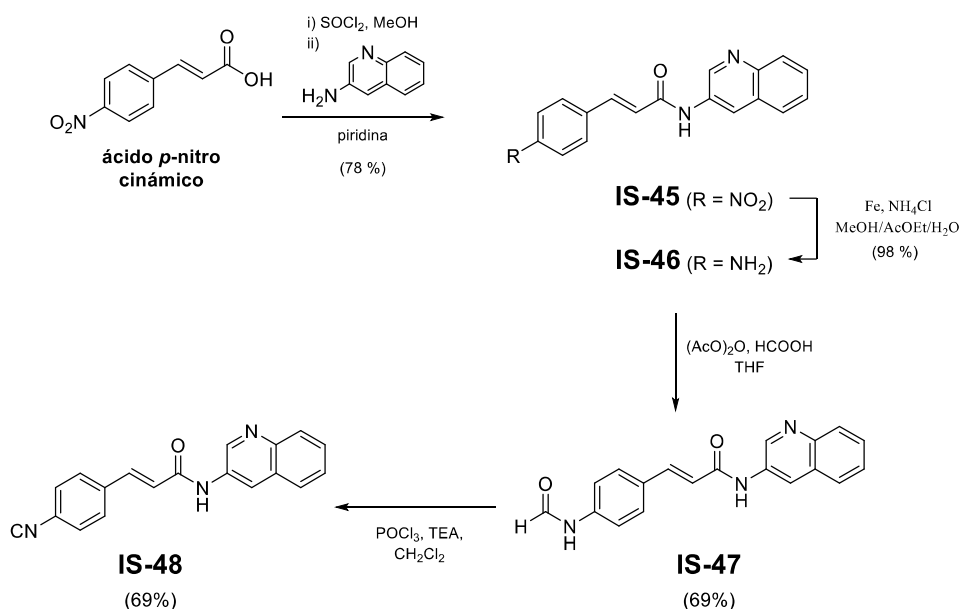
Esquema 4.14: Síntesis de **IS-42**.

Siguiendo la misma lógica sintética, se construyó otro bloque terpénico a partir de alcanfor, el cual fue transformado en una amina mediante un protocolo previamente descrito, ilustrado en el Esquema 4.15.¹⁵ En primer lugar, el alcanfor se convirtió en su correspondiente oxima mediante reacción con hidroxilamina. En una segunda etapa, la oxima fue sometida a condiciones reductoras en pentanol anhidro, utilizando sodio metálico como agente reductor, lo que permitió obtener la amina **IS-43**. Esta amina sirvió como precursor para la generación del isonitrilo **IS-44** mediante la técnica habitual.



Esquema 4.15: Síntesis de IS-44.

Finalmente, se sintetizó un isonitrilo más complejo, según los mismos criterios en cuanto a relevancia biológica y diversidad biosintética, donde se unió un fragmento de ácido cinámico con 3-aminoquinolina. Este fragmento se obtuvo mediante una reacción de acoplamiento entre ácido *p*-nitrocínámico y 3-aminoquinolina. Este fragmento se obtuvo mediante una reacción de acoplamiento entre ácido *p*-nitrocínámico y 3-aminoquinolina, seguida de la reducción del grupo nitro, con el fin de generar la amina requerida para la posterior formación del isonitrilo (Esquema 4.16).

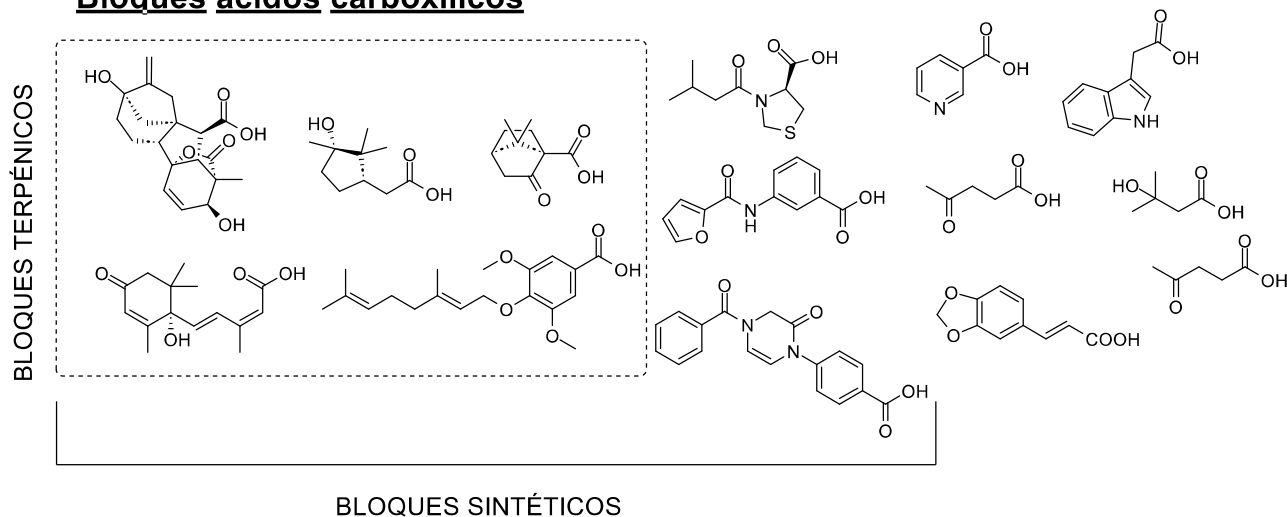


Esquema 4.16: Síntesis de IS-48.

Para recopilar y ordenar toda la información anterior, y a riesgo de ser redundantes, en la Figura 4.19 se muestran todos los bloques que se emplearán para la síntesis de los compuestos finales. Estos bloques cumplen en conjunto con las premisas que se establecieron para su selección: por ejemplo, todos están presentes en PNs conocidos, aunque con muy distinta prevalencia, y tienen una diversidad estructural suficiente como para introducir variabilidad en las propiedades globales de los productos finales.

Además, estos fragmentos deberían representar distintos orígenes biosintéticos, que en nuestro caso incluyen estructuras que en la naturaleza provienen de las vías del shikimato, mevalonato, corismato y FAS, entre otras.

Bloques ácidos carboxílicos



Bloques isonitrilos

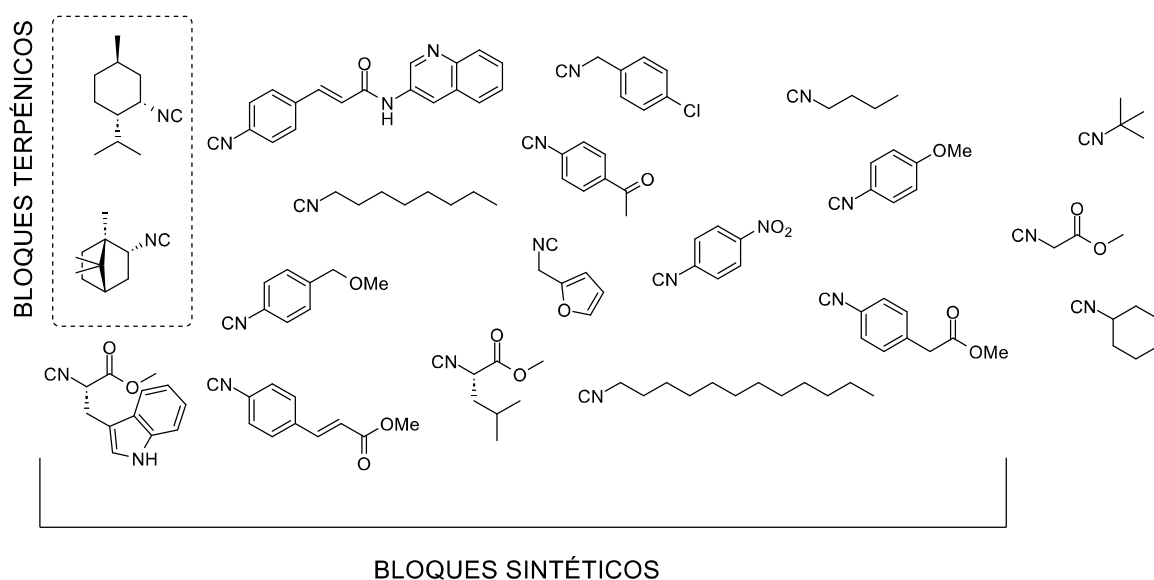


Figura 4.19: Bloques ácidos e isonitrilos sintetizados.

Selección de los nuevos pPNs a sintetizar

En este punto decidimos replantear la estrategia para la selección de los compuestos a sintetizar. En el Capítulo 3, el diseño de la biblioteca ahí descrita se sustentó en un enfoque estrictamente combinatorio: todos los fragmentos de partida fueron considerados en igualdad de condiciones y se generaron virtualmente todas las

combinaciones posibles. La selección de los compuestos a sintetizar se realizó en función de sus propiedades moleculares globales, priorizando la diversidad dentro del conjunto final, más que el peso relativo de cada fragmento individual. De este modo, la estrategia otorgaba el mismo valor a cada bloque y la elección se guiaba principalmente por criterios de cobertura del espacio químico.

En contraste, en esta oportunidad se decidió adoptar un enfoque diferente. En lugar de considerar a todos los fragmentos en igualdad de condiciones, se estableció una jerarquía que permitió identificar ciertos bloques como más relevantes que otros. De este modo, en lugar de depender únicamente de la combinación global de propiedades emergentes, la selección de fragmentos prioritarios ofrece un control más fino sobre qué características estructurales y funcionales se incorporan en la biblioteca. Esta estrategia busca orientar el espacio químico explorado hacia regiones de mayor interés, conservando la diversidad, pero con una dirección más definida en cuanto a los rasgos aportados por los bloques de partida. De esta idea surgió la incorporación de fragmentos terpénicos y considerarlos bloques prioritarios: estos fragmentos aportan un carácter lipofílico, lo que en combinación con la carga positiva de la piperazina genera compuestos de naturaleza anfifílica. De este modo, se mantiene una característica clave de las bibliotecas previas, donde la coexistencia de dominios polares y apolares resultó en compuestos con actividad biológica. Al mismo tiempo, los esqueletos terpénicos introducen una variedad topológica que no estaba presente en los fragmentos alifáticos lineales empleados anteriormente: anillos de distinto tamaño, múltiples insaturaciones y una elevada proporción de carbonos sp^3 , todos elementos que, en principio, deberían ampliar la diversidad estructural de la biblioteca.

Por eso, la premisa fundamental fue diseñar compuestos en los que al menos uno de los fragmentos correspondiera a alguno de los siete bloques terpénicos previamente sintetizados. De esta forma, se asegura la introducción de las características deseadas aportadas por estos bloques, que quedan necesariamente combinados con fragmentos que pueden considerarse de distinto origen biogenético, cumpliendo así una de las bases del diseño de pPNs. Aun así, el número de combinaciones para cada bloque es grande e imposible de llevar a la práctica.

En base a la experiencia previa, se decidió que para cada uno de los siete bloques terpénicos (ya sea como componentes carboxílicos o isonitrilos) se sintetizarían cuatro compuestos finales diferentes, conformando así una biblioteca de 28 miembros, tamaño

adecuado tanto para una búsqueda sistemática de propiedades biológicas como para nuestras capacidades sintéticas.

Para seleccionar esas combinaciones se recurrió nuevamente a un enfoque apoyado en herramientas de quimioinformática. En primer lugar, se generó una biblioteca virtual combinatoria considerando que los compuestos finales debían tener solamente un único bloque derivado de terpenos en su estructura, lo que arrojó 103 compuestos posibles. Estos compuestos fueron caracterizados con los 22 descriptores definidos para esta tesis, y se aplicó un criterio de selección basado en distancias relativas de los compuestos en el espacio químico definido por esos descriptores.

Este procedimiento de selección puede ejemplificarse así: en la biblioteca virtual aparecen 17 compuestos donde el ácido giberélico se combinó con un isonitrilo no terpénico. En primer lugar, para cada una de esas 17 moléculas se calculó su separación respecto del conjunto de las 86 moléculas que no contienen ese fragmento empleando la distancia de Mahalanobis. Esta métrica multivariante es superior a las distancias euclidianas tradicionales, ya que considera tanto la escala de cada descriptor individual como las correlaciones inherentes entre ellos.

Primero, se caracterizó el conjunto de compuestos con fragmentos terpénicos no derivados del ácido giberélico estimando su vector de medias para definir el centro de la distribución y su matriz de covarianza para representar la dispersión. Luego, para cada compuesto derivado de ácido giberélico, se calculó la distancia a ese centro del conjunto, ponderando la medida por la matriz de covarianza.

El valor resultante de la distancia de Mahalanobis se interpreta como la cantidad de desviaciones estándar combinadas que separan a la molécula en cuestión del promedio de las 86 moléculas. De esta manera, valores más elevados indican una mayor diferencia en propiedades de la molécula respecto de las demás.

Con los márgenes Mahalanobis calculados para las 17 moléculas derivadas del ácido giberélico, se fijó un umbral adaptativo por percentil: se tomó, como regla inicial, el percentil 25 de los márgenes (es decir, el valor por debajo del cual cae el 25% de las 17 distancias), y se consideraron elegibles solo los compuestos cuyo margen fue igual o superior a ese valor. De esta manera, la selección se fuerza hacia aquellos compuestos que contienen ácido giberélico más distantes del grupo que no contienen este fragmento. Con el conjunto elegible de compuestos derivados del ácido giberélico (que resultaron ser 13 según el criterio de distancia definido), se generaron los 715 cuartetos posibles. Cada

cuarteto se puntuó con dos medidas complementarias, calculadas también en el mismo espacio químico y usando la misma métrica de Mahalanobis:

- diversidad interna: se tomó la distancia mínima entre pares dentro del cuarteto. Maximizar esta cantidad obliga a que ninguna pareja de compuestos seleccionados quede demasiado próxima (para evitar redundancia de propiedades).
- separación externa del cuarteto: para lo cual se calculó la distancia del centro del cuarteto (el promedio de los descriptores de esos 4 compuestos) al resto de las 86 moléculas sin ese bloque terpénico. El cuarteto elegido fue el que maximizó la diversidad interna y, en caso de empate, se seleccionó el que presentó mayor margen del centro frente al resto de las moléculas.

A modo ilustrativo, la Figura 4.20 ubica a los cuatro compuestos seleccionados derivados del ácido giberélico en una proyección PCA. Es importante destacar que las decisiones se tomaron siempre en el espacio completo de los 22 descriptores con la métrica de Mahalanobis y no en el espacio reducido a dos dimensiones del PCA, y por lo tanto las distancias entre los grupos no queda reflejada linealmente en el gráfico.

Este procedimiento arrojó entonces un conjunto de 4 compuestos derivados del ácido giberélico y que cumple dos condiciones a la vez: cada molécula queda suficientemente separada del resto de las moléculas de la biblioteca virtual, y entre sí cubren regiones distintas del espacio de propiedades, reduciendo así la redundancia.

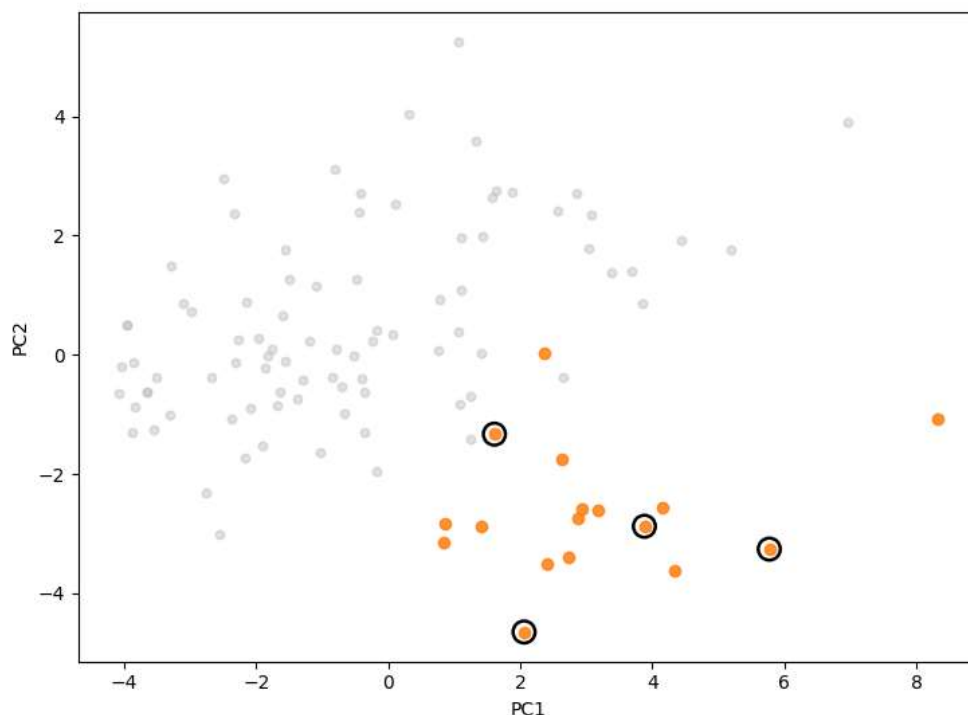


Figura 4.20: Proyección bidimensional de la biblioteca combinatoria que contienen el ácido giberélico como bloque terpénico en el espacio obtenido mediante PCA.

Siguiendo la misma estrategia de selección aplicada previamente, se identificaron, a partir de las bibliotecas combinatorias generadas, cuatro compuestos representativos para cada uno de los seis bloques estructurales derivados de terpenos previamente sintetizados. Así, se estableció un conjunto de 28 compuestos cuya preparación fue planificada y codificada dentro de la familia **PIP2**. Esta selección permitió abarcar de manera equilibrada la diversidad estructural disponible, garantizando al mismo tiempo la comparabilidad entre los distintos derivados y la coherencia en el análisis de los resultados posteriores.

Caracterización y análisis

Con las estructuras de los 28 compuestos seleccionados ya definidas, surge la pregunta de si esta colección presenta una diversidad estructural suficiente en el contexto de esta Tesis. Para ello se usó el mismo criterio de análisis que se discutió en los capítulos previos y se realizó un PCA de esta biblioteca junto con la base PN-T. Las proyecciones correspondientes a las 5 primeras PCs se muestran en la Figura 4.21.

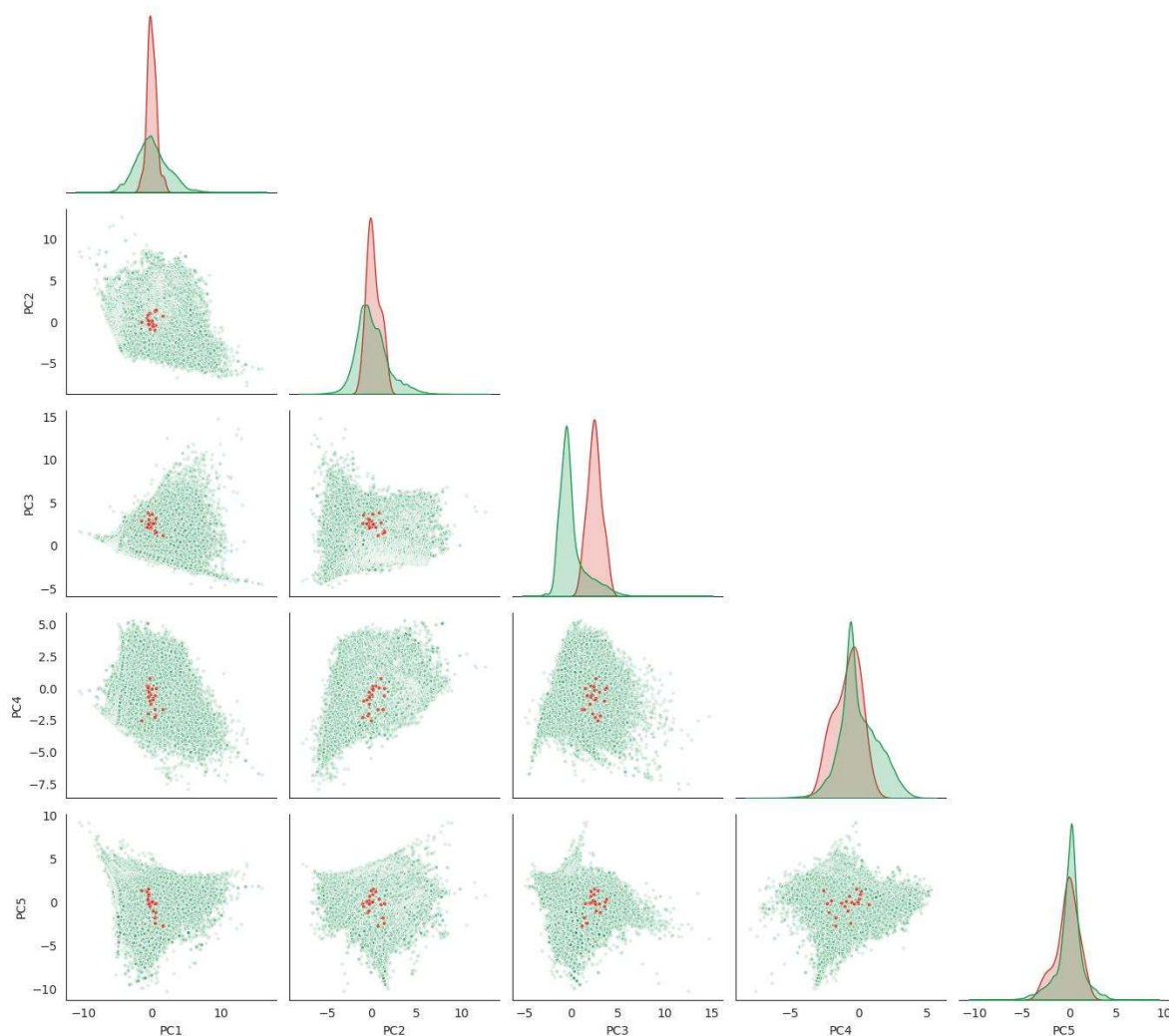


Figura 4.21: Pair plot: PN-T (verde), biblioteca de compuestos sintetizados **PIP2** (rojo).

Al comparar la posición relativa de los compuestos seleccionados en el espacio definido por los PN-T, no solamente puede verse que los mismos quedan contenidos dentro de la región ocupada por los PN en los planos PC1–PC5, si no que, a partir de los histogramas se deduce que los 28 compuestos se ubican dentro de las zonas de mayor densidad del conjunto de productos naturales de referencia (PN), lo que intuitivamente refuerza su carácter de pPNs.

La única asimetría aparece en PC3, donde los compuestos diseñados en esta sección de la tesis muestran un desplazamiento hacia valores más altos. Como se discutió en el Capítulo 2, la tercera componente principal reúne principalmente características relacionadas con la proporción de átomos de nitrógeno (en especial nitrógenos básicos y

amidas), y el contenido relativo de oxígenos. Este desplazamiento hacia valores altos de PC3 es coherente con la estructura base de los compuestos diseñados.

Síntesis de la biblioteca (PIP2)

A continuación, se describirá, a modo de ejemplo, la síntesis de algunos de los compuestos seleccionados, junto con ciertas particularidades relevantes de la caracterización estructural realizada. En todos los casos se siguió el Esquema 4.1 para la obtención de los compuestos finales de la familia sintetizada mediante la reacción de Ugi Split en el presente Capítulo.

Como primer ejemplo de aplicación de la metodología previamente explicada, se muestra el caso que emplea ácido giberélico. Se obtuvieron así los cuatro compuestos seleccionados que se muestran en la Figura 4.22.

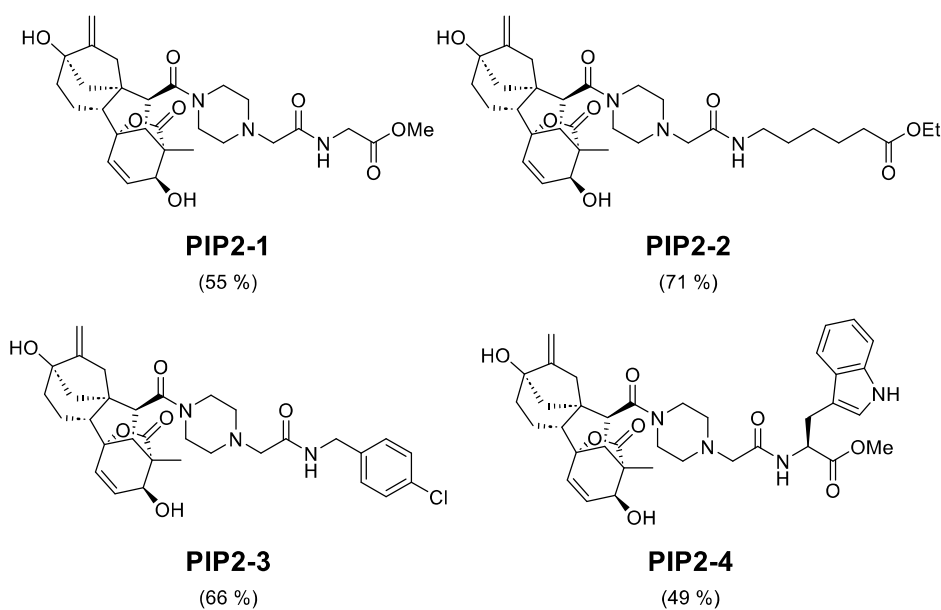


Figura 4.22: Productos Ugi Split derivados de ácido giberélico.

Todos los productos fueron sintetizados y purificados siguiendo la metodología descrita en la Sección Experimental de esta Tesis, y luego caracterizados mediante espectroscopía de RMN y MS. En la Figura 4.23 se muestra a modo de ejemplo el espectro de RMN ¹H de **PIP2-3** con algunas señales diagnósticas de cada bloque de construcción resaltadas.

Entre las señales remarcadas a campos altos se encuentra aquella que proviene de los H del bloque del formaldehído (señal **a**), una de las señales anchas características del bloque de la piperazina (señal **b**) y la señal **c** del singulete del CH₃ del ácido giberérico. A medida que se fija la atención a desplazamientos más altos, se encuentran las señales de H más desprotegidos, como por ejemplo el doble doblete del doble enlace **d**, la señales **e** del OH, el metileno de la amina (señal **f**) y la señal del H unido al mismo C que el alcohol (señal **g**). Por último, a campos más bajos se pueden observar la señal **h** de la amida, los dos dobletes aromáticos (señal **i** y **j**) y otra señal de los dobles enlaces de **PIP2-3** (señal **k**).

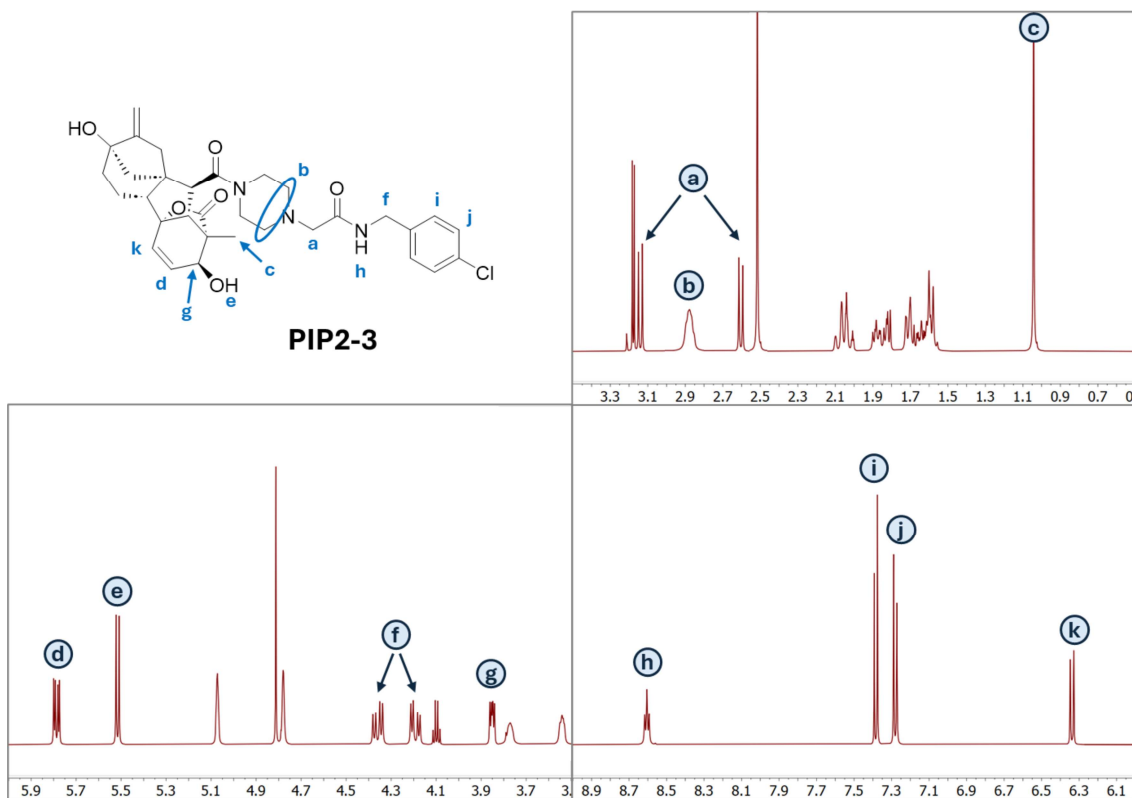


Figura 4.23: Ampliaciones del espectro de RMN ¹H de **PIP2-3**.

Es interesante resaltar algunos fenómenos poco frecuentes que se observaron en las señales del espectro de RMN ¹H de **PIP2-3**. En los espectros del Capítulo anterior, ya se había observado que los H procedentes del formaldehído podían ser no equivalentes, lo que generaba un doblete para cada uno de ellos. En el caso del compuesto **PIP2-3**, este fenómeno no solo se observa en la señal **a** de la Figura 4.23, sino que también se presenta para la señal **f**. Estos H, designados como H_a y H_b en la Figura 4.24, se presentan como doble dobletes debido a que tienen una constante de acoplamiento entre ellos con un valor de $J_{gem} = 15,19$ Hz, y también acoplan con el H de la amida NH_c con un $J_{CH-NH} = 6,37$ Hz. Este

último acoplamiento se puede observar claramente en la señal **h**, que también está ampliada en la Figura 4.24.

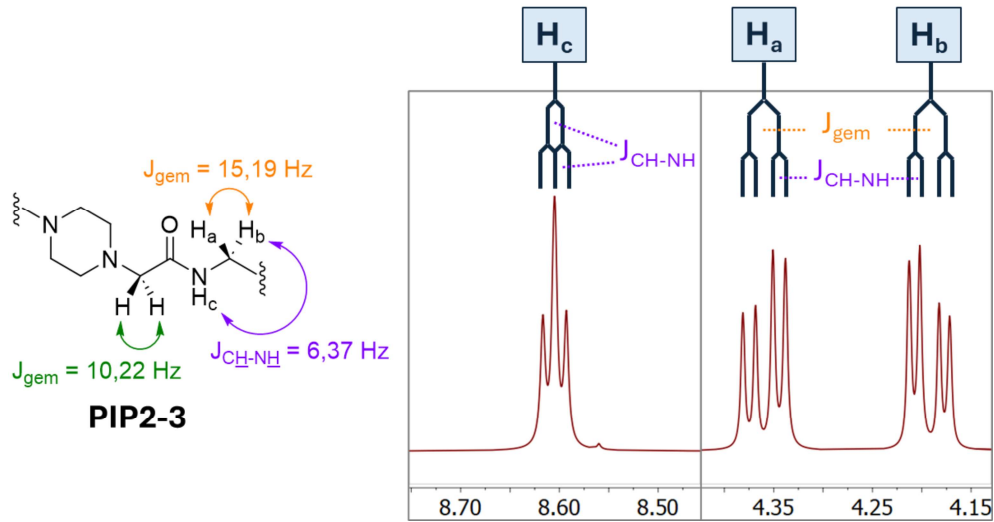


Figura 4.24: Ampliaciones de las señales **f** y **h** del espectro de RMN ^1H de **PIP2-3**.

Para lograr la asignación inequívoca de todas las señales, fue necesario apoyarse en la información obtenida mediante los espectros bidimensionales de COSY, HSQC y HMBC, entre otros. Por ejemplo, en la Figura 4.25 se muestra una ampliación del espectro COSY de **PIP2-3**, donde se puede confirmar la asignación de los H de la Figura 4.24, ya que pueden observarse los distintos acoplamientos entre dichos H.

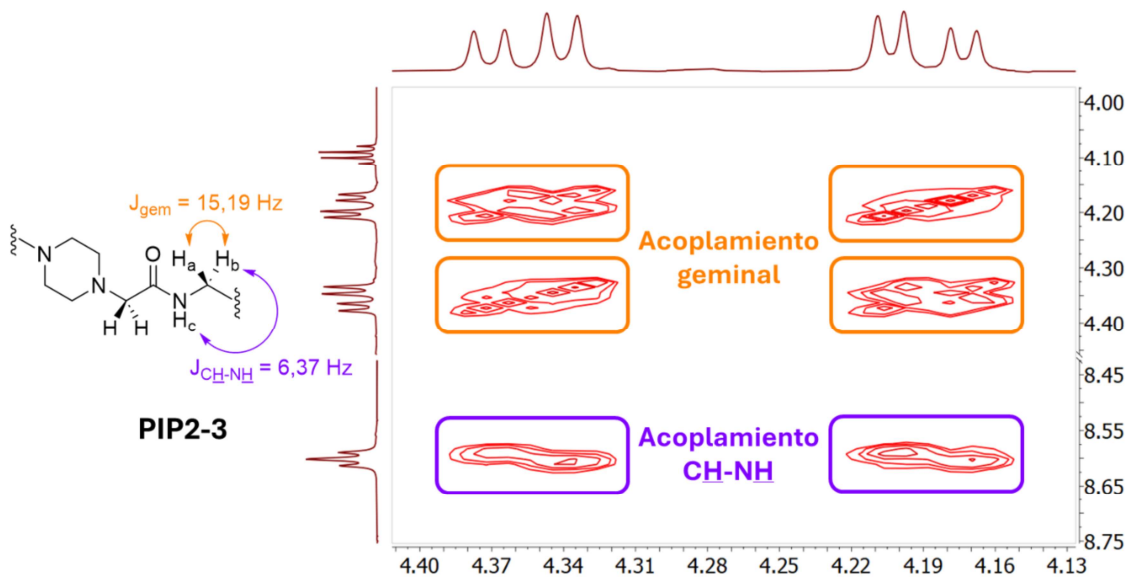


Figura 4.25: Ampliación de espectro COSY de **PIP2-3**.

La caracterización de **PIP2-3** también incluyó la asignación de las señales de ^{13}C . A continuación, se muestra el espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.26) donde pueden notarse distintas regiones de señales. A δ más altos se distinguen claramente 3 señales de carbonilos, seguido de una zona con señales de los C aromáticos y de los alquenos. Luego se diferencian claramente tres señales distintivas de C unidos a O, procedentes de los alcoholes o del C cuaternario que forma la lactona, y, por último, un área con señales de C alifáticos.

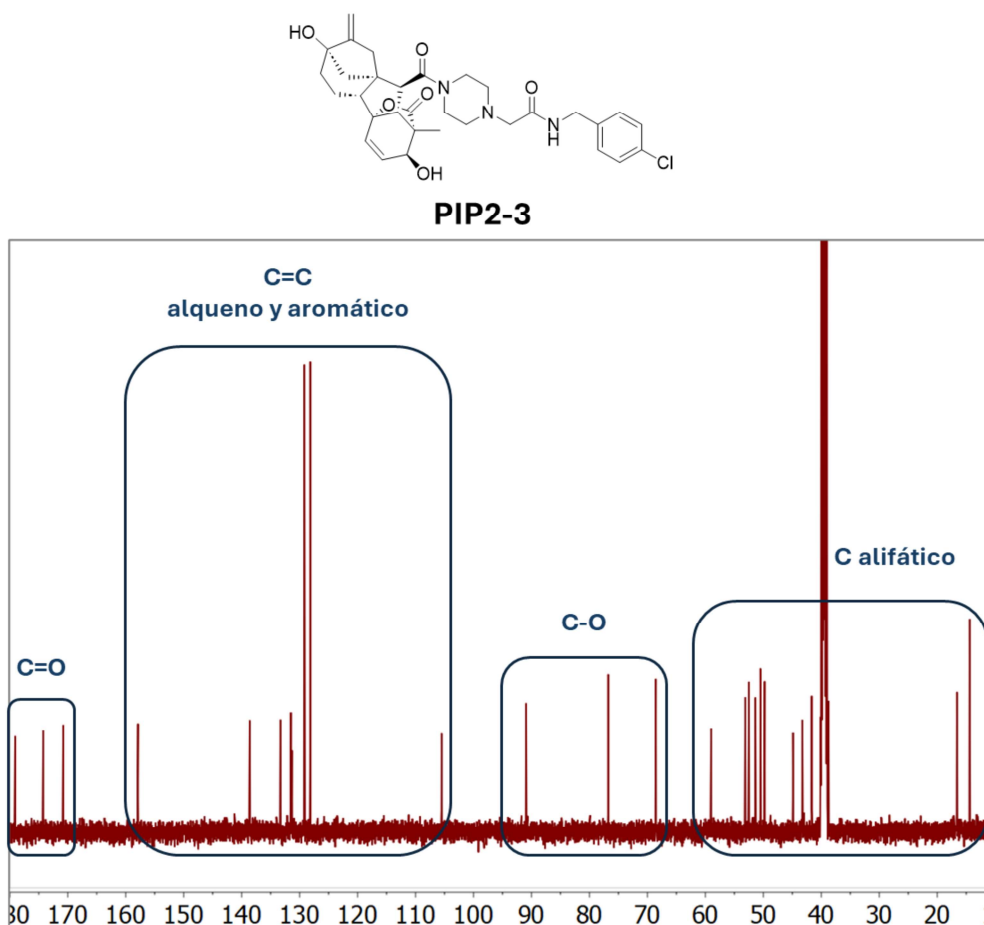


Figura 4.26: Espectro de RMN ^{13}C de **PIP2-3**.

La Figura 4.27 muestra las estructuras de los cuatro compuestos derivados del ácido abscísico que se seleccionaron para la síntesis.

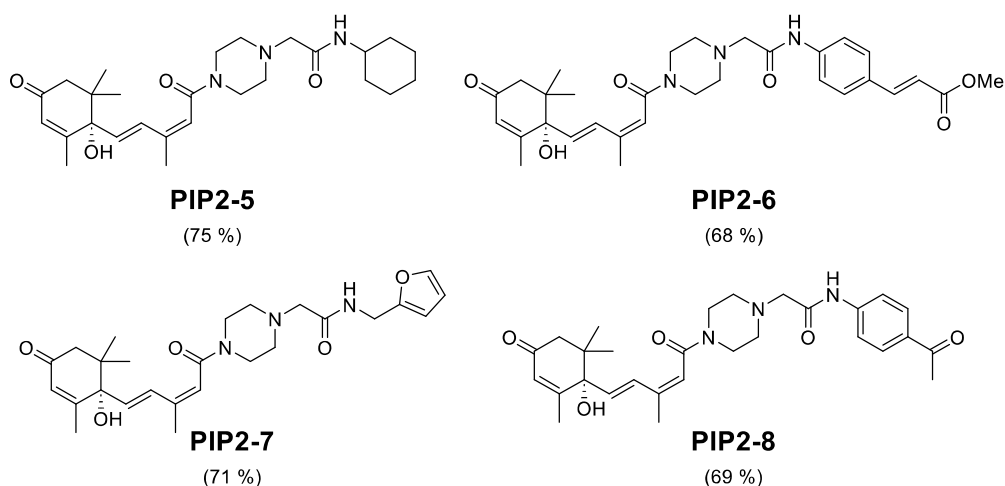


Figura 4.27: Productos Ugi Split derivados de ácido abscísico.

Los productos fueron obtenidos siguiendo el mismo protocolo de síntesis que indicaba formar primero la enamina, dejando reaccionar formaldehído con piperazina en una solución metanólica. Seguido del agregado del componente ácido, para favorecer los pasos de intercambio de protones, y, por último, el agregado del isonitrilo. La purificación se realizó mediante columna cromatográfica, empleando distintas proporciones de éter de petróleo y acetato de etilo, siempre con un agregado de trietilamina, para desplazar la posible protonación del N terciario del aducto Ugi Split.

En los cuatro productos Ugi Split obtenidos a partir del ácido abscísico se observó la presencia de confórmeros en solución. Para ilustrar dicho fenómeno se muestra la Figura 4.28 con una ampliación del espectro de RMN ^1H de **PIP2-5**. En la zona de dobles enlaces de este producto se puede contemplar la presencia de un doblete del H vinílico **a** con una constante de acoplamiento *trans* de 15,83 Hz que se corresponde con la señal del otro H vinílico **c**, que presenta tres confórmeros en solución. Además, en esa región se distinguen claramente el doblete de la amida NH (señal **b**) y los singuletes superpuestos de los H de los dobles enlaces **d** y **e**.

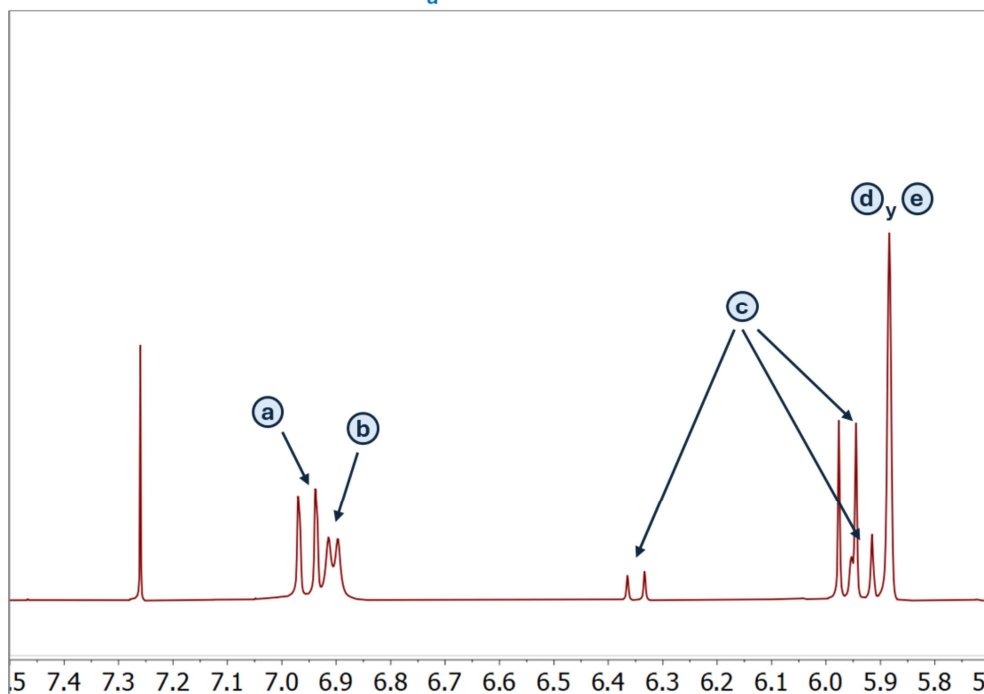
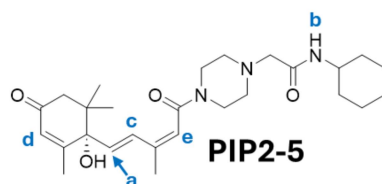


Figura 4.28: Ampliación del espectro de RMN ^1H de **PIP2-5**.

Al examinar detenidamente la ampliación del espectro de RMN ^1H de **PIP2-5**, como se muestra en la Figura 4.28, inicialmente parecía que la única señal que exhibía confórmeros con entornos químicos diferentes era la señal **c**. Sin embargo, sorprendentemente, esta observación no coincidía con lo que se observaba en el espectro de RMN ^{13}C , como se ilustra en la Figura 4.29. En este espectro, se observaba que todos los C de los enlaces dobles y los carbonilos presentaban señales duplicadas, lo que debería coexistir con la presencia de señales duplicadas para los H correspondientes. Este hallazgo planteaba interrogantes sobre el análisis de las señales de H del compuesto estudiado.

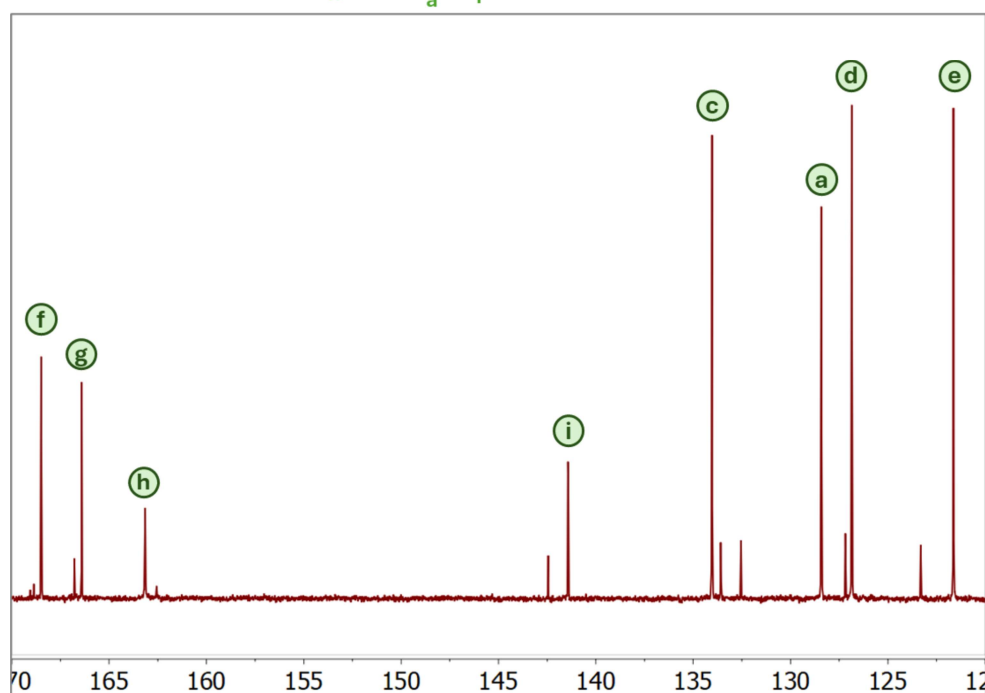
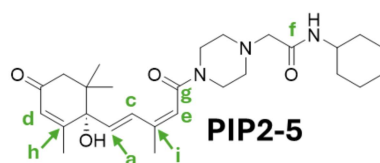


Figura 4.29: Ampliación del espectro de RMN ^{13}C de **PIP2-5**.

Para abordar esta discrepancia entre las señales de RMN ^1H y ^{13}C , se procedió a un análisis minucioso utilizando espectros bidimensionales, como el espectro HSQC, que se muestra en la Figura 4.30. Al ampliar la región previamente discutida, se observó que las señales **d** y **e** también se presentaban duplicadas debido a la presencia de conformeros, lo que confirma las asignaciones de todas las señales identificadas. Este análisis en profundidad de los espectros bidimensionales permitió una comprensión más completa de la estructura molecular del compuesto en estudio.

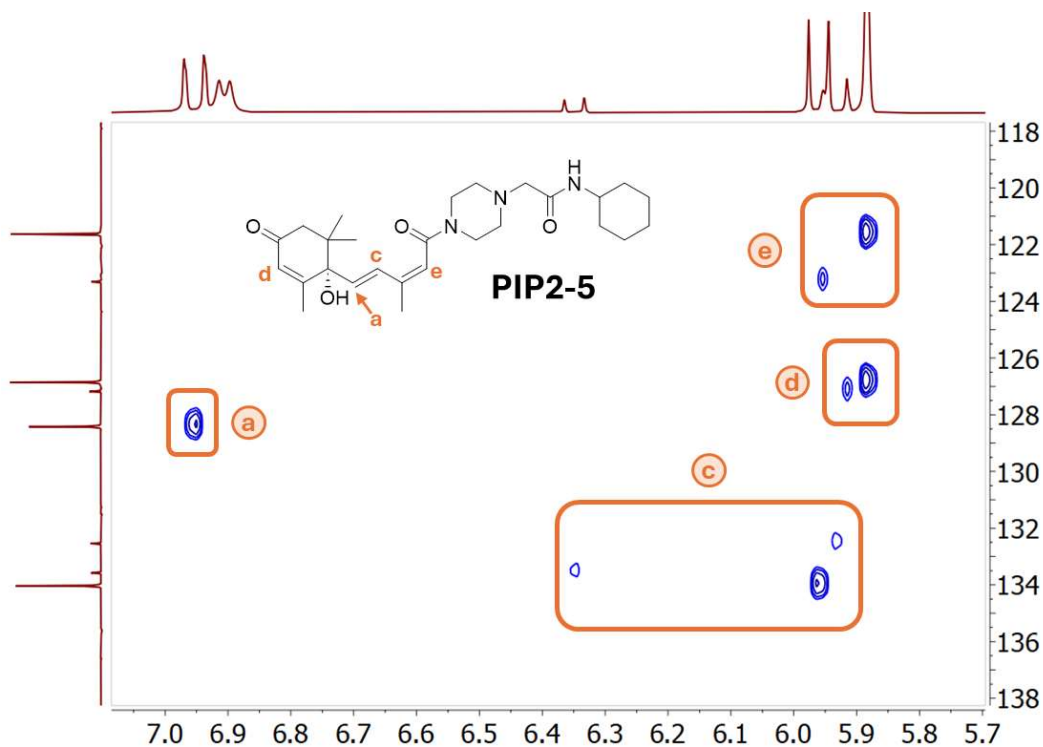


Figura 4.30: Ampliación del espectro HSQC de **PIP2-5**.

A continuación, se ejecutó la variación sistemática con cuatro isonitrilos diferentes manteniendo el ácido **AC-2**. Los rendimientos obtenidos para los cuatro aductos Ugi Split fueron en general regulares (Figura 4.31), destacándose el compuesto **PIP2-10** por presentar el rendimiento más bajo dentro de la serie.

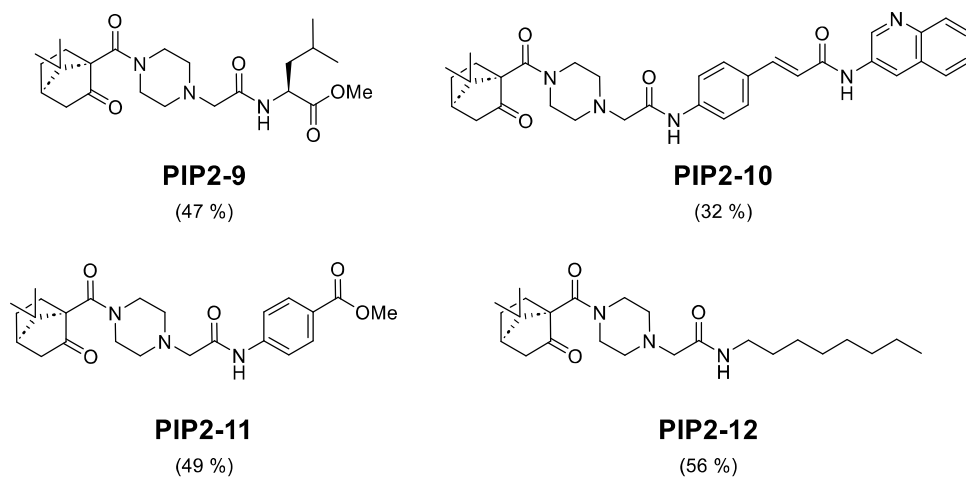


Figura 4.31: Productos Ugi Split derivados del ácido **AC-2**.

Debido a la movilidad limitada de los dos ciclos de los productos y la presencia de centros quirales, las señales de los H en el espectro de RMN ^1H usualmente aparecieron como señales anchas y superpuestas, como se ilustra en la Figura 4.32 con el espectro de **PIP2-12**. En el mismo se marcan algunas señales de cada bloque de construcción que pudieron ser asignadas mediante el estudio detallado de los espectros de RMN ^{13}C y bidimensionales.

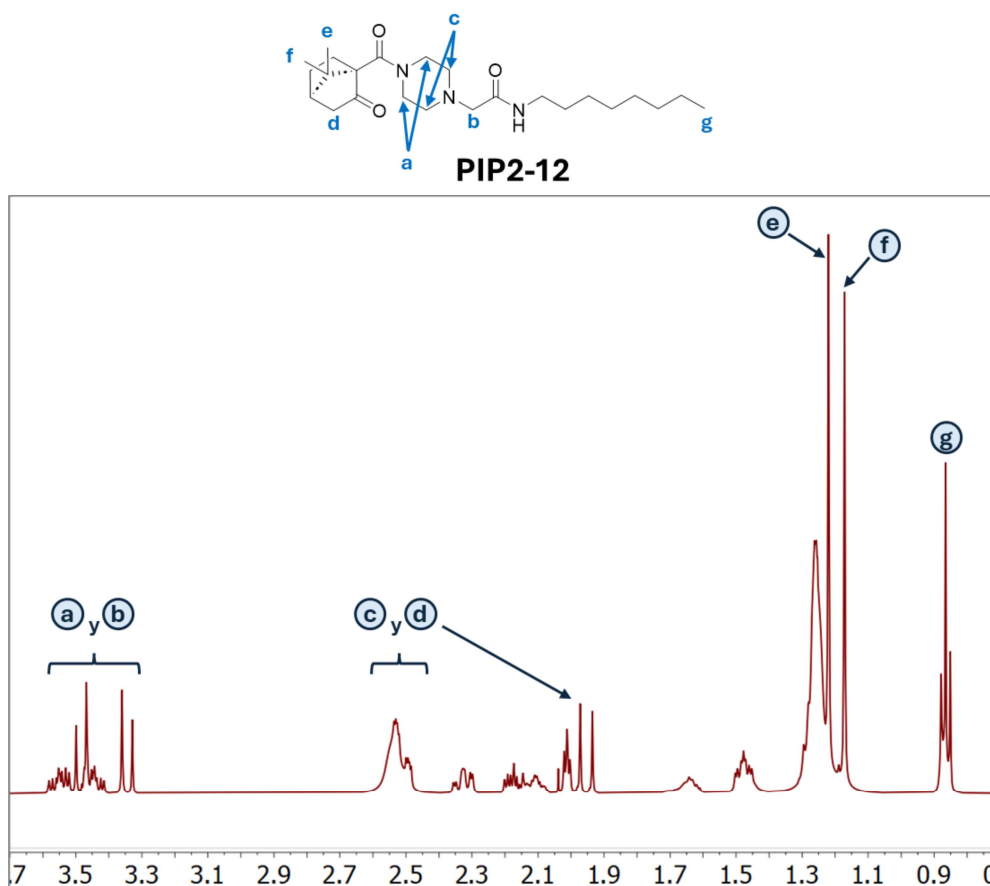


Figura 4.32: Ampliación del espectro de RMN ^1H de **PIP2-12**.

En contraste con la metodología habitual empleada para asignar por completo los espectros, donde generalmente se comienza con el espectro de RMN ^1H , para estos productos Ugi Split se encontró que resultaba más conveniente iniciar la asignación utilizando el espectro de RMN ^{13}C . Como ejemplo ilustrativo, se presenta a continuación el espectro de RMN ^{13}C del compuesto **PIP2-12** en la Figura 4.33. Este espectro exhibe todas las señales de los C del producto de manera claramente resuelta. Por ejemplo, se distingue la señal **g** de la cetona alrededor de 210 ppm, seguida de los dos picos correspondientes a los carbonilos de las amidas entre 180-170 ppm. A campos más elevados, se destacan

algunas asignaciones para resaltar la alta resolución de todas las señales de C. Entre estas, se puede identificar la señal del C cuaternario **h** ubicado entre dos carbonilos, la señal **b** del bloque de formaldehído, un único pico **c** para los dos C equivalentes de la piperazina, y, por último, en aquella región ampliada también se puede apreciar claramente la señal **i** del C cuaternario del puente. Este análisis detallado del espectro de RMN ^{13}C proporcionó una base sólida para la asignación precisa de las señales en este tipo de productos.

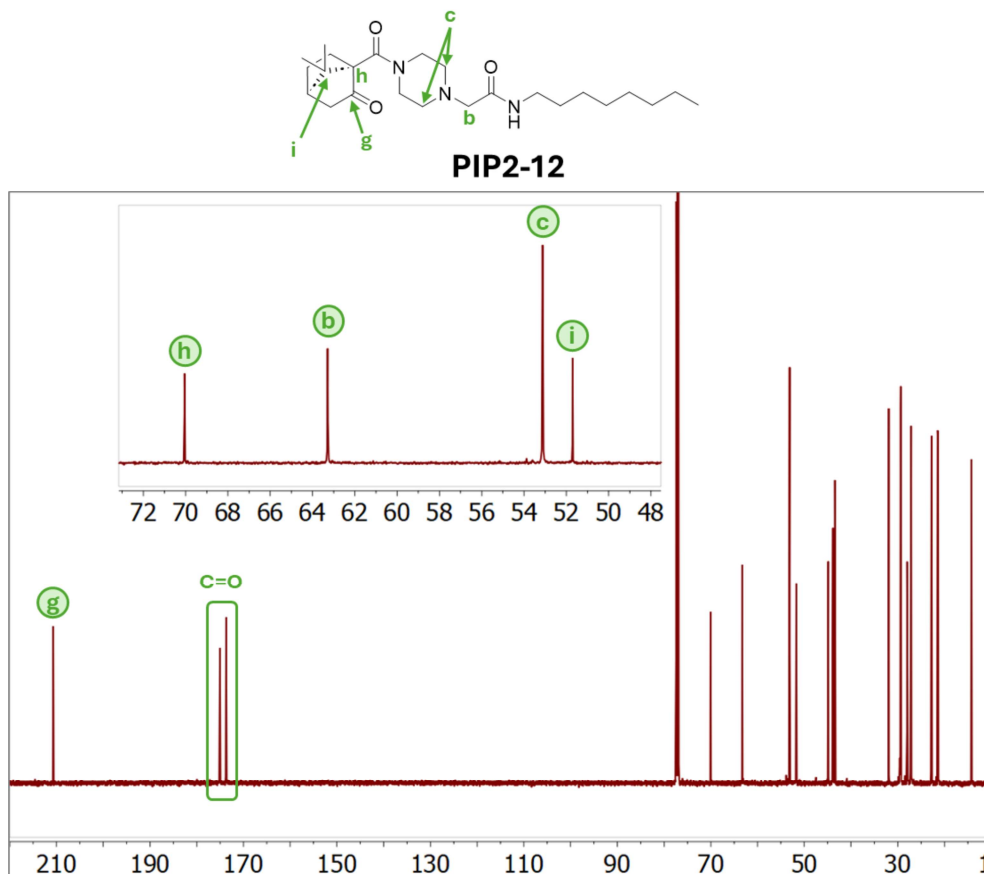


Figura 4.33: Espectro de RMN ^{13}C de **PIP2-12**.

Una vez asignados los C, se pudo reconfirmar que la complejidad adicional del espectro de RMN ^1H se debía a la rotación limitada de los ciclos y la presencia de amidas en la estructura de **PIP2-12**. Aquella movilidad restringida origina entornos químicos diferentes para los H de metilenos, lo que se traduce en señales distintas en el espectro de RMN ^1H . Sin embargo, ambos correlacionan con una única señal de C en el espectro de RMN ^{13}C , como se confirma en la Figura 4.34. En esta figura se muestra una ampliación del espectro bidimensional HSQC que sirve para estudiar la unión H-C a un enlace de distancia. La

región ampliada ilustra las señales **b** y **c**, correspondientes a los metilenos del bloque de formaldehído y piperazina, respectivamente.

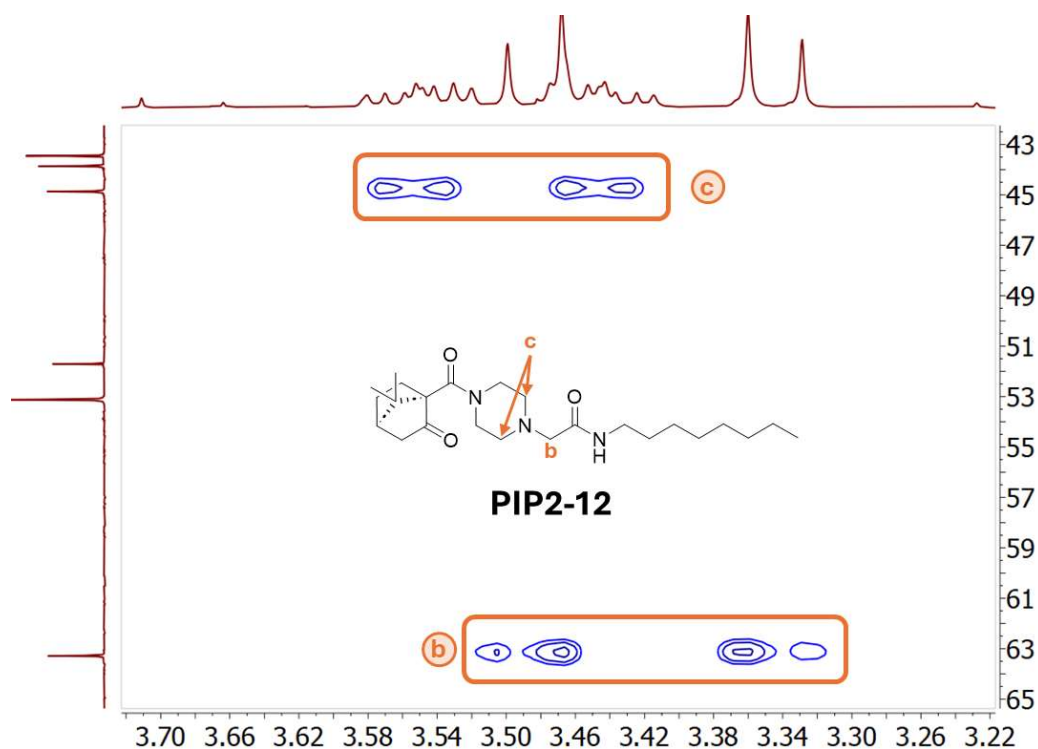


Figura 4.34: Ampliación del espectro HSQC de **PIP2-12**.

Particularmente para el caso de **PIP2-10**, la asignación de las señales del espectro RMN ^1H fue especialmente desafiante debido a que la región aromática presentaba señales solapadas y, además, señales duplicadas o triplicadas debido a la presencia de confórmeros. En la Figura 4.35 se muestra una ampliación de la zona a campo bajo con la asignación de algunas señales para ilustrar el fenómeno discutido.

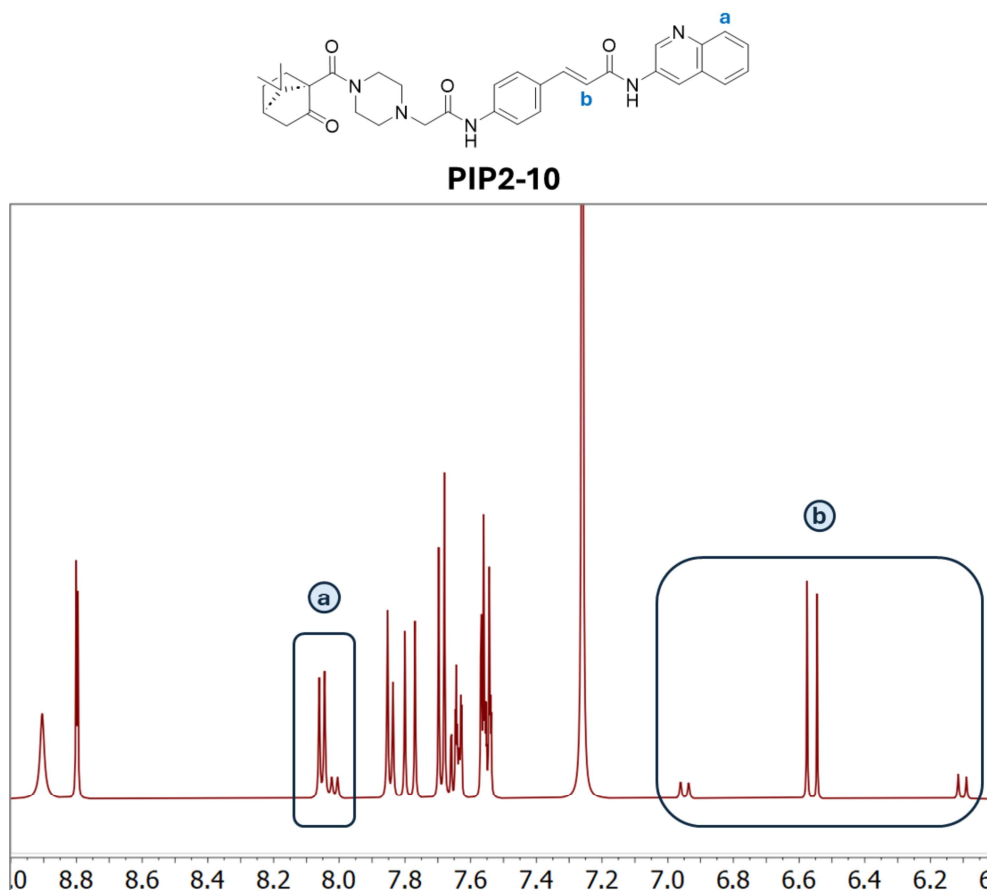


Figura 4.35: Ampliación del espectro de RMN ¹H de **PIP2-10**.

Para la correcta asignación de todas las señales de H aromáticos de **PIP2-10** fue indispensable la asistencia de espectros bidimensionales para contar con más información. En la Figura 4.36 se muestra una ampliación del espectro COSY de dicho producto Ugi Split con algunos de los distintos tipos de acoplamiento presentes en la molécula. Dicha información resultó indispensable al momento de asignar las señales de los H aromáticos. Por ejemplo, una vez asignado el doblete correspondiente al H_b con un $J_{trans} = 15,37$ Hz, se buscó otro doblete que correlacione en el espectro COSY y tenga un valor de la constante de acoplamiento semejante.

Otro ejemplo que puede ayudar a ilustrar el método de asignación es la señal correspondiente al H_d. Dicha señal se presenta como un doble doblete en el espectro de RMN ¹H, dado que acopla con los H_a, H_e y H_f con valores diferentes de las respectivas constantes de acoplamiento. Todas aquellas señales de acoplamiento entre los H de la quinolina se encuentran señaladas en el espectro COSY.

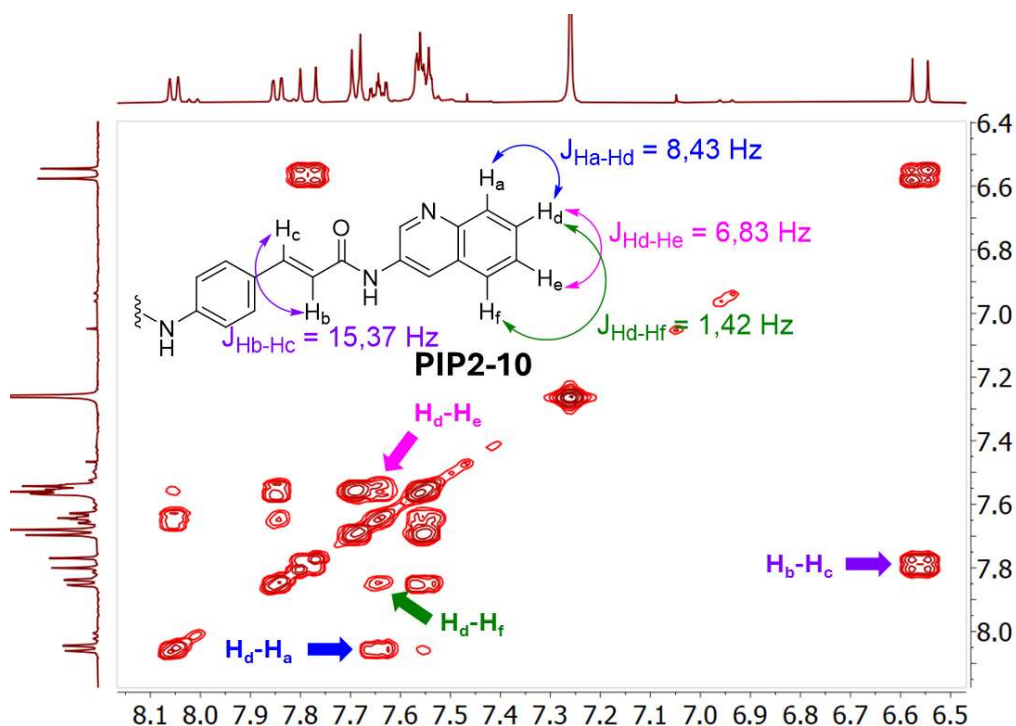


Figura 4.36: Ampliación del espectro COSY de **PIP2-10**.

Como último ejemplo mostrado en el proceso de síntesis de la biblioteca de compuestos basados en terpenos, se mantuvo constante el isonitrilo **IS-42** obtenido a partir de (-)-mentol variando de manera organizada los bloques ácidos hasta obtener los cuatro productos mostrados en la Figura 4.37.

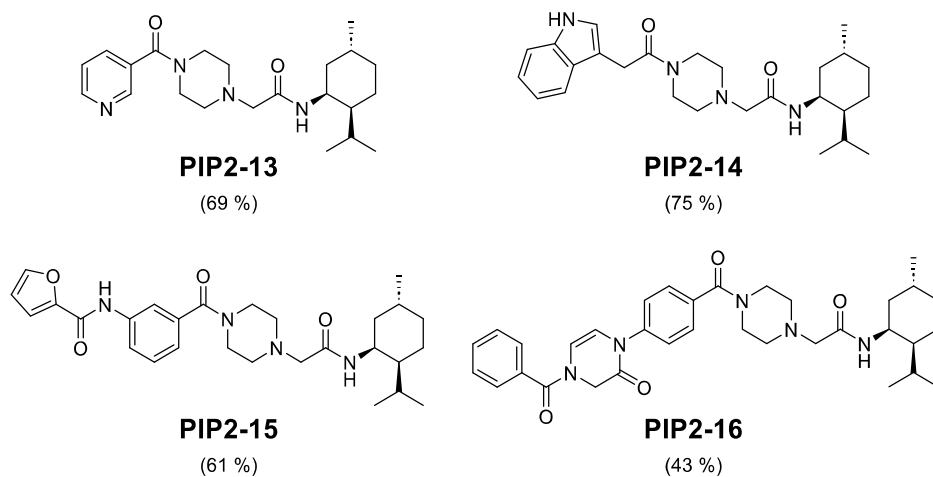


Figura 4.37: Productos Ugi Split derivados del isonitrilo **IS-42**.

Se ejemplifica a continuación la caracterización de uno de los productos (**PIP2-14**) con dos ampliaciones del espectro RMN ^1H (Figura 4.38). En la figura de la izquierda se muestran las señales características del grupo funcional indol y la amida (señal **d**). Las señales del indol se destacan por encontrarse completamente resueltas entre ellas, presentándose como dos doble dobles correspondientes a la señal **b** y **c**, dos doble dobles para los H **e** y **f**, y un doblete para la señal **g**. Debido a la alta resolución del espectro, se pudieron calcular los valores de las constantes de acoplamiento para todas aquellas señales. Por ejemplo, dos constantes con valores $J = 7,9$ y $0,9$ Hz para la señal **b** y $J = 8,2$ y $0,9$ Hz para **c**, para **e** y **f** se obtuvieron tres valores de constantes de acoplamiento distintas ($J = 8,2$; $7,0$ y $1,2$ Hz para la señal **e** y $J = 8,0$; $7,0$ y $1,0$ Hz para la señal **f**), y, por último, un $J = 2,4$ Hz para el doblete **g**.

En la región del espectro ilustrada a la derecha se puede apreciar la presencia de un multiplete **h** correspondiente al CH del mentol unido al N, un singulete **i** del metileno procedente del bloque ácido, las señales **j** y **l** de la piperazina, y la señal **k** remarcada del formaldehído. Hay que destacar dos acontecimientos particulares que se observan en este espectro: el primero es que en este compuesto se observa el fenómeno de H no equivalentes del formaldehído discutido anteriormente, generando un doblete para cada uno de los H con un J_{gem} de aproximadamente 16 Hz. El segundo hecho destacable es que, a diferencia de espectros anteriores, en esta ocasión se puede apreciar que todos los metilenos de la piperazina aparecen como señales independientes, y, con excepción de la que se encuentra a δ más alto, todas ellas aparecen como tripletes con constantes de acoplamiento que rondan el valor de 5 Hz.

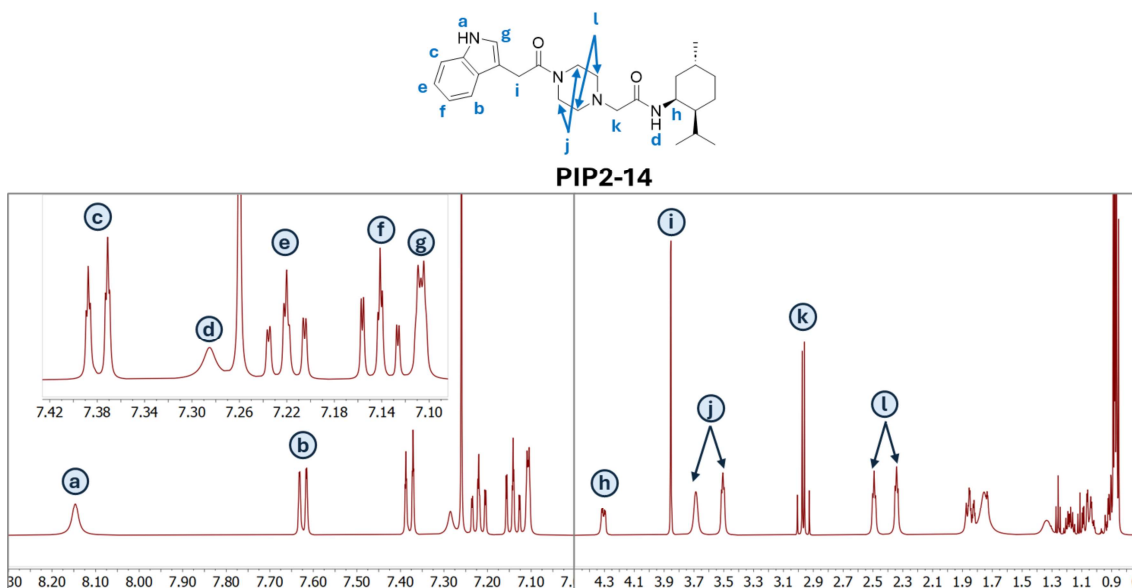


Figura 4.38: Espectro de RMN ^1H de **PIP2-14**.

A través del análisis del espectro bidimensional HMBC fue posible asignar inequívocamente los H provenientes del bloque de la piperazina, siguiendo una a una las correlaciones heteronucleares (Figura 4.39). Por ejemplo, se encontró una correlación entre el C del carbonilo de amida C_m (170,1 ppm) y los H a 3,69 y 3,51 ppm, lo que permite confirmar la asignación de los H del metileno (H_j). Asimismo, se pudieron asignar los H_i gracias a la correlación en HMBC con el C del metileno (C_k), el cual a su vez se asignó mediante la correlación de sus H con el C carbonílico vecino C_n .

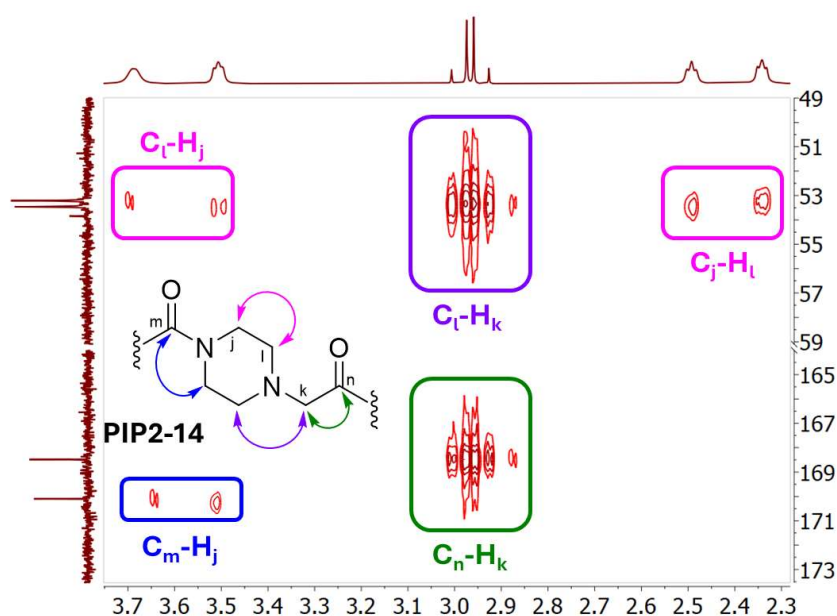


Figura 4.39: Ampliación del espectro HMBC de **PIP2-14**.

Además del espectro HMBC, se complementó la caracterización del fragmento proveniente de la piperazina mediante las correlaciones H-H en el espectro COSY (Figura 4.40).

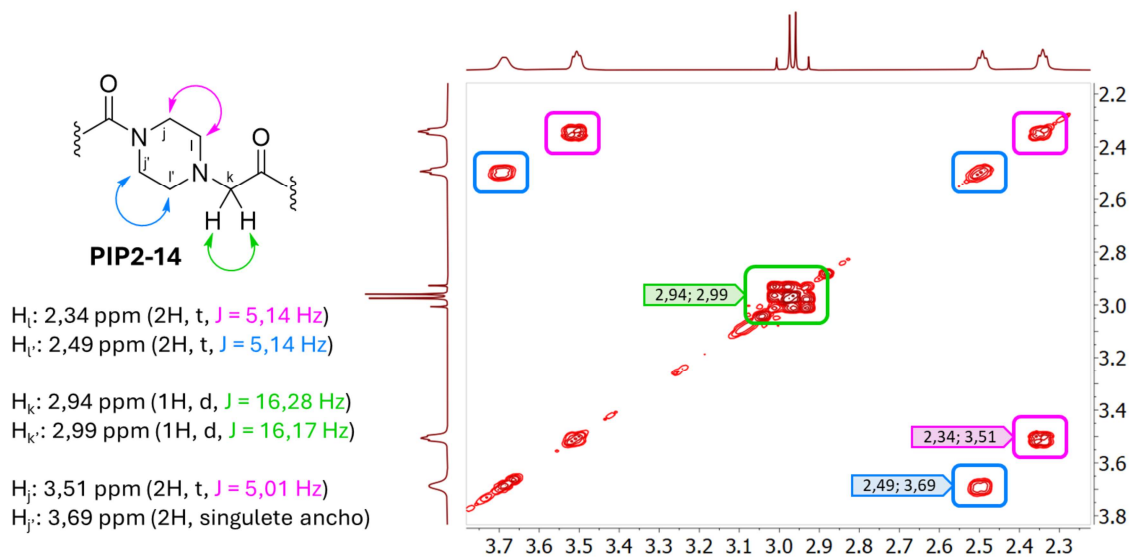


Figura 4.40: Ampliación del espectro COSY de **PIP2-14**.

En cuanto al espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.41), se evidenciaron las señales diagnóstico de los productos Ugi Split: los dos carbonilos de amida (**o** y **p**), el metileno proveniente del formaldehído (**k**) y los dos metilenos resaltados de la piperazina (**l**).

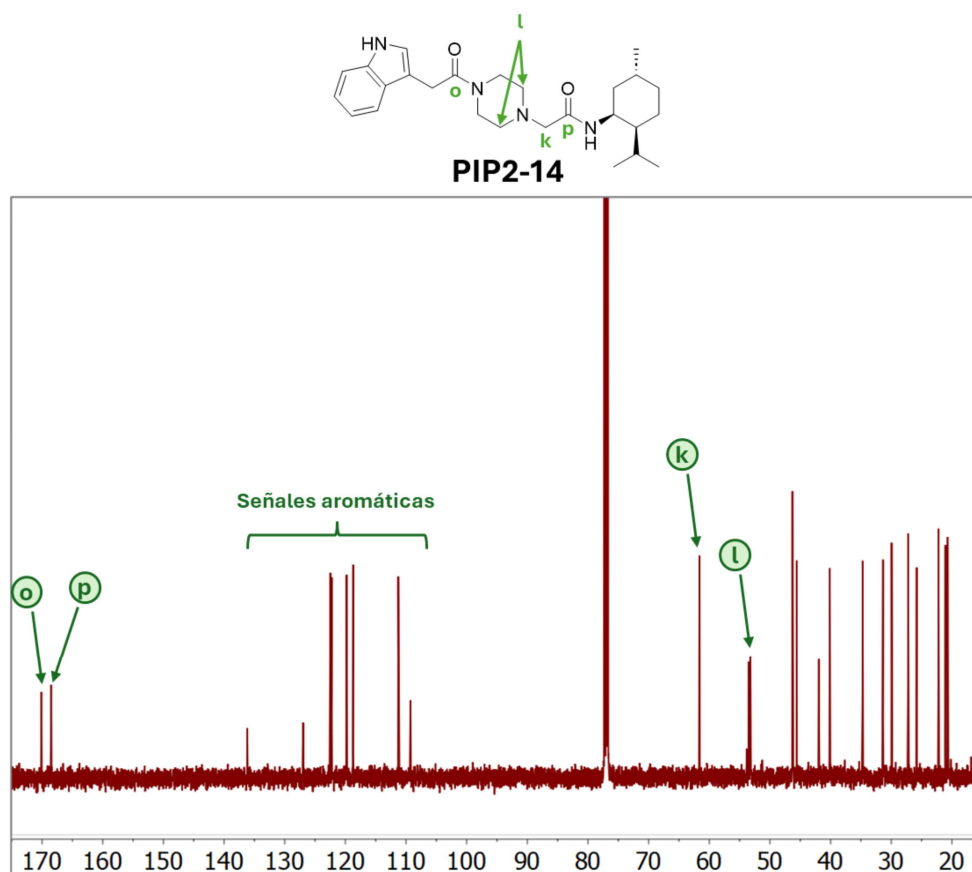


Figura 4.41: Espectro de RMN ^{13}C de **PIP2-14**.

Con el propósito de evitar que esta sección se torne excesivamente extensa y reiterativa, se optó por presentar el conjunto restante de productos finales de la familia **PIP2** de manera resumida en la Figura 4.42, donde se consignan tanto sus estructuras como los rendimientos correspondientes. Cabe señalar que todos estos compuestos fueron seleccionados siguiendo los mismos criterios de diseño y priorización detallados en la sección anterior. Asimismo, las rutas sintéticas empleadas para su obtención se basaron en procedimientos análogos a los utilizados previamente para la preparación de los demás pPNs, garantizando de este modo la coherencia metodológica a lo largo de toda la serie de compuestos estudiados.

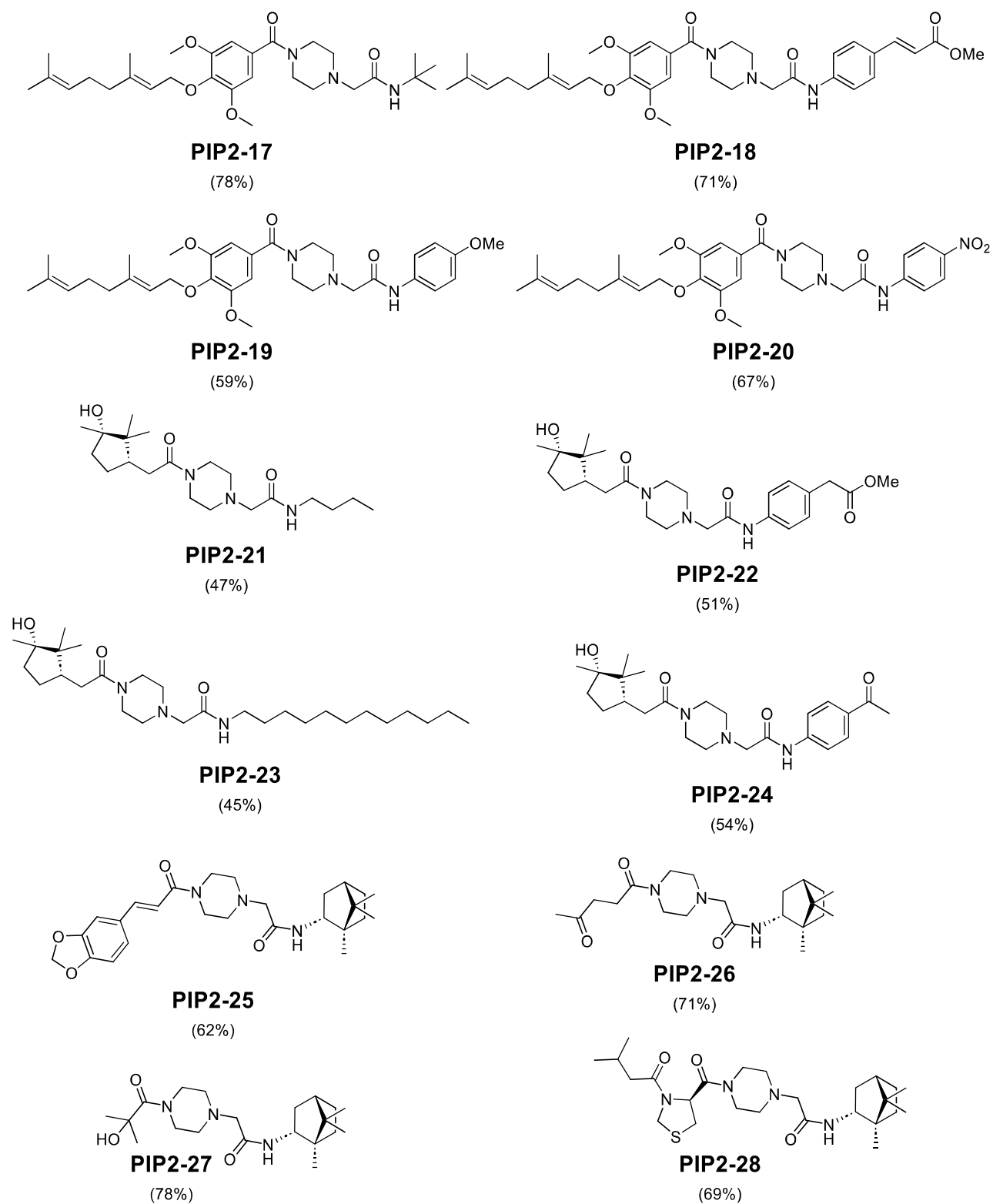


Figura 4.42: Compuestos adicionales de la biblioteca **PIP2**.

Ensayos biológicos

Nuevamente, las potenciales propiedades biológicas de los pPNs sintetizados fueron evaluadas en distintos ensayos fenotípicos. Con el fin de identificar alguna actividad biológica inherente, los ensayos fueron seleccionados en función de la capacidad de los compuestos para inducir respuestas observables en células u organismos vivos, proporcionando una visión integral de las interacciones biológicas. Los ensayos elegidos para este Capítulo fueron: antifúngicos y antiproliferativos.

Ensayos antifúngicos

En esta etapa, contando ya con una biblioteca conformada por 28 compuestos, se procedió a iniciar la evaluación biológica de los mismos para detectar posibles propiedades antifúngicas. Con este fin, se realizó un *screening* cualitativo de bioautografía de los compuestos sintéticos *in vitro*, en el que, en los casos en los que el compuesto exhibió actividad, se observó un halo de inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* (FS) alrededor del punto de siembra. De todos los compuestos ensayados, ocho moléculas presentaron resultados positivos.

Para aquellos compuestos que presentaron halos significativos en la bioautografía, se procedió a determinar la MIC contra *Fusarium solani* (FS), *Fusarium tucumaniae* (FT) y *Fusarium graminearum* (FG), utilizando la metodología estándar. Los resultados se resumen en la Tabla 4.3.

Compuesto	MIC (μM)		
	<i>FS</i>	<i>FT</i>	<i>FG</i>
PIP2-9	114,8	114,8	114,8
PIP2-12	119,2	238,3	119,2
PIP2-17	97,0	193,9	24,2
PIP2-19	88,4	176,8	88,4
PIP2-13	64,7	258,7	129,4
PIP2-14	57,0	228,0	11,5
PIP2-15	50,5	202,2	25,3
PIP2-16	42,7	170,7	85,4

Tabla 4.3. Valores de MIC para las distintas cepas de hongo.

Aunque la diversidad estructural de los compuestos no permite llevar a cabo un análisis completo de las relaciones entre la estructura y la actividad con los compuestos obtenidos, se pueden extraer algunas conclusiones relevantes. Por ejemplo, los compuestos **PIP2-13**, **PIP2-14**, **PIP2-15** y **PIP2-16** sintetizados utilizando el isonitrilo **IS-42** (Figura 4.43) presentaron un halo significativo en la bioautografía.

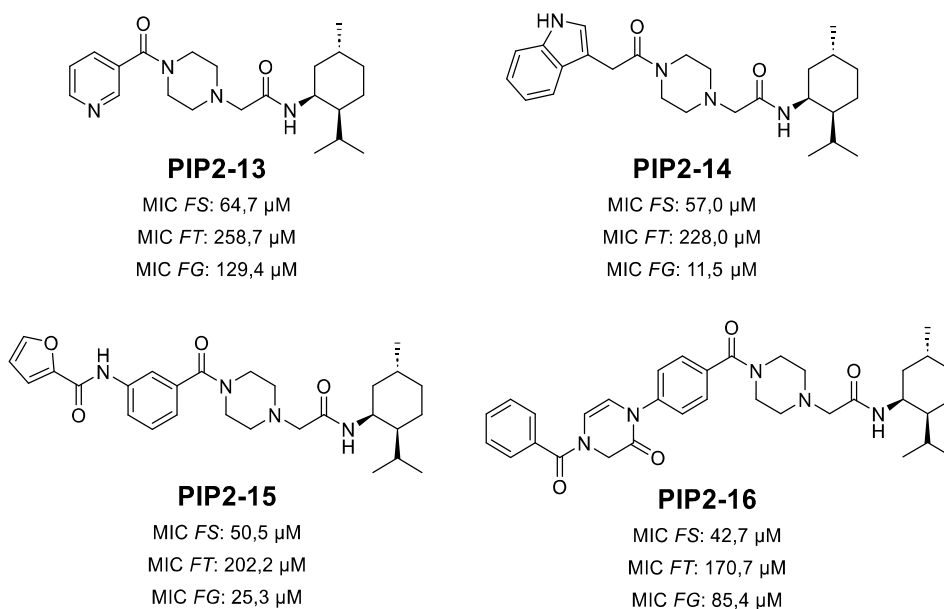


Figura 4.43: Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de **PIP2-13**, **PIP2-14**, **PIP2-15** y **PIP2-16**.

Los ensayos de actividad antifúngica, evaluados a partir de los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC), revelaron una marcada selectividad del compuesto **PIP2-13**, el cual mostró eficacia exclusiva frente a *Fusarium solani* (FS). En contraste, los otros tres compuestos analizados exhibieron un espectro de acción más amplio, extendiendo su actividad también hacia *Fusarium graminearum* (FG). Sin embargo, se observaron subgrupos completos de derivados que resultaron inactivos frente a la inhibición del crecimiento de ambas cepas, lo que sugiere que la presencia del bloque estructural derivado del mentol podría desempeñar un papel determinante en la expresión de la actividad antifúngica en este sistema.

Un hallazgo particularmente relevante corresponde al compuesto **PIP2-14**, cuyo valor de MIC se estableció en 11,5 μ M, una cifra muy próxima a la reportada para el control positivo Carbendazim (8,2 μ M). Este último constituye un fungicida bencimidazólico de amplio espectro de uso extendido en la agricultura, lo que resalta la importancia del resultado

obtenido y posiciona al compuesto **PIP2-14** como un candidato promisorio dentro de la serie analizada.

Ensayos antiproliferativos

A diferencia de los ensayos biológicos descritos en el Capítulo 3, donde el objetivo principal fue evaluar sólo las propiedades antiproliferativas de los compuestos, en el caso de esta nueva familia se implementó una modificación en el protocolo experimental con el fin de obtener información adicional sobre su perfil biológico. En colaboración con la Dra. Andrea Barquero, se introdujo un cambio en la técnica de *screening*: en lugar de sembrar inicialmente las células Huh-7, esperar a la formación de la monocapa y posteriormente adicionar la solución de los compuestos sintetizados, se optó por incorporar simultáneamente la suspensión celular junto con las soluciones de los compuestos en estudio.

Este ajuste metodológico permite, aunque de manera cualitativa, distinguir entre efectos citotóxicos y antiproliferativos. En el primer caso, un compuesto citotóxico impide que las células puedan adherirse, extenderse y comenzar su replicación, conduciendo a la muerte celular. En el segundo caso, un compuesto con propiedades antiproliferativas no destruye directamente a las células, pero sí interfiere con el proceso de división celular, bloqueando la replicación y, en consecuencia, favoreciendo procesos citopáticos.

Finalmente, en la Tabla 4.4 se presentan los resultados cualitativos de los compuestos activos obtenidos a partir de esta estrategia experimental, donde se diferencian claramente los compuestos con actividad predominantemente citotóxica de aquellos con efectos principalmente antiproliferativos.

que **PIP2-21** no se presentó como un compuesto activo al desarrollar el ensayo (Figura 4.45). Sorprendentemente, la única diferencia entre ambas moléculas radica en la longitud de la cadena alifática proveniente del isonitrilo, lo que implicaría que podría estar involucrado en el mecanismo de acción del compuesto.

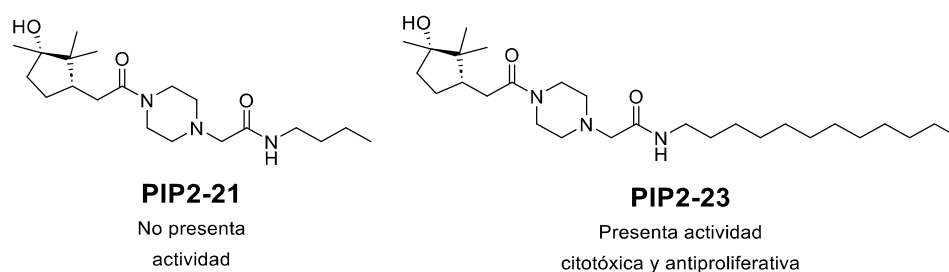


Figura 4.45: Compuestos activos sintetizados a partir del bloque ácido **AC-5**.

Luego de seleccionar los compuestos de interés con actividad antiproliferativa, se llevó a cabo la evaluación de la viabilidad de distintas líneas celulares luego de su exposición a una concentración final de 50 μM durante 72 horas. Se analizó mediante el ensayo de MTT en células humanas A549 (proveniente de adenocarcinoma de pulmón) y HuH-7 (proveniente de carcinoma de hígado) obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 4.46.

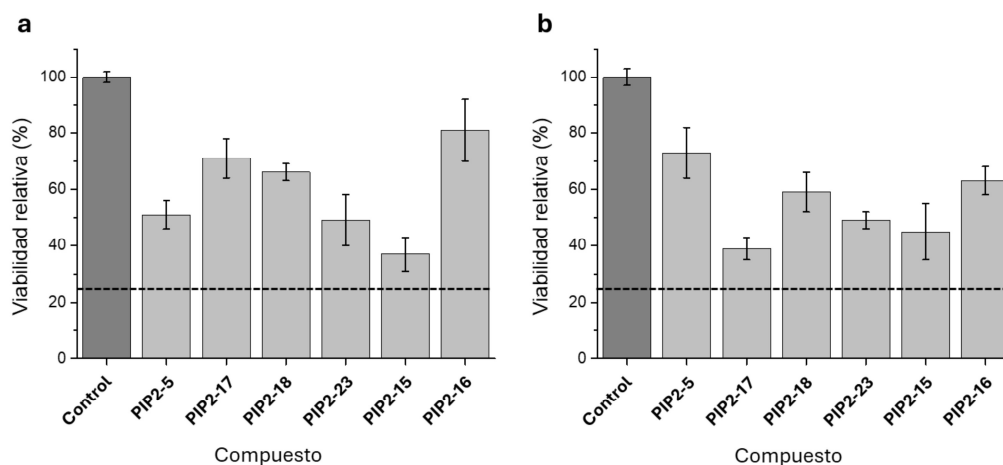


Figura 4.46: Inhibición de la proliferación a 50 μM de las líneas celulares (a) A549 y (b) HuH-7.

Aunque varios compuestos demostraron una capacidad destacada para inhibir la proliferación celular, de acuerdo con el criterio establecido a lo largo de esta Tesis, solo aquellos que, a la concentración evaluada, redujeron la viabilidad celular a menos del 25%

respecto al control fueron considerados antiproliferativos relevantes y seleccionados para investigaciones adicionales. Sin embargo, ninguno de los compuestos pertenecientes a esta familia logró superar dicho umbral de inhibición

Referencias

- (1) Roughley, S. D.; Jordan, A. M. The Medicinal Chemist's Toolbox: An Analysis of Reactions Used in the Pursuit of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (10), 3451–3479. <https://doi.org/10.1021/jm200187y>.
- (2) Wang, R.; Piggott, A. M.; Chooi, Y.-H.; Li, H. Discovery, Bioactivity and Biosynthesis of Fungal Piperazines. *Nat. Prod. Rep.* **2023**, *40* (2), 387–411. <https://doi.org/10.1039/D2NP00070A>.
- (3) Yuan, B.; Liu, D.; Guan, X.; Yan, Y.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Yang, D.; Ma, M.; Lin, W. Piperazine Ring Formation by a Single-Module NRPS and Cleavage by an α -KG-Dependent Nonheme Iron Dioxygenase in Brasiliamide Biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **2020**, *104* (14), 6149–6159. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10678-w>.
- (4) Zhu, L.; Li, J.; Fan, X.; Hu, X.; Chen, J.; Liu, Y.; Hao, X.; Shi, T.; Wang, Z.; Zhao, Q. Design, Synthesis and Antitumor Activity Evaluation of Chrysamide B Derivatives. *Bioorganic Chemistry* **2021**, *111*, 104828. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104828>.
- (5) Hedden, P. The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **2020**, *61* (11), 1832–1849. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa092>.
- (6) Dong, T.; Park, Y.; Hwang, I. Abscisic Acid: Biosynthesis, Inactivation, Homeostasis and Signalling. *Essays in Biochemistry* **2015**, *58*, 29–48. <https://doi.org/10.1042/bse0580029>.
- (7) Mashiguchi, K.; Tanaka, K.; Sakai, T.; Sugawara, S.; Kawaide, H.; Natsume, M.; Hanada, A.; Yaeno, T.; Shirasu, K.; Yao, H.; McSteen, P.; Zhao, Y.; Hayashi, K.; Kamiya, Y.; Kasahara, H. The Main Auxin Biosynthesis Pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108* (45), 18512–18517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108434108>.
- (8) Huynh, U.; McDonald, S. L.; Lim, D.; Uddin, Md. N.; Wengryniuk, S. E.; Dey, S.; Coltart, D. M. Formation, Alkylation, and Hydrolysis of Chiral Nonracemic *N*-Amino Cyclic

Carbamate Hydrazones: An Approach to the Enantioselective α -Alkylation of Ketones. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (21), 12951–12964. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00655>.

(9) Srinivasulu, C.; Ramgopal, M.; Ramanjaneyulu, G.; Anuradha, C. M.; Suresh Kumar, C. Syringic Acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *108*, 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.069>.

(10) Baumann, S.; Herrmann, J.; Raju, R.; Steinmetz, H.; Mohr, K. I.; Hüttel, S.; Harmrolfs, K.; Stadler, M.; Müller, R. Cystobactamids: Myxobacterial Topoisomerase Inhibitors Exhibiting Potent Antibacterial Activity. *Angew Chem Int Ed* **2014**, *53* (52), 14605–14609. <https://doi.org/10.1002/anie.201409964>.

(11) Kim, Y. J.; Kim, H.-J.; Kim, G.-W.; Cho, K.; Takahashi, S.; Koshino, H.; Kim, W.-G. Isolation of Coralmycins A and B, Potent Anti-Gram Negative Compounds from the Myxobacteria *Coralloccoccus Coralloides* M23. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (9), 2223–2228. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00294>.

(12) Alonso, F.; Galilea, A.; Mañez, P. A.; Acebedo, S. L.; Cabrera, G. M.; Otero, M.; Barquero, A. A.; Ramírez, J. A. Beyond Pseudo-natural Products: Sequential Ugi/Pictet-Spengler Reactions Leading to Steroidal Pyrazinoisoquinolines That Trigger Caspase-Independent Death in HepG2 Cells. *ChemMedChem* **2021**, *16* (12), 1945–1955. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100052>.

(13) Zhang, B.; Kurpiewska, K.; Dömling, A. Highly Stereoselective Ugi/Pictet–Spengler Sequence. *J. Org. Chem.* **2022**, *87* (11), 7085–7096. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00244>.

(14) Baev, D. S.; Blokhin, M. E.; Chirkova, V. Yu.; Belenkaya, S. V.; Luzina, O. A.; Yarovaya, O. I.; Salakhutdinov, N. F.; Shcherbakov, D. N. Triterpenic Acid Amides as Potential Inhibitors of the SARS-CoV-2 Main Protease. *Molecules* **2022**, *28* (1), 303. <https://doi.org/10.3390/molecules28010303>.

(15) Paquette, L. A.; Doehner, R. F. Synthesis of Optically Active Triazolinediones and Examination of Their Utility for Inducing Asymmetry in Diels-Alder Cycloaddition Reactions. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (25), 5105–5113. <https://doi.org/10.1021/jo01313a018>.

Capítulo 5

Biblioteca CIC

CAPÍTULO 5: Biblioteca CIC

Introducción

En el Capítulo 3 se abordó el diseño de pseudo productos naturales (pPNs) mediante la reacción Ugi Split, una estrategia sin antecedentes, en donde se empleó piperazina como diamina simétrica conectora. Como se discutió en los capítulos iniciales, el concepto de pPNs se inspira en la lógica biosintética de los productos naturales (PNs): módulos provenientes de rutas evolutivamente distintas -policétidos, péptidos, terpenos, alcaloides- que en la naturaleza en ocasiones se combinan para generar metabolitos híbridos con arquitecturas singulares. Retomando ese principio, el diseño *de novo* de pPNs busca seleccionar fragmentos presentes en PNs y recombinarlos en disposiciones inéditas, de manera de ampliar el espacio químico biológicamente relevante. En ese marco, la incorporación de la piperazina permitió generar una primera biblioteca donde un heterociclo presente en numerosos metabolitos especializados se integraba en un esqueleto peptidomimético construido modularmente. El resultado fue una colección de compuestos obtenida con gran eficiencia sintética y que, además, mostró perfiles bioactivos interesantes, validando así tanto la metodología como el concepto que la sustentaba.

Por otro lado, en el Capítulo 4 esa misma estrategia se retomó y se llevó un paso más adelante: se mantuvo la piperazina como núcleo estructurante, pero se amplió el repertorio de fragmentos hacia bloques terpénicos y otros derivados de rutas biosintéticas diversas, con el fin de incrementar la diversidad estructural y explorar con mayor libertad el espacio químico. Nuevamente, algunos de los compuestos obtenidos en esa colección también mostraron actividad biológica promisorio, reforzando la solidez del enfoque.

Explorando la literatura en busca de antecedentes sobre usos de la reacción Ugi Split en diferentes contextos, encontramos un trabajo publicado en 2008 que mostraba el potencial de esta reacción en la derivatización del macrociclo 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (ciclen), cuya estructura se muestra en la Figura 5.1a. Esta poliamina macrocíclica es muy relevante por sus variadas aplicaciones, que incluyen sensores químicos,¹⁻⁴ sondas de bioimagen⁵⁻⁷ y agentes de contraste para resonancia magnética.⁸⁻¹²

En este trabajo, Piersanti y Zappia mostraron que la reacción Ugi Split permitía la preparación directa de derivados bis-funcionalizados de ciclen en posiciones N1,N4 y

N1,N7 (Figura 5.1b). Los autores obtuvieron ambos productos en proporciones controlables según las condiciones de reacción, y extendieron la metodología a macrociclos análogos como dimetilciclen, con buenos rendimientos.¹³

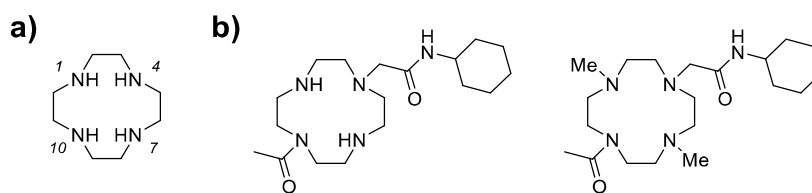
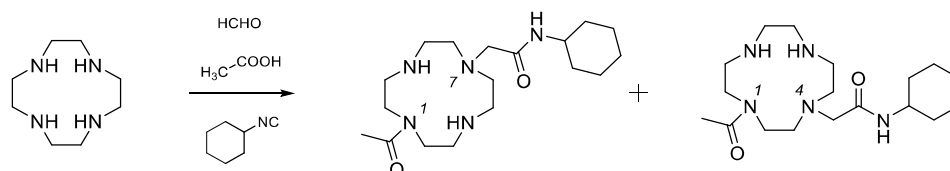


Figura 5.1: Estructura de: a) ciclen, b) productos obtenidos por Piersanti y Zappia mediante la reacción de Ugi Split sobre el ciclen.

Este antecedente fue clave para considerar a este macrociclo como bloque de construcción dentro del marco del diseño de pPNs. La biblioteca descrita en el Capítulo 4 puede entenderse como una continuación directa de la diseñada en el Capítulo 3, ya que en ambos casos la estrategia combinó una reacción Ugi Split sobre el anillo de piperazina como elemento conector, y donde la diferencia principal estuvo en la ampliación del repertorio de fragmentos hacia unidades de origen natural más diverso, en particular terpenos y otros bloques biológicamente relevantes. En cambio, en este Capítulo se propone una exploración alternativa: mantener a la reacción de Ugi Split como paso clave, pero reemplazar la piperazina por un bloque sin correlato biosintético, el ciclen. De este modo, la propuesta busca explorar hasta qué punto puede extenderse el concepto de pPNs cuando se incorporan fragmentos que las rutas biosintéticas conocidas no ofrecen.

Sin embargo, el antecedente de Piersanti y Zappia mostró una limitación importante en la aplicación de la reacción de Ugi Split sobre esta poliamina macrocíclica: cuando la reacción se llevó a cabo con formaldehído, ácido acético e isocianuro de ciclohexilo en metanol, estos investigadores obtuvieron una mezcla de derivados bis-funcionalizados en posiciones no equivalentes del macrociclo (Esquema 5.1). Bajo condiciones suaves (temperatura ambiente, 16 h) se formó una mezcla aproximadamente 1:1 de los isómeros N1,N4 y N1,N7. Sin embargo, al prolongar la reacción y trabajar a reflujo, la relación se desplazó de manera reproducible hacia una proporción 1:2 en favor del producto N1,N7.



Esquema 5.1: Mezcla de productos obtenidos por Piersanti y Zappia.

Experimentos adicionales mostraron que incluso al partir de un único isómero, la mezcla evolucionaba hasta alcanzar ese equilibrio, lo que evidenció un proceso de migración acíclica interno (reordenamiento de Mumm) responsable de la interconversión. Este hallazgo es relevante porque demuestra que la regioselectividad de la reacción de Ugi Split sobre el ciclen no responde a un control estrictamente cinético, sino que bajo ciertas condiciones prevalece el producto termodinámicamente más estable.

Aunque estos autores no llevaron a cabo estudios detallados, propusieron un posible mecanismo para intentar explicar los rendimientos y la reactividad observados, y que se detalla en la Figura 5.2. En este proceso, una de las aminas secundarias del sustrato reacciona con el grupo carbonilo para formar un ion iminio. Este ion iminio luego reacciona mediante la adición del isonitrilo y el resto carboxilato, dando lugar al primer intermediario mostrado, un imidato (como se muestra en detalle en el Capítulo 3 en la Figura 3.2 y Figura 3.4). Posteriormente, este intermediario sufre una transacilación en la que el resto acilo migra a la segunda amina secundaria N7, en un proceso conocido como reordenamiento de Mumm. Este reordenamiento puede ocurrir directamente (ruta b) o a través del heteroátomo Z acilado, que actúa como portador del grupo acilo (ruta a), generando una especie cargada, que se encuentra en equilibrio con el producto 1,7 disustituído.

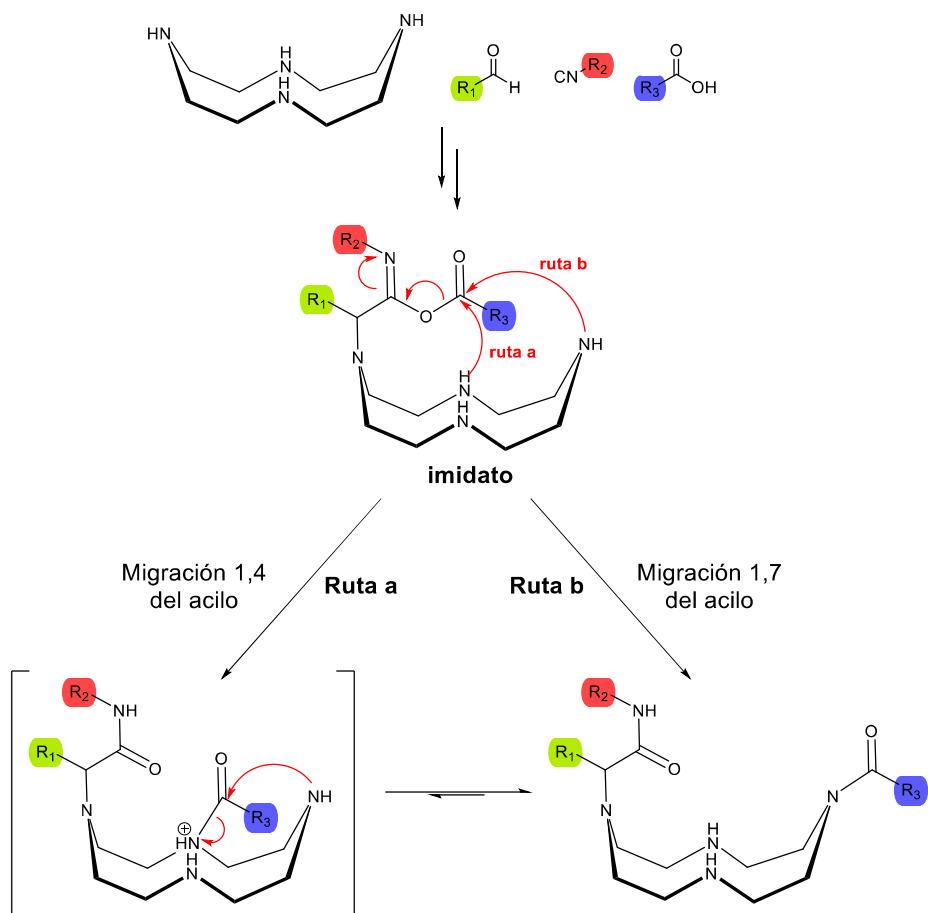
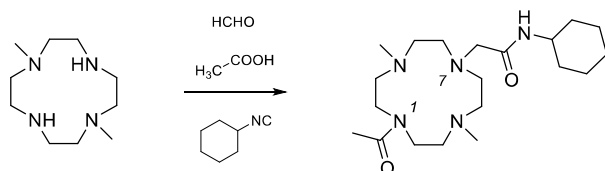


Figura 5.2: La migración del acilo justifica la obtención de los productos Ugi Split 1,7-disustituídos.

Síntesis

Preparación de bloques de construcción

En este contexto, es importante mostrar que al partir de 1,4-dimetilciclen, es posible acceder al compuesto 1,7-disustituído de manera exclusiva (Esquema 5.2).

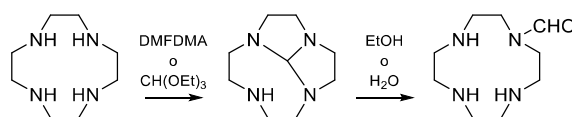


Esquema 5.2: Ruta sintética aplicada por Piersanti y Zappia para la obtención del producto N1,N7 disustituído exclusivamente.

A partir de este antecedente, se planteó la posibilidad de implementar una estrategia de protección regioselectiva de los diferentes átomos de nitrógeno presentes en el ciclen. Este enfoque permitiría bloquear de manera controlada determinadas posiciones del macrociclo, con el objetivo de dirigir selectivamente la reactividad. De este modo, se buscó ejercer un mayor control sobre el patrón de sustitución resultante en la reacción de Ugi Split, evitando la obtención de mezclas de los derivados.

Dada la importancia que tienen los derivados del ciclen, existen muchos estudios sobre protecciones selectivas. Por ejemplo, la funcionalización de una única posición nitrogenada se puede lograr haciendo reaccionar el electrófilo apropiado con un gran exceso de compuesto macrocíclico.¹⁴⁻²² Esta estrategia implica sólo un paso sintético y el tratamiento es relativamente simple, ya que el exceso de ciclen se puede eliminar fácilmente, a expensas de un rendimiento acotado. En algunos casos se puede usar un exceso menor de ciclen, o incluso una relación estequiométrica de 1:1, cuando la reactividad del reactivo acilante se modula adecuadamente, como en el ejemplo de los carbonatos mixtos de *p*-nitrofenilo²³ o ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo.²⁴ También se han descrito secuencias de varios pasos para preparar ciclen mono protegido.²⁵

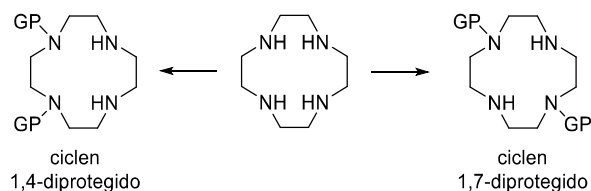
Alternativamente, la protección complementaria de tres de los cuatro átomos de nitrógeno es generalmente más sencilla, ya que los agentes acilantes suaves reaccionan más lentamente o, a veces, no reaccionan en absoluto con el cuarto átomo de nitrógeno. Esto permite la preparación con alto rendimiento de triformil-²⁶ y tri-BOC-ciclen,^{27,28} por ejemplo. Vale la pena mencionar que el ciclen reacciona con dimetilformamida dimetil acetal (DMFDMA)²⁹⁻³¹ u ortoformiato de trietilo³² para dar el intermediario aislable mostrado en el Esquema 5.3, cuya suave hidrólisis conduce a la formación limpia del derivado monoformilo. Esta secuencia permite acceder a un ciclo triprotegido o monoprotegido, y actualmente se emplea en la producción industrial del agente de contraste para resonancia magnética ProHance™, aprobado para uso clínico.³³



Esquema 5.3: Síntesis de ciclen monoprotegido.

En este trabajo, y dadas las características de la reacción de Ugi Split, necesitábamos contar con sustratos diprottegidos, derivados que plantean el problema adicional de la

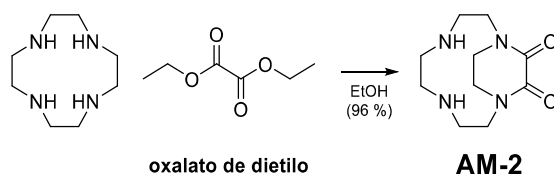
regioselectividad, dado que existen dos formas isoméricas posibles, con sustitución 1,4 ó 1,7 (Esquema 5.4).³⁴



Esquema 5.4: Rutas de diprotección de ciclen regioselectivas.

Preparación de ciclen 1,4-diprotectado

Una búsqueda bibliográfica permitió identificar, en primer lugar, una metodología adecuada para proteger dos nitrógenos vecinos. La técnica, detallada en el Esquema 5.5, consistió en disolver ciclen en etanol seco y añadir oxalato de dietilo. La mezcla de reacción se agitó durante 48 h. a temperatura ambiente, monitoreando el progreso mediante cromatografía en capa delgada. Finalmente, se obtuvo el producto **AM-2** como un sólido blanco, con excelente rendimiento.



Esquema 5.5: Síntesis de **AM-2**.

La protección se lleva a cabo mediante dos ataques nucleofílicos sucesivos de los átomos de nitrógeno del ciclen hacia los C carbonílicos del oxalato de dietilo, que actúan como electrófilos (Figura 5.3). El primer ataque puede ser realizado por cualquiera de los nitrógenos del ciclen, ya que bajo las condiciones empleadas son equivalentes, constituyendo el paso determinante de la reacción. En cambio, el segundo ataque nucleofílico ocurre necesariamente desde el nitrógeno ubicado en posición 4 respecto del primero, debido a una cuestión de proximidad espacial. En ambos pasos, se libera etanol como subproducto de la reacción.

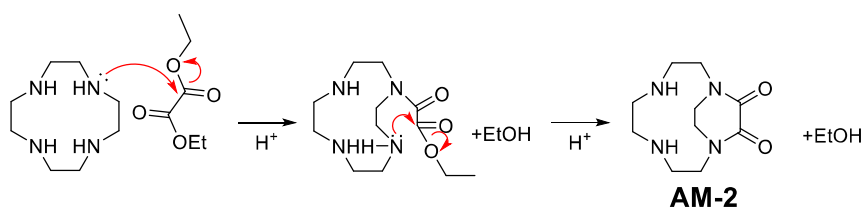


Figura 5.3: Mecanismo de formación de **AM-2**.

Para corroborar la efectividad en el paso de protección, se realizó la caracterización del sólido obtenido mediante espectroscopía RMN, buscando en especial la señal diagnóstica de los carbonilos como indicio distintivo del producto deseado (Figura 5.4). Aquella señal se presenta como un único pico para los dos C carbonílicos a 160,2 ppm, debido a la simetría de la molécula.

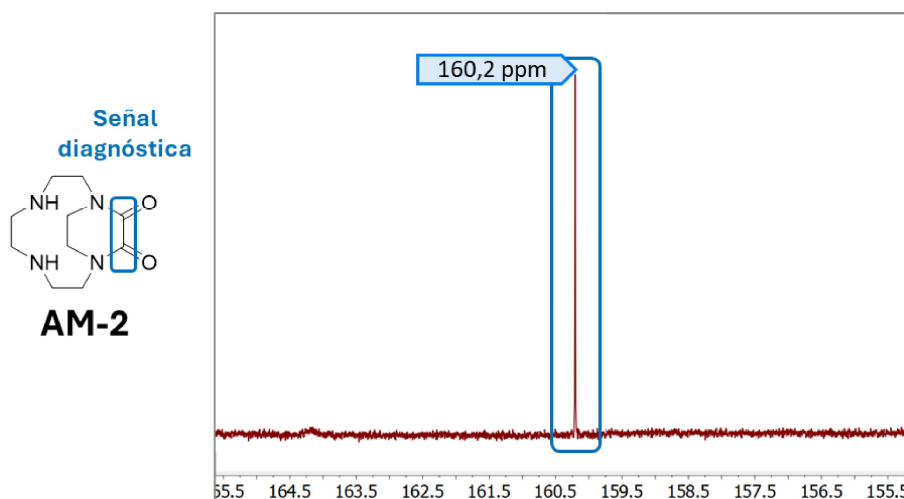


Figura 5.4: Ampliación del espectro RMN ^{13}C de **AM-2**.

Preparación de ciclen 1,7-diprottegido

A partir de la búsqueda bibliográfica, se identificó como alternativa promisoría una metodología desarrollada por Kovacs y Sherry para la síntesis de derivados 1,7-diprottegidos del ciclen (Esquema 5.4).^{35,36} Esta estrategia se basa en un control preciso del pH, que permite la protonación selectiva de los dos átomos de nitrógeno opuestos, desactivando su reactividad y facilitando la introducción de dos grupos protectores idénticos.

Esta metodología se basa en la gran brecha en las constantes de acidez asociadas al segundo y tercer paso de protonación (pK_a s 10,51; 9,49; 1,6; 0,8).²² A pH 3, la protonación

ocurre en los átomos de nitrógeno opuestos, debido a la repulsión electrostática entre las cargas positivas. Este fenómeno puede aprovecharse para introducir dos grupos protectores idénticos con regioselectividad específica en las posiciones 1 y 7. Este protocolo es operativamente sencillo y adecuado para preparaciones a gran escala, pero está limitado a grupos protectores resistentes a la condición ácida aplicada.

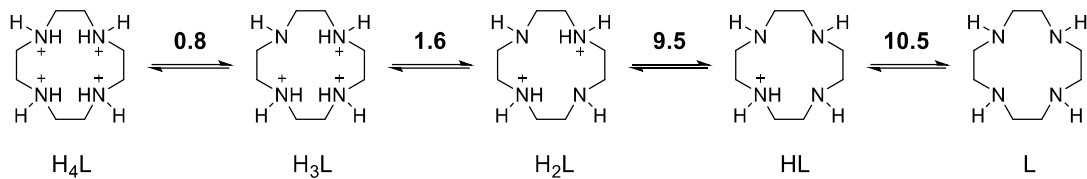
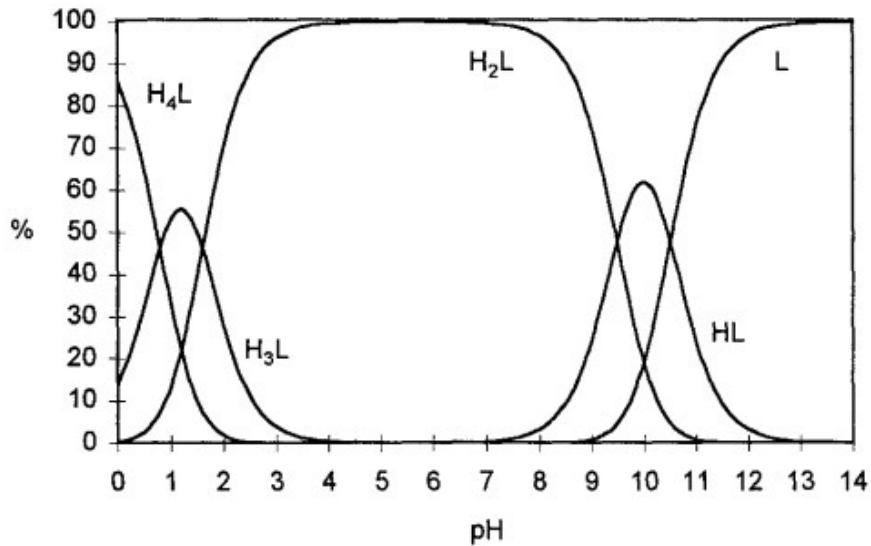


Figura 5.5: Diagrama de especiación del ciclén.

Es probable que la introducción de los dos grupos protectores ocurra de manera secuencial, lo que implica la formación de un intermedio ciclado monoprotegido que no se aísla durante el proceso. En este trabajo evaluamos el uso de dicarbonato de di-*tert*-butilo (anhídrido Boc, Boc₂O) y cloroformiato de bencilo (Cbz-Cl) como posibles grupos protectores (Figura 5.6).

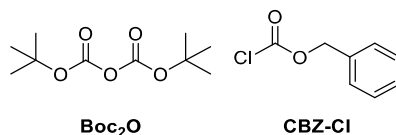
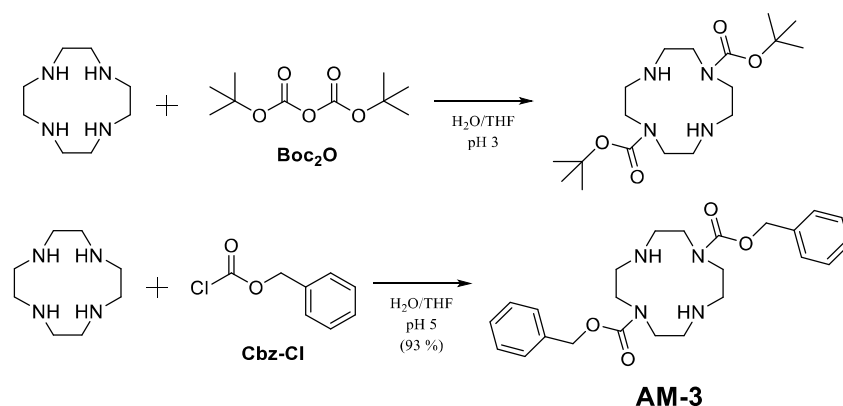


Figura 5.6: Estructuras de los grupos protectores ensayados para ciclén.

La metodología que se usó al evaluar ambos grupos protectores fue bastante similar: se disolvió ciclen en una mezcla de agua / THF acidificada previamente con HCl, con diferentes valores de pH según el grupo protector: pH = 3 para el Cbz-Cl y pH = 5 para Boc₂O, debido a la diferencia entre sus estabilidades frente al medio ácido. Luego, se añadió lentamente una solución del agente acilante correspondiente en THF a la mezcla, que se mantenía bajo agitación vigorosa. El pH se controló mediante la adición continua de bicarbonato de sodio. Alcanzada la conversión total del material de partida, según lo observado por TLC, la mezcla de reacción se extrajo con éter de petróleo, se basificó con carbonato de sodio y se extrajo con diclorometano.

Finalmente, se optó por seguir adelante con el grupo protector Cbz-Cl debido a que el rendimiento de dicha reacción fue de 93% (Esquema 5.6), a diferencia del 67% obtenido con el Boc₂O.



Esquema 5.6: Síntesis de **AM-3**.

Una vez aislado el producto mayoritario, se verificó la eficiencia de la reacción de diprotección buscando las señales representativas de la incorporación del Cbz. En la Figura 5.7 se muestran dichas señales: el carbonilo a 156,6 ppm y una región con C aromáticos.

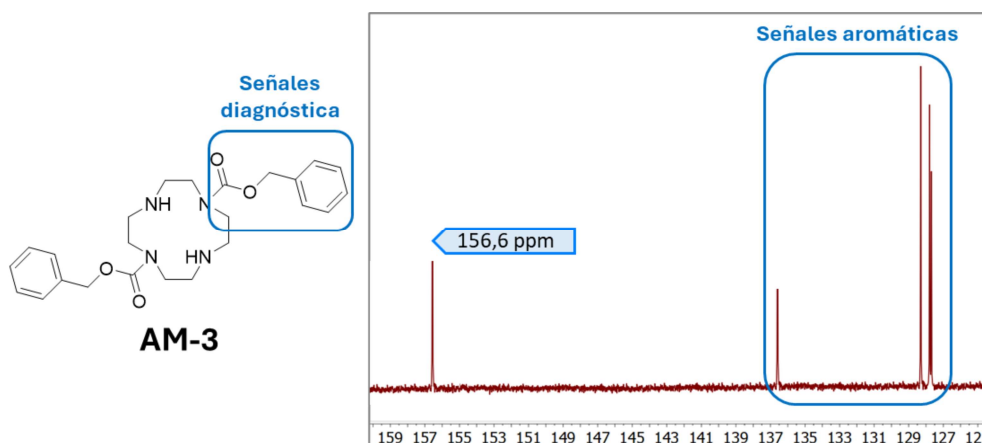
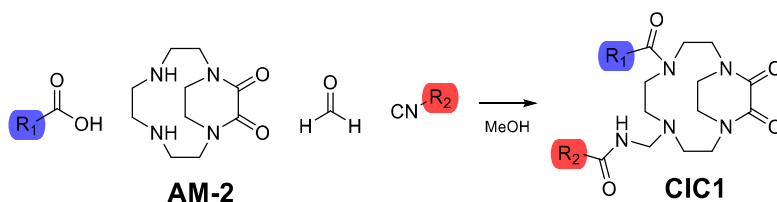


Figura 5.7: Ampliación del espectro de RMN ¹³C de **AM-3**.

Síntesis de los productos Ugi Split (CIC)

Contando ya con los dos precursores diprottegidos, el próximo paso consistió en evaluar su participación como componentes en reacciones de Ugi Split, para generar así la subfamilia con esqueleto **CIC1**. Para eso, y teniendo en cuenta los resultados descriptos en el Capítulo 3, se decidió utilizar una serie de ácidos grasos y algunos de los isonitrilos empleados anteriormente. Como siempre, las reacciones se llevaron a cabo en metanol, controlando cuidadosamente el orden de agregado de los reactivos.

En primer lugar, se partió del precursor **AM-2**, que se disolvió en la cantidad adecuada de metanol junto con formaldehído para permitir la formación de la enamina correspondiente. Después de 30 minutos, se incorporaron el isonitrilo y el ácido carboxílico seleccionados. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 5 días aproximadamente, según la reacción general mostrada en el Esquema 5.7.



Esquema 5.7: Síntesis de los productos Ugi Split con patrón de sustitución 1,4 (**CIC1**).

En todos los casos, una vez que la reacción llegó a completitud, se procedió al aislamiento del producto mediante evaporación del metanol, redisolución del residuo en diclorometano o acetato de etilo y posterior purificación por cromatografía en columna. De

esta manera se obtuvieron los primeros seis aductos **CIC1-1** - **CIC1-6** con el patrón de sustitución 1,4 con rendimientos moderados, como se muestra en la Figura 5.8.

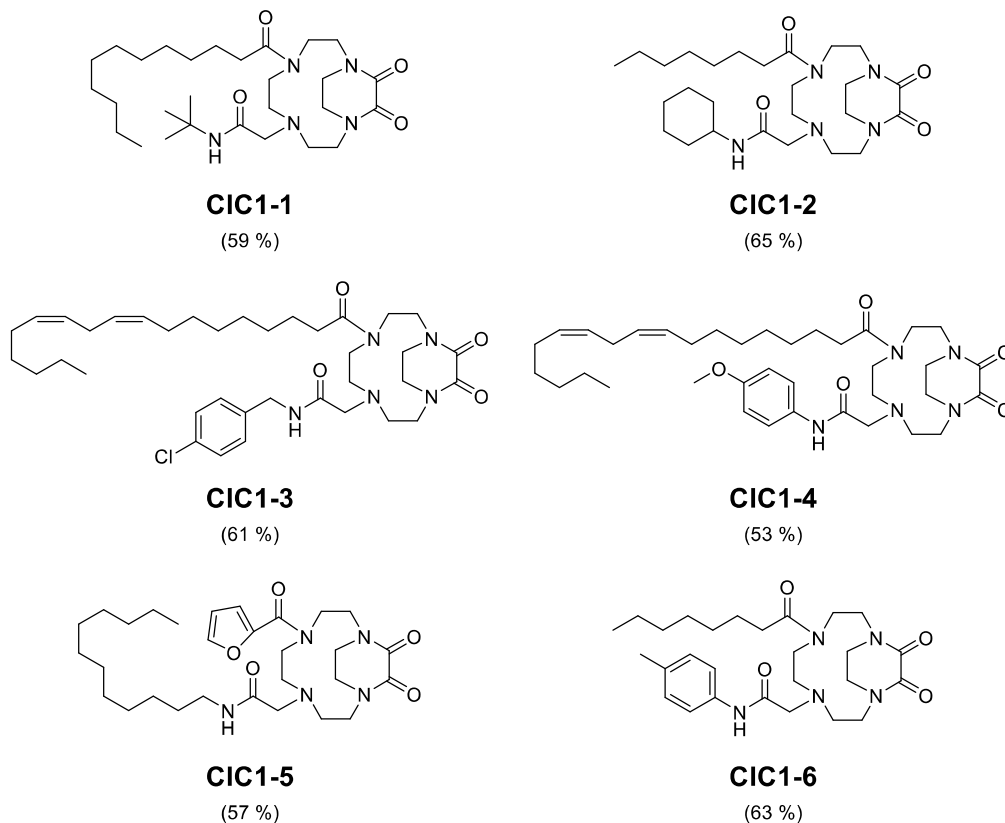


Figura 5.8: Productos Ugi Split con patrón de sustitución 1,4.

Todos los productos obtenidos en esta familia fueron caracterizados por RMN. Como ejemplo ilustrativo, se presenta el espectro de RMN ^1H de uno de los compuestos sintetizados (**CIC1-4**), el cual muestra las señales características de la estructura esperada (Figura 5.9). Si se observa el espectro, puede advertirse el par de dobletes característico de un anillo aromático *p*-disustituído (**a** y **c**), una señal **b** como singulete ancho a 7,17 ppm y el singulete **e**, todas señales que evidencian la incorporación del bloque del isonitrilo a la estructura aislada. Además, se pueden distinguir claramente las señales del ácido graso, como el multiplete **d** en 5,38 ppm proveniente de los CH vinílicos del ácido linoleico, los dos tripletes **f** y **g**, los metilenos alílicos **h** que se solapan en un único cuarteto, las señales de los metilenos **i** y **j**, y, por último, el triplete del metilo terminal **k** del bloque del ácido graso. La señal correspondiente al bloque proveniente del formaldehído y a los H metilénicos del anillo se presentaron en una amplia región como señales superpuestas en el rango de desplazamiento químico entre 3,7 y 3 ppm del espectro.

Debido a esta superposición de señales, no fue posible diferenciar y asignar individualmente cada una de las señales correspondientes a los distintos metilenos del ciclo. Sin embargo, se logró identificar claramente la señal del singulete característica del metileno proveniente del formaldehído, permitiendo su asignación inequívoca dentro de esa región espectral.

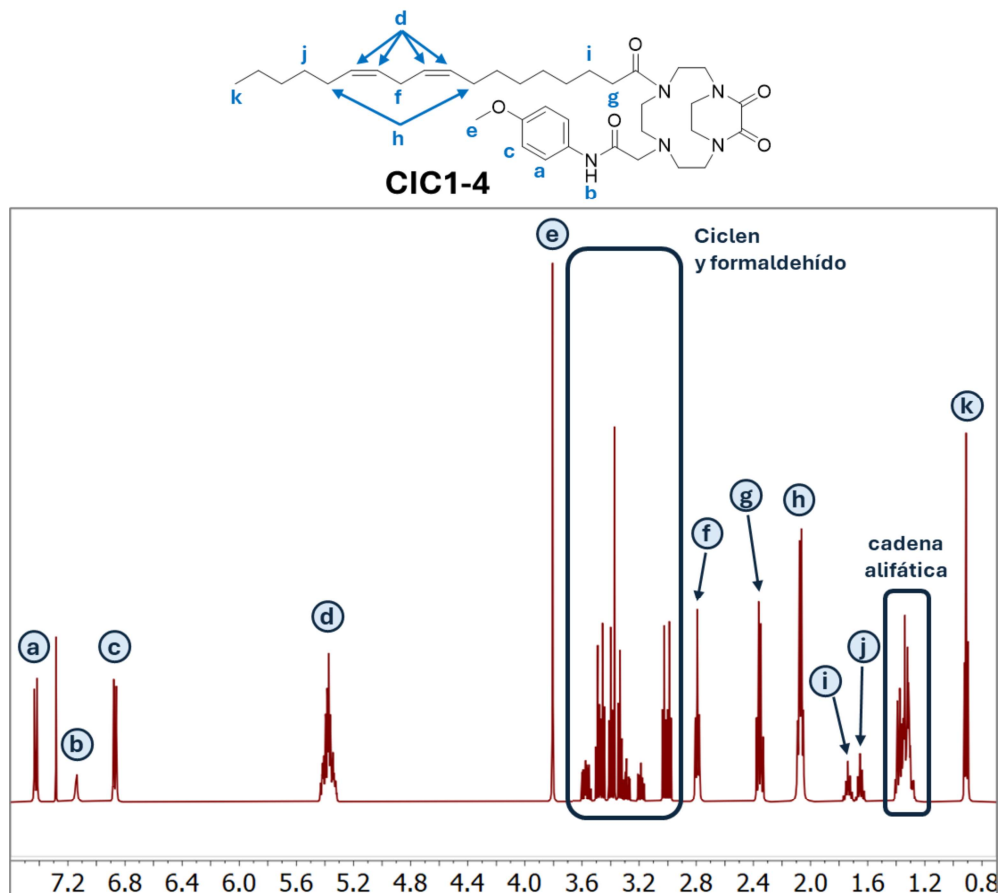


Figura 5.9: Espectro de RMN ^1H de **CIC1-4**.

Por otro lado, en el análisis de la ampliación del espectro de RMN ^{13}C de **CIC1-4** (mostrada en la Figura 5.10), se evidenciaron cuatro señales características de carbonilo y la señal del C aromático unido al OCH_3 . Aquellos cuatro picos de carbonilo permitieron confirmar la estructura propuesta para el compuesto **CIC1-4**. Entre estas señales, se pueden diferenciar a δ más altos los carbonilos del ácido graso y del carbonilo generado por la introducción del isonitrilo a 179,2 ppm y 171,4 ppm, respectivamente, y dos señales por debajo de 160 ppm correspondientes a los carbonilos del puente fusionado a los nitrógenos del ciclen. Por último, a 156,5 ppm se destaca la señal del C aromático unido a O.

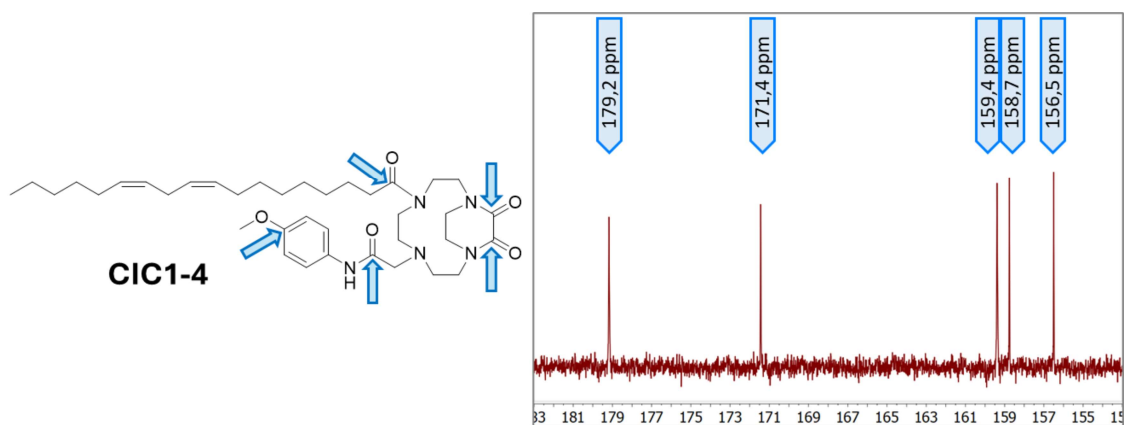
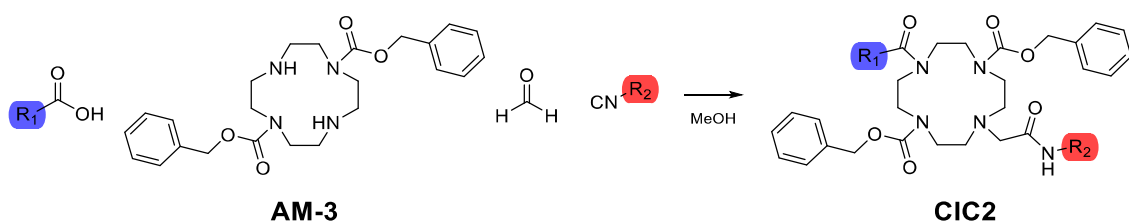


Figura 5.10: Ampliación del espectro de RMN ^{13}C de **CIC1-4**.

En el mismo sentido, se sintetizó un segundo subgrupo de compuestos empleando el ciclen 1,7-diprotégido **AM-3** para obtener la subfamilia bajo el código **CIC2** (Esquema 5.8).



Esquema 5.8: Síntesis de los productos Ugi Split con patrón de sustitución 1,7 (**CIC2**).

Una vez consumido por completo el material de partida limitante **AM-3**, se procedió al aislamiento y purificación del producto objetivo mediante técnicas cromatográficas en columna. A través de este proceso se lograron aislar seis aductos cíclicos derivados de la reacción Ugi Split, todos ellos con una disposición relativa 1,7 de los sustituyentes.

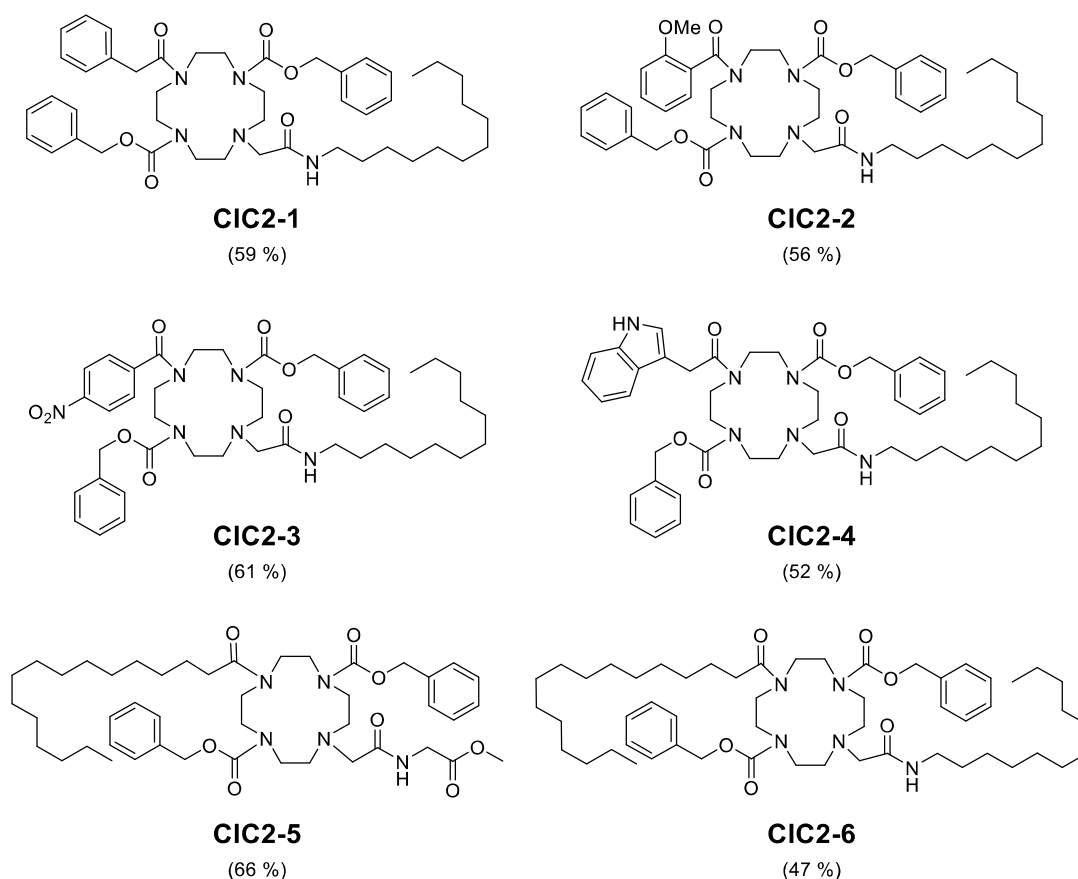


Figura 5.11: Productos Ugi Split con patrón de sustitución 1,7.

El espectro de RMN ^1H de este conjunto de compuestos resultó particularmente complejo de interpretar, ya que las señales correspondientes al ciclen 1,7-diprotectado suelen aparecer anchas, duplicadas y no equivalentes entre sí, a pesar de la presencia de un eje/plano de simetría. Para ilustrar este fenómeno, se muestra la Figura 5.12 donde se encuentran remarcadas algunas señales que se utilizaron para constatar la estructura de **CIC2-1**. Como señales confirmatorias se pueden listar: la señal ancha **a** por encima de 7,5 ppm característica del NH de la amida, señales de los metilenos **b** del CBZ ubicados entre el carbamato y el anillo aromático, un singulete por debajo de 4 ppm del metileno del ácido fenilacético (señal **c**), otro singulete **d** procedente del formaldehído a 3,46 ppm, y luego señales típicas de cadenas alifáticas largas, como el multiplete **e** y el triplete **f**. Aparte de esas señales, se puede observar una región del espectro con las señales aromáticas superpuestas entre 7,5 – 7,0 ppm, y una zona entre 3,3 – 2,5 ppm donde salen todas las señales del ciclen y el metileno α al nitrógeno del isonitrilo pero que no llegan a resolverse. Probablemente, este suceso pueda deberse a uno o varios motivos de los siguientes: que los H de los metilenos del ciclen no son equivalentes entre ellos, como ocurre

habitualmente para H que se encuentran en distintas caras de un ciclo; que debido al gran tamaño del ciclo del ciclen (12 átomos), la movilidad sea bastante elevada permitiendo que adopte una conformación donde metilenos opuestos, que deberían ser iguales por simetría, no tengan entornos químicos iguales; o bien, la presencia de varios confórmeros de la molécula en solución, duplicando señales.

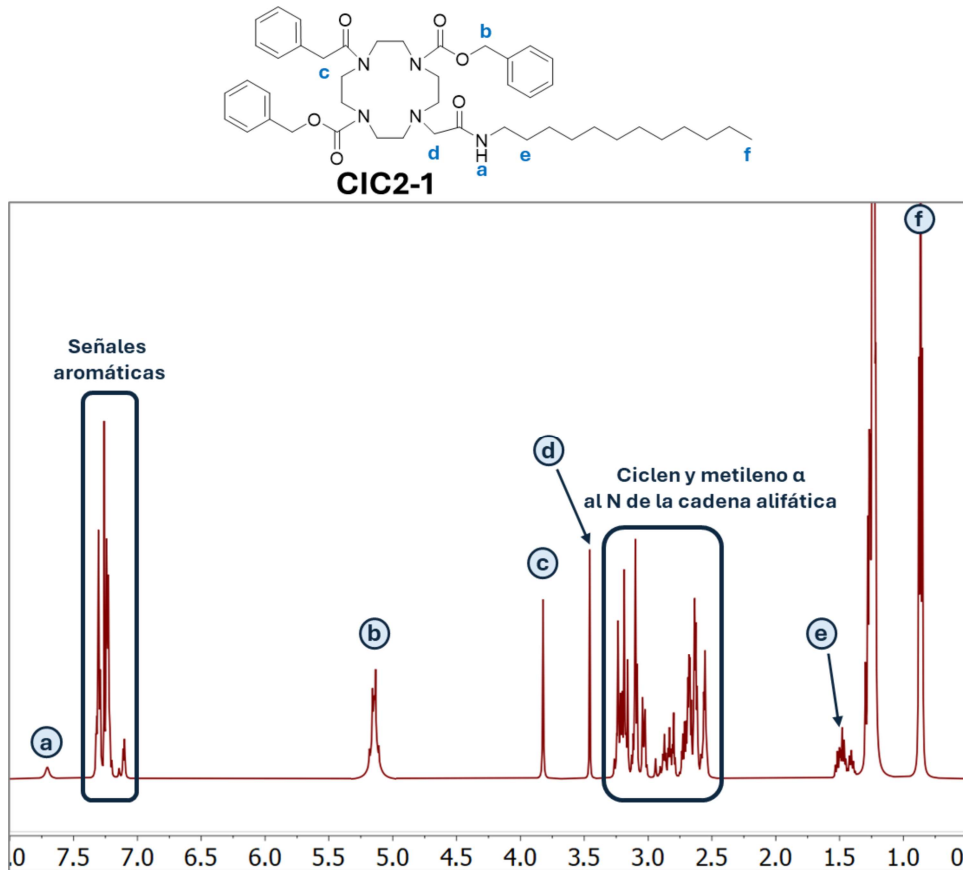


Figura 5.12: Espectro de RMN ¹H de **CIC2-1**.

Con el fin de intentar simplificar las señales del espectro RMN ¹H de **CIC2-1**, se realizó un espectro de RMN ¹H *pure shift*.³⁷ Un espectro de “desplazamiento puro” o *pure shift* es aquel en el que la posición de las señales de RMN ¹H está únicamente determinada por el desplazamiento químico, y no contiene información acerca del acoplamiento escalar homonuclear J_{H-H} debido a la supresión de la multiplicidad. La supresión de la estructura multiplete en los espectros de RMN ¹H ofrece una gran mejora en la resolución espectral, ya que cada multiplete colapsa en una sola línea en el desplazamiento químico apropiado. Sin embargo, el costo a pagar es una baja sensibilidad en la técnica, obteniendo una disminución en la relación señal/ruido.

El experimento de RMN ^1H *pure shift* realizado sobre el compuesto **CIC2-1** mostró una mejora significativa en la resolución de la región comprendida entre 3,2 y 2,5 ppm, donde se localizan las señales correspondientes a los metilenos del ciclen y al metileno α al nitrógeno del isonitrilo. Al suprimir la multiplicidad de las señales, esta técnica permitió distinguir con mayor claridad algunas señales relevantes, como se indica en la Figura 5.13.

No obstante, una desventaja encontrada durante el análisis espectral fue la dificultad para distinguir algunas señales respecto al ruido. Además, debido a la similitud en el desplazamiento químico de las señales y la baja sensibilidad de la técnica utilizada, muchas señales no pudieron ser completamente resueltas, presentándose como picos con "hombros". A pesar de estas limitaciones, el experimento de RMN *pure shift* representó una herramienta poderosa al proporcionar claridad en la interpretación de las señales en la región específica mencionada, lo que contribuyó al entendimiento de la estructura molecular del compuesto estudiado.

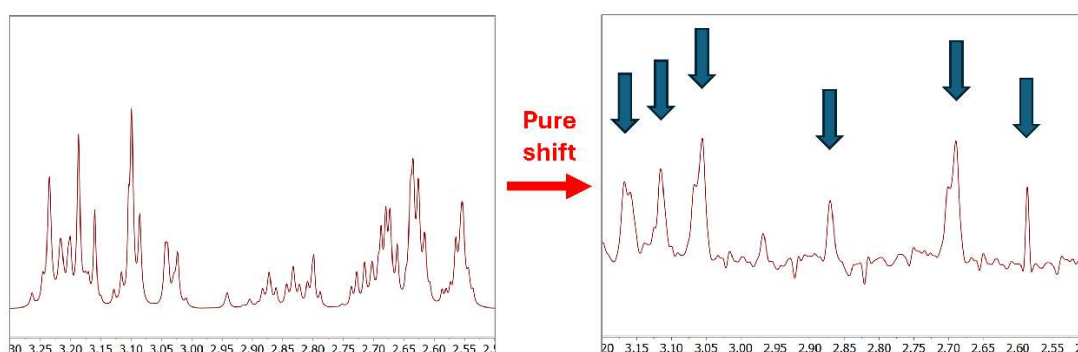
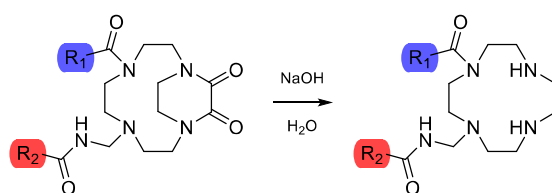


Figura 5.13: Ampliación del espectro RMN ^1H de **CIC2-1**: tradicional (izquierda); *pure shift* (derecha).

Clivaje de los distintos grupos protectores

Una vez obtenidos los 12 productos Ugi Split con distintas disposiciones de sustituyentes, se procedió a la remoción de los grupos protectores. Para liberar los nitrógenos de los compuestos 1,4-disustituídos (Esquema 5.9), se los sometió a una hidrólisis alcalina (NaOH acuoso, 90 °C, durante toda la noche). Finalizada la conversión del material de partida, según lo evidenciado por los análisis de TLC, los productos se extrajeron con diclorometano.



Esquema 5.9: Desprotección de los productos Ugi Split con patrón de sustitución 1,4.

Los rendimientos obtenidos para la desprotección de los seis aductos Ugi Split en las condiciones ensayadas fueron moderados, como se muestra en la Figura 5.14.

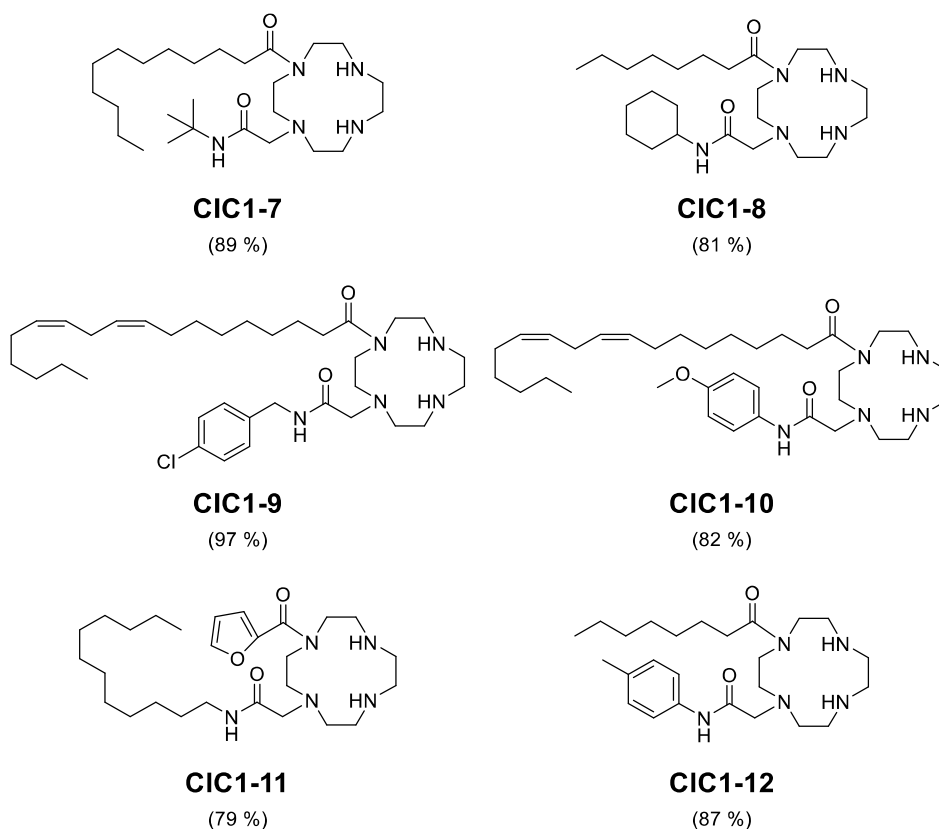


Figura 5.14: Productos Ugi Split desprotegido con patrón de sustitución 1,4.

Debido a la complejidad evidente en los espectros de RMN ^1H de los productos obtenidos, el proceso de asignación se enfocó principalmente en las señales diagnósticas que estaban claramente resueltas. Sin embargo, al llevar adelante aquella estrategia, uno de los compuestos mostró un comportamiento distinto al resto: el producto desprotegido **CIC1-9** exhibió señales estrechas y duplicadas (o incluso más), lo que sugirió la presencia de confómeros en solución, como se ilustra en Figura 5.15.

Además, a pesar de que el anillo aromático en este compuesto es un sistema *p*-disustituído, no se observaron las señales características esperadas. Esto se debió a que los dobletes típicos de dicho sistema estaban superpuestos entre sí y con las señales de los confórmeros, dificultando su identificación en el espectro. Este fenómeno añadió una capa adicional de complejidad al proceso de asignación de las señales en el espectro de RMN ^1H de este compuesto específico.

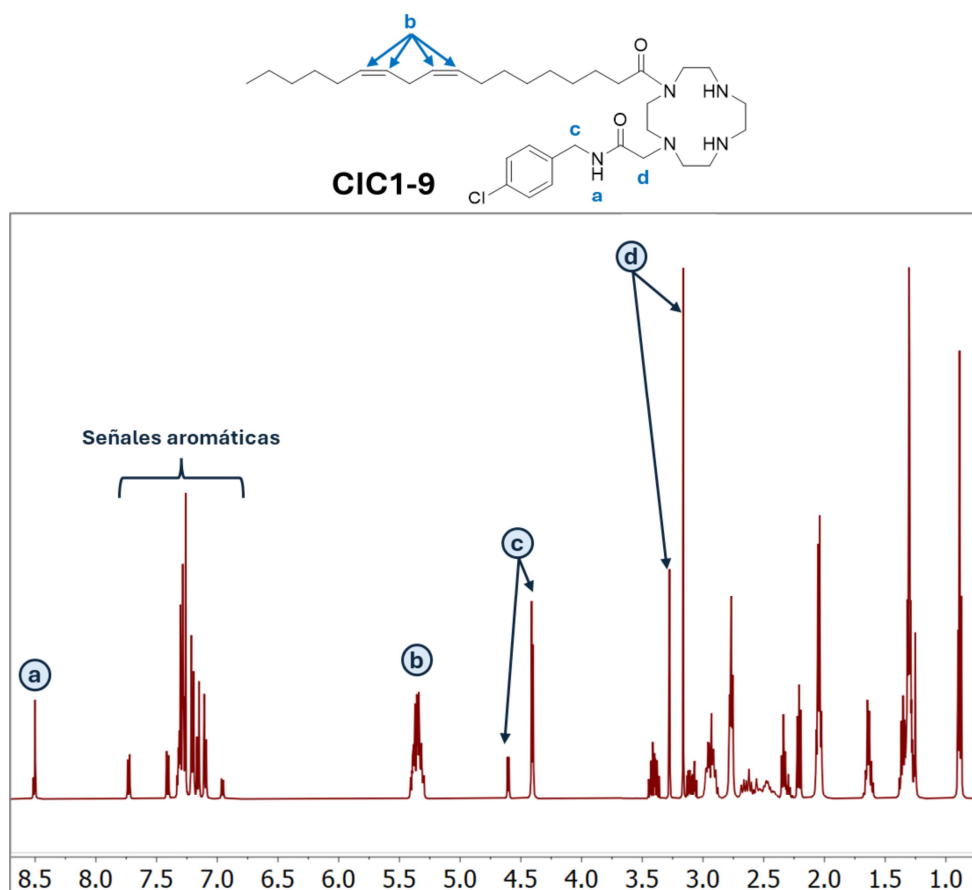


Figura 5.15: Espectro de RMN ^1H de **CIC1-9**.

Para ofrecer una explicación más detallada del fenómeno observado en las señales del compuesto **CIC1-9**, se presenta en la Figura 5.16 una ampliación de la región aromática tanto en el espectro de RMN ^1H como en el espectro COSY. Esta ampliación revela la presencia de cuatro confórmeros distintos (designados como **A**, **B**, **C** y **D**), cada uno de los cuales exhibe su propio conjunto de dos dobletes característicos de los sistemas aromáticos 1,4-disustituídos.

Estos dobletes muestran sus correspondientes acoplamientos fuera de la diagonal en el espectro COSY, lo que proporciona una clara evidencia de la existencia de múltiples

conformaciones en solución. Esta observación sugiere la presencia de una dinámica conformacional significativa en el compuesto **CIC1-9**, donde las diferentes conformaciones coexisten y pueden interconvertirse rápidamente en solución.

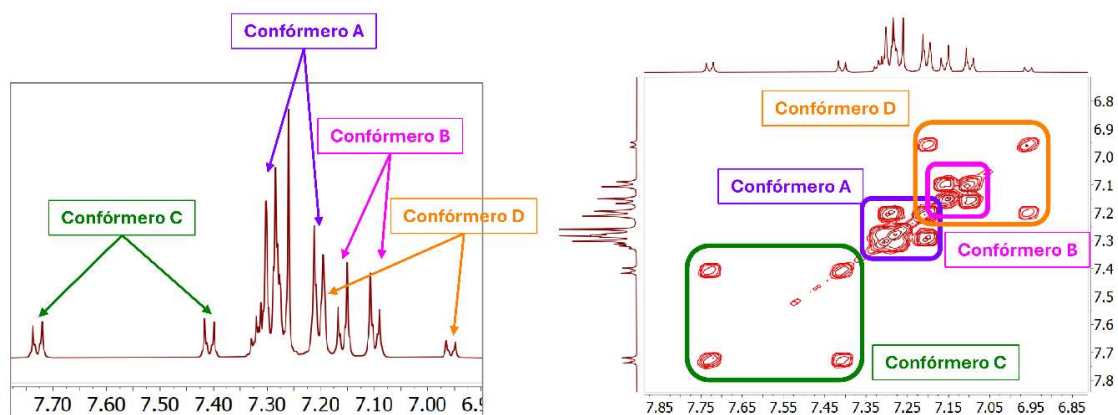


Figura 5.16: Ampliaciones de los espectros de **CIC1-9**: RMN ^1H (izquierda); COSY (derecha).

Para confirmar la remoción del grupo protector, se llevó a cabo un análisis detallado de la región de campo bajo del espectro de RMN ^{13}C . Como se puede apreciar en la Figura 5.17, se observan dos señales de carbonilos distintas: una a 178,7 ppm, correspondiente al carbonilo del ácido graso, y otra señal a 172,6 ppm, originada por el carbonilo remanente del bloque isonitrilo. Es importante destacar que se pudo detectar la presencia de señales duplicadas, e incluso triplicadas, de estos picos, debido a la presencia de los confórmeros.

Además, se verificó la correcta desprotección del ciclen, ya que no se observaron señales de los carbonilos del puente, que suelen ubicarse típicamente alrededor de 160 ppm. Este análisis confirma de manera concluyente el éxito del proceso de clivaje del grupo protector.

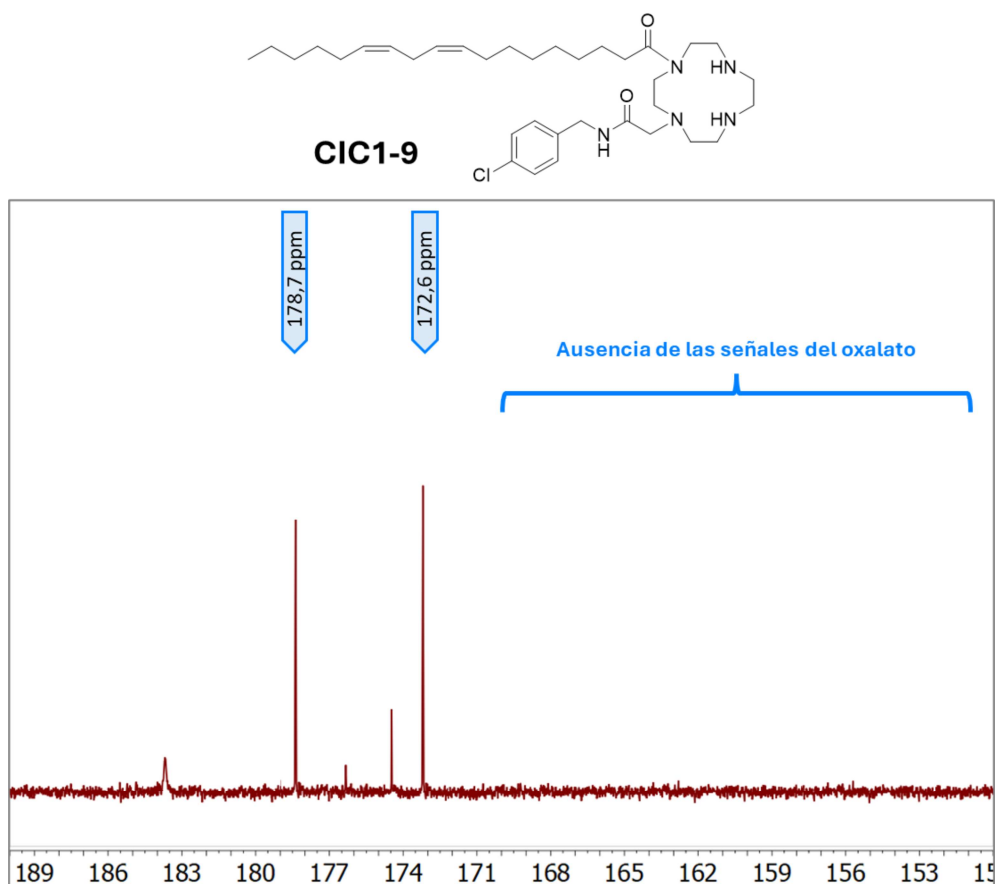
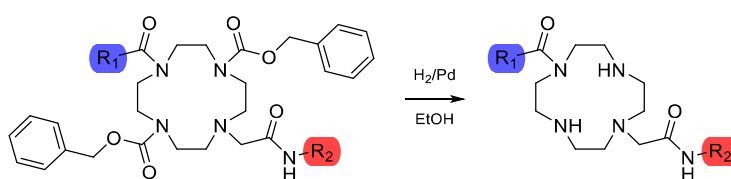


Figura 5.17: Ampliación del espectro de RMN ^{13}C de **CIC1-9**.

Por otro lado, se removió el grupo Cbz de los aductos Ugi Split con patrón de sustitución 1,7 (Esquema 5.10).



Esquema 5.10: Desprotección de los productos Ugi Split con patrón de sustitución 1,7.

Este proceso de desprotección se realizó por hidrogenólisis disolviendo en etanol absoluto cada uno de los compuestos y agregando paladio (10% sobre carbón) como catalizador. La mezcla resultante se sometió a una hidrogenación en condiciones suaves a presión atmosférica durante un período de 48 horas. Posteriormente, el catalizador se separó por filtración y el solvente se eliminó al vacío para concentrar la solución. Los aceites resultantes de esta reacción se disolvieron entonces en éter etílico, y la solución se extrajo

con una solución acuosa de hidróxido de sodio para obtener los productos finales como aceites con excelentes rendimientos, como se muestra en la Figura 5.18.

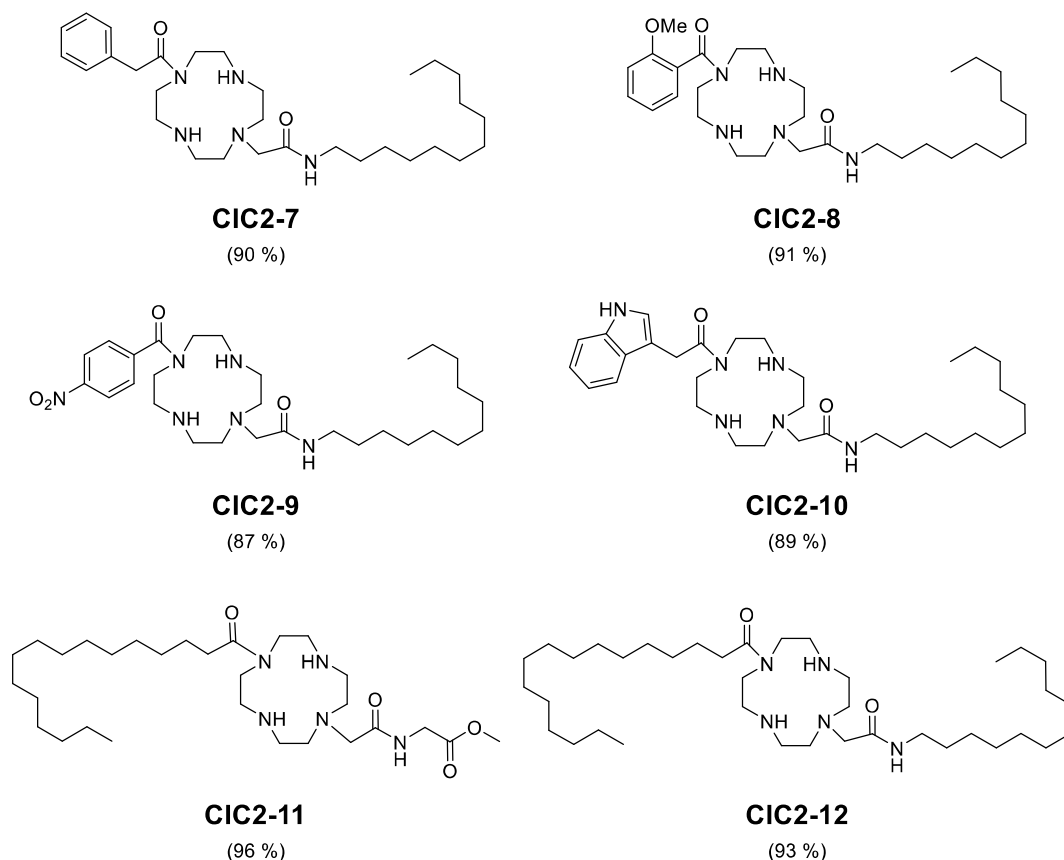


Figura 5.18: Productos Ugi Split desprotegido con patrón de sustitución 1,7.

El análisis de RMN de los productos mostró cierta similitud entre ellos, debido a que presentaron señales anchas para los metilenos del ciclen, y muchas veces también un ensanchamiento para las señales originadas por las cadenas alifáticas. En el caso de la caracterización por RMN ^1H de **CIC2-11** (Figura 5.19) se evidenció la presencia de un único triplete a campos bajos proveniente del H de la amida, mientras que todo el resto de las señales se encontraban por debajo de 4 ppm. Entre aquellas señales se puede destacar la presencia del doblete **b** del isonitrilo y dos singuletes **c** y **d** del OCH_3 y del formaldehído, respectivamente. Además, algunas señales características del ácido linoleico, como son las señales **e**, **f** y **g**. Hay que remarcar que estas últimas salieron significativamente más anchas que en otras oportunidades. En la zona comprendida entre 3,2 y 2,6 ppm se observaron varias señales anchas y poco resueltas, asignadas a los metilenos del ciclen.

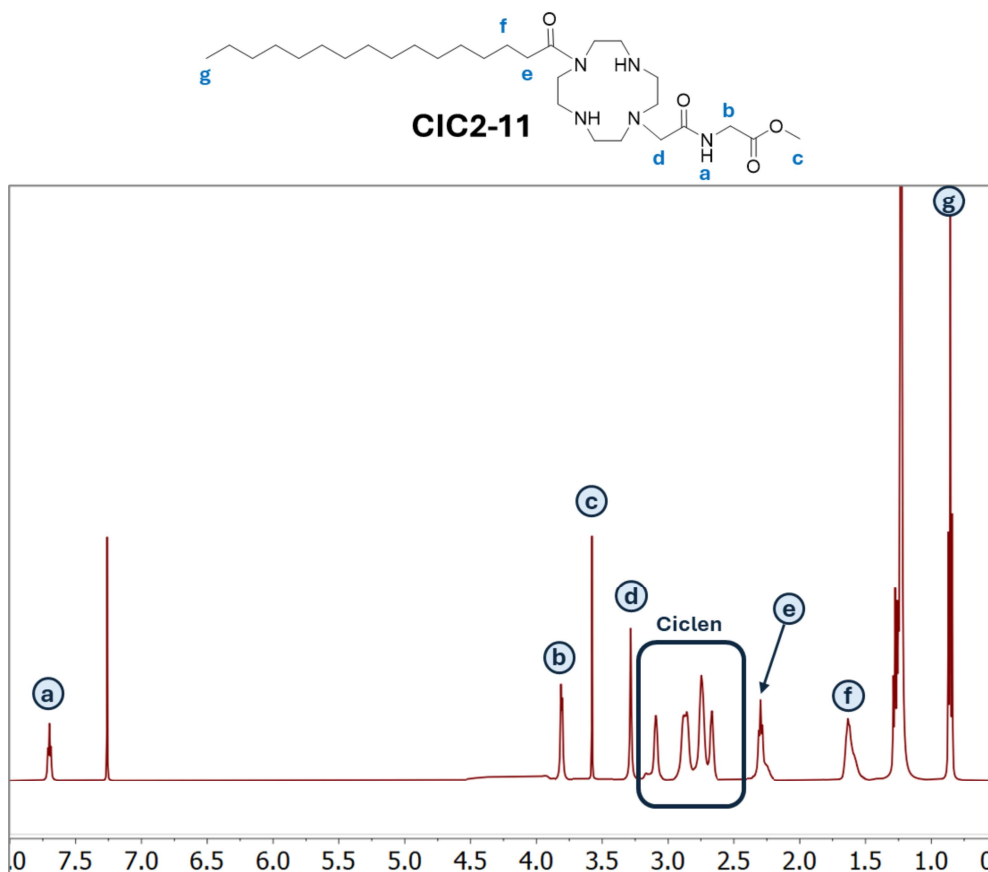


Figura 5.19: Espectro de RMN ^1H de **CIC2-11**.

Con el espectro de correlación heteronuclear (HSQC) (Figura 5.20) se pudieron asignar inequívocamente los picos de los C. Por ejemplo, en la ampliación se ilustra la correlación característica del formaldehído (3,28 ppm; 60,5 ppm), como así también se observa el acoplamiento del metileno α al carbonilo del ácido graso entre el triplete a 2,27 ppm y el C a 33,6 ppm. Asimismo, en aquella región del espectro HSQC se pueden contemplar las señales de acoplamiento de todos los metilenos del ciclen.

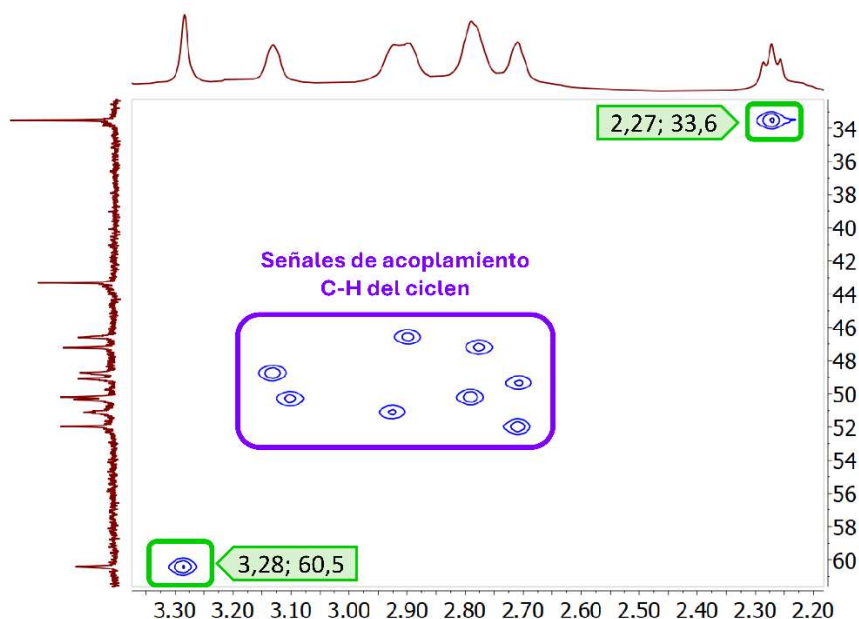


Figura 5.20: Ampliación del espectro HSQC de **CIC2-11**.

Caracterización de los compuestos como potenciales pPNs.

En las secciones anteriores se mostró que, si se elige una secuencia adecuada, la reacción Ugi Split puede aplicarse al ciclen para obtener derivados de manera regioselectiva. Este resultado abrió la posibilidad de utilizar a este macrociclo como bloque de construcción dentro del marco del diseño *de novo* de potenciales pPNs. Sin embargo, a diferencia de los capítulos previos, donde la estrategia se apoyaba en la utilización de fragmentos con presencia en PNs existentes, aquí el esqueleto central no tiene un correlato directo con rutas biosintéticas conocidas. El ciclen es un macrociclo enteramente sintético y, precisamente por ello, resulta especialmente interesante evaluar si, al combinarlo con fragmentos que sí se encuentran en PNs, los compuestos derivados ocupan regiones del espacio químico de estos. Para ello, se aplicó el mismo criterio de análisis discutido en capítulos previos, realizando un PCA de esta biblioteca junto con la base PN-T. El objetivo fue, por un lado, cuantificar la diversidad de los nuevos compuestos incluidos en la biblioteca, y por otro, poner a prueba la hipótesis de que un bloque artificial puede integrarse en la lógica de diseño de los pPNs.

En este contexto surgió una discusión sobre los intermediarios de síntesis. Inicialmente, no se consideró incluirlos como productos relevantes dentro del análisis, dado que contenían grupos protectores introducidos exclusivamente con fines sintéticos. Sin embargo, una revisión de las bases de datos de PNs reveló que algunos compuestos

presentan carbamatos estables como parte de sus esqueletos, y que también se han identificado metabolitos con nitrógenos involucrados en puentes 1,2-dioxo (Figura 5.21), lo cual demuestra que este tipo de subestructuras no es ajeno a rutas biosintéticas posibles. Estos hallazgos motivaron la inclusión de los 12 intermediarios en el análisis, a pesar de que su obtención no formaba parte del diseño original.

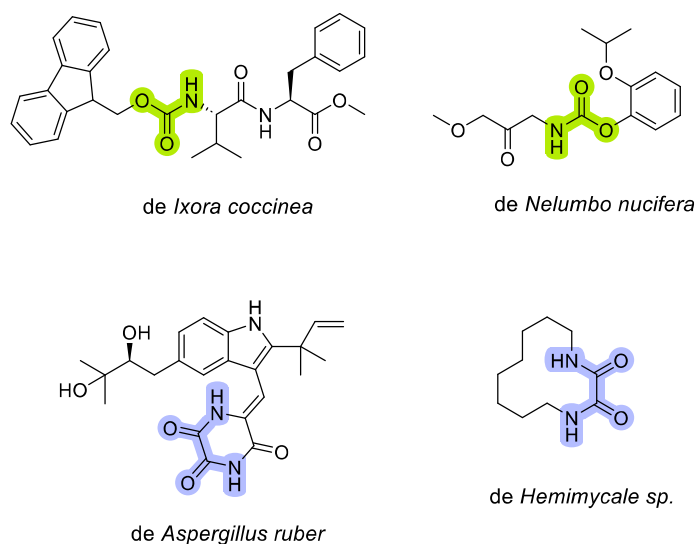


Figura 5.21: Ejemplos de PNs con grupos funcionales de carbamatos y estructuras tipo puente 1,2-dioxo cíclicas.

Como siempre, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) incorporando a la biblioteca de ciclen junto con la base PN-T, caracterizados por los 22 descriptores seleccionados para esta tesis. Las proyecciones de las cinco primeras componentes principales, mostradas en la Figura 5.22, permiten evaluar tanto el posicionamiento de los compuestos finales en relación con la nube de PNs, como el impacto de los intermediarios que contienen grupos protectores.

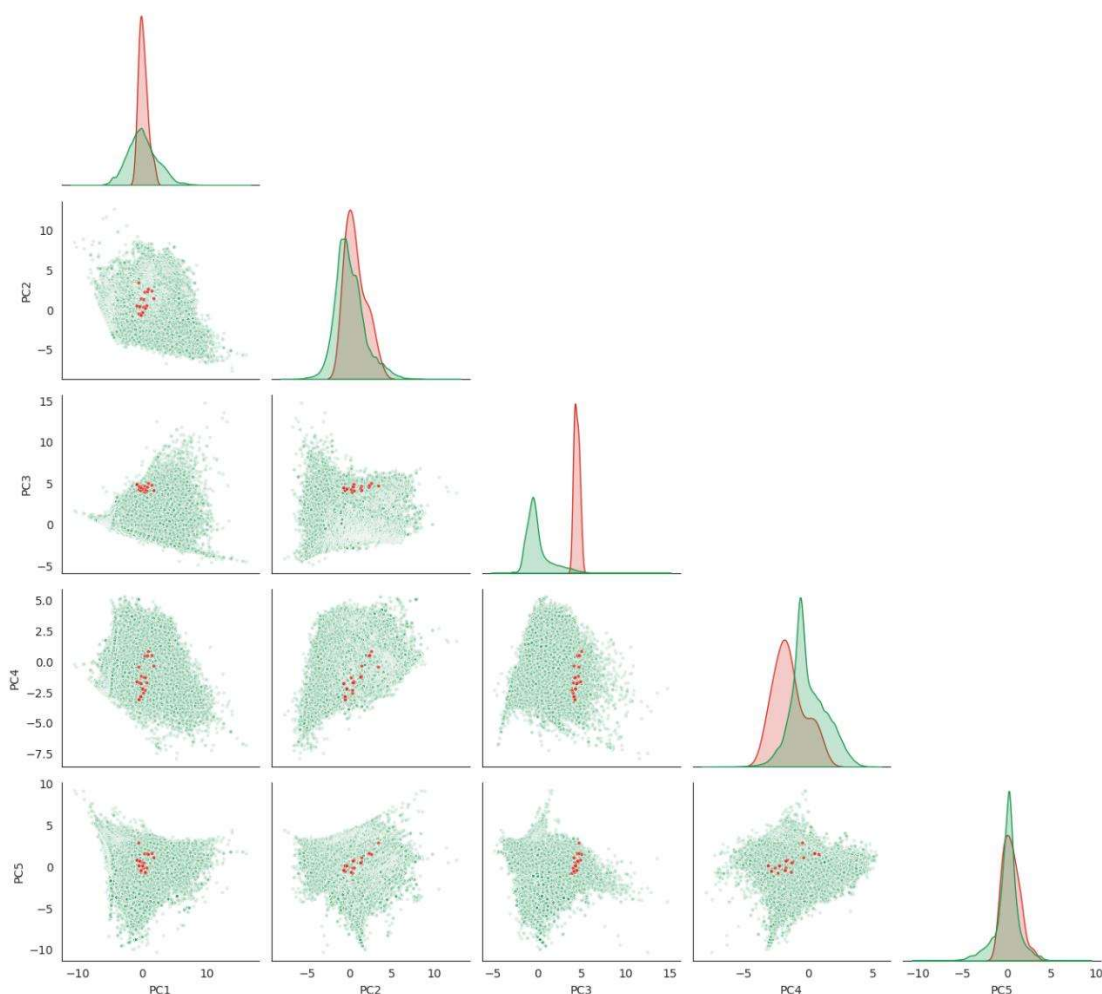


Figura 5.22: Pair plot: PN-T (verde), biblioteca de compuestos sintetizados **CIC1** y **CIC2** (rojo).

Se observa que la biblioteca basada en el ciclen (en rojo) se ubica en el interior del espacio químico de referencia de PNs (en verde), sin desplazarse hacia regiones periféricas. Esto sugiere que, a pesar de estar contruidos sobre un macrociclo artificial, los compuestos mantienen propiedades globales consistentes con las de los PNs. Al igual que en el caso de las bibliotecas mostradas en los capítulos previos, la separación más clara respecto de la base aparece en PC3, donde los histogramas muestran un corrimiento definido en relación con los PNs, un comportamiento que puede explicarse en base a la mayor cantidad promedio de nitrógenos en general, y de grupos amida en particular, que nuestros compuestos presentan frente a la mayoría de los metabolitos especializados.

En este punto, resulta pertinente discutir que la elección de ciclen en lugar de piperazina para la generación de esta nueva biblioteca se justificó, en gran medida, por el objetivo de diversificar la química accesible mediante la reacción de Ugi Split, así como por el desafío

sintético que implicó alcanzar la regioselectividad requerida. Este aspecto obligó a implementar estrategias experimentales específicas y, en consecuencia, abrió la posibilidad de explorar nuevas rutas sintéticas en términos de control y diseño. Al mismo tiempo, este cambio no constituye únicamente un ejercicio metodológico: tiene consecuencias directas sobre la arquitectura de las moléculas finales, ya que el ciclen introduce un motivo macrocíclico de doce miembros, ubicando a esta familia en un territorio estructural ampliamente explorado por la naturaleza.

Los PNs macrocíclicos constituyen una clase sumamente relevante en Química Medicinal, que incluye péptidos cíclicos como el pre-sclerotiotido F, aislado del hongo marino *Aspergillus insulicola*³⁸, poliquétidos macrocíclicos como la eritromicina y la epotilona A (un inhibidor de la polimerización de la tubulina aislado de la myxobacteria *Sorangium cellulosum*³⁹), y terpenoides como el klyflaccembranol A (producido por el coral *Klyxum flaccidum*⁴⁰, Figura 5.23). Estos compuestos, a pesar de sus diferentes orígenes biosintéticos, comparten la presencia de anillos grandes que condicionan su conformación, su flexibilidad y su capacidad de interacción con blancos biológicos de gran superficie. En muchos casos, es precisamente la arquitectura macrocíclica la que confiere ventajas como estabilidad frente a la hidrólisis, permeabilidad modulada o capacidad de adoptar conformaciones bioactivas restringidas.

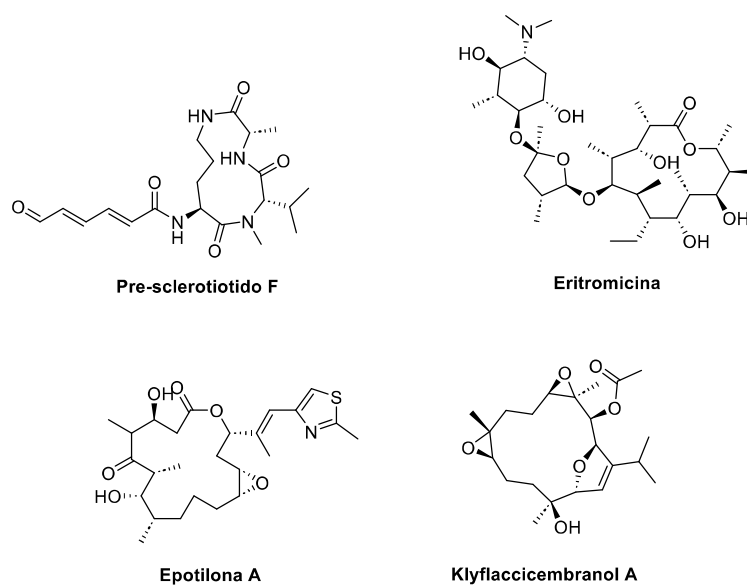


Figura 5.23: Ejemplos de PNs macrocíclicos relevantes en Química Medicinal.

Entonces, resulta pertinente preguntarse qué lugar ocupan los macrociclos dentro de la biblioteca de referencia de PNs que utilizamos como comparación. Si bien no es un análisis exhaustivo, podemos ver que de los 180399 PNs de la base PN-T que recopilamos de COCONUT, 13128 contienen un anillo de al menos 12 miembros (tamaño que suele tomarse como el mínimo para una molécula macrocíclica), lo cual corresponde a un 7.3% de los compuestos. Analizando la base mencionada, y según las etiquetas aportadas por COCONUT, puede verse el origen biosintético de esos PNs, tal como se muestra en la Tabla 5.1.

Categoría	N compuestos	Porcentaje (%)
Alcaloides	2032	15.48
Péptidos	4514	34.38
Policétidos	3544	27.00
Fenilpropanoides y shikimatos	352	2.68
Terpenoides	2686	20.64

Tabla 5.1: Resultados del análisis del origen de los PN-T macrocíclicos.

Como se comentó, todos los compuestos fueron seleccionados siguiendo la definición más aceptada para *macrociclos*, entendida en un sentido estructural amplio como aquellas moléculas que poseen un anillo de doce o más miembros. Sin embargo, esta definición es puramente topológica y probablemente no logra capturar la diversidad química del conjunto, ya que dentro de esta clase se incluyen PNs de orígenes biosintéticos muy diferentes (por ejemplo, policétidos, péptidos, híbridos policétido-peptídicos, entre otros). Este solapamiento plantea un interrogante conceptual: ¿la categoría *macrociclo* constituye por sí sola un grupo químicamente coherente, o más bien funciona como un “contenedor” de familias de compuestos profundamente heterogéneas? Para responder a esta cuestión resulta pertinente evaluar si las propiedades moleculares se correlacionan con las etiquetas de origen biosintético.

Para explorar la relación entre las propiedades moleculares y las etiquetas de origen biosintético, se aplicaron distintos enfoques de análisis multivariado. En una primera instancia, se empleó un análisis PCA como herramienta exploratoria no supervisada. Esta técnica no permitió observar agrupamientos de acuerdo con las clases biosintéticas, lo que sugiere que la categoría “macrociclo” abarca moléculas con propiedades muy diversas y sin separación evidente.

Posteriormente, se utilizaron métodos supervisados orientados a maximizar la separación entre clases, como el análisis discriminante lineal (LDA), en el cual las funciones discriminantes se calculan de forma que la variabilidad entre clases se maximice respecto de la variabilidad intraclase. Además, se entrenó un clasificador del tipo *Random Forest*.

Random Forest es un método de aprendizaje automático utilizado tanto para tareas de clasificación (predecir la categoría a la que pertenece un elemento) como de regresión (predecir un valor numérico). Su funcionamiento se basa en la generación de múltiples árboles de decisión durante el proceso de entrenamiento, cuya combinación permite obtener una predicción final más robusta y precisa. La idea central consiste en aprovechar la "opinión" conjunta de numerosos "expertos" individuales (los árboles), en lugar de depender de un único modelo, lo que contribuye a reducir el sobreajuste y mejorar el rendimiento general.

Para construir cada árbol, el algoritmo toma una muestra aleatoria de los datos originales y, al decidir cómo dividir los datos en cada rama, considera únicamente un subconjunto aleatorio de las características disponibles. Una vez generados todos los árboles, se les presenta un nuevo dato para que cada uno emita su propia predicción. La predicción final del modelo *Random Forest* se obtiene mediante el voto mayoritario (en tareas de clasificación) o mediante el promedio de todas las predicciones individuales (en tareas de regresión).

En esencia, *Random Forest* permite construir modelos predictivos potentes y estables. Sus principales ventajas incluyen una alta precisión, robustez frente al sobreajuste (es decir, evitar memorizar los datos en lugar de aprender patrones generales), y la capacidad de identificar las características más relevantes en la toma de decisiones. En este caso, el modelo permitió clasificar los nuevos compuestos (**CIC**), mostrando que se agrupan principalmente con los alcaloides y péptidos.

En estos casos, al incorporar la información de clase mediante métodos supervisados, se evidenció que los descriptores moleculares poseen un alto poder discriminante. El LDA alcanzó una exactitud promedio de 0.848, lo que indica una separación lineal significativa entre las distintas clases. Esto se refleja en la proyección LDA mostrada en la Figura 5.24, donde se observan agrupamientos correspondientes a cada origen biosintético: los policétidos y terpenoides conforman conjuntos bien delimitados, mientras que los péptidos y fenilpropanoides presentan mayor solapamiento en la región central.

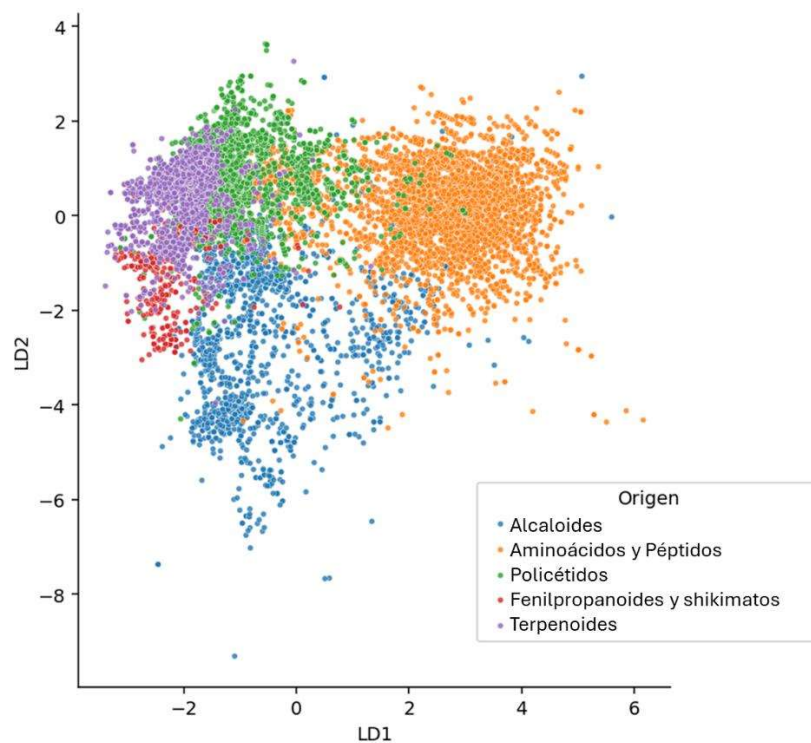


Figura 5.24: Proyección bidimensional LDA de los PNs según su origen biosintético.

Más aún, el modelo de *Random Forest* mejoró significativamente el desempeño, alcanzando una exactitud promedio de 0.978. Este resultado evidencia que la combinación de propiedades seleccionadas permite predecir con gran precisión la procedencia biosintética de los compuestos. Los resultados se visualizan en la matriz de confusión correspondiente (Figura 5.25).

Una matriz de confusión es una tabla que resume el rendimiento de un modelo de clasificación, representando visualmente sus aciertos y errores. Compara las clases reales de los datos con las clases predichas por el modelo. La diagonal principal indica las clasificaciones correctas, mientras que los valores fuera de la diagonal representan errores, especificando qué clases fueron confundidas entre sí. Su propósito es ofrecer un análisis detallado del desempeño del modelo, más allá de la simple exactitud, al permitir la identificación de patrones específicos de error.

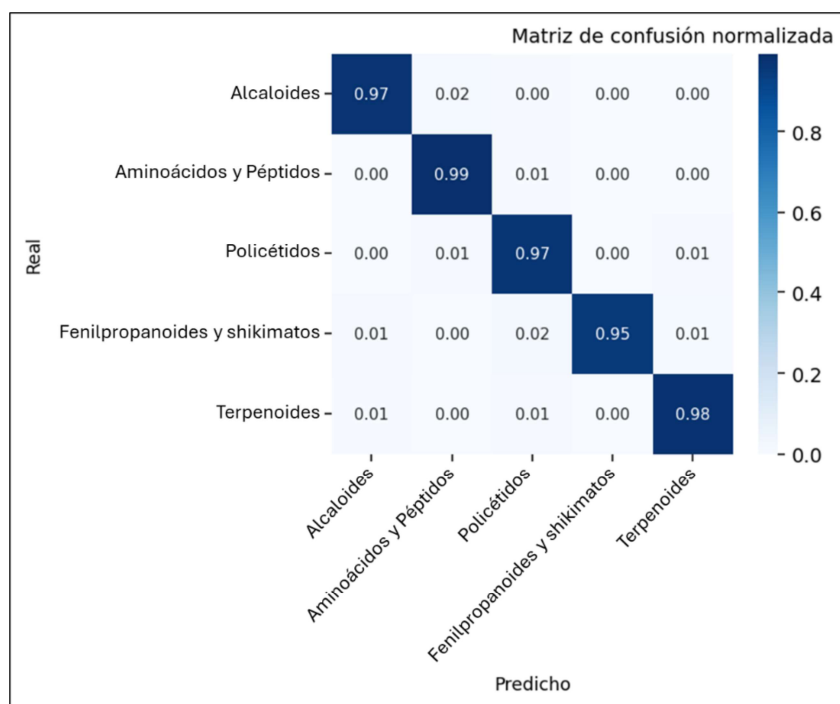


Figura 5.25: Matriz de confusión normalizada de los PN según su origen biosintético.

Una vez caracterizadas las distintas clases de PN macrocíclicos, y teniendo disponible un modelo clasificador para estos PN, la pregunta siguiente es si los compuestos **CIC** diseñados, a pesar de estar basados en un bloque enteramente sintético, comparten con ellos alguna de las características que la naturaleza ha seleccionado y conservado.

Esta relación entre los compuestos sintéticos (**CIC**) y los macrociclos naturales de referencia se evaluó proyectando los **CIC** sobre el modelo de *Random Forest* previamente entrenado. El clasificador asignó la mayoría de los **CIC** a la clase *Alcaloides* (18 compuestos), y el resto a *Péptidos* (6 compuestos).

Esta predicción se representa en la Figura 5.26 mediante un mapa t-SNE, construido a partir de las probabilidades de clasificación generadas por el modelo. La técnica t-SNE (*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) es un algoritmo de aprendizaje no supervisado empleado principalmente para la reducción de dimensionalidad, con el propósito de facilitar la visualización de conjuntos de datos complejos. Su función consiste en transformar datos definidos en espacios de alta dimensionalidad —como en este caso, compuestos químicos caracterizados por múltiples descriptores moleculares— y proyectarlos en un espacio de menor dimensión, típicamente bidimensional, que permita una interpretación visual más accesible.

El principio fundamental de t-SNE es preservar la estructura local de los datos. El algoritmo modela las similitudes entre los puntos de datos en el espacio original de alta dimensión y busca optimizar una representación en el espacio de baja dimensión que conserve estas relaciones de vecindad. En otras palabras, los puntos que son cercanos o similares en el espacio original son mapeados para que también aparezcan cercanos en el gráfico de dos dimensiones, mientras que los puntos diferentes son ubicados a mayor distancia. Este proceso da como resultado la formación de agrupaciones o "clústeres" visualmente distinguibles, que revelan la estructura intrínseca del conjunto de datos.

En el contexto de esta Tesis, la técnica t-SNE se empleó como una herramienta de validación y exploración visual para los resultados obtenidos del clasificador *Random Forest*. El mapa t-SNE permitió representar gráficamente la proximidad relativa de los compuestos sintéticos (**CIC**) con respecto a las clases biosintéticas de los PNs de referencia. Al observar que los compuestos **CIC**, destacados en rojo, se agruparon en regiones adyacentes a los alcaloides (azul) y péptidos (naranja), el mapa corroboró visualmente la asignación de clases que el modelo predictivo había realizado, facilitando así la interpretación de las relaciones quimioinformáticas entre las moléculas sintetizadas y las familias de PNs.

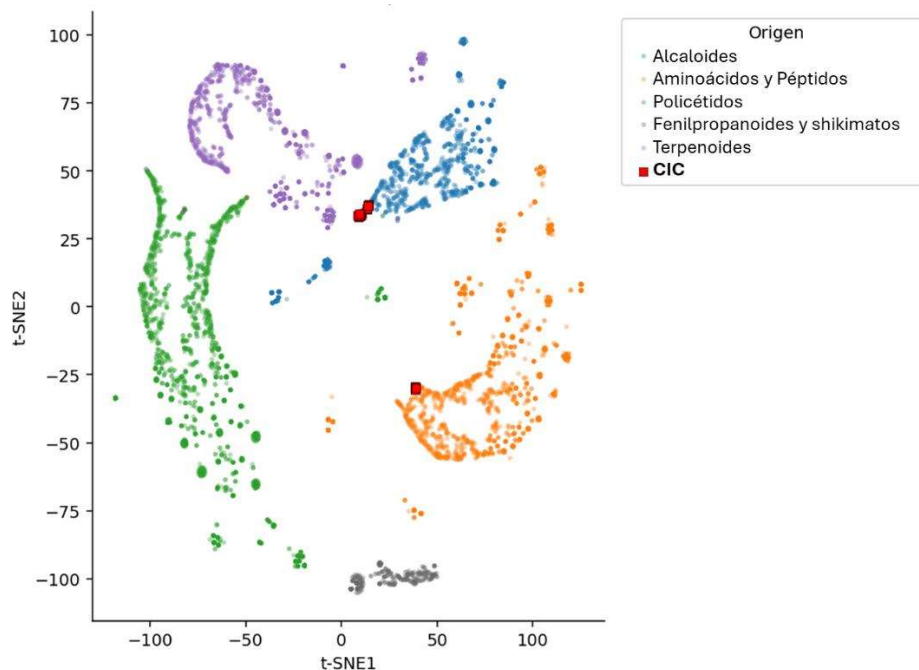


Figura 5.26: Mapa t-SNE según clasificación de Random Forest.

En conjunto, los análisis quimioinformáticos realizados demuestran que la estrategia de combinar un macrociclo sintético como el ciclen con fragmentos de distinta procedencia biosintética permite generar compuestos que se integran de manera coherente en el espacio químico de los PNs. El hecho de que los **CIC** se agrupen en regiones adyacentes a alcaloides y péptidos, y que el modelo de *Random Forest* los clasifique mayoritariamente en esas clases, sugiere que bloques sin correlato biosintético directo pueden dar lugar a arquitecturas que conservan las propiedades globales de metabolitos especializados. Este hallazgo refuerza el potencial del diseño *de novo* de pPNs, al demostrar que es posible expandirlo más allá de los bloques naturales y, aun así, obtener moléculas con perfiles químicos comparables a los seleccionados por la evolución.

Para poner a prueba si esta estrategia de diseño efectivamente conduce a moléculas con propiedades biológicas relevantes, se evaluó la biblioteca de pPNs **CIC** en distintos ensayos fenotípicos.

Ensayos biológicos

Los pPNs sintetizados fueron evaluados mediante ensayos biológicos fenotípicos, con el objetivo de identificar posibles actividades biológicas. Al igual que con las demás familias sintetizadas a lo largo de esta Tesis, se emplearon ensayos antifúngicos y antiproliferativos para determinar la actividad de los pPNs.

Ensayos antifúngicos

En esta fase, tras la síntesis de la biblioteca compuesta por 24 compuestos, se inició la evaluación de sus propiedades antifúngicas. Con tal propósito, se recurrió nuevamente al empleo de una técnica cualitativa de *screening* conocida como bioautografía. Este método se aplicó contra *Fusarium solani* (FS) realizando la medición del diámetro de los halos de inhibición luego de 48 h. de incubación (Tabla 5.2).

CIC1-1	CIC1-2	CIC1-3	CIC1-4	CIC1-5	CIC1-6	CIC1-7	CIC1-8	CIC1-9	CIC1-10	CIC1-11	CIC1-12
0	0.3	0.1	0.1	0	0.2	2.15	1.55	1.15	2	1.05	1.65
CIC2-1	CIC2-2	CIC2-3	CIC2-4	CIC2-5	CIC2-6	CIC2-7	CIC2-8	CIC2-9	CIC2-10	CIC2-11	CIC2-12
0	0	0	0	0	0	0.1	0	0	0.1	0	0

Tabla 5.2: Valores de diámetro de inhibición evaluado contra FS.

Del análisis de los resultados obtenidos para la serie de compuestos protegidos se observa que, en todos los casos, los diámetros de inhibición frente a *Fusarium solani* fueron nulos o cercanos a cero. En el patrón de sustitución 1,4 de los compuestos protegidos, **CIC1-1** a **CIC1-6** presentaron únicamente halos de inhibición mínimos, con diámetros que no superaron los 0,3 cm. Estos valores, además de ser muy reducidos, no evidencian una tendencia clara que permita atribuirles un efecto antifúngico intrínseco relevante dentro de esta subfamilia. La situación fue aún más marcada en el patrón de sustitución 1,7 de los compuestos protegidos (compuestos **CIC2-1** a **CIC2-6**), donde la totalidad de los ensayos arrojó un valor de 0 cm, lo que indica una ausencia completa de actividad bajo las condiciones experimentales empleadas. En contraste, los resultados obtenidos para los compuestos desprotegidos mostraron una diferencia significativa entre ambos patrones de sustitución en términos de diámetro de inhibición.

En conjunto, estos resultados permiten establecer que la protección de los nitrógenos del ciclen en ambas series de compuestos conduce a una drástica disminución, e incluso anulación, de la actividad biológica. Esto sugiere que los fragmentos enmascarados durante el proceso de protección cumplen un rol esencial en la interacción con el blanco biológico, probablemente a través de la formación de enlaces de hidrógeno, interacciones polares o la generación de una conformación más favorable para la unión. La pérdida de estas interacciones críticas explicaría la ausencia de halos de inhibición significativos en los compuestos protegidos.

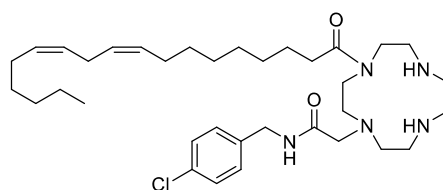
Por lo tanto, puede concluirse que la protección química de los grupos activos limita severamente la capacidad antifúngica de la biblioteca, resaltando la importancia de la desprotección como condición indispensable para la manifestación de la actividad observada en los compuestos análogos libres.

Aunque el halo de inhibición observado para ninguno de los compuestos fue significativamente amplio, ciertas observaciones sugieren direcciones prometedoras para investigaciones adicionales. Se notó que sólo los compuestos desprotegidos con un patrón de sustitución 1,4 demostraron cierta actividad, mientras que aquellos con sustitución 1,7 no lo hicieron. Este hallazgo apunta hacia la importancia del patrón de sustitución en la actividad antifúngica de los compuestos evaluados.

Este fenómeno podría indicar la existencia de un mecanismo de acción específico asociado con los compuestos 1,4-disustituídos, lo que justificaría una investigación más detallada sobre su modo de acción. Además, este resultado sugiere la posibilidad de

realizar modificaciones estructurales específicas para mejorar la actividad antifúngica. La búsqueda de compuestos con patrones de sustitución 1,4 más activos podría ser una estrategia prometedora para optimizar la actividad antifúngica de la biblioteca de compuestos evaluados. Aunque no es el objetivo de esta Tesis, estos hallazgos resaltan la importancia de comprender la relación entre la estructura química y la actividad biológica, y subrayan la necesidad de explorar a fondo el potencial terapéutico de los compuestos con sustitución 1,4 en aplicaciones antifúngicas.

Para los compuestos que manifestaron halos de inhibición significativos en la bioautografía, se llevó a cabo la determinación del valor de la MIC contra *Fusarium solani* (FS), *Fusarium tucumaniae* (FT) y *Fusarium graminearum* (FG), empleando el mismo protocolo experimental utilizado en secciones previas. Los resultados obtenidos de estos análisis revelaron que el compuesto más activo de esta serie, compuesto **CIC1-9** (Figura 5.27), presenta una actividad selectiva contra FG, evidenciada por un valor de MIC de 40,6 μM , en contraste con las concentraciones observadas para las otras cepas evaluadas, que fueron el doble o hasta cuatro veces mayores.



CIC1-9

MIC FS: 162,3 μM

MIC FT: 81,1 μM

MIC FG: 40,6 μM

Figura 5.27: MICs de **CIC1-9**.

Si bien esos valores no son particularmente llamativos comparado con los antifúngicos comerciales empleados como control, Pyraclostrobin (MIC FG: 1,0 μM) y Carbendazim (MIC FG: 8,2 μM), es un puntapié inicial para intentar mejorar sus propiedades como potencial agente contra patógenos fúngicos específico.

Ensayos antiproliferativos

Con el fin de detectar posibles compuestos tóxicos, se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar su capacidad como inhibidores de la proliferación celular. Para ello, se trataron

cultivos de distintas líneas celulares con todos los compuestos a una concentración final de 50 μM durante 72 h., con el fin de detectar de manera rápida y cualitativa su citotoxicidad (Tabla 5.3).

	CIC1-1	CIC1-2	CIC1-3	CIC1-4	CIC1-5	CIC1-6	CIC1-7	CIC1-8	CIC1-9	CIC1-10	CIC1-11	CIC1-12
CRFK	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Vero	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
A549	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no

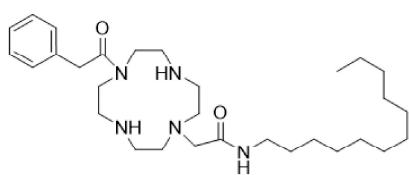
	CIC2-1	CIC2-2	CIC2-3	CIC2-4	CIC2-5	CIC2-6	CIC2-7	CIC2-8	CIC2-9	CIC2-10	CIC2-11	CIC2-12
CRFK	sí	no	no	no	no	no	sí	sí	sí	no	sí	sí
Vero	no	sí	no	no	no	no	sí	sí	sí	no	sí	sí
A549	sí	no	no	no	no	no	sí	sí	sí	no	sí	sí

Tabla 5.3: Resultados cualitativos de la actividad citotóxica en distintas líneas celulares.

Del análisis preliminar de la Tabla 5.3 se desprende que, en términos generales, los compuestos citotóxicos correspondieron a los desprotegidos, en particular aquellos con el patrón de sustitución 1,7, con excepción del compuesto **CIC2-10**.

Una vez identificados rápidamente los compuestos activos mediante el *screening*, se procedió a su caracterización mediante la determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), definida como la concentración necesaria para alcanzar un 50% de inhibición del efecto antiproliferativo. Para ello, se evaluó la inhibición en distintas líneas celulares a diferentes concentraciones, ajustando los datos obtenidos mediante un modelo matemático adecuado.

Los compuestos más activos, **CIC2-7**, **CIC2-8** y **CIC2-9**, mostraron valores de IC_{50} de aproximadamente 10 μM , 50 μM y 50 μM , respectivamente. Estos valores resultan comparables—e incluso superiores en el caso de **CIC2-7**— al IC_{50} de 37 μM registrado para el 5-fluorouracilo, fármaco citotóxico de uso clínico evaluado en condiciones experimentales equivalentes (Figura 5.28).

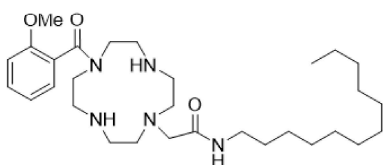
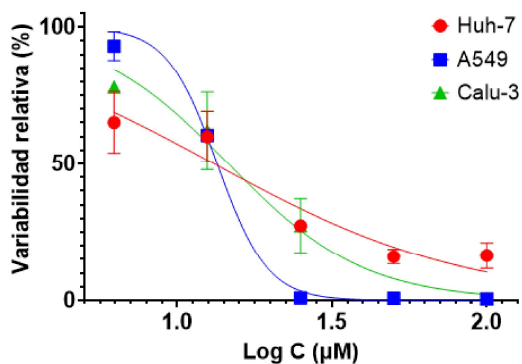


CIC2-7

IC₅₀ Huh-7 = 13,16 μM

IC₅₀ A549 = 13,46 μM

IC₅₀ Calu-3 = 16,63 μM

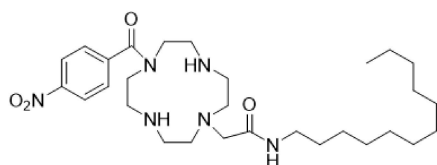
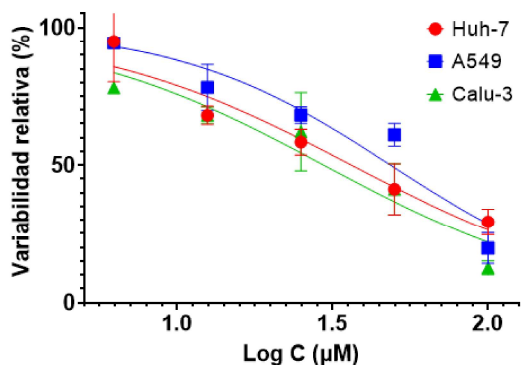


CIC2-8

IC₅₀ Huh-7 = 36,43 μM

IC₅₀ A549 = 48,64 μM

IC₅₀ Calu-3 = 29,65 μM



CIC2-9

IC₅₀ Huh-7 = 15,13 μM

IC₅₀ A549 = 49,22 μM

IC₅₀ Calu-3 = 50,57 μM

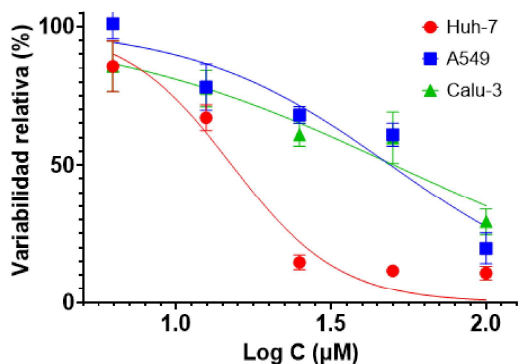


Figura 5.28: IC₅₀ para distintas líneas celulares de **CIC2-7**, **CIC2-8** y **CIC2-9**.

Analizando los resultados obtenidos de los IC₅₀, se puede notar que **CIC2-7** presenta valores similares para las tres líneas celulares estudiadas, a diferencia de **CIC2-9**, que mostró una selectividad para las células Huh-7. Otra observación interesante que se desprende de la observación de las estructuras es que tanto la identidad y posición del sustituyente aromático, como la existencia de un espaciador de tipo metileno entre el carbonilo de la amida y el anillo parecen tener un efecto directo en su actividad antiproliferativa.

Los valores de IC₅₀ obtenidos para los compuestos **CIC2-7**, **CIC2-8** y **CIC2-9** revelan diferencias significativas en su perfil antiproliferativo. **CIC2-7** mostró una actividad consistente en las tres líneas celulares evaluadas, lo que sugiere un efecto citotóxico generalizado. En cambio, **CIC2-9** presentó una marcada selectividad hacia las células Huh-7, mientras que en A549 y Calu-3 los valores fueron considerablemente más altos. **CIC2-8** mostró una actividad intermedia, con valores más elevados y menos uniformes entre líneas.

Aunque la diversidad estructural de los compuestos obtenidos no permite establecer relaciones concluyentes entre estructura y actividad, es posible extraer algunas observaciones preliminares. Las diferencias en la actividad antiproliferativa parecen estar vinculadas a características estructurales específicas: tanto la identidad y posición del sustituyente aromático como la presencia de un espaciador tipo metileno entre el carbonilo de la amida y el anillo podrían influir directamente en el perfil bioactivo de los compuestos.

Referencias

- (1) Zhang, K.; Dou, W.; Tang, X.; Yang, L.; Ju, Z.; Cui, Y.; Liu, W. Selective and Sensitive Time-Gated Luminescence Detection of Hydrogen Sulfide. *Tetrahedron Letters* **2015**, *56* (21), 2707–2709. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.04.012>.
- (2) Xu, H.-R.; Li, K.; Liu, Q.; Wu, T.-M.; Wang, M.-Q.; Hou, J.-T.; Huang, Z.; Xie, Y.-M.; Yu, X.-Q. Dianthracene–Cyclen Conjugate: The First Equal-Equivalent Responding Fluorescent Chemosensor for Pb²⁺ in Aqueous Solution. *Analyst* **2013**, *138* (8), 2329. <https://doi.org/10.1039/c3an36789d>.
- (3) Wang, M.-Q.; Li, K.; Hou, J.-T.; Wu, M.-Y.; Huang, Z.; Yu, X.-Q. BINOL-Based Fluorescent Sensor for Recognition of Cu(II) and Sulfide Anion in Water. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (18), 8350–8354. <https://doi.org/10.1021/jo301196m>.
- (4) M. P. Lima, L.; Tripiier, R. Cyclen-Based Lanthanide Complexes as Luminescent Anion Receptors. *CIC* **2011**, *1* (1), 36–60. <https://doi.org/10.2174/1877944111101010036>.
- (5) *Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents*; Braddock, M., Ed.; Drug Discovery; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2011. <https://doi.org/10.1039/9781849732918>.

- (6) Mewis, R. E.; Archibald, S. J. Biomedical Applications of Macrocyclic Ligand Complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, *254* (15–16), 1686–1712. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.02.025>.
- (7) Tanaka, K.; Fukase, K. PET (Positron Emission Tomography) Imaging of Biomolecules Using Metal–DOTA Complexes: A New Collaborative Challenge by Chemists, Biologists, and Physicians for Future Diagnostics and Exploration of in Vivo Dynamics. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (5), 815. <https://doi.org/10.1039/b718157b>.
- (8) Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 957–1057. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363>.
- (9) Giovenzana, G. B.; Lattuada, L.; Negri, R. Recent Advances in Bifunctional Paramagnetic Chelates for MRI. *Israel Journal of Chemistry* **2017**, *57* (9), 825–832. <https://doi.org/10.1002/ijch.201700028>.
- (10) *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Second edition.; Merbach, A. E., Helm, L., Tóth, É., Eds.; Wiley: Chichester, West Sussex, 2013.
- (11) Geraldes, C. F. G. C.; Laurent, S. Classification and Basic Properties of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Contrast Media & Molecular* **2009**, *4* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1002/cmml.265>.
- (12) Hermann, P.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Lukeš, I. Gadolinium(III) Complexes as MRI Contrast Agents: Ligand Design and Properties of the Complexes. *Dalton Trans.* **2008**, No. 23, 3027. <https://doi.org/10.1039/b719704g>.
- (13) Piersanti, G.; Remi, F.; Fusi, V.; Formica, M.; Giorgi, L.; Zappia, G. Direct Preparation of Unsymmetrical Difunctionalized Cyclen Derivatives by an Ugi Multicomponent Reaction. *Org. Lett.* **2009**, *11* (2), 417–420. <https://doi.org/10.1021/ol802674r>.
- (14) Massue, J.; Plush, S. E.; Bonnet, C. S.; Moore, D. A.; Gunnlaugsson, T. Selective Mono N-Alkylations of Cyclen in One Step Syntheses. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48* (45), 8052–8055. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.022>.
- (15) Que, E. L.; Chang, C. J. A Smart Magnetic Resonance Contrast Agent for Selective Copper Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (50), 15942–15943. <https://doi.org/10.1021/ja065264l>.

- (16) Li, C.; Wong, W.-T. Luminescent Heptadentate Tb³⁺ Complex with Pendant Aza-15-Crown-5 Showing Recognition of Lactate and Salicylate in Aqueous Solution. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45* (31), 6055–6058. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.06.063>.
- (17) Li, C.; Wong, W.-T. A Convenient Method for the Preparation of Mono N-Alkylated Cyclams and Cyclens in High Yields. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43* (17), 3217–3220. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00497-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00497-5).
- (18) Eisenwiener, K.-P.; Powell, P.; Mäcke, H. R. A Convenient Synthesis of Novel Bifunctional Prochelators for Coupling to Bioactive Peptides for Radiometal Labelling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, *10* (18), 2133–2135. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00413-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00413-3).
- (19) Peterson, J. J.; Pak, R. H.; Meares, C. F. Total Solid-Phase Synthesis of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-*N*, *N'*, *N''*, *N'''*-Tetraacetic Acid-Functionalized Peptides for Radioimmunotherapy. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10* (2), 316–320. <https://doi.org/10.1021/bc980118t>.
- (20) Heppeler, A.; Froidevaux, S.; Mäcke, H. R.; Jermann, E.; Béhé, M.; Powell, P.; Hennig, M. Radiometal-Labelled Macrocyclic Chelator-Derivatised Somatostatin Analogue with Superb Tumour-Targeting Properties and Potential for Receptor-Mediated Internal Radiotherapy. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5* (7), 1974–1981. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3765\(19990702\)5:7<1974::AID-CHEM1974>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19990702)5:7<1974::AID-CHEM1974>3.0.CO;2-X).
- (21) Anelli, P. L.; Calabi, L.; Dapporto, P.; Murru, M.; Paleari, L.; Paoli, P.; Uggeri, F.; Verona, S.; Virtuani, M. Highly Regioselective Access to 7-Substituted 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1-Carbaldehyde Derivatives: Synthetic Aspects and NMR Elucidation of the Structures. X-Ray Crystal Structures of 7-Triphenylmethyl-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1-Carbaldehyde and 7-Triphenylmethyloctahydro-5H,9bH-2a,4a,7,9a-Tetraazacycloocta [Cd] Pentalene. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, No. 23, 2995. <https://doi.org/10.1039/p19950002995>.
- (22) Meunier, I.; Mishra, A. K.; Hanquet, B.; Guilard, R.; Cocolios, P. Synthesis and Characterization of Various Unsubstituted and Mono-N-Substituted Tetraazamacrocycles. *Can. J. Chem.* **1995**, *73* (5), 685–695. <https://doi.org/10.1139/v95-087>.
- (23) Skwierawska, A. M. Selective Monoprotection of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane via Direct Reaction with 4-Nitrophenyl Active Esters. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49* (44), 6308–6310. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.08.059>.

- (24) Ito, H.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Ueno, T.; Komatsu, T.; Nagano, T.; Urano, Y. Detection of NAD(P)H-Dependent Enzyme Activity with Dynamic Luminescence Quenching of Terbium Complexes. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (39), 8319–8322. <https://doi.org/10.1039/C5CC01613D>.
- (25) Aoki, S.; Kawatani, H.; Goto, T.; Kimura, E.; Shiro, M. A Double-Functionalized Cyclen with Carbamoyl and Dansyl Groups (Cyclen = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane): A Selective Fluorescent Probe for Y^{3+} and La^{3+} . *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (6), 1123–1132. <https://doi.org/10.1021/ja0033786>.
- (26) Boldrini, V.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R.; Palmisano, G.; Sisti, M. Expedient N-Monoalkylation of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (Cyclen) via Formamido Protection. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41 (33), 6527–6530. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01092-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01092-3).
- (27) Kimura, E.; Aoki, S.; Koike, T.; Shiro, M. A Tris(Zn^{II} -1,4,7,10-Tetraazacyclododecane) Complex as a New Receptor for Phosphate Dianions in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (13), 3068–3076. <https://doi.org/10.1021/ja9640408>.
- (28) Brandès, S.; Lacour, S.; Denat, F.; Pullumbi, P.; Guillard, R. Convenient Synthesis of New Tetraazamacrocyclic-Based Macrobicycles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, No. 4, 639–642. <https://doi.org/10.1039/a708390d>.
- (29) Dischino, D. D.; Delaney, E. J.; Emswiler, J. E.; Gaughan, G. T.; Prasad, J. S.; Srivastava, S. K.; Tweedle, M. F. Synthesis of Nonionic Gadolinium Chelates Useful as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: 1,4,7-Tris(Carboxymethyl)-10-Substituted-1,4,7,10-Tetraazacyclododecanes and Their Corresponding Gadolinium Chelates. *Inorg. Chem.* **1991**, 30 (6), 1265–1269. <https://doi.org/10.1021/ic00006a020>.
- (30) Platzek, J.; Blaszkiewicz, P.; Gries, H.; Luger, P.; Michl, G.; Müller-Fahrnow, A.; Radüchel, B.; Sülzle, D. Synthesis and Structure of a New Macrocyclic Polyhydroxylated Gadolinium Chelate Used as a Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging. *Inorg. Chem.* **1997**, 36 (26), 6086–6093. <https://doi.org/10.1021/ic970123t>.
- (31) Ferrand, A.; Imbert, D.; Chauvin, A.; Vandevyver, C. D. B.; Bünzli, J. G. Non-Cytotoxic, Bifunctional Eu^{III} and Tb^{III} Luminescent Macrocyclic Complexes for Luminescence Resonant Energy-Transfer Experiments. *Chemistry A European J* **2007**, 13 (31), 8678–8687. <https://doi.org/10.1002/chem.200700819>.

- (32) Ripa, G.; Scala, A.; Murru, M.; Panetta, E.; Viscardi, C. F.; Ausonio, M. A Process for the Preparation of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-Triacetic Acid and the Derivatives Thereof. WO1998056776A1, December 17, 1998.
- (33) Tweedle, M. F. The ProHance Story: The Making of a Novel MRI Contrast Agent: *Eur Radiol* **1997**, 7 (S5), S225–S230. <https://doi.org/10.1007/PL00006897>.
- (34) Yoo, J.; Reichert, D. E.; Welch, M. J. Comparative in Vivo Behavior Studies of Cyclen-Based Copper-64 Complexes: Regioselective Synthesis, X-Ray Structure, Radiochemistry, Log *P*, and Biodistribution. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (26), 6625–6637. <https://doi.org/10.1021/jm0496990>.
- (35) Kovacs, Z.; Sherry, A. D. pH-Controlled Selective Protection of Polyaza Macrocycles. *Synthesis* **1997**, 1997 (07), 759–763. <https://doi.org/10.1055/s-1997-1418>.
- (36) Kovacs, Z.; Sherry, A. D. A General Synthesis of 1,7-Disubstituted 1,4,7,10-Tetraazacyclododecanes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, No. 2, 185. <https://doi.org/10.1039/c39950000185>.
- (37) Zangger, K. Pure Shift NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2015**, 86–87, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2015.02.002>.
- (38) Wu, Q. X.; Jin, X. J.; Draskovic, M.; Crews, M. S.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Yao, X. J.; Crews, P. Unraveling the Numerous Biosynthetic Products of the Marine Sediment-Derived Fungus, *Aspergillus Insulicola*. *Phytochemistry Letters* **2012**, 5 (1), 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.11.005>.
- (39) Forli, S. Epothilones: From Discovery to Clinical Trials. *Curr Top Med Chem* **2014**, 14 (20), 2312–2321. <https://doi.org/10.2174/1568026614666141130095855>.
- (40) Ahmed, A.; Tsai, C.-R.; Huang, C.-Y.; Wang, S.-Y.; Sheu, J.-H. Klyflaccicembranols A–I, New Cembranoids from the Soft Coral *Klyxum Flaccidum*. *Marine Drugs* **2017**, 15 (1), 23. <https://doi.org/10.3390/md15010023>.

Capítulo 6

Discusión General

CAPÍTULO 6: Discusión General

La Síntesis Orgánica como Productora de Propiedades: El Paradigma de Hammond y el Propósito de la Síntesis

George S. Hammond, uno de los pioneros de la química orgánica física y célebre por la enunciación del postulado que lleva su nombre, planteaba ya en 1968 una visión que trasciende la práctica cotidiana del laboratorio para interrogar el propósito fundamental de la disciplina: “*the most fundamental and lasting objective of synthesis is not production of new compounds, but production of properties*”. Esta afirmación, realizada en un momento en que la síntesis orgánica se consolidaba como disciplina, expresaba una perspectiva madura sobre el objetivo químico. Desde este punto de vista, la síntesis no es un fin en sí mismo, sino un medio para un objetivo superior: la capacidad de transformar la materia en sistemas con propiedades inéditas, expandiendo deliberadamente los horizontes de lo que la propia naturaleza ha generado a través de la evolución.

En la misma línea, puede decirse que el verdadero propósito de la Síntesis Orgánica, especialmente en su aplicación a la química medicinal y la biología química, va más allá de la mera obtención de nuevas sustancias. El foco principal radica en las propiedades que emergen como resultado de una arquitectura molecular específica. De entre todas estas propiedades, una de las más significativas por sus implicancias, pero también de las más desafiantes de descubrir y racionalizar, es el efecto que estas nuevas entidades químicas pueden ejercer sobre los complejos sistemas biológicos. Aunque el arte de la síntesis ha avanzado de forma considerable y hoy en día se dispone de un arsenal de herramientas conceptuales y tecnológicas para producir una gama casi ilimitada de nuevas moléculas, la ciencia todavía se encuentra en etapas iniciales para comprender y, sobre todo, para predecir cómo la presencia de una estructura novedosa incidirá en la intrincada red de interacciones que define a un organismo vivo.

Marco de Análisis para las Bibliotecas de la Presente Tesis: El Paisaje Químico Interno

Bajo esta perspectiva, los resultados de la presente Tesis deben ser analizados no en términos de la mera cantidad de compuestos obtenidos, sino de las propiedades colectivas que lograron expresarse como consecuencia de cada decisión de diseño. Cada

biblioteca generada —las familias **PIP1**, **PIP2** y **CIC**— representa, en esencia, una hipótesis materializada sobre cómo la reorganización de fragmentos estructurales específicos, ensamblados mediante una lógica sintética definida, puede dar lugar a conjuntos de moléculas con una firma fisicoquímica y funcional particular.

Con este objetivo, se vuelve necesario realizar un análisis comparativo que contraste las tres bibliotecas generadas en este trabajo con la colección desarrollada por nuestro grupo en 2012, de la cual derivan conceptualmente los compuestos de esta Tesis. La inclusión de esa serie inicial en el análisis es metodológicamente crucial, ya que funciona como un punto de referencia o una línea de base. Permite evaluar en qué medida las estrategias de diseño posteriores —la incorporación del heterociclo de piperazina, la decoración con fragmentos terpénicos de alta complejidad, o la construcción de un andamio macrocíclico— fueron modulando la diversidad estructural y fisicoquímica. Este enfoque comparativo nos permitirá dilucidar si todas las colecciones comparten un espacio químico común o si, por el contrario, cada estrategia logró explorar un nicho diferenciado.

Para abordar esta cuestión de manera cuantitativa, se aplicaron las técnicas de análisis multivariado que fueron introducidas y justificadas en capítulos anteriores. El primer abordaje, de naturaleza exploratoria, consistió en un análisis de componentes principales (PCA). Como se discutió previamente, esta técnica no supervisada resulta especialmente adecuada como paso inicial, ya que permite explorar la distribución global de las cuatro bibliotecas en el espacio definido por los descriptores moleculares, revelando las tendencias de varianza intrínsecas y los patrones de agrupamiento naturales sin imponer ninguna clasificación *a priori*.

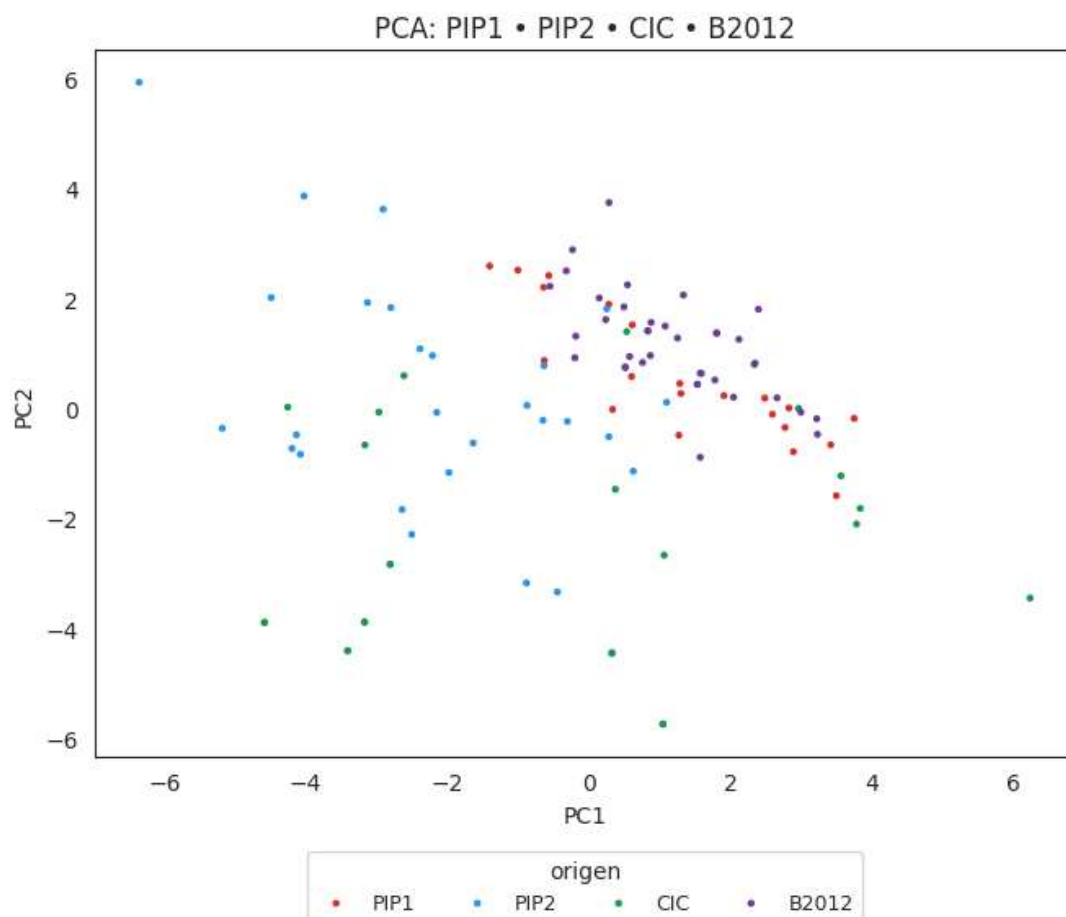


Figura 6.1: Proyección bidimensional de PCA de las familias de pPNs sintetizadas en esta Tesis y la colección sintetizada en 2012 por nuestro grupo.

Como se muestra en la Figura 6.1, la proyección de las cuatro bibliotecas de compuestos (**PIP1**, **PIP2**, **CIC** y los acil lipopeptoides descritos en 2012 y etiquetados como la serie de referencia **B2012**) sobre el espacio definido por las dos primeras componentes principales (PCs) revela un panorama de considerable solapamiento. Las nubes de puntos correspondientes a cada familia no forman agrupamientos nítidos y separados, sino que se superponen extensamente. Este resultado inicial sugiere que todas las bibliotecas comparten un núcleo de propiedades fisicoquímicas comunes, lo cual es coherente con el hecho de que todas se derivan de una estrategia sintética análoga, basada en reacciones multicomponente.

Sin embargo, una inspección más detallada de la distribución advierte matices relevantes. Se observa que la colección **PIP2** (mostrada en azul) presenta una dispersión significativamente más amplia que las demás y se desplaza hacia valores negativos de la

primera componente principal (PC1). Recordando el análisis de cargas presentado en el Capítulo 2, la PC1 está fuertemente influenciada por descriptores de polaridad (como la superficie polar relativa y la proporción de heteroátomos) en oposición a la lipofilidad (cLogP). El desplazamiento de la familia **PIP2** hacia esta región del espacio es una consecuencia directa de su diseño, donde se incorporaron deliberadamente fragmentos terpénicos y policíclicos de alta complejidad y riqueza en carbono sp^3 , como la estructura rígida del ácido giberélico o los derivados del alcanfor. Este comportamiento sugiere que, aunque globalmente las bibliotecas comparten un origen común, la estrategia de diseño aplicada en **PIP2** fue exitosa en introducir una variabilidad estructural y fisicoquímica adicional, expandiendo la exploración hacia una región del espacio de propiedades que las otras colecciones no cubren con la misma extensión.

Si bien el PCA es útil para visualizar la varianza global, su naturaleza no supervisada limita su capacidad para resolver clústeres que se solapan. Para profundizar en las diferencias sistemáticas entre las colecciones, se aplicó un análisis discriminante lineal (LDA). El resultado, presentado en la Figura 6.2, es inequívoco y notorio: en el plano definido por las dos primeras funciones discriminantes (LDA1 y LDA2), las cuatro bibliotecas se proyectan en dominios claramente diferenciados, con una segregación prácticamente perfecta.

Esta separación tan marcada refleja que, aunque globalmente los compuestos convergen en un mismo espacio químico, cada biblioteca exhibe una "firma" estructural distintiva. Las decisiones de diseño tomadas en cada capítulo —la elección del heterociclo central (piperazina vs. ciclen), el grado de funcionalización, la presencia de motivos terpénicos o la imposición de una topología macrocíclica— introducen patrones sistemáticos en los descriptores moleculares, que el LDA es capaz de amplificar para construir direcciones de máxima discriminación.

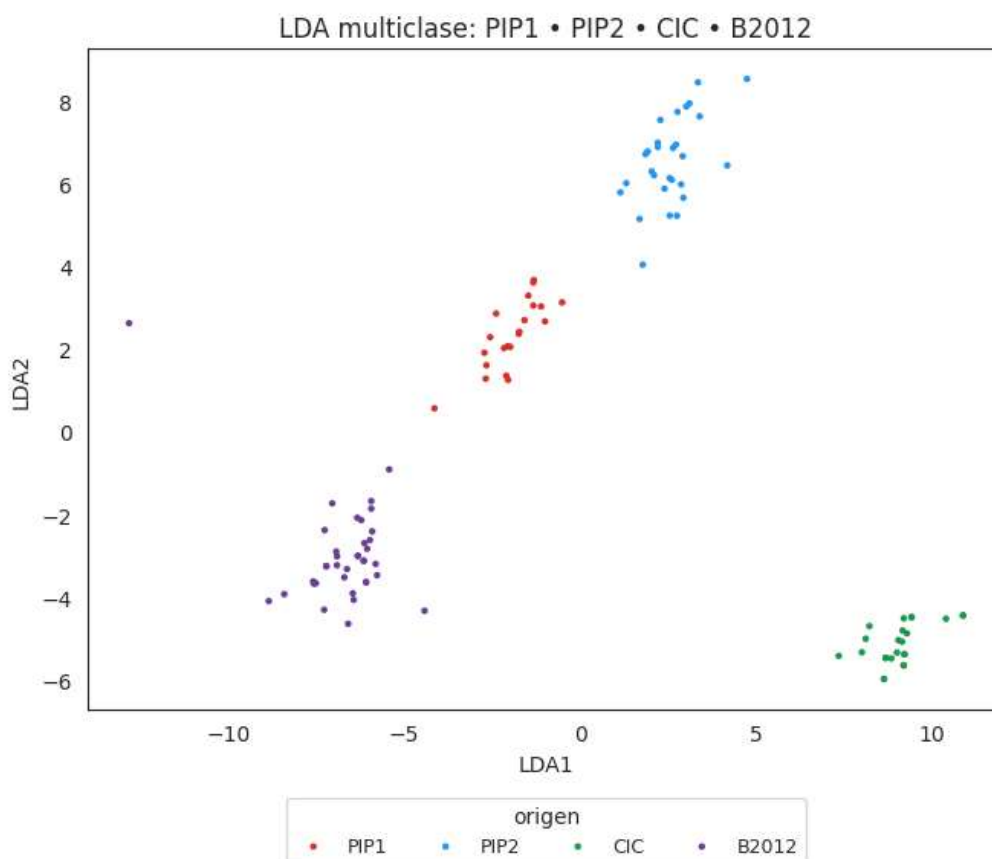


Figura 6.2: Proyección bidimensional de LDA de las familias de pPNs sintetizadas en esta Tesis y la colección sintetizada en 2012 por nuestro grupo.

El análisis de la contribución de cada descriptor a estas funciones permite interpretar la naturaleza química según cada uno de los ejes de separación. En el caso de la interpretación del eje discriminante LDA1 se puede notar que este eje separa a las bibliotecas principalmente según un gradiente de topología y composición heteroatómica. Hacia los valores positivos de LDA1 se ubican los compuestos caracterizados por la presencia de anillos grandes, un alto número de nitrógenos básicos y una mayor solubilidad acuosa relativa. Estos rasgos definen a la familia **CIC**, construida sobre el andamio macrocíclico del ciclen. En el extremo opuesto, con valores negativos, se sitúan las moléculas con mayor flexibilidad conformacional (más enlaces rotables), una mayor densidad de grupos amida y oxígeno, y una superficie polar relativa más elevada, perfil que describe a la perfección a la serie lineal **B2012**. Las dos bibliotecas basadas en piperazina (**PIP1** y **PIP2**) ocupan, lógicamente, posiciones intermedias.

En cuanto a la interpretación del eje discriminante LDA2 se puede ver que este segundo eje refleja una tensión entre la complejidad tridimensional y la flexibilidad. Los valores positivos de LDA2 están fuertemente asociados a descriptores de rigidez y saturación, como el número de cierres de anillo, la presencia de carbonos puenteados y una elevada fracción de carbonos sp^3 . Estos rasgos son la firma inconfundible de la colección **PIP2**, donde se incorporaron bloques terpénicos inherentemente tridimensionales. En contraste, los valores negativos corresponden a descriptores asociados con arquitecturas más abiertas y flexibles, lo que describe bien a los derivados de **CIC** y, en menor medida, a los de la serie **B2012**. **PIP1** vuelve a ocupar una posición intermedia, sin rasgos tan marcados hacia ninguno de los polos.

En conjunto, la proyección LDA muestra con una nitidez inequívoca que cada biblioteca posee una firma estructural propia y reconocible: los derivados de ciclen **CIC** destacan por su macrociclo con alto contenido de nitrógenos, **PIP2** por su carácter policíclico y rico en oxígenos, y la serie de 2012 por su flexibilidad y abundancia de amidas. Este análisis valida la eficacia de las estrategias de diseño implementadas, demostrando que modificaciones racionales en la selección de fragmentos y andamios conducen a familias de compuestos con perfiles de propiedades sistemáticamente distintos y controlados.

El Paisaje Químico Externo: Posicionamiento de los pPNs en el Contexto Global

Una vez establecido que cada una de las bibliotecas sintetizadas en esta Tesis posee una firma estructural propia y distinguible, surge de manera natural la necesidad de visitar la hipótesis central que las engloba: si estos compuestos pueden ser considerados, de manera rigurosa, como pseudo productos naturales (pPNs). En principio, esta cuestión no puede resolverse de forma concluyente únicamente a partir de la comparación interna entre ellas. Definir el carácter "pseudo natural" requiere, por necesidad, un contraste con colecciones de referencia externas que sirvan como arquetipos de los universos "natural" y "sintético".

En particular, se recurrió a dos universos complementarios, seleccionados para representar los polos de este espectro. Por un lado, se utilizó, como anteriormente, la base de datos de productos naturales PN-T, recopilada y curada como parte de esta Tesis a partir de la base COCONUT, la cual funciona como nuestro estándar de oro para el "espacio químico natural". Por otro lado, se seleccionó una biblioteca de moléculas sintéticas comerciales de la empresa Enamine (Hit Locator Library-200), diseñada

específicamente para campañas de *screening* de alta densidad. Esta última representa el "espacio sintético convencional", un universo de moléculas a menudo optimizado para la accesibilidad sintética a gran escala y el cumplimiento de reglas fisicoquímicas simples. El análisis mediante PCA de nuestras bibliotecas en el contexto de cada uno de estos dos espacios de referencia permitiría evaluar si su distribución respalda el criterio conceptual que define a un pPN: una molécula que emula las propiedades de los productos naturales (PNs) mientras se aleja de las características típicas de los compuestos sintéticos de cribado.

Como se ilustra en la Figura 6.3, cuando se proyectaron las bibliotecas sintetizadas sobre el espacio PCA entrenado exclusivamente con PNs, se observó un resultado de fundamental importancia: los pPNs sintetizados a lo largo de esta Tesis (en rojo) no se sitúan en regiones periféricas ni externas al espacio definido por los metabolitos naturales (en verde), sino que se localizan de manera inequívoca en su interior. Si bien es cierto que forman un conjunto más compacto y restringido en comparación con la vasta dispersión de los PNs, un resultado esperable dada la inmensa diversidad estructural generada por millones de años de evolución frente a una colección de diseño limitado, sus distribuciones se solapan de manera significativa con las de la referencia en prácticamente todas las PCs. Esta afinidad en el espacio de propiedades globales refuerza la idea de que las moléculas diseñadas, a pesar de su origen puramente sintético, conservan características fisicoquímicas y topológicas (como rangos de peso molecular, polaridad, flexibilidad y tridimensionalidad) que son consistentes con las de los PNs. Esta coincidencia constituye un criterio esencial y una primera validación experimental para que puedan ser considerados como pPNs.

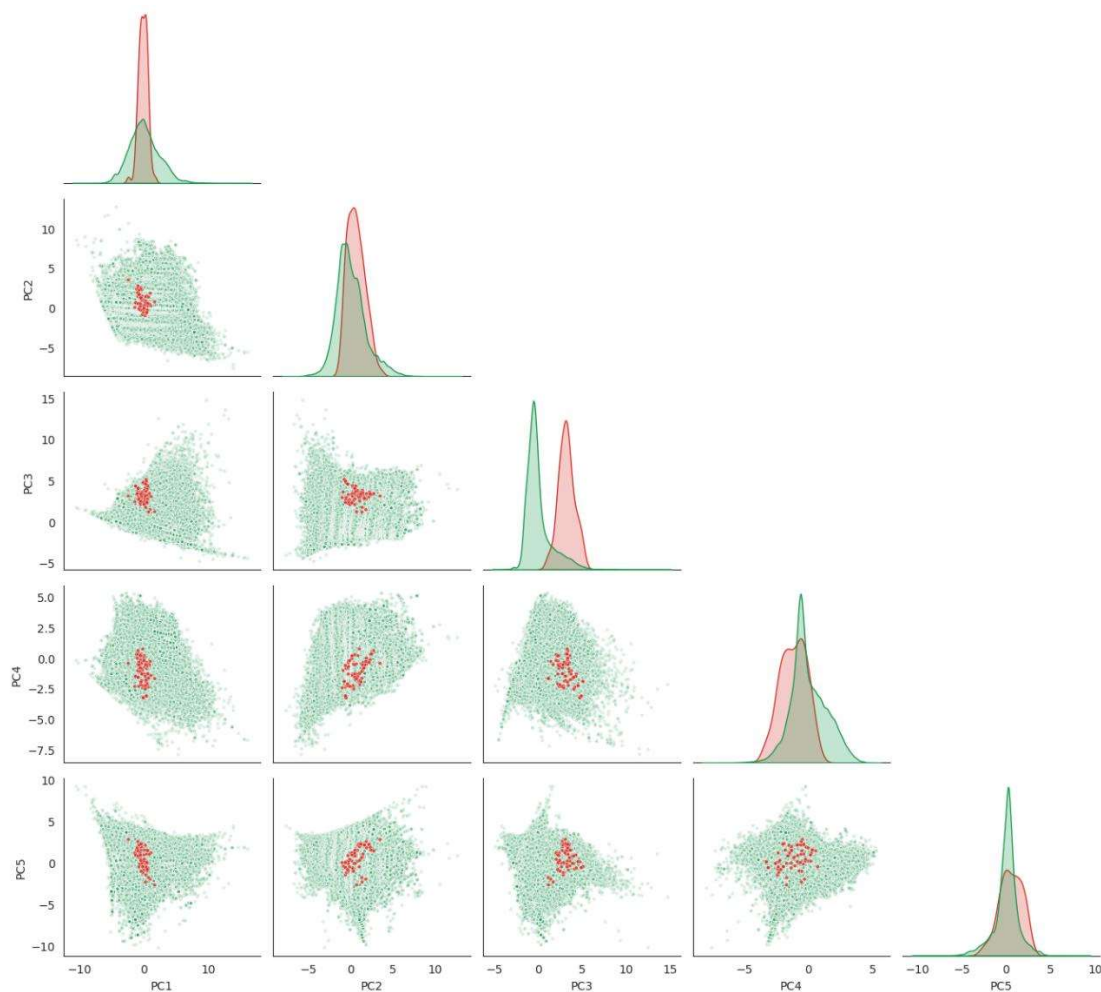


Figura 6.3: Pair plot de los PNs (verde) y los pPNs sintetizados en esta Tesis (rojo).

Por el contrario, cuando se realizó el mismo análisis proyectando los pPNs sobre la base de datos de compuestos sintéticos de Enamine (Figura 6.4), el panorama fue marcadamente diferente. En este caso, los pPNs (en rojo) no se superponen de manera homogénea con la densa nube de moléculas comerciales (en amarillo). En su lugar, tienden a proyectarse en regiones laterales del espacio PCA, a menudo en zonas de baja densidad poblacional. Aunque algunos compuestos se ubican cerca del dominio central, la mayoría aparece sistemáticamente desplazada. Este comportamiento indica que, en términos de propiedades globales, los pPNs sintetizados no reproducen el perfil típico de una biblioteca de screening comercial. Ocupan un dominio diferenciado que los distancia del "espacio sintético convencional", el cual está a menudo dominado por estructuras más planas, menos complejas y con una distribución de heteroátomos diferente.

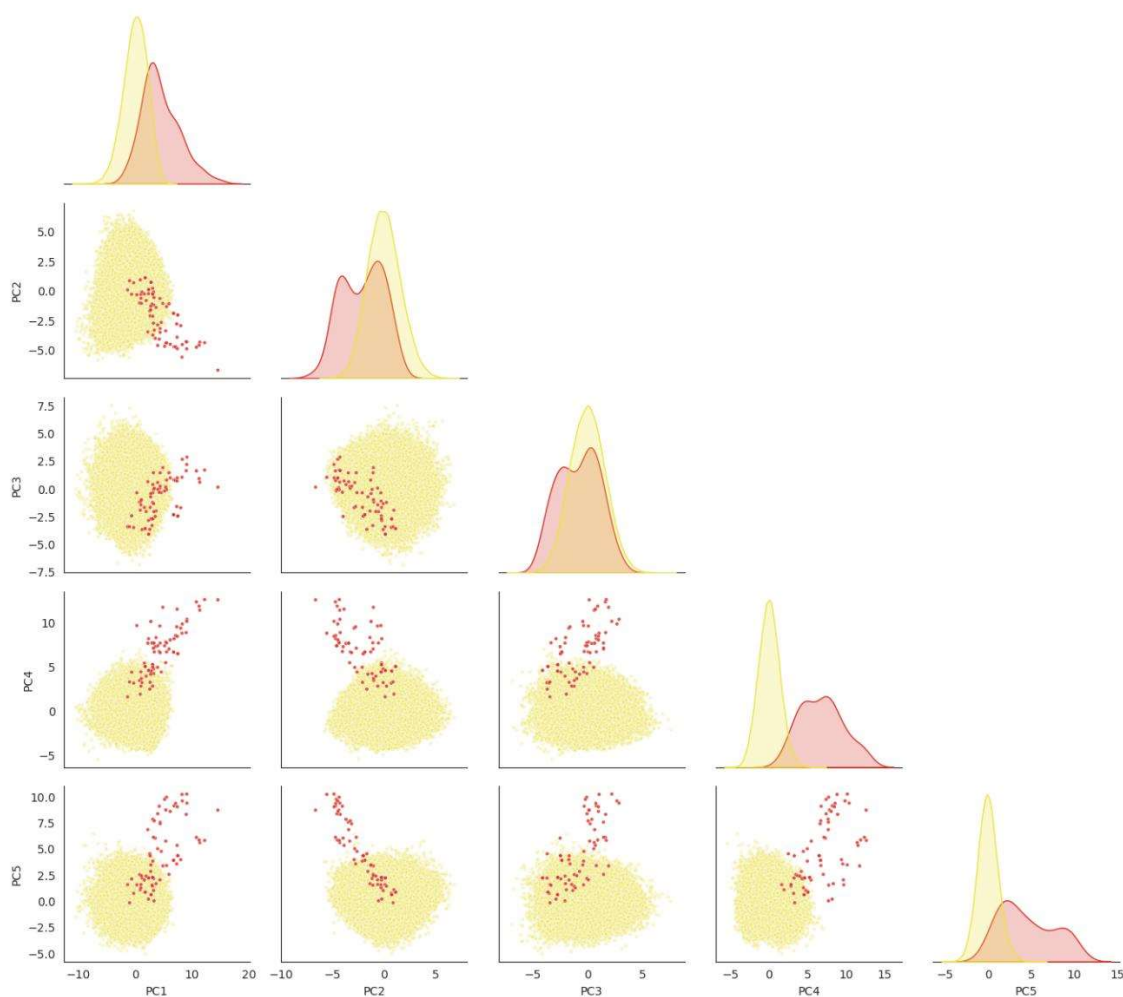


Figura 6.4: Pair plot de los compuestos sintéticos de la base de datos de Enamine (amarillo) y los pPNs sintetizados en esta Tesis (rojo).

Al comparar los gráficos de cada PCA, no solo se advierte que los pPNs ocupan posiciones relativas distintas con respecto a las bibliotecas de referencia, sino que además parecen distribuirse en una región más amplia del espacio definido por los compuestos de Enamine que la que alcanzan dentro del espacio definido por los PNs.

Para evaluar cuantitativamente esta diferencia, se calculó el volumen ocupado por cada familia mediante un elipsoide robusto (MCD, 99 %) en las cinco dimensiones definidas por las primeras cinco PCs. Esta aproximación consiste en ajustar una forma elipsoidal que abarque el 99 % de los puntos de cada conjunto, considerando la correlación entre variables y minimizando la influencia de valores extremos aislados.

Los resultados muestran que, en el espacio de los PNs, los pPNs representan aproximadamente el 10 % del volumen (4339.9 vs. 459.8 unidades), mientras que en el

espacio de Enamine alcanzan cerca del 24 % (33834.7 vs. 8063.5 unidades). Estos datos confirman que los pPNs exploran un subconjunto relativamente restringido del espacio químico de los PNs, pero logran cubrir de manera más amplia una fracción significativa del espacio definido por la biblioteca de compuestos sintéticos comerciales.

Estos resultados duales, afinidad con el espacio natural y disimilitud con el espacio de compuestos sintéticos, plantean la necesidad de examinar a los tres conjuntos en un mismo escenario comparativo. Para ello, se aplicó un análisis discriminante lineal multiclase, una técnica supervisada ideal para visualizar las relaciones entre clases predefinidas. El resultado, mostrado en la Figura 6.5, refuerza la interpretación de los análisis PCA previos de una manera más nítida.

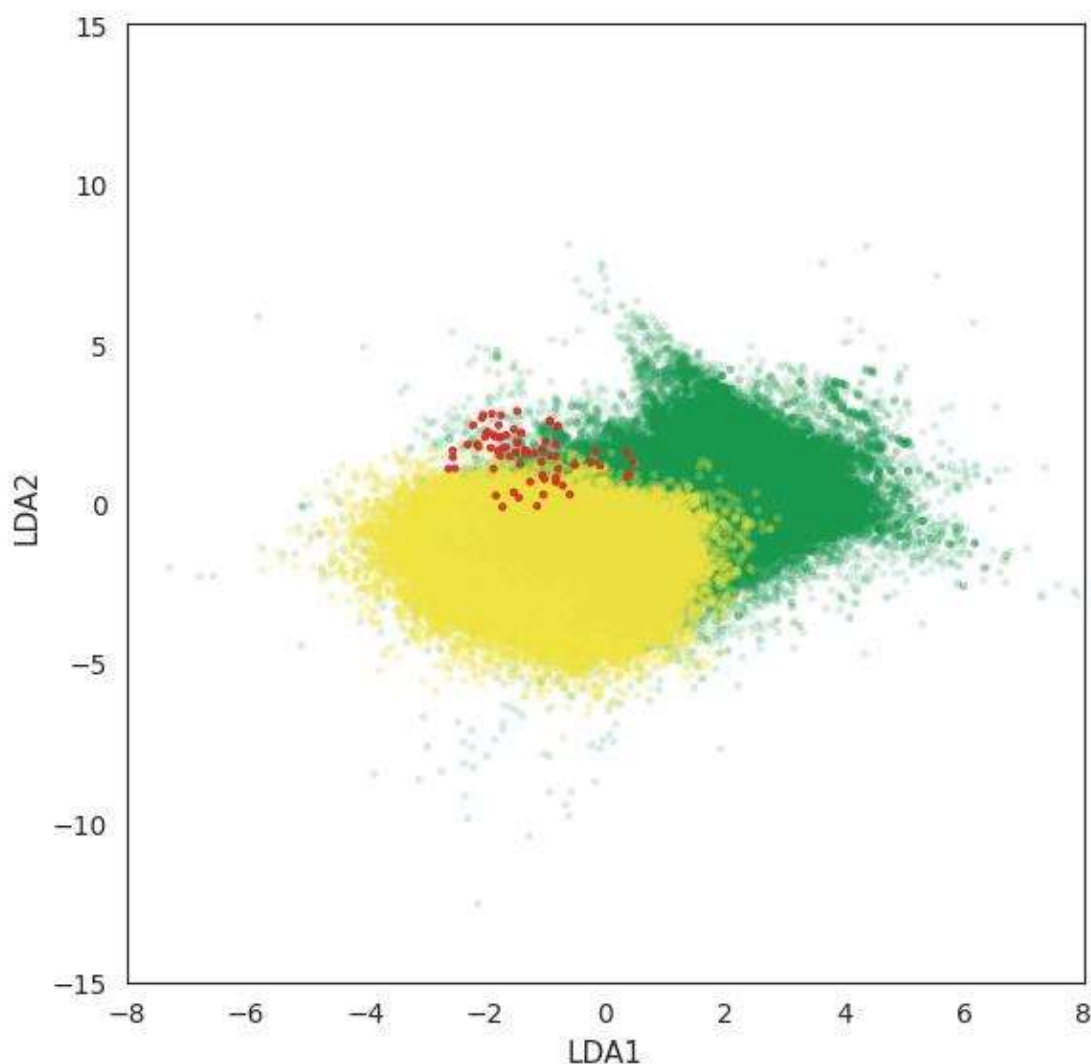


Figura 6.5: Proyección bidimensional de LDA de los PNs (verde), las moléculas sintéticas Enamine (amarillo) y las familias de pPNs sintetizadas en esta Tesis (rojo).

En este espacio, los PNs (verde) y los sintéticos (amarillo) ocupan dominios mayoritariamente distintos, aunque con una zona de solapamiento. De manera crucial, los pPNs (rojo) se proyectan en una zona intermedia, precisamente en la interfaz entre ambos grupos. Su distribución compacta sugiere que constituyen un conjunto coherente que no puede asimilarse de manera simple a ninguna de las dos colecciones de referencia. Más bien, configuran una región propia, un "tercer espacio" situado en la frontera entre los dos universos.

El resultado del LDA introduce, en realidad, una aparente "tensión conceptual" que conviene considerar con cuidado. Si la definición de un pPN se basa en compartir propiedades con los PNs, podría parecer contradictorio que una técnica supervisada como el LDA los proyecte como una clase que se separa de ellos. A primera vista, esto podría interpretarse como un indicio de que los pPNs no ocupan exactamente el mismo espacio químico que los PNs, lo que llevaría a cuestionar la medida en que sostienen la afinidad que se propone en su definición.

Otra lectura posible del análisis LDA, sin embargo, es que la separación observada no implica necesariamente una desvinculación del espacio natural, sino que sugiere la existencia de un patrón estructural interno suficientemente consistente como para que los pPNs sintetizados en esta Tesis sean reconocidos por el modelo como un grupo diferenciado, aunque no necesariamente separado. En este sentido, su posición en el espacio discriminante podría reflejar su doble herencia: por un lado, la huella de los PNs que los inspiran (que explica su proximidad al clúster verde) y, por otro, la impronta indeleble de la lógica sintética que les dio origen (el uso recurrente de la reacción de Ugi Split y de andamios específicos), que explica su coherencia interna como grupo.

Para profundizar en esta cuestión y poner a prueba esta interpretación, se decidió incorporar al análisis un conjunto de referencia externo de pPNs. Para ello, se recopiló de la literatura la estructura de 431 compuestos reportados por el grupo de investigación de Herbert Waldmann bajo la denominación explícita de pPNs. Aquí conviene hacer una aclaración metodológica importante: estos compuestos son considerados pPNs en gran medida porque así lo define el propio autor que acuñó el concepto, más que por haber sido validados sistemáticamente contra un criterio objetivo de "naturalidad". En consecuencia, analizarlos en el mismo espacio multiclase (Figura 6.6) no solo aporta un punto de comparación con la bibliografía más relevante del campo, sino que también permite

evaluar si la separación observada en el LDA constituye un rasgo común y definitorio de esta categoría de moléculas tal como ha sido utilizada en la práctica.

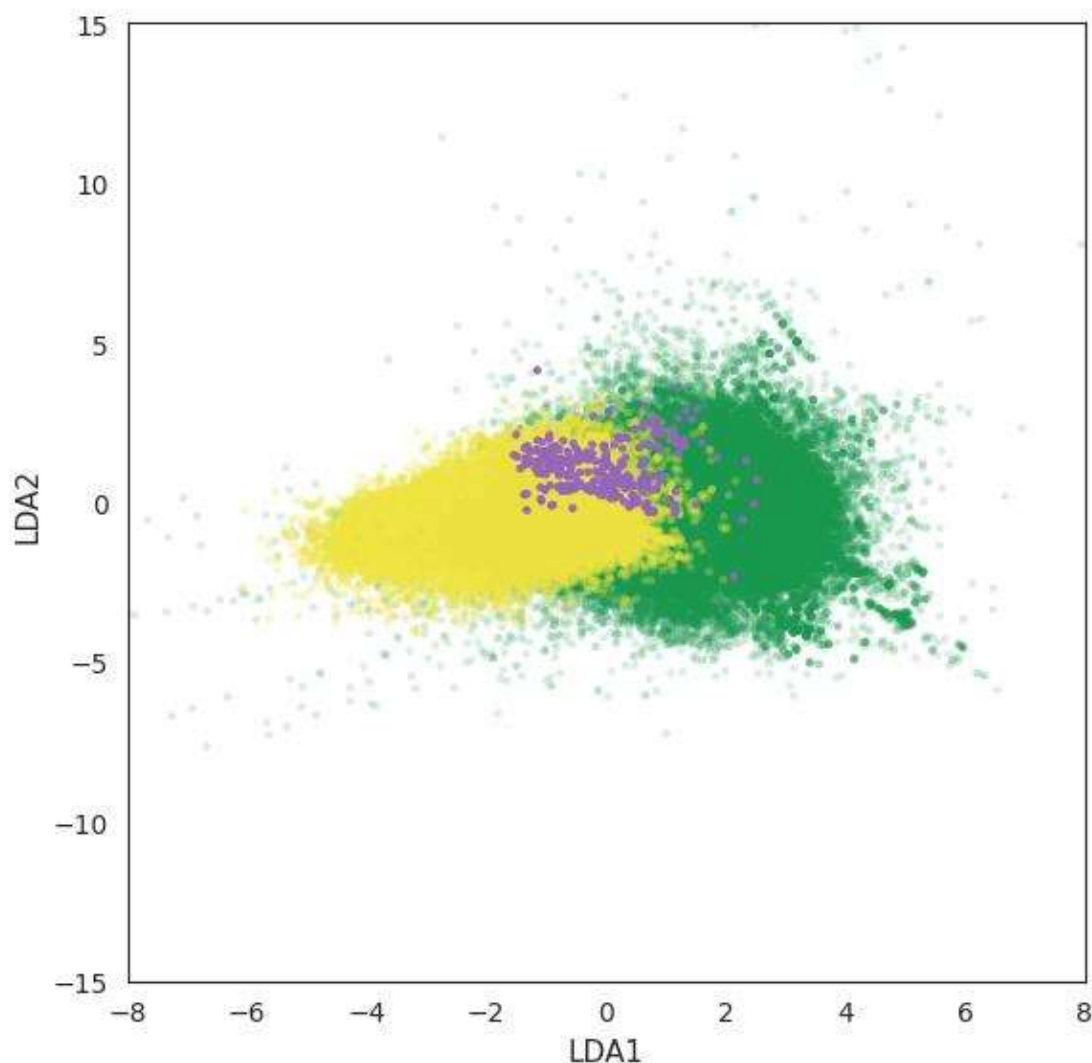


Figura 6.6: Proyección bidimensional de LDA de los pPNs (verde), las moléculas sintéticas Enamine (amarillo) y las familias de pPNs sintetizadas por Waldmann (violeta).

El resultado de este análisis es particularmente revelador. Como se puede observar en la Figura 6.6, la colección de pPNs de Waldmann (en violeta) se proyecta precisamente en la misma región intermedia que los compuestos sintetizados en esta Tesis (en rojo en la Figura 6.5). El hecho de que dos colecciones de pPNs, generadas de manera independiente, con estrategias sintéticas y bloques de construcción diferentes, converjan en el mismo "tercer espacio" en la interfaz entre lo natural y lo sintético, refuerza de manera contundente la interpretación alternativa. Lejos de invalidar el concepto de pPN, la

separación observada en el LDA podría entenderse como parte de su definición práctica: se trata de moléculas que guardan una semejanza global con los PNs, pero que al mismo tiempo revelan, bajo un análisis supervisado y más detallado, una identidad propia que las distingue de los extremos representados por los metabolitos especializados y las bibliotecas sintéticas convencionales.

Hacia una Definición Cuantitativa y Unificada del Concepto de pPN

En el Capítulo 2 de esta Tesis se planteó que una definición robusta de pPN debía anclarse no solo en consideraciones cualitativas, como la reorganización de fragmentos naturales en arquitecturas nuevas, sino también en un criterio cuantitativo. En ese contexto, se propuso que un compuesto puede ser considerado un pPN si cumple simultáneamente dos condiciones:

1. Afinidad Global: Conserva propiedades fisicoquímicas y topológicas globales comparables a las de los productos naturales.
2. Diferenciación por Fragmentos: Exhibe un patrón de subestructuras (fragmentos) que difiere del que domina en los metabolitos evolutivos.

Los análisis de PCA ya validaron la primera condición. Con esta lógica en mente, se retoma ahora el análisis del *NP-likeness score*, una métrica desarrollada por Ertl y colaboradores¹ que, como se discutió en el Capítulo 2, se ha convertido en el estándar para evaluar el grado de semejanza de una molécula con el universo natural a nivel de fragmentos, permitiendo así poner a prueba la segunda condición.

La comparación de las distribuciones de este score para las cuatro colecciones (Figura 6.7) revela un panorama perfectamente coherente con esta hipótesis dual.

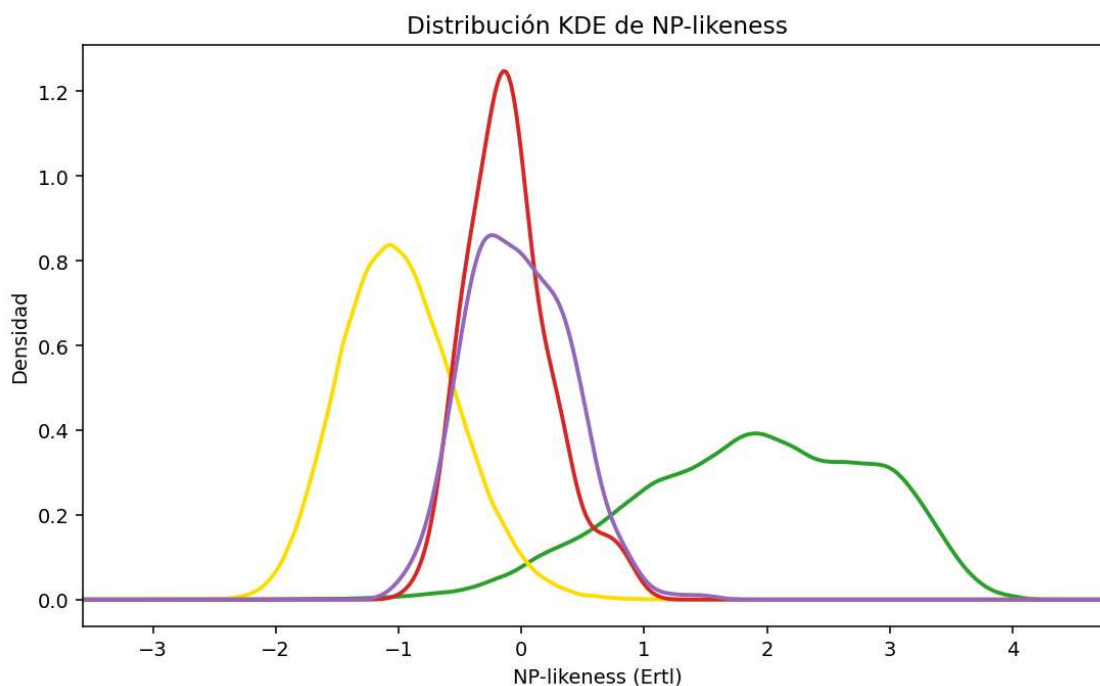


Figura 6.7: Distribución sobre el eje discriminante LD1 de los PNs (verde), las moléculas sintéticas Enamine (amarillo), las familias de pPNs sintetizadas por Waldmann (violeta) y las familias de pPNs sintetizadas en esta Tesis (rojo).

Los PNs (curva verde) se concentran, como era de esperar, en valores claramente positivos de NP-likeness, con un máximo bien definido que refleja la alta frecuencia de fragmentos estructurales validados por la evolución. En contraste, los compuestos sintéticos comerciales de Enamine (curva amarilla) se agrupan de forma compacta en la zona negativa, con un pico agudo alrededor de -1 , lo que da cuenta de un patrón de fragmentos poco común en metabolitos especializados.

Entre ambos extremos se ubican, de manera inequívoca, los pPNs. Tanto los sintetizados en esta Tesis (curva roja) como los reportados por Waldmann (curva violeta) se agrupan en valores próximos a cero, con distribuciones más estrechas que las de los conjuntos de referencia. Si bien no alcanzan las zonas de alta "naturalidad" donde predominan los PNs, tampoco se confunden con el perfil marcadamente "no natural" de los sintéticos. Lo que resulta más notable y confirmatorio es que ambas colecciones de pPNs, desarrolladas de manera independiente, muestran un comportamiento casi idéntico: sus curvas están prácticamente superpuestas.

Estos resultados pueden leerse como una confirmación cuantitativa de la naturaleza intermedia y dual de los pPNs. Por un lado, conservan un núcleo de semejanza con los PNs,

suficiente para no caer en el dominio típicamente sintético a nivel de fragmentos. Por otro, la recombinación de estos fragmentos en arquitecturas novedosas y a través de lógicas sintéticas específicas los distingue de los metabolitos canónicos. En este equilibrio se reconoce la doble condición que se discutió en el Capítulo 2: afinidad global con los PNs y diferenciación a nivel de fragmentos.

Conviene, sin embargo, subrayar un aspecto metodológico: el NP-*likeness score* es una métrica relativa, calculada a partir de frecuencias de fragmentos entrenadas en bases de datos específicas, y por lo tanto los valores absolutos pueden variar según el conjunto utilizado. No obstante, lo relevante no es tanto el valor numérico en sí mismo, sino la comparación relativa de las distribuciones. Bajo esa mirada, el patrón reproducido de forma consistente por los pPNs de esta Tesis y los de la literatura de referencia (Waldmann) refuerza la idea de que esta categoría de compuestos adquiere coherencia y una identidad propia precisamente al ocupar ese espacio intermedio, reconocible y cuantificable en la interfaz entre lo natural y lo sintético.

Implicancias Metodológicas y Posicionamiento de la Estrategia de la Tesis

Una vez caracterizadas las bibliotecas sintetizadas en esta Tesis en términos de su distribución estructural y su afinidad relativa con los universos natural y sintético, resulta pertinente ampliar la discusión hacia un plano más metodológico. En particular, interesa considerar cómo se vincula el enfoque adoptado en este trabajo con las distintas estrategias que se utilizan actualmente para la búsqueda de compuestos bioactivos. Para ello, conviene tomar en cuenta tres dimensiones que, si bien suelen analizarse por separado, están profundamente entrelazadas y definen en su conjunto cualquier campaña de descubrimiento: la fuente de los compuestos que se seleccionan o diseñan, el tipo de ensayo empleado para evaluar su efecto biológico, y el grado de conocimiento que se tiene sobre el blanco molecular.

Lo que sigue no pretende ser una clasificación exhaustiva ni una taxonomía cerrada, sino más bien una visión global que permita situar, en términos comparativos, las diferentes combinaciones posibles entre estos tres factores. Esta perspectiva integradora busca dar un contexto más amplio a la estrategia desarrollada en esta Tesis, y al mismo tiempo abrir el análisis hacia los criterios que guían, explícita o implícitamente, las decisiones experimentales en la búsqueda de nuevas entidades bioactivas.

Desde una perspectiva histórica, la evolución de la farmacología ha transitado entre dos paradigmas principales. Recién con el desarrollo de la biología molecular, la cristalografía de rayos X y, más recientemente, la proteómica estructural y la inteligencia artificial, fue posible acceder a la estructura tridimensional de miles de macromoléculas. Estos avances habilitaron un cambio de paradigma, permitiendo diseñar compuestos en función de un blanco conocido. Esta evolución permite contrastar dos formas complementarias de pensar la relación entre química y biología: una que parte de la molécula y busca el efecto, y otra que parte del blanco y busca el modulador. En lo que sigue se analizan ambas estrategias.

La mayoría de los compuestos bioactivos descubiertos hasta fines del siglo XX, incluyendo hitos como la penicilina o los primeros agentes quimioterapéuticos, fueron identificados sin contar con información previa sobre su blanco molecular específico.² El abordaje predominante consistía en observar el efecto global, el fenotipo, que ciertas sustancias producían sobre un organismo, un tejido o un cultivo celular, y recién en etapas posteriores, a menudo años después, intentar dilucidar su mecanismo de acción a nivel molecular.

Este enfoque, conocido como cribado o *screening* fenotípico, constituyó durante décadas el método estándar para el descubrimiento de fármacos, siendo particularmente fructífero en el caso de los antibióticos, antitumorales e inmunosupresores derivados de PNs. Es importante subrayar que la falta de conocimiento sobre los blancos moleculares no era una limitación metodológica autoimpuesta, sino una consecuencia natural del estado del conocimiento biológico de la época. La pregunta fundamental no era "¿Qué molécula se une a esta enzima?", sino "¿Qué extracto o compuesto detiene el crecimiento de esta bacteria?".

La Lógica del Enfoque "Molécula-Primero"

En el contexto donde no se dispone de un blanco molecular definido, el punto de partida es necesariamente la molécula misma. Se parte de una colección de compuestos y se busca determinar si alguno de ellos produce un efecto biológico observable en un sistema relevante. Esta lógica, que hereda su estructura del enfoque fenotípico tradicional, desplaza el foco desde la biología molecular hacia la química: no se pregunta a qué blanco puede dirigirse un compuesto previamente diseñado, sino qué compuestos inducen un cambio fenotípico de interés, y solo a partir de ahí se investiga el porqué.

Esta estrategia es especialmente poderosa cuando se desconoce el mecanismo biológico subyacente a una patología, cuando el fenómeno de interés es complejo o multifactorial (implicando múltiples vías de señalización), o cuando se busca deliberadamente escapar a los modelos convencionales de interacción blanco-ligando para descubrir nuevos modos de acción. Lejos de ser una aproximación desinformada o "a ciegas", el *screening* fenotípico permite captar efectos sistémicos, revelar actividades inesperadas y descubrir compuestos que actúan a través de mecanismos novedosos, que nunca habrían sido identificados mediante un enfoque dirigido a un único blanco preseleccionado.^{3,4}

En estos casos, el tipo de ensayo empleado no apunta a validar una interacción molecular específica, sino a detectar una respuesta funcional. Los puntos finales o *end-points* de estos ensayos son variados y dependen del sistema biológico en estudio: inhibición del crecimiento celular, alteraciones morfológicas observables por microscopía, cambios en la expresión de un gen reportero, actividad antimicrobiana, toxicidad selectiva, inducción de apoptosis, entre otros. Si alguna molécula de la colección muestra un comportamiento diferenciado y reproducible, puede ser seleccionada como un "*hit*" para su posterior investigación. En esa etapa, su mecanismo de acción puede ser explorado mediante ensayos dirigidos o utilizando herramientas de deconvolución del blanco.⁵

En este enfoque, por tanto, el blanco molecular no está ausente, sino latente: no forma parte del diseño inicial de la campaña, pero puede emerger como consecuencia del efecto fenotípico observado, conectando así el efecto con su causa molecular.

Las fuentes de compuestos que se utilizan en estos casos son diversas, pero comparten un rasgo común: deben permitir una exploración amplia y estructuralmente rica del espacio químico.

- Productos naturales (PNs): Constituyen la fuente histórica por excelencia. Su inmensa diversidad estructural y el hecho de haber sido seleccionados por la evolución para interactuar con sistemas biológicos les confiere una alta probabilidad de contener compuestos bioactivos.⁶
- Bibliotecas sintéticas: El uso de bibliotecas sintéticas en ensayos fenotípicos es relativamente común en contextos industriales o plataformas de alto rendimiento, pero implica un costo elevado y una considerable complejidad experimental, tanto en términos logísticos como analíticos.⁷ No obstante, se ha demostrado que el rendimiento y la accesibilidad de estas campañas pueden mejorar significativamente cuando las bibliotecas se enriquecen racionalmente antes del

- ensayo, ya sea mediante filtros de diversidad estructural o análisis computacionales previos que prioricen compuestos con mayor probabilidad de éxito.⁸ Esta estrategia no sólo reduce la carga experimental, sino que también aumenta la relevancia biológica de los compuestos seleccionados.
- **Fármacos conocidos (reposicionamiento):** Consiste en evaluar fármacos ya aprobados en nuevos ensayos fenotípicos para descubrir nuevas aplicaciones terapéuticas, una estrategia que aprovecha sus perfiles de seguridad ya conocidos.⁹

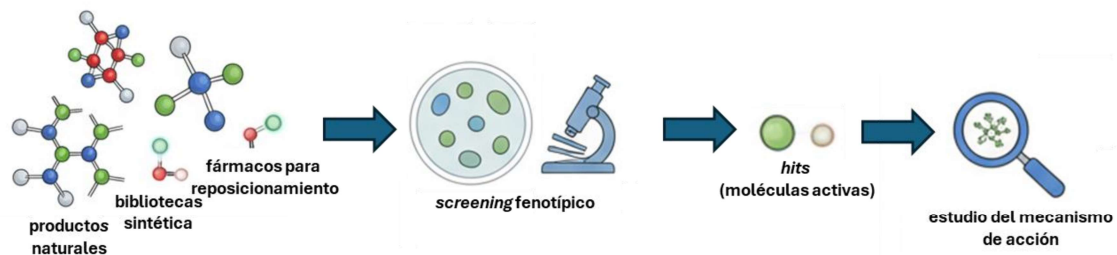


Figura 6.8: Representación de la metodología aplicada en el paradigma "Molécula-Primero".

El Paradigma Moderno: El Enfoque Dirigido al Blanco o "Blanco-Primero"

En contraste con la estrategia exploratoria centrada en las moléculas, el desarrollo de métodos para determinar y modelar la estructura de blancos moleculares específicos ha habilitado una vía alternativa: partir de un objetivo biológico claramente definido y buscar o diseñar compuestos capaces de interactuar selectivamente con él. Esta lógica de diseño dirigido al blanco (*target-based*) permite aplicar herramientas computacionales y experimentales con un nivel de especificidad mucho mayor y se ha convertido en uno de los pilares del descubrimiento racional de fármacos en las últimas décadas. A diferencia del enfoque fenotípico, aquí la hipótesis está definida desde el inicio: se espera que ciertos compuestos puedan modular la función de una proteína, una enzima o un receptor particular, ya sea mediante inhibición, activación o desplazamiento competitivo.

Este conocimiento previo del blanco molecular permite emplear un arsenal de técnicas de alta precisión. Por un lado, se utilizan ensayos bioquímicos específicos, como ensayos enzimáticos que miden la inhibición de una catálisis, ensayos de unión que cuantifican la afinidad de un ligando, o ensayos celulares que utilizan sistemas reporteros para medir la activación de una vía de señalización concreta. Por otro lado, y de manera crucial, se aplican estrategias *in silico*.¹⁰ El *docking* molecular, por ejemplo, simula

computacionalmente la unión de miles o millones de compuestos a un sitio activo para predecir su afinidad.¹¹ Los modelos farmacofóricos definen las características espaciales y electrónicas necesarias para la interacción, permitiendo filtrar bases de datos en busca de moléculas que cumplan dichos requisitos.^{12,13} Estas herramientas hacen posible evaluar virtualmente bibliotecas completas antes del ensayo experimental, priorizando un número reducido de compuestos con alta probabilidad de ser activos y reduciendo así significativamente la carga de trabajo y los costos. En este contexto, la disponibilidad de datos estructurales de alta resolución (obtenidos por cristalografía de rayos X, RMN o criomicroscopía electrónica) resulta clave, ya que permite modelar con precisión la interacción entre el blanco y sus posibles ligandos.¹⁴

Las fuentes de compuestos utilizadas en estas estrategias incluyen tanto bibliotecas sintéticas comerciales, que pueden testarse directamente *in vitro* o descargarse en formato virtual para el cribado *in silico*,¹⁵ como también fármacos ya conocidos, que se reevalúan frente a nuevos blancos en campañas de reposicionamiento racional.^{9,16} Además, existe una creciente tendencia a diseñar bibliotecas *de novo*, generadas específicamente para adaptarse a las características del blanco mediante combinatoria estructural o algoritmos de inteligencia artificial.^{17,18} En todos estos casos, el conocimiento del blanco no solo orienta el diseño y la selección, sino que estructura el proceso de descubrimiento entero: desde la hipótesis inicial hasta la validación funcional.

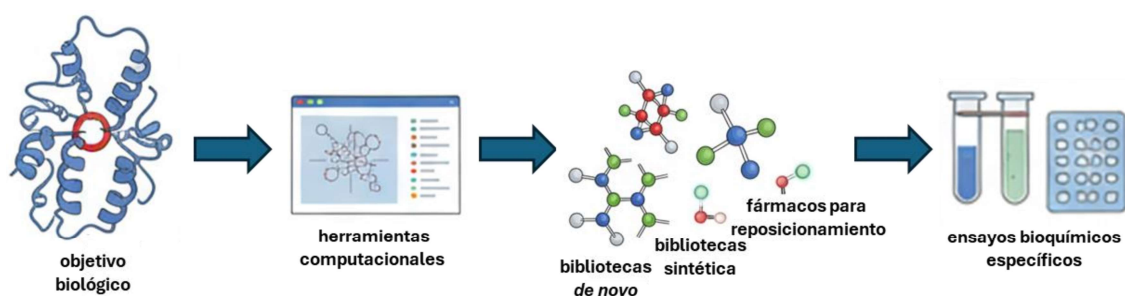


Figura 6.9: Representación de la metodología aplicada en el paradigma "Blanco-Primero".

El Enfoque de la Tesis: Una Estrategia Híbrida de Diseño Racional y Validación Fenotípica

En este panorama metodológico, la estrategia desarrollada en esta Tesis puede entenderse como una forma intermedia y deliberada que combina elementos de ambos enfoques. Por un lado, parte del diseño racional de una biblioteca de compuestos —los pPNs— construida mediante criterios estructurales inspirados en PNs, con el objetivo explícito de explorar regiones poco pobladas del espacio químico. Esta elección, aunque

no se apoya en un blanco molecular único y definido, tampoco responde a una lógica puramente exploratoria o aleatoria.

En cambio, se funda en la idea de que ciertas arquitecturas moleculares, por su composición de fragmentos, su topología o su complejidad tridimensional, poseen un potencial bioactivo implícito que puede ser priorizado computacionalmente antes de su síntesis y validación experimental. Así, aunque no se parte de un objetivo biológico concreto, la selección y el filtrado de los compuestos se realizan bajo hipótesis estructurales coherentes, como se detalló en los Capítulos 3 y 4. Este enfoque se aleja tanto del *screening* empírico de bibliotecas masivas como del diseño estrictamente dirigido a un blanco, y propone en cambio una vía alternativa basada en la exploración estructurada del espacio químico. En ese sentido, los resultados de esta Tesis no solo aportan una nueva colección de moléculas, sino que también ilustran una forma posible de navegar el espacio entre la síntesis exploratoria y la búsqueda puramente racional de propiedades.

El enfoque adoptado en esta Tesis, basado en el diseño racional de bibliotecas combinatorias sin una diana molecular específica, presenta una serie de ventajas claras, pero también algunas limitaciones que conviene explicitar.

Entre los aspectos positivos, destaca en primer lugar la posibilidad de orientar la diversidad estructural desde etapas tempranas. Al elegir fragmentos y arquitecturas que favorecen la presencia de propiedades deseables (como la tridimensionalidad o la anfipaticidad), se puede explorar de manera inteligente el espacio químico sin depender de un blanco puntual. Esta libertad permite investigar zonas poco transitadas del espacio químico, alejadas tanto de los PNs canónicos como de los compuestos sintéticos comerciales, lo que incrementa la probabilidad de encontrar perfiles bioactivos novedosos. Además, el uso de herramientas computacionales para caracterizar y filtrar los compuestos, como los descriptores moleculares, el análisis multivariado y las métricas de semejanza natural, aporta un criterio racional de priorización, que reduce la arbitrariedad del cribado fenotípico tradicional. Finalmente, esta combinación de diseño deliberado y validación abierta mantiene una flexibilidad funcional importante, ya que los compuestos resultantes pueden interactuar con diferentes blancos o rutas biológicas, abriendo el camino a descubrimientos inesperados o a compuestos con actividad *multitarget*.

Sin embargo, este enfoque también presenta desafíos. La ausencia de un blanco definido impide aplicar estrategias de optimización específicas, como los ciclos de diseño-

retroalimentación basados en la estructura de un complejo ligando-proteína, lo que puede dificultar el refinamiento racional posterior a un hallazgo inicial. Además, en caso de observarse actividad biológica, la elucidación del mecanismo de acción puede ser más compleja y requiere herramientas adicionales de deconvolución del blanco. Finalmente, la eficacia de esta estrategia depende en buena medida de la calidad de los criterios computacionales de filtrado, ya que una priorización mal calibrada podría llevar a seleccionar compuestos que, si bien interesantes desde el punto de vista estructural, no resulten relevantes desde una perspectiva funcional.

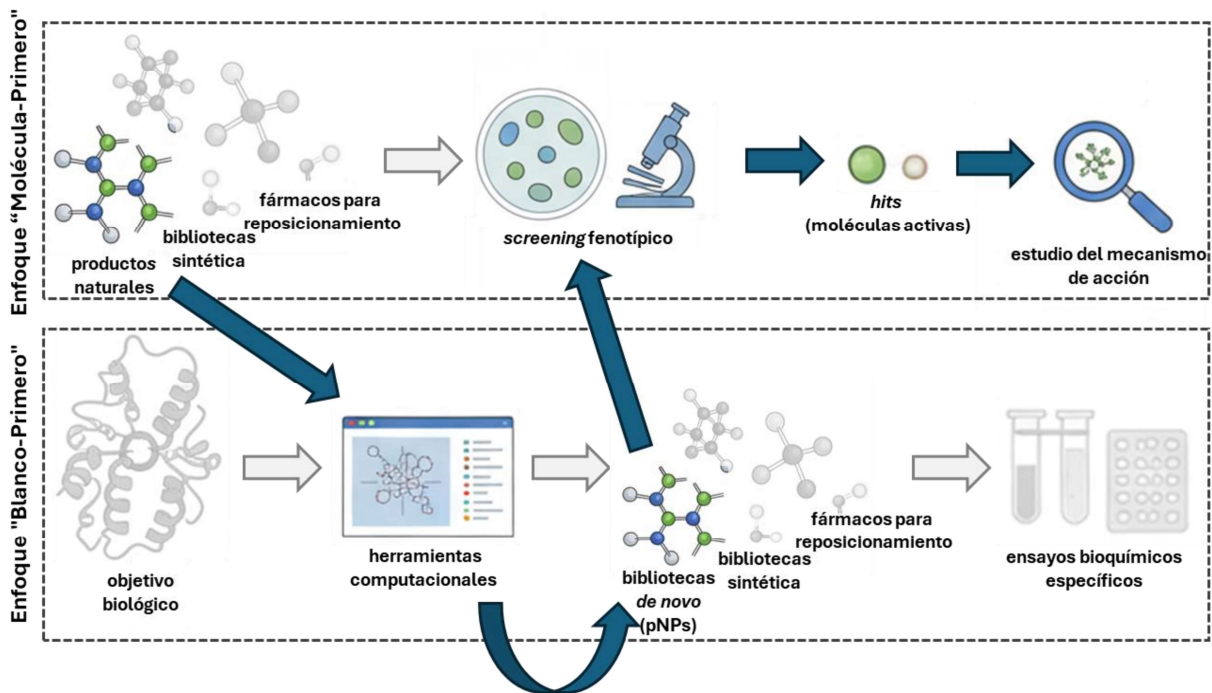


Figura 6.10: Representación de la metodología híbrida aplicada en esta Tesis.

Conclusiones y perspectivas futuras

La hipótesis central que impulsó este trabajo de Tesis fue que una colección pequeña de pNPs, diseñada de manera racional y correctamente posicionada en el espacio químico, puede tener una alta relevancia biológica y funcionar como una fuente prolífica de compuestos activos. Los hallazgos experimentales obtenidos en los ensayos fenotípicos respaldan sólidamente esa posibilidad.

Del total de los 72 compuestos únicos diseñados y sintetizados en las familias **PIP1**, **PIP2** y **CIC**, 20 mostraron algún grado de actividad biológica en los ensayos celulares realizados. Para este recuento se incluyeron también aquellos compuestos con actividad moderada o

baja, dado que, incluso en ausencia de la identificación del blanco molecular, es posible iniciar una exploración preliminar de la relación estructura-actividad mediante la síntesis de derivados. Esto representa una tasa de éxito (*hit rate*) del 28%, valor sustancialmente superior al que suele observarse en campañas tradicionales de screening fenotípico de alta densidad de bibliotecas comerciales, donde las tasas de éxito rara vez superan el 1%.¹⁹

Este resultado no es una mera curiosidad estadística; es la manifestación cuantitativa del concepto de relevancia biológica discutido en el Capítulo 1. Mientras que las bibliotecas comerciales masivas exploran el espacio químico de manera extensa, pero a menudo superficial, la estrategia de diseño de pPNs parece enriquecer la colección con compuestos que poseen una mayor probabilidad intrínseca de interactuar con sistemas biológicos. Al construir moléculas a partir de fragmentos previamente seleccionados y validados por la evolución, y al ensamblarlos en arquitecturas con complejidad tridimensional y una distribución de heteroátomos que imitan la de los PNs (como lo demostró el análisis quimioinformático), se obtiene una biblioteca de tamaño reducido, pero con un alto potencial en su relevancia biológica. Los resultados más destacados se resumen en la Tabla 6.1.

Compuesto	Familia	Actividad Primaria	Especie/Línea Celular	Valor (μM)	Referencia
PIP1-13	PIP1	Antiviral	ZIKV	IC ₅₀ = 12.3	Cap. 3
		Antiviral	SARS-CoV-2	IC ₅₀ = 9.3	Cap. 3
PIP1-18	PIP1	Antiproliferativa	Caco-2	IC ₅₀ = 2.5	Cap. 3
PIP2-14	PIP2	Antifúngica	<i>F. graminearum</i>	MIC = 11.5	Cap. 4
PIP2-17	PIP2	Antifúngica	<i>F. graminearum</i>	MIC = 24.2	Cap. 4
CIC2-7	CIC	Antiproliferativa	A549	IC ₅₀ ≈ 10	Cap. 5

Tabla 6.1: Resumen de los compuestos con actividad biológica significativa identificados en esta Tesis.

De esta manera se observa que los resultados presentados en esta Tesis permiten vislumbrar el potencial de los pPNs como un paradigma central en el diseño *de novo* de bibliotecas pequeñas, pero altamente relevantes desde el punto de vista biológico. A partir de la reorganización combinatoria de fragmentos naturales, se obtuvieron compuestos

con arquitecturas inéditas, no accesibles por rutas biosintéticas conocidas, y capaces de modular procesos celulares complejos en ensayos fenotípicos.

Esta aproximación, que conjuga la inspiración en el proceso de selección natural con la exploración deliberada de espacios químicos poco transitados, propone una vía alternativa y eficiente para la identificación de nuevas estructuras bioactivas, que se sitúa estratégicamente entre los dos grandes paradigmas del descubrimiento de fármacos. No es un cribado masivo y ateórico, ni tampoco un diseño rígidamente enfocado en un único blanco. Es una exploración racional del espacio químico biológicamente relevante.

En este sentido, los pPNs no solo representan una categoría conceptual novedosa, cuya identidad ha sido validada quimioinformáticamente en este trabajo, sino también una promesa concreta para el descubrimiento de compuestos con mecanismos de acción inesperados. La diversidad de actividades encontradas —antifúngica, antiproliferativa, antiviral— a partir de un conjunto tan reducido de moléculas es un testimonio de la fertilidad de este "tercer espacio" químico que habitan.

Por lo tanto, el desafío, hacia adelante, consiste en capitalizar los hallazgos de este trabajo y proyectarlos hacia nuevos horizontes de investigación. La identificación de 20 compuestos activos no es el final del camino, sino el comienzo. Las perspectivas futuras pueden delinearse en varias direcciones estratégicas, que van desde la química medicinal clásica hasta la biología química y la ciencia de datos.

Las futuras líneas de trabajo que se desprenden de esta Tesis incluyen:

- Optimización de Compuestos Líderes: Los compuestos más prometedores, como el antiviral **PIP1-13** o el antiproliferativo **PIP1-18**, deben ser considerados como puntos de partida para programas de química medicinal. Será pertinente iniciar estudios de Relación Estructura-Actividad (SAR) para identificar los farmacóforos clave y optimizar su potencia y propiedades farmacocinéticas.
- Elucidación de Mecanismos de Acción: Para los compuestos con perfiles más interesantes, es crucial iniciar estudios de deconvolución del blanco molecular. Técnicas como la proteómica química podrían permitir la identificación de las dianas celulares responsables de la actividad observada.
- Expansión de la Plataforma Sintética: La metodología validada en esta Tesis puede ser expandida. Se podría ampliar el repertorio de fragmentos naturales y explorar

el uso de otras reacciones multicomponente para generar nuevas topologías moleculares.

- Integración con Modelado Predictivo: El conjunto de datos generado puede ser utilizado para entrenar modelos de aprendizaje automático (*Machine Learning*) que aprendan las reglas que relacionan la estructura de un pPN con su actividad biológica, para guiar el diseño de futuras bibliotecas de manera más precisa.

En conclusión, esta Tesis ha establecido un marco conceptual y experimental robusto para el diseño, síntesis y validación de pPNs, demostrando que esta estrategia es una fuente fértil de nuevas moléculas bioactivas y abriendo múltiples avenidas para la investigación futura en la excitante frontera entre la química sintética, la biología y la ciencia de datos.

Referencias

- (1) Ertl, P.; Roggo, S.; Schuffenhauer, A. Natural Product-Likeness Score and Its Application for Prioritization of Compound Libraries. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48* (1), 68–74. <https://doi.org/10.1021/ci700286x>.
- (2) Vincent, F.; Nueda, A.; Lee, J.; Schenone, M.; Prunotto, M.; Mercola, M. Phenotypic Drug Discovery: Recent Successes, Lessons Learned and New Directions. *Nat Rev Drug Discov* **2022**, *21* (12), 899–914. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00472-w>.
- (3) Moffat, J. G.; Vincent, F.; Lee, J. A.; Eder, J.; Prunotto, M. Opportunities and Challenges in Phenotypic Drug Discovery: An Industry Perspective. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (8), 531–543. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.111>.
- (4) Childers, W. E.; Elokely, K. M.; Abou-Gharbia, M. The Resurrection of Phenotypic Drug Discovery. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11* (10), 1820–1828. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00006>.
- (5) Hight, S. K.; Clark, T. N.; Kurita, K. L.; McMillan, E. A.; Bray, W.; Shaikh, A. F.; Khadilkar, A.; Haeckl, F. P. J.; Carnevale-Neto, F.; La, S.; Lohith, A.; Vaden, R. M.; Lee, J.; Wei, S.; Lokey, R. S.; White, M. A.; Linington, R. G.; MacMillan, J. B. High-Throughput Functional Annotation of Natural Products by Integrated Activity Profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2022**, *119* (49), e2208458119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2208458119>.
- (6) Atanasov, A. G.; Zotchev, S. B.; Dirsch, V. M.; the International Natural Product Sciences Taskforce; Orhan, I. E.; Banach, M.; Rollinger, J. M.; Barreca, D.; Weckwerth, W.;

Bauer, R.; Bayer, E. A.; Majeed, M.; Bishayee, A.; Bochkov, V.; Bonn, G. K.; Braidly, N.; Bucar, F.; Cifuentes, A.; D'Onofrio, G.; Bodkin, M.; Diederich, M.; Dinkova-Kostova, A. T.; Efferth, T.; El Bairi, K.; Arkells, N.; Fan, T.-P.; Fiebich, B. L.; Freissmuth, M.; Georgiev, M. I.; Gibbons, S.; Godfrey, K. M.; Gruber, C. W.; Heer, J.; Huber, L. A.; Ibanez, E.; Kijjoo, A.; Kiss, A. K.; Lu, A.; Macias, F. A.; Miller, M. J. S.; Mocan, A.; Müller, R.; Nicoletti, F.; Perry, G.; Pittalà, V.; Rastrelli, L.; Ristow, M.; Russo, G. L.; Silva, A. S.; Schuster, D.; Sheridan, H.; Skalicka-Woźniak, K.; Skaltsounis, L.; Sobarzo-Sánchez, E.; Bredt, D. S.; Stuppner, H.; Sureda, A.; Tzvetkov, N. T.; Vacca, R. A.; Aggarwal, B. B.; Battino, M.; Giampieri, F.; Wink, M.; Wolfender, J.-L.; Xiao, J.; Yeung, A. W. K.; Lizard, G.; Popp, M. A.; Heinrich, M.; Berindan-Neagoe, I.; Stadler, M.; Daglia, M.; Verpoorte, R.; Supuran, C. T. Natural Products in Drug Discovery: Advances and Opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20* (3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.

(7) Lee, O. W.; Austin, S.; Gamma, M.; Cheff, D. M.; Lee, T. D.; Wilson, K. M.; Johnson, J.; Travers, J.; Braisted, J. C.; Guha, R.; Klumpp-Thomas, C.; Shen, M.; Hall, M. D. Cytotoxic Profiling of Annotated and Diverse Chemical Libraries Using Quantitative High-Throughput Screening. *SLAS Discovery* **2020**, *25* (1), 9–20. <https://doi.org/10.1177/2472555219873068>.

(8) Xu, D.; Zhou, D.; Bum-Erdene, K.; Bailey, B. J.; Sishtla, K.; Liu, S.; Wan, J.; Aryal, U. K.; Lee, J. A.; Wells, C. D.; Fishel, M. L.; Corson, T. W.; Pollok, K. E.; Meroueh, S. O. Phenotypic Screening of Chemical Libraries Enriched by Molecular Docking to Multiple Targets Selected from Glioblastoma Genomic Data. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15* (6), 1424–1444. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00078>.

(9) Nossier, E. S.; Anwar, M. M.; El-Zahabi, M. A. Recent Advances in Drug Repositioning and Rediscovery for Different Therapeutic Activities Utilizing Updated Technological Approaches. *Mol Divers* **2025**. <https://doi.org/10.1007/s11030-025-11248-w>.

(10) Wei, H.; McCammon, J. A. Structure and Dynamics in Drug Discovery. *npj Drug Discov.* **2024**, *1* (1), 1. <https://doi.org/10.1038/s44386-024-00001-2>.

(11) Oliveira, T.; Silva, M.; Maia, E.; Silva, A.; Taranto, A. Virtual Screening Algorithms in Drug Discovery: A Review Focused on Machine and Deep Learning Methods. *DDC* **2023**, *2* (2), 311–334. <https://doi.org/10.3390/ddc2020017>.

(12) Giordano, D.; Biancaniello, C.; Argenio, M. A.; Facchiano, A. Drug Design by Pharmacophore and Virtual Screening Approach. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (5), 646. <https://doi.org/10.3390/ph15050646>.

- (13) Moyano-Gómez, P.; Lehtonen, J. V.; Pentikäinen, O. T.; Postila, P. A. Building Shape-Focused Pharmacophore Models for Effective Docking Screening. *J Cheminform* **2024**, *16* (1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13321-024-00857-6>.
- (14) Shoemaker, S. C.; Ando, N. X-Rays in the Cryo-Electron Microscopy Era: Structural Biology's Dynamic Future. *Biochemistry* **2018**, *57* (3), 277–285. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01031>.
- (15) Lyu, J.; Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. Modeling the Expansion of Virtual Screening Libraries. *Nat Chem Biol* **2023**, *19* (6), 712–718. <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01234-w>.
- (16) Pinzi, L.; Bisi, N.; Rastelli, G. How Drug Repurposing Can Advance Drug Discovery: Challenges and Opportunities. *Front. Drug Discov.* **2024**, *4*, 1460100. <https://doi.org/10.3389/fddsv.2024.1460100>.
- (17) Johansson, S. V.; Haghiri Chehreghani, M.; Engkvist, O.; Schliep, A. De Novo Generated Combinatorial Library Design. *Digital Discovery* **2024**, *3* (1), 122–135. <https://doi.org/10.1039/D3DD00095H>.
- (18) Merk, D.; Friedrich, L.; Grisoni, F.; Schneider, G. De Novo Design of Bioactive Small Molecules by Artificial Intelligence. *Molecular Informatics* **2018**, *37* (1–2), 1700153. <https://doi.org/10.1002/minf.201700153>.
- (19) Goodwin, S.; Shahtahmassebi, G.; Hanley, Q. S. Statistical Models for Identifying Frequent Hitters in High Throughput Screening. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 17200. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74139-0>.

Capítulo 7

Sección Experimental

CAPÍTULO 7: Sección Experimental

Síntesis y caracterización de compuestos orgánicos

Consideraciones sintéticas generales y métodos de elucidación estructural

Todos los reactivos y solventes fueron adquiridos de proveedores comerciales y empleados sin purificaciones adicionales, con la excepción de hexano, ciclohexano, éter de petróleo y acetato de etilo (AcOEt) que siempre se destilaron previo a su uso y de tetrahidrofurano y diclorometano (CH_2Cl_2) que se destilaron cuando resultó necesario. Los análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se efectuaron empleando placas de sílica gel 60 F254 (Merck) soportadas sobre aluminio (0,2 mm de espesor) empleando distintos sistemas de solventes, y visualizando las señales ya sea bajo luz UV (254 o 366 nm) o bien con reveladores químicos como ácido fosfomolibdico, ácido sulfúrico, reactivo de Dragendorff y verde de bromocresol. Para las columnas cromatográficas se empleó como fase estacionaria sílica gel 60 (230 – 400 mesh, Merck) y los solventes de desarrollo que se indican en cada caso. Los puntos de fusión se determinaron con un equipo Fisher-Johns.

Se adquirieron espectros de RMN ^1H y ^{13}C en diversos solventes (CDCl_3 , CD_3OD , DMSO-d_6) y se los suplementó con experimentos bidimensionales tales como COSY (*correlation spectroscopy*), HSQC-DEPT (*multiplicity–edited heteronuclear single quantum coherence – distortionless enhancement by polarization transfer*), HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*) y NOESY (*nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy*) para permitir la asignación de las señales.

Los espectros de RMN 200 MHz a 25 °C fueron registrados a 200,13 MHz para ^1H con un espectrómetro Bruker AC 200. Los espectros de RMN 300 MHz a 25 °C fueron registrados a 300,18 MHz para ^1H con un espectrómetro Bruker Fourier con una sonda con gradiente Z de 5 mm. Los espectros de RMN 500 MHz a temperatura variable (25 °C – 80 °C) fueron registrados a 500,13 MHz para ^1H con un espectrómetro Bruker Avance II 500 equipado con una sonda BBFO+. Los espectros de RMN fueron procesados empleando el software MestReNova. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en ppm relativos al tetrametilsilano (TMS) como estándar interno, y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Los patrones de partición de señales se abrevian de la siguiente manera: singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), multiplete (m), doble doblete (dd), doble

triplete (dt), doble doble doblete (ddd), singulete ancho (sa), doblete ancho (da) y triplete ancho (ta).

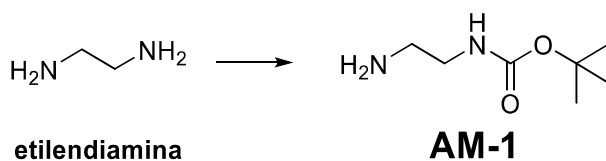
Se obtuvieron espectros de masa de alta resolución por ionización de electrospray (HR-ESI) en modos positivo y negativo empleando un espectrómetro Bruker micrOTOF-Q II o bien un espectrómetro Bruker MaXis UHR-QTOF 4 GHz. Se utilizaron temperaturas de desolvatación de 200 °C y voltajes de 4,0–4,5 kV en modo positivo y 3,0–4,0 kV en modo negativo.

Los reactivos y solventes se nombraron según sus denominaciones comerciales, mientras que los compuestos sintetizados se nombraron cuando resultó relevante según nomenclatura IUPAC utilizando el software ChemDraw.

Técnicas sintéticas experimentales y caracterización de los compuestos obtenidos en el Capítulo 3

Metodología para la síntesis de los bloques AM

Síntesis de AM-1



A una solución de etilendiamina (EDA) (20,0 mmol, 1,34 mL) en CH₂Cl₂ (15 mL) a 0 °C se le añadió una solución de dicarbonato de di-*tert*-butilo (anhídrido Boc) (2,00 mmol, 0,46 mL) en CH₂Cl₂ (10 mL) gota a gota a lo largo de 2 h. La mezcla se calentó hasta 25 °C y se agitó durante 14 h. La reacción se concentró y se disolvió en NaHCO₃ (ss). El crudo se extrajo con CH₂Cl₂ tres veces y NaCl (ss) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. Se obtuvo el producto **AM-1** como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 99%.

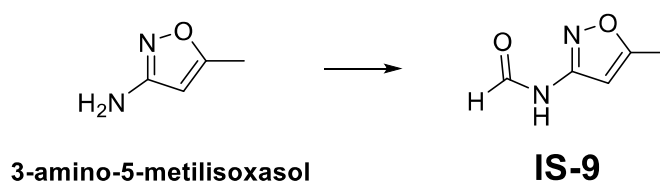
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.94 (sa, 1H), 3.22 – 3.16 (m, 2H), 2.80 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹

Metodología para la síntesis de los bloques IS

Metodología general para la síntesis de formamidas:² Una mezcla de anhídrido acético (0,5 mol) y ácido fórmico (0,75 mol) se agitó a 60 °C durante 3 h. Esta mezcla se añadió gota a gota a una solución de la respectiva amina (0,025 mol) y trietilamina (6 eq) en 100 mL de THF y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. Se controló por CCD hasta desaparición total de la amina de partida. La solución se diluyó con AcOEt, se lavó sucesivamente con NaHCO₃ (ss) y NaCl (ss), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. La formamida obtenida se utilizó sin purificación adicional.

Síntesis de IS-9



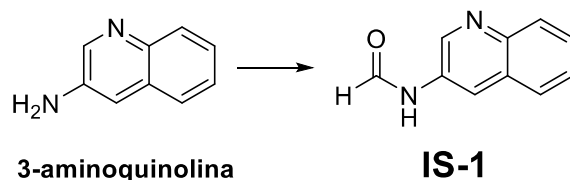
El compuesto **IS-9** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de 3-amino-5-metilisoxazol. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 67%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): rotámero mayoritario: 8.40 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 5.53 (s, 3H), 3.70 (s, 5H), 2.39 (s, 4H); rotámero minoritario: 9.69 (s, 2H), 8.80 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 2.28 (s, 2H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): rotámero mayoritario: 169, 164, 159, 96, 94, 13. rotámero minoritario: 170, 162, 157, 97, 93, 12.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³

Síntesis de IS-13



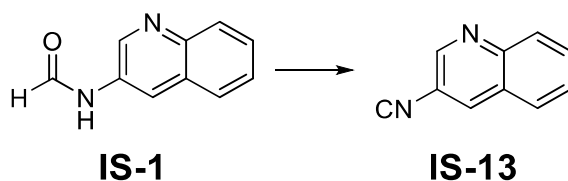
El compuesto **IS-1** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de 3-aminoquinolina. El producto se aisló como un sólido gris claro. Rendimiento: 92%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 10.63 (sa, 1H), 8.80 y 8.93 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 7.93 (sa, 1H), 7.78 (sa, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.47 (s, 1H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 158.6, 161.0, 142.7, 142.4, 130.2, 126.9, 126.1, 125.8, 125.2, 120.9, 118.3.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.⁴

Metodología general para la síntesis de los isonitrilos:^{5,6} Se preparó una solución de la formamida (3,99 mmol) en CH_2Cl_2 (20 mL), se añadió trietilamina (2,5 eq) y la mezcla se enfrió sobre hielo. Luego, se añadió gota a gota una solución de POCl_3 (1,2 eq) en CH_2Cl_2 (10 mL) durante 30 min en una atmósfera de argón y se dejó que la reacción prosiguiera a 0 °C durante 30 min y luego a temperatura ambiente durante 4 h. más con agitación continua. El crudo de reacción se concentró a presión reducida, y el producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo y trietilamina al 1%). El isonitrilo se aisló por evaporación.



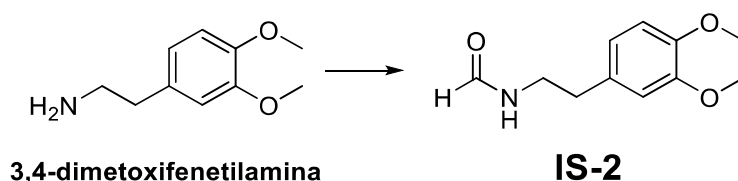
El compuesto **IS-13** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-1**. El producto se aisló como un sólido amarillo pálido. Rendimiento: 93%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.89 (d, $J = 2.3$, 1H), 8.18 – 8.14 (m, 2H), 7.85 – 7.80 (m, 2H), 7.68 - 7.64 (m, 1H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169.1, 147.52, 147.46, 133.1, 131.7, 130.1, 128.8, 128.2, 127.1.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.⁷

Síntesis de IS-14

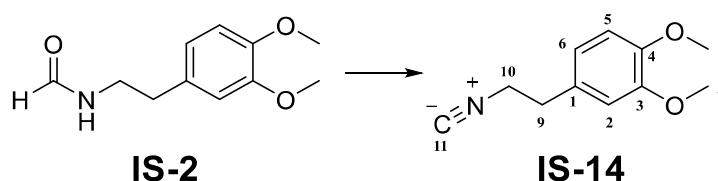


El compuesto **IS-2** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de 3,4-dimetoxifenetilamina. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 86%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.15 (s) y 7.96 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.76 – 6.67 (m, 2H), 5.49 (sa, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.57 y 3.46 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.80 y 2.76 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 164.5, 161.2, 149.1, 147.8, 131.1, 120.7, 112.0, 111.5, 56.0, 55.9, 43.3, 39.4, 37.4, 35.2.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.⁸



El compuesto **IS-14** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-2**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 42%.

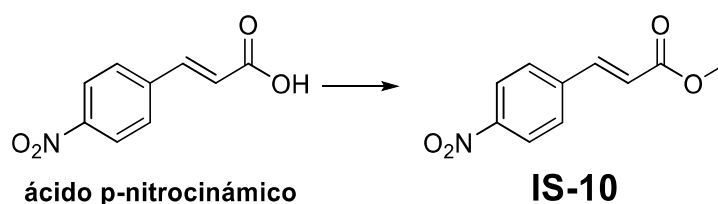
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.82 (H-5, d, $J = 7.93$ Hz, 1H), 6.77 (H-2, d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 6.74 (H-6, dd, $J = 7.9$ y 1.91 Hz, 1H), 3.87 (H-8, s, 3H), 3.86 (H-7, s, 3H), 3.57 (H-10, t, $J = 7.02$ Hz, 2H), 2.91 (H-9, t, $J = 6.90$ Hz, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 156.7, 156.6 y 156.5 (C-11), 149.1 (C-3), 148.3 (C-4), 129.3 (C-1), 120.8 (C-6), 112.0 (C-2), 111.5 (C-5), 56.0 (C-7), 56.0 (C-8), 43.4, 43.3 y 43.2 (C-10), 35.4 (C-9).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_2$ 192.1019, encontrado 192.1051.

Procedimiento general para la síntesis de ésteres: Se disolvió 1 g de ácido en 30 mL de metanol, y bajo agitación a temperatura ambiente, se agregó 1,1 eq de SOCl_2 lentamente. Se controló por CCD hasta desaparición total del ácido de partida. Se evaporó a presión reducida para evaporar el metanol. El producto precipitado se redisolvió en AcOEt, se lavó con agua, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El éster obtenido se utilizó sin purificación adicional.

Síntesis de IS-15



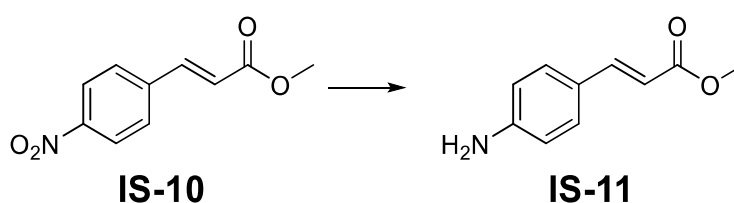
El compuesto **IS-10** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de ésteres a partir de ácido *p*-nitrocínámico. El producto se aisló como un sólido amarillo. Rendimiento: 100%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.72 – 7.65 (m, 3H), 6.55 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 4.30 (s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.2, 148.1, 141.6, 139.1, 128.4, 123.9, 121.8, 52.1.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.⁹

Procedimiento general para la reducción de grupo NO_2 aromático:¹⁰ A una solución de compuesto nitrado (5,0 mmol), cloruro de amonio (5,0 eq) en metanol (20 mL), agua (10 mL) y AcOEt (20 mL) se le añadió hierro en polvo (3,0 eq). La mezcla se calentó a reflujo suave durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad.

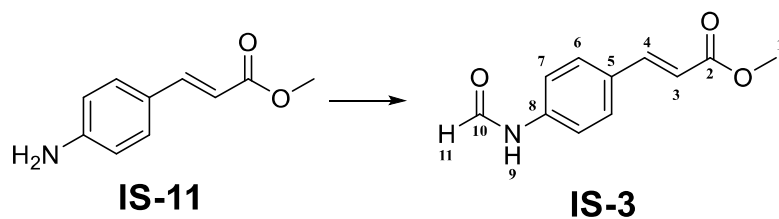


El compuesto **IS-11** se obtuvo siguiendo la metodología general para la reducción de grupo NO_2 aromático a partir de **IS-10**. El producto se aisló como un sólido de color amarillo pálido. Rendimiento: 97%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.60 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.64 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.24 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 3.96 (sa, 2H), 3.78 (s, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168.1, 148.8, 145.1, 129.9, 124.6, 114.8, 113.2, 51.4.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹¹

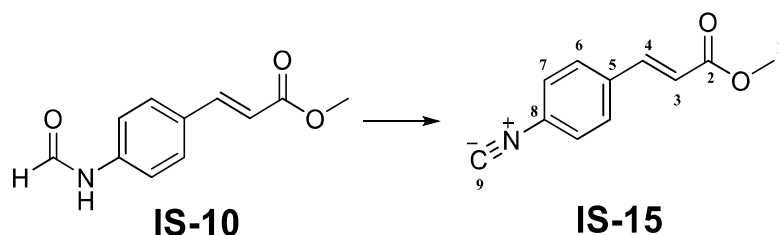


El compuesto **IS-3** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de **IS-11**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 94%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.78 y 8.40 (H-11, d, $J = 11.3, 1.7$ Hz, 1H), 8.25 (H-9, d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 7.64 y 7.64 (H-4, d, $J = 16.1, 16.0$ Hz, 1H), 7.59 y 7.52 (H-6, d, $J = 8.6, 8.6$ Hz, 2H), 7.49 y 7.10 (H-7, d, $J = 8.6, 8.6$ Hz, 2H), 6.38 y 6.37 (H-3, d, $J = 16.1, 15.9$ Hz, 1H), 3.80 y 3.80 (H-1, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167.7 y 167.5 (C-2), 162.0 y 159.1 (C-10), 144.1 y 143.7 (C-4), 138.8 y 138.6 (C-8), 131.4 y 130.9 (C-5), 129.8 y 129.2 (C-6), 120.1 y 118.5 (C-7), 117.5 y 117.2 (C-3), 51.9 y 51.9 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_3$ 206.0812, encontrado 206.0843.



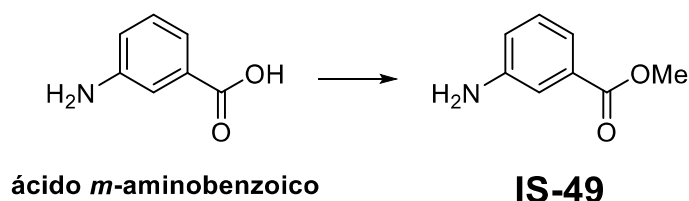
El compuesto **IS-15** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-10**. El producto se aisló como un sólido amarillo (P.f.: 125 °C). Rendimiento: 88%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.64 (H-4, d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.54 (H-6, d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.39 (H-7, d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.45 (H-3, d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 3.81 (H-1, s, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.9 (C-2), 166.2 (C-9), 142.7 (C-4), 135.6 (C-5), 129.1 (C-6), 127.1 (C-7), 120.3 (C-3), 114.3 (C-8), 52.1 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_2$ 188.0706, encontrado 188.0671.

Síntesis de IS-16

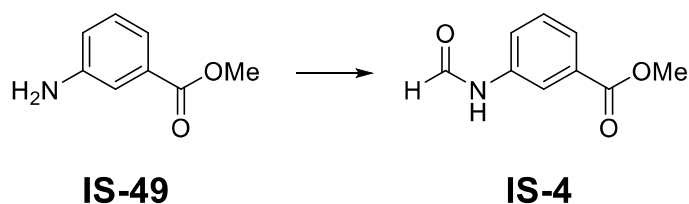


El compuesto **IS-49** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de ésteres a partir de ácido *m*-aminobenzoico. El producto se aisló como un sólido blanco. Rendimiento: 100%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.16 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.82 – 6.79 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.59 (sa, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167.5, 146.9, 131.0, 129.2, 119.5, 119.3, 115.7, 52.0.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹²

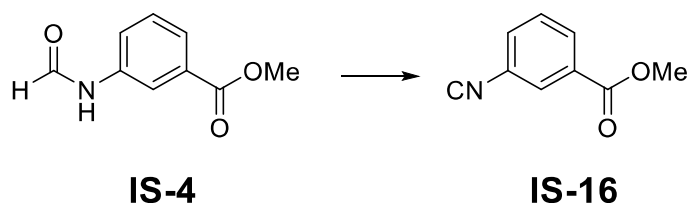


El compuesto **IS-4** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de **IS-49**. El producto se aisló como un sólido amarillo. Rendimiento: 96%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.79 (d, $J = 11.2$ Hz, 0.45H), 8.61 (sa, 0.41H), 8.45 (s, 0.59H), 8.15 – 8.09 (m, 0.62H), 8.02 – 7.95 (m, 0.69H), 7.93 (sa, 0.50H), 7.90 – 7.85 (m, 0.58H), 7.85 – 7.78 (m, 1H), 7.49 – 7.39 (m, 1H), 7.34 – 7.30 (m, 0.45H), 3.95 (d, $J = 10.0$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.7, 166.3, 162.4, 159.3, 137.2, 137.1, 131.8, 130.9, 129.9, 129.3, 126.2, 125.8, 124.6, 122.9, 120.7, 119.4, 52.5, 52.4.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹³



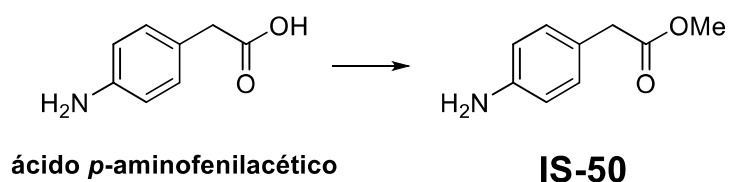
El compuesto **IS-16** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-4**. El producto se aisló como un líquido amarillo. Rendimiento: 87%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.09 – 8.07 (m, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.51 – 7.49 (m, 1H), 3.95 (s, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165.6, 165.2, 131.8, 131.8, 130.4, 130.3, 129.7, 127.5, 52.6.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹⁴

Síntesis de IS-17

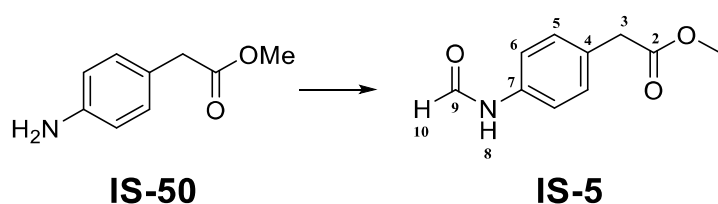


El compuesto **IS-50** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de ésteres a partir de ácido *p*-aminofenilacético. El producto se aisló como un sólido blanco. Rendimiento: 99%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.51 (s, 2H), 1.26 (sa, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 155.4, 145.4, 130.1, 123.9, 115.3, 51.9, 40.3.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.

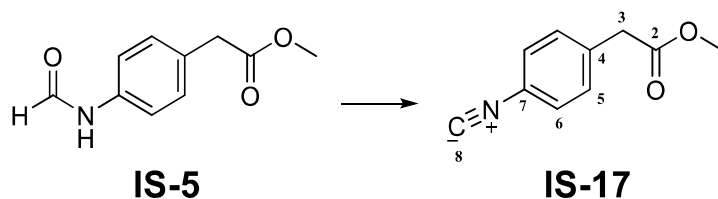


El compuesto **IS-5** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de **IS-50**. El producto se aisló como un líquido amarillo. Rendimiento: 89%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.63 y 8.26 (H-10, d, $J = 11.4, 1.8$ Hz, 1H), 8.94 y 8.08 (H-8, d, $J = 11.6, 10.9$ Hz, 1H), 7.46 y 7.24 (H-6, d, $J = 8.5, 8.3$ Hz, 2H), 7.19 y 7.03 (H-5, d, $J = 8.5, 8.3$ Hz, 2H), 3.68 y 3.67 (H-1, s, 3H), 3.60 y 3.58 (H-3, s, 2H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.3 y 172.1 (C-2), 163.2 y 159.5 (C-9), 136.2 y 135.9 (C-7), 131.1 y 130.3 (C-4), 130.7 y 129.9 (C-5), 120.3 y 119.0 (C-6), 52.2 y 52.2 (C-1), 40.6 y 40.4 (C-3).

HRMS (ESI $^+$): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_3$ 194.0812, encontrado 194.0824.



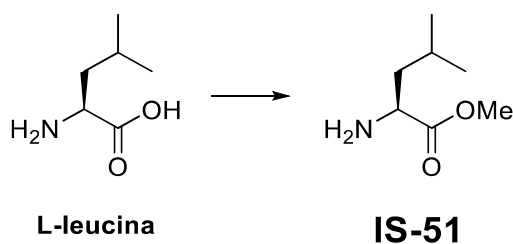
El compuesto **IS-17** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-5**. El producto se aisló como un líquido amarillo. Rendimiento: 55%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.37 – 7.28 (H-5 y H-6, m, 4H), 3.70 (H-1, s, 2H), 3.64 (H-3, s, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.2 (C-2), 164.4 (C-8), 135.7 (C-4), 130.5 (C-5), 126.7 (C-6), 118.8 (C-7), 52.4 (C-1), 40.8 (C-3).

HRMS (ESI $^+$): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NO}_2$ 176.0706, encontrado 176.0778.

Síntesis de IS-18

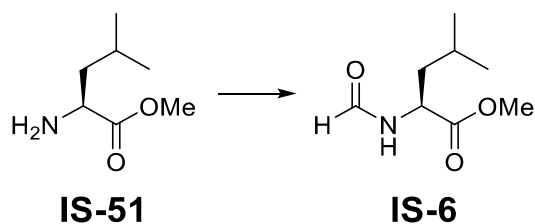


El compuesto **IS-51** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de ésteres a partir de L-leucina. El producto se aisló como un líquido incoloro. Rendimiento: 100%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.64 (s, 3H), 3.41 (dd, $J = 4.8$ Hz, 1H), 1.74 – 1.66 (m, 1H), 1.66 (sa, 2H), 1.52 – 1.46 (m, 1H), 1.38 – 1.32 (m, 1H), 0.87 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 176.9, 52.6, 51.7, 43.9, 24.6, 22.8, 21.7.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹⁵

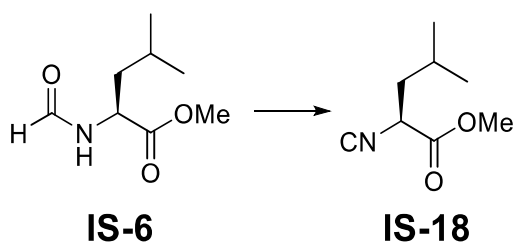


El compuesto **IS-6** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de **IS-51**. El producto se aisló como un sólido amarillo. Rendimiento: 85%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.10 (s, 1H), 4.46 (m, 1H), 3.47 (s, 3H), 2.0 (s, 1H), 1.80 – 1.74 (m, 3H), 1.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 6H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.8, 162.4, 51.6, 48.2, 40.3, 22.8, 22.4.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹⁶



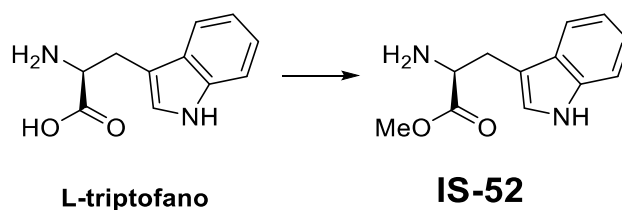
El compuesto **IS-18** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-6**. El producto se aisló como un líquido amarillo. Rendimiento: 70%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.29 (dd, $J = 10.1, 4.8$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 1.87 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 0.99 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167.7, 160.1, 55.1, 53.3, 41.3, 24.8, 22.6, 20.9.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹⁷

Síntesis de IS-19

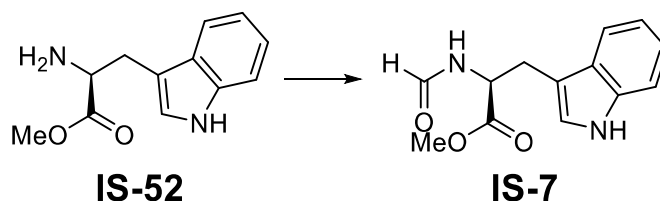


El compuesto **IS-52** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de ésteres a partir de L-triptofano. El producto se aisló como un sólido marrón. Rendimiento: 99%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.35 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.19 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.12 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.84 (dd, $J = 7.6$, 4.8 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.28 (dd, $J = 14.4$, 4.8 Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 14.4$, 8.0 Hz, 1H), 1.64 (s, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 175.8, 136.3, 127.5, 123.0, 122.2, 119.5, 118.8, 111.3, 111.0, 55.0, 52.1, 30.8.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.

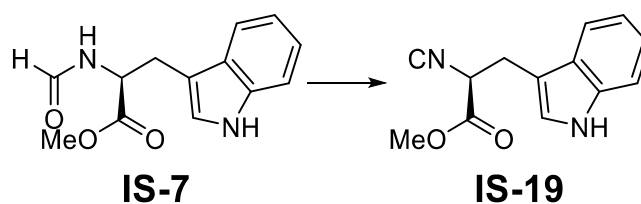


El compuesto **IS-7** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de **IS-52**. El producto se aisló como un líquido incoloro. Rendimiento: 88%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.35 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.56 (dt, $J = 7.9$, 0.9 Hz, 1H), 7.36 (dt, $J = 8.1$, 0.9 Hz, 1H), 7.24 – 7.19 (m, 1H), 7.14 (ddd, $J = 8.0$, 7.0, 1.1 Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.09 – 4.99 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.36 (dd, $J = 5.4$, 3.3 Hz, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.9, 159.8, 135.0, 126.4, 121.9, 121.3, 118.6, 117.4, 110.3, 108.3, 59.4, 51.4, 50.5, 26.4.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹⁶



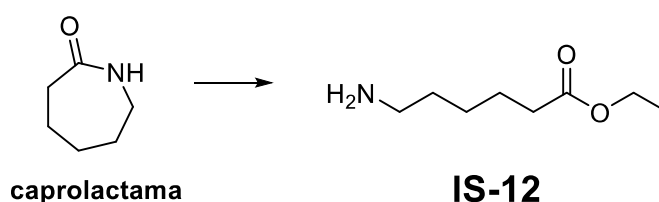
El compuesto **IS-19** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-7**. El producto se aisló como un líquido amarillo. Rendimiento: 76%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.20 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), 7.16 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.55 (dd, $J = 7.9, 4.7$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.48 (dd, $J = 14.7, 4.7$ Hz, 1H), 3.36 (dd, $J = 14.7, 7.9$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167.0, 160.0, 136.0, 126.6, 123.7, 122.3, 119.7, 118.0, 111.4, 108.4, 57.4, 53.3, 29.4.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.¹⁸

Síntesis de IS-20

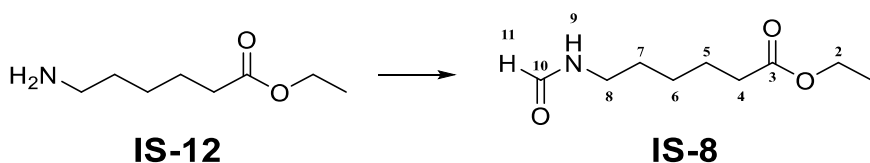


Se siguió la metodología descrita por Menezes *et. al.*¹⁹ La caprolactama y NaOH (1,2 eq) se disolvieron en etanol dentro de un tubo de presión de paredes gruesas, el cual fue sellado. La mezcla se agitó a 120 °C durante 12 h. Después de enfriar el tubo a temperatura ambiente, la mezcla se disolvió con etanol y se trató gota a gota con cloruro de tionilo (1,2 eq) a 0 °C con agitación vigorosa. Luego de 30 min, la suspensión se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida. El producto precipitado se redisolvió en AcOEt, se lavó con NaHCO_3 , se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El producto obtenido se utilizó sin purificación adicional. El éster **IS-12** se obtuvo como sólido blanco. Rendimiento: 55%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.10 (s, 2H), 4.06 (q, $J = 7.1$, Hz, 2H), 3.60 (s, 2H), 2.98 (s, 2H), 2.27 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.82 – 1.72 (m, 2H), 1.66 – 1.56 (m, 2H), 1.44 – 1.34 (m, 2H), 1.23 – 1.15 (m, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.6, 60.3, 39.8, 33.9, 27.1, 25.9, 24.2, 14.1.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²⁰

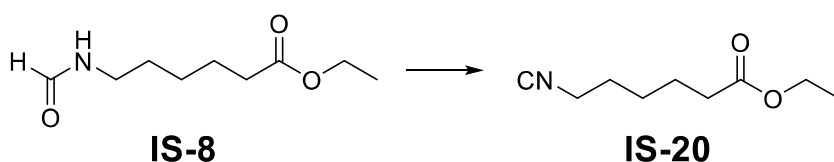


El compuesto **IS-8** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de **IS-12**. El producto se aisló como un líquido incoloro. Rendimiento: 90%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.14 y 8.00 (H-11, d, $J = 11.96$, 2.18 Hz, 1H), 6.42 y 5.83 (H-9, sa, 1H), 4.10 (H-2, q, $J = 7.14$ Hz, 2H), 3.29 y 3.20 (H-8, q, $J = 6.75$ Hz, 2H), 2.29 (H-4, t, $J = 7.38$ Hz, 2H), 1.63 (H-5, p, $J = 7.45$ Hz, 2H), 1.53 (H-7, p, $J = 7.25$ Hz, 2H), 1.35 (H-6, p, $J = 7.42$ Hz, 2H), 1.23 (H-1, t, $J = 7.16$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.8 y 173.6 (C-3), 165.3 y 161.5 (C-10), 60.5 y 60.4 (C-2), 41.9 y 38.0 (C-8), 34.2 y 34.1 (C-4), 30.9 y 29.2 (C-7), 26.3 y 25.9 (C-6), 24.5 y 24.4 (C-5), 20.9 y 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_3$ 188.1281, encontrado 188.1194.



El compuesto **IS-20** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-8**. El producto se aisló como un líquido amarillo. Rendimiento: 67%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.12 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.40 – 3.37 (m, 2H), 2.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.73 – 1.60 (m, 4H), 1.50 – 1.44 (m, 2H), 1.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

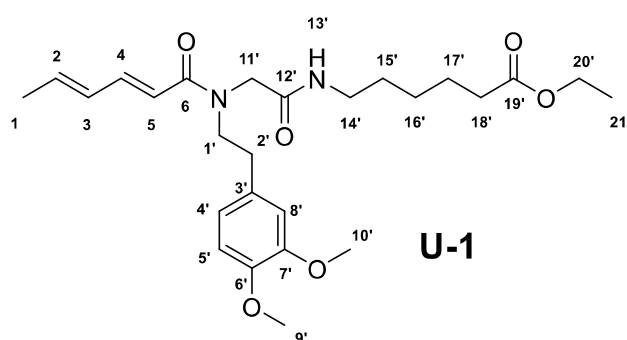
^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.4, 156.0 – 155.9 (m), 60.5, 41.5 – 41.4 (m), 34.0, 28.9, 25.9, 24.1, 14.3.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²¹

Metodología para la síntesis de los bloques U

Metodología general para la reacción de Ugi: El formaldehído (1 eq) y la amina (1 eq) se disolvieron en 5 mL de metanol y se agitaron durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadió el ácido (0,7 - 1,0 mmol, 1 eq) y el isonitrilo correspondiente (1 eq). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente hasta la desaparición del material de partida (normalmente 5 - 7 días). El solvente se evaporó a presión reducida y el residuo se recogió en AcOEt y se lavó con NaOH (5% acuoso). Los productos crudos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de hexano/AcOEt).

Síntesis de U-1



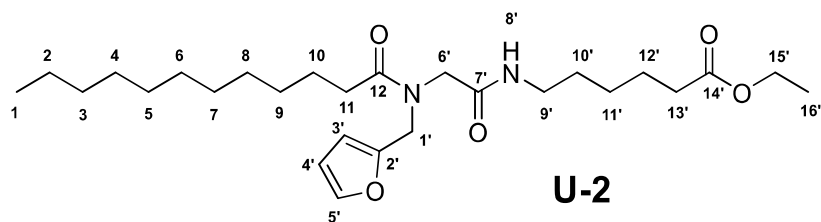
El compuesto **U-1** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para reacciones de Ugi usando ácido sórbico, 3,4-dimetoxifenetilamina y el isonitrilo **IS-20**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 67%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.19 (H-4, m, 1H), 6.74 (H-13', sa, 1H), 6.71 (H-5', m, 1H), 6.67 (H-4', m, 1H), 6.63 (H-8', s, 1H), 6.10 (H-3, m, 1H), 6.09 (H-2, m, 1H), 5.99 (H-5, d, $J = 14.63$ Hz, 1H), 4.05 (H-20', q, $J = 7.10$ Hz, 2H), 3.93 (H-11', s, 2H), 3.82 (H-10', s, 3H), 3.80 (H-9', s, 3H), 3.62 (H-1', t, $J = 7.21$ Hz, 2H), 3.16 (H-14', q, $J = 6.61$ Hz, 2H), 2.80 (H-2', t, $J = 6.64$ Hz, 2H), 2.22 (H-18', t, $J = 7.08$ Hz, 2H), 1.81 (H-1, d, $J = 5.06$ Hz, 3H), 1.56 (H-17', p, $J = 7.50$ Hz, 2H), 1.44 (H-15', p, $J = 7.47$ Hz, 2H), 1.27 (H-16', p, $J = 7.13$ Hz, 2H), 1.19 (H-21', t, $J = 7.11$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.3 (C-19'), 169.3 (C-12'), 167.6 (C-6), 148.9 (C-7'), 147.8 (C-6'), 143.8 (C-4), 138.5 (C-2), 130.2 (C-3'), 129.8 (C-3), 120.7 (C-4'), 116.9 (C-5), 111.9 (C-8'), 111.3 (C-5'), 60.0 (C-20'), 55.7 (C-9' y C-10'), 51.6 (C-11'), 51.1 (C-1'), 39.0 (C-14'), 34.9 (C-2'), 33.9 (C-18'), 28.9 (C-15'), 26.1 (C-16'), 24.3 (C-17'), 18.5 (C-1), 14.1 (C-21').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_6$ 475.2803, encontrado 475.2853.

Síntesis de U-2



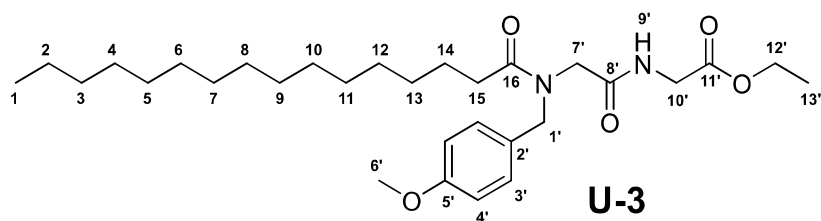
El compuesto **U-2** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para reacciones de Ugi usando ácido láurico, furfurilamina y el isonitrilo **IS-20**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 73%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.36 (H-5', d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.34 – 6.29 (H-4', m, 1H), 6.30 (H-8', t, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.26 (H-3', d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.53 (H-1', s, 2H), 4.10 (H-15', q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.94 (H-6', s, 2H), 3.15 (H-9', q, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.53 (H-11, t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.26 (H-13', t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.65 (H-10, q, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.59 (H-12', q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.48 – 1.37 (H-10' y H-11', m, 4H), 1.36 – 1.19 (H-2 a H-9 y H-16', m, 18H), 0.86 (H-1, t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.4 (C-12), 173.7 (C-14'), 169.2 (C-7'), 149.5 (C-2'), 143.0 (C-5'), 110.6 (C-4'), 109.0 (C-3'), 60.4 (C-15'), 50.5 (C-6'), 46.0 (C-1'), 39.2 (C-9'), 34.2 (C-13'), 33.1 (C-11), 32.0 (C-3), 29.86 – 29.31 (C-4 a C-9), 29.2 (C-10'), 26.4 (C-11'), 25.2 (C-10), 24.6 (C-12'), 22.8 (C-2), 14.4 (C-16'), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_5$ 479.3479, encontrado 479.3475.

Síntesis de U-3



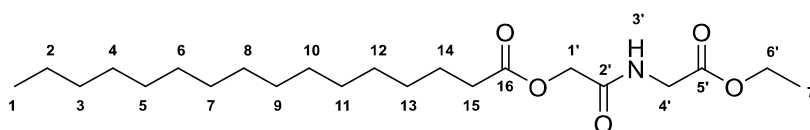
El compuesto **U-3** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para reacciones de Ugi usando ácido palmítico, 4-metoxibencilamina e isocianoacetato de etilo. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 65%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.09 (H-3', d, $J = 8.25$ Hz, 2H), 6.87 (H-4', d, $J = 8.72$ Hz, 2H), 6.79 (H-9', m, 1H), 4.58 (H-1', s, 2H), 4.19 (H-12', q, $J = 7.16$ Hz, 2H), 3.98 (H-7', s, 2H),

3.96 (H-10', d, J = 7.25 Hz, 2H), 3.79 (H-6', s, 3H), 2.44 (H-15, t, J = 7.66 Hz, 2H), 1.66 (H-14, m, 2H), 1.27 (H-13', t, J = 7.15 Hz, 3H), 1.24 - 1.28 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.87 (H-1, t, J = 6.74 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.8 (C-16), 169.7 (C-8'), 169.5 (C-11'), 159.4 (C-5'), 130.0 (C-2'), 128.1 (C-3'), 114.5 (C-4'), 61.5 (C-12'), 55.4 (C-6'), 51.9 (C-1'), 49.7 (C-7'), 41.3 (C-10'), 33.2 (C-15), 32.0 (C-3), 29.8 - 29.5 (C-4 a C-13), 25.4 (C-14), 22.8 (C-2), 14.3 (C-13'), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₀H₅₁N₂O₅ 519.3792, encontrado 519.3841.



U-3'

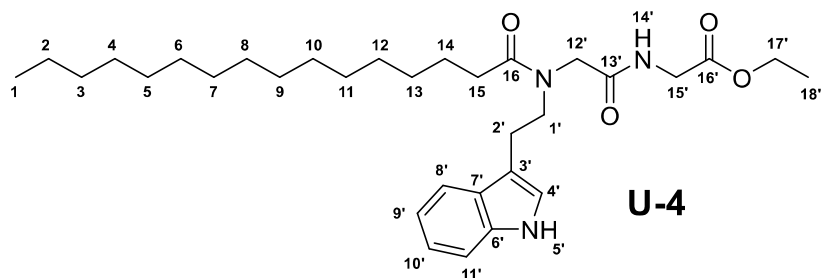
El compuesto **U-3'** se aisló como subproducto en la síntesis del compuesto **U-3** siguiendo el procedimiento general para reacciones de Ugi usando ácido palmítico, 4-metoxibencilamina e isocianoacetato de etilo. Se obtuvo el producto Passerini como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 19%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.66 (H-3', sa, 1H), 4.60 (H-1', s, 2H), 4.23 (H-6', q, J = 7.13 Hz, 2H), 4.07 (H-4', d, J = 5.07 Hz, 2H), 2.42 (H-15, t, J = 7.53 Hz, 2H), 1.65 (H-14, m, 2H), 1.29 (H-7', t, J = 7.21 Hz, 3H), 1.24 - 1.28 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.87 (H-1, t, J = 6.57 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.4 (C-16), 169.6 (C-5'), 167.4 (C-2'), 62.8 (C-1'), 61.9 (C-6'), 41.1 (C-4'), 34.1 (C-15), 32.0 (C-3), 30.4 - 28.9 (C-4 a C-16 y C-7'), 24.9 (C-14), 22.8 (C-2), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₂₂H₄₂NO₅ 400.3057, encontrado 400.3151.

Síntesis de U-4



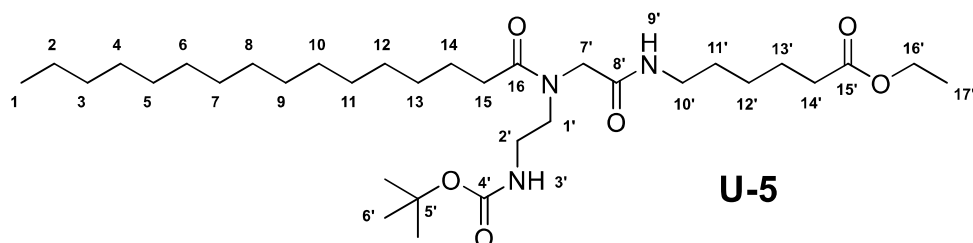
El compuesto **U-4** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para reacciones de Ugi usando ácido palmítico, triptamina e isocianoacetato de etilo. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 67%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.28 (H-5', m, 1H), 7.56 (H-8', d, $J = 7.86$ Hz, 1H), 7.36 (H-11', d, $J = 8.11$ Hz, 1H), 7.20 (H-10', t, $J = 7.65$ Hz, 1H), 7.13 (H-9', t, $J = 7.43$ Hz, 1H), 6.99 (H-4' y H-14', m, 2H), 6.99 (H-14', sa, 1H), 4.18 (H-17', q, $J = 7.16$ Hz, 2H), 4.07 (H-12', s, 2H), 3.99 (H-15', d, $J = 5.44$ Hz, 2H), 3.69 (H-1', t, $J = 7.31$ Hz, 2H), 3.05 (H-2', t, $J = 7.24$ Hz, 2H), 2.16 (H-15, t, $J = 7.52$ Hz, 2H), 1.50 (H-14, p, $J = 7.57$ Hz, 2H), 1.14 - 1.29 (H-2 a H-13 y H-18', m, 26H), 0.88 (H-1, t, $J = 6.84$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.9 (C-16), 170.1 (C-13'), 169.7 (C-16'), 136.4 (C-6'), 127.2 (C-7'), 122.6 (C-4'), 122.4 (C-10'), 119.8 (C-9'), 118.3 (C-8'), 111.9 (C-3'), 111.5 (C-11'), 61.5 (C-17'), 51.0 (C-12'), 50.3 (C-1'), 41.4 (C-15'), 32.8 (C-15), 32.1 (C-'), 29.9 - 29.3 (C-4 a C-13 y C-18'), 25.3 (C-14), 24.8 (C-2'), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_4$ 542.3952, encontrado 542.3925.

Síntesis de U-5



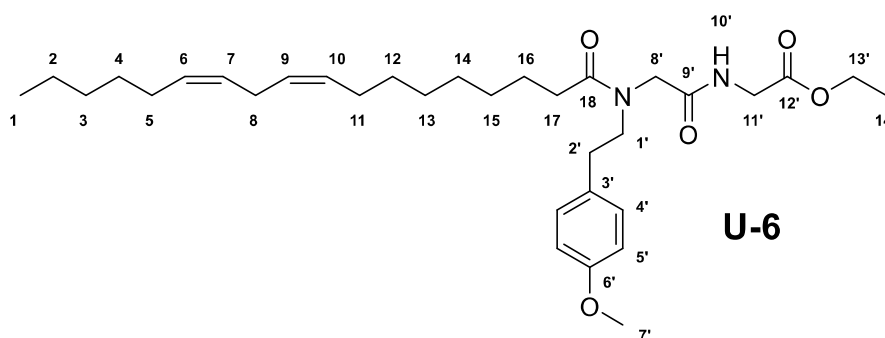
El compuesto **U-5** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para reacciones de Ugi usando ácido palmítico, **AM-1** y el isonitrilo **IS-20**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 71%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.43 (H-9', sa, 1H), 5.48 (H-3', sa, 1H), 4.11 (H-16', q, J = 7.16 Hz, 2H), 3.85 (H-7', s, 2H), 3.49 (H-1', t, J = 5.90 Hz, 2H), 3.29 (H-2', dt, J = 6.49 y 5.48 Hz, 2H), 3.22 (H-10', q, J = 6.62 Hz, 2H), 2.35 (H-15, t, J = 7.63 Hz, 2H), 2.28 (H-14', t, J = 7.44 Hz, 2H), 1.78 (H-14 y H-13', m, 4H), 1.62 (H-11' y H-12', m, 4H), 1.55 – 1.20 (H-2 a H-13, m, 24H), 1.42 (H-6', s, 9H), 0.87 (H-1, t, J = 6.80 Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.7 (C-16), 156.2 (C-15'), 79.6 (C-5'), 60.4 (C-16'), 51.5 (C-7'), 49.8 (C-1'), 39.5 (C-10'), 39.1 (C-2'), 34.2 (C-14'), 32.9 (C-15), 32.1 (C-3), 30 – 29 (C-4 a C-13), 28.5 (C-6'), 28.5 (C-11'), 26.5 (C-12'), 25.3 (C-14), 24.5 (C-13'), 22.8 (C-2), 14.4 (C-17'), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{33}\text{H}_{64}\text{N}_3\text{O}_6$ 598.4790, encontrado 598.4779.

Síntesis de U-6



El compuesto **U-6** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para reacciones de Ugi usando ácido linoleico, 4-metoxifenetilamina e isocianoacetato de etilo. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 82%.

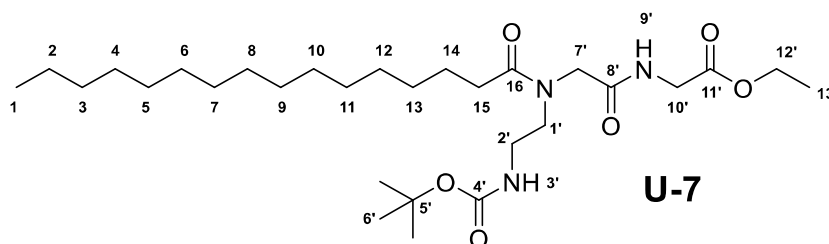
^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.05 (H-4', d, J = 8.56 Hz, 2H), 6.95 (H-10', t, J = 5.51 Hz, 1H), 6.82 (H-5', d, J = 8.59 Hz, 2H), 5.36 (H-7 y H-9, m, 2H), 5.32 (H-6 y H-10, m, 2H), 4.16 (H-13', q, J = 7.16 Hz, 2H), 4.00 (H-8', s, 2H), 3.97 (H-11', d, J = 5.50 Hz, 2H), 3.76 (H-7', s, 3H), 3.56 (H-1', t, J = 7.39 Hz, 2H), 2.81 (H-2', t, J = 7.32 Hz, 2H), 2.75 (H-8, t, J = 6.77 Hz, 2H), 2.24 (H-17, t, J = 7.51 Hz, 2H), 2.03 (H-5 y H-11, q, J = 6.77 Hz, 4H), 1.54 (H-16, p, J = 7.58 Hz, 2H), 1.23 – 1.37 (H-2 a H-4 y H-12 a H-15, m, 14H), 1.24 (H-14', t, J = 7.13 Hz, 3H), 0.87 (H-1, t, J = 6.87 Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.5 (C-18), 169.8 (C-9'), 169.6 (C-12'), 158.6 (C-6'), 130.3 (C-6), 130.1 (C-10), 129.9 (C-3'), 129.8 (C-4'), 128.1 (C-9), 128.0 (C-7), 114.2 (C-5'), 61.4 (C-13'), 55.3 (C-7'), 51.4 (C-1'), 50.7 (C-8'), 41.3 (C-11'), 34.2 (C-2'), 32.7 (C-17), 31.6

(C-3), 29.7 – 29.3 (C-4 y C-12 a C-15), 27.3 (C-5), 27.3 (C-11), 25.7 (C-8), 25.2 (C-16), 22.6 (C-2), 14.2 (C-14'), 14.1 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₃H₅₃N₂O₅ 557.3949, encontrado 557.3956.

Síntesis de U-7



El compuesto **U-7** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para reacciones de Ugi usando ácido linoleico, **AM-1** e isocianoacetato de etilo. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 64%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.13 (H-9', t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.98 (H-3', t, J = 6.1 Hz, 1H), 4.18 (H-12', q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.00 – 3.93 (H-7' y H-10', m, 4H), 3.54 (H-1', t, J = 4.0 Hz, 2H), 3.25 (H-2', q, J = 5.7 Hz, 2H), 2.35 (H-15, t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.59 (H-14, p, J = 7.6 Hz, 2H), 1.41 (H-6', s, 9H), 1.33 – 1.20 (H-2 a H-13 y H-13', m, 27H), 0.86 (H-1, t, J = 6.9 Hz, 3H).

¹³C RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.5 (C-16), 170.8 (C-11'), 170.2 (C-8'), 156.5 (C-4'), 79.3 (C-5'), 61.7 (C-12'), 52.0 (C-7'), 50.2 (C-1'), 41.2 (C-10'), 39.1 (C-2'), 33.0 (C-15), 32.0 (C-3), 29.8 - 29.5 (C-4 a C-13), 28.5 (C-6'), 25.3 (C-14), 22.8 (C-2), 14.2 (C-1 y C-13').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₂₉H₅₆N₃O₆ 542.4164, encontrado 542.4153.

Metodología para la síntesis de los bloques PIP1

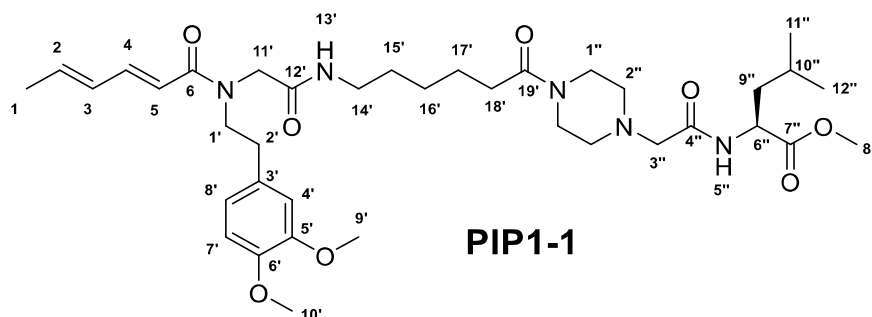
Procedimiento general para la hidrólisis del éster y obtención de los derivados Uac: Se preparó una solución que contenía 1,0 mmol del éster en 5 mL de metanol y luego se agregaron 2,0 mmol de K₂CO₃ a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió mediante CCD. Al finalizar, la solución se acidificó con una solución de HCl al 5% hasta que el pH alcanzó 2, lo que dio como resultado la precipitación del ácido correspondiente. El ácido obtenido se utilizó sin purificación adicional.

Procedimiento general para Ugi Split (Técnica A): Las reacciones se llevaron a cabo en las mismas condiciones que la reacción de Ugi descrita anteriormente, con piperazina como

componente amina. Los productos crudos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de metanol/AcOEt con la adición de trietilamina al 1%).

Procedimiento general para Ugi Split (Técnica B: generación del isonitrilo *in situ*):²² Se preparó una solución de la formamida (0,1 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL), se añadió trietilamina (2,5 eq) y la mezcla se enfrió sobre hielo. Se añadió gota a gota una solución de trifosgeno (0,4 eq) en CH₂Cl₂ (5 mL) a la mezcla en agitación durante 30 min. La mezcla de reacción se agitó a -10 °C durante 30 min más. Paralelamente se preparó una solución de la amina (1,05 eq) y formaldehído (1,1 eq) en 5 mL de metanol y se dejó agitar 15 min, y después se añadió el ácido (1,05 eq). Luego, se añadió la solución resultante junto con otros 5 mL de MeOH a la mezcla de reacción de isonitrilo formada *in situ* en baño de hielo. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente hasta la desaparición del material de partida (normalmente 5 - 7 días). El solvente se evaporó a presión reducida. Los productos crudos se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de metanol/AcOEt con la adición de trietilamina al 1%).

Síntesis de PIP1-1 y PIP1-22



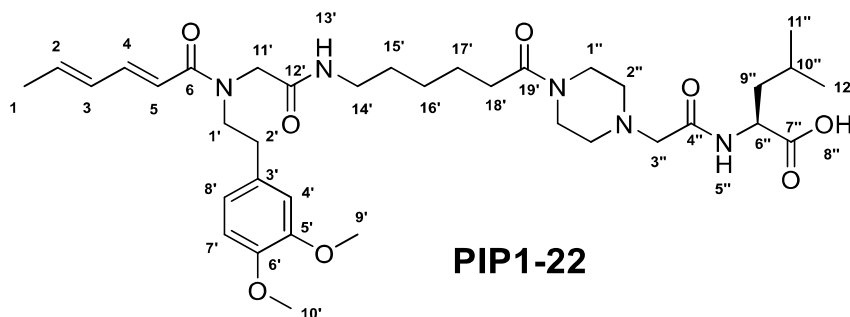
El compuesto **PIP1-1** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-1** y el isonitrilo **IS-18**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 80%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.38 (H-5'', d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.23 (H-4, dd, J = 14.7, 9.5 Hz, 1H), 6.78 (H-7', d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.73 (H-13', t, J = 5.6 Hz, 1H), 6.68 (H-8', d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.65 (H-4', s, 1H), 6.13 (H-3, m, 1H), 6.11 (H-2, d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.01 (H-5, d, J = 14.7 Hz, 1H), 4.64 (H-6'', td, J = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 3.95 (H-11', s, 2H), 3.85 (H-9', s, 3H), 3.83 (H-10', s, 3H), 3.72 (H-8'', s, 3H), 3.64 (H-1', t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.59 – 3.39 (H-1'', m, 4H), 3.20 (H-14', q, J = 6.8, 6.0 Hz, 2H), 3.08 (H-3''a, d, J = 16.1 Hz, 1H), 2.99 (H-3''b, d, J = 16.2 Hz,

1H), 2.82 (H-2', t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.68 – 2.41 (H-2'', m, 4H), 2.28 (H-18', t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.84 (H-1, d, J = 5.2 Hz, 3H), 1.71 – 1.20 (H-15', H-16', H-17', H-9'' y H-10'', m, 9H), 0.95 (H-11'', d, J = 2.0 Hz, 3H), 0.93 (H-12'', d, J = 2.2 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.6 (C-7''), 171.5 (C-19'), 169.7 (C-4''), 169.7 (C-12'), 168.0 (C-6), 149.3 (C-5'), 148.1 (C-6'), 144.3 (C-4), 139.0 (C-2), 130.3 (C-3'), 130.1 (C-3), 120.9 (C-8'), 117.0 (C-5), 112.1 (C-7'), 111.6 (C-4'), 61.4 (C-3''), 56.1 (C-9'), 56.0 (C-10'), 53.6 (C-2''a), 53.3 (C-2''b), 52.4 (C-8''), 52.2 (C-11'), 51.4 (C-1'), 50.2 (C-6''), 45.6 (C-1''), 41.6 (C-9''), 39.3 (C-14'), 35.2 (C-2'), 33.1 (C-18'), 29.3 (C-15'), 26.7 (C-16'), 25.1 (C-10''), 24.8 (C-17'), 23.0 (C-11''), 21.9 (C-12''), 18.8 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₇H₅₈N₅O₈ 700.4285, encontrado 700.4310.



El compuesto **PIP1-22** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del éster a partir del producto Ugi Split **PIP1-1**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 78%.

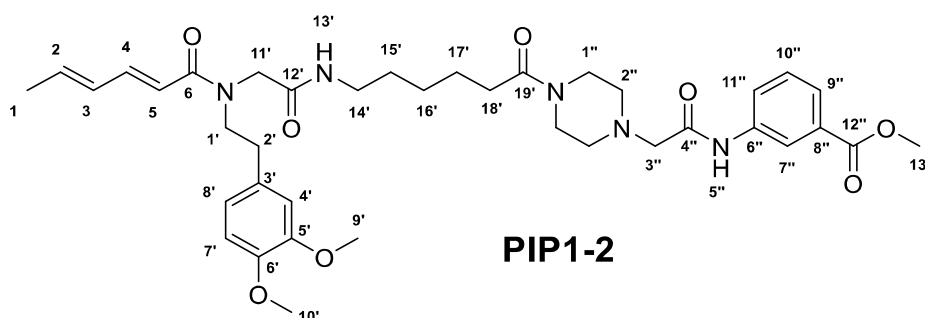
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.62 (H-5'', d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.20 (H-4, dd, J = 14.7, 9.6 Hz, 1H), 6.90 (H-13', t, J = 5.0 Hz, 1H), 6.78 (H-7', d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.69 (H-8', d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.66 (H-4', s, 1H), 6.18 – 6.05 (H-2 y H-3, m, 2H), 6.01 (H-5, d, J = 14.6 Hz, 1H), 4.06 (H-6'', t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.96 (H-11', s, 2H), 3.85 (H-9', s, 3H), 3.83 (H-10', s, 3H), 3.64 (H-1', t, J = 7.4 Hz, 2H), 3.51 (H-1'', m, 4H), 3.18 (H-14', t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.08 (H-3''a, d, J = 15.6 Hz, 1H), 2.98 (H-3''b, d, J = 15.6 Hz, 1H), 2.83 (H-2', t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.49 (H-2'', m, 4H), 2.26 (H-18', t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.83 (H-1, d, J = 5.6 Hz, 3H), 1.63 – 1.52 (H-9'' y H-10'', m, 3H), 1.47 (H-15', m, 2H), 1.36 – 1.19 (H-16' y H-17', m, 4H), 0.90 (H-11'', d, J = 5.4 Hz, 3H), 0.86 (H-12'', d, J = 5.7 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.0 (C-7''), 171.7 (C-19'), 171.0 (C-4''), 169.6 (C-12'), 168.0 (C-6), 149.3 (C-5'), 148.1 (C-6'), 144.1 (C-4), 138.9 (C-2), 130.5 (C-3'), 130.2 (C-3), 121.0 (C-8'), 117.2 (C-5), 112.2 (C-4'), 111.6 (C-7'), 61.2 (C-3''), 56.1 (C-9'), 56.1 (C-10'), 54.1 (C-6''), 53.6 (C-2''), 51.8 (C-11'), 51.4 (C-1'), 45.5 (C-1''), 41.1 (C-9''), 39.4 (C-14'), 35.2

(C-2'), 33.1 (C-18'), 29.8 (C-17'), 29.4 (C-15'), 26.8 (C-16'), 24.9 (C-10''), 23.6 (C-11''), 21.7 (C-12''), 18.8 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₆H₅₆N₅O₈ 686.4129, encontrado 686.4124.

Síntesis de PIP1-2



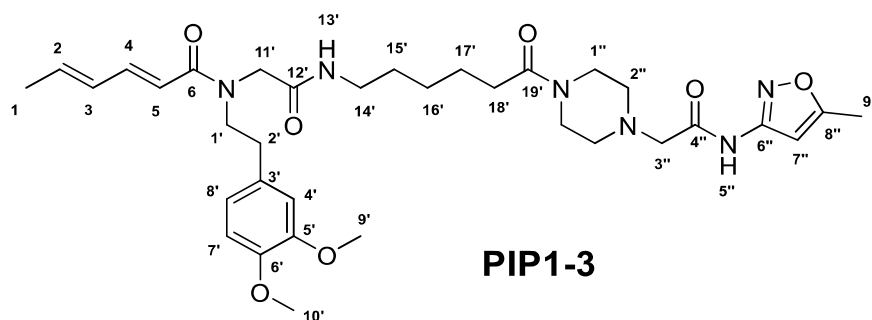
El compuesto **PIP1-2** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-1** y el isonitrilo **IS-16**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 66%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.08 (H-5'', s, 1H), 8.01 (H-9'', d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.99 (H-7'', s, 1H), 7.79 (H-11'', d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.42 (H-10'', t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.20 (H-4, t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.78 (H-4', s, 1H), 6.74 (H-8', d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.72 (H-13', t, J = 6.2 Hz, 1H), 6.67 (H-7', d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.11 (H-3, t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.02 (H-5, d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.89 (H-2, m, 1H), 3.92 (H-13'', s, 3H), 3.86 (H-9', s, 3H), 3.84 (H-10', s, 3H), 3.71 (H-1''a, m, 2H), 3.64 (H-1', t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.54 (H-1''b, m, 2H), 3.28 (H-11', s, 2H), 3.25 (H-14', m, 2H), 3.18 (H-3'', s, 2H), 2.90 (H-2', t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.60 (H-2'', t, J = 5.0 Hz, 4H), 2.30 (H-18', t, J = 8.3 Hz, 2H), 1.84 (H-1, d, J = 5.2 Hz, 3H), 1.62 (H-17', m, 2H), 1.50 (H-15', m, 2H), 1.34 (H-16', m, 2H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.5 (C-19'), 170.2 (C-12'), 168.0 (C-4''), 168.0 (C-6), 166.8 (C-12''), 149.3 (C-5'), 144.3 (C-6'), 139.1 (C-4), 138.5 (C-6''), 137.7 (C-2), 131.1 (C-3'), 130.1 (C-8''), 129.5 (C-10''), 129.2 (C-3), 125.6 (C-11''), 124.2 (C-9''), 121.0 (C-8'), 120.4 (C-7''), 117.1 (C-5), 112.2 (C-7'), 111.6 (C-4'), 62.1 (C-3''), 58.6 (C-11'), 56.1 (C-10'), 56.0 (C-9'), 53.8 (C-2''a), 53.4 (C-2''b), 52.4 (C-13''), 51.4 (C-1'), 46.0 (C-1''a), 43.6 (C-14'), 41.7 (C-1''b), 35.2 (C-2'), 33.1 (C-18'), 29.4 (C-15'), 26.7 (C-16'), 24.8 (C-17'), 18.8 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₈H₅₂N₅O₈ 706.3810, encontrado 706.3806.

Síntesis de PIP1-3



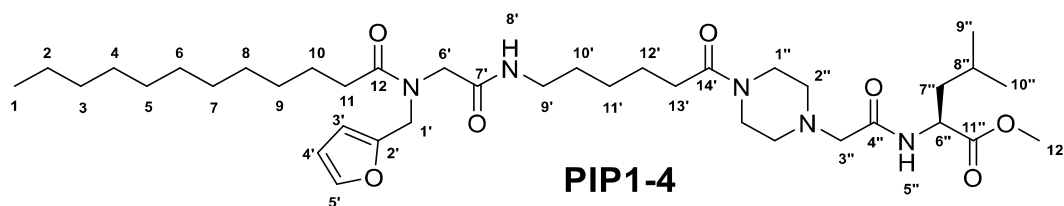
El compuesto **PIP1-3** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica B del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-1** y la formamida **IS-9**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 72%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.19 (H-4, td, $J = 10.4, 9.8, 5.1$ Hz, 1H), 6.85 (H-13', t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 6.77 (H-7', d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.73 – 6.63 (H-4' y H-8', m, 2H), 6.56 (H-5'', s, 1H), 6.17 – 6.05 (H-2 y H-3, m, 2H), 6.00 (H-5, d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 3.96 (H-11', s, 2H), 3.84 (H-9', s, 3H), 3.82 (H-10', s, 3H), 3.67 – 3.60 (H-1' y H-3'', m, 4H), 3.49 – 3.38 (H-1''a, m, 2H), 3.17 (H-14' y H-1''b, m, 4H), 2.96 – 2.88 (H-2''b, m, 2H), 2.85 – 2.78 (H-2' y H-2''b, m, 4H), 2.20 (H-18', t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.95 (H-9'', s, 3H), 1.82 (H-1, dd, $J = 5.5, 2.2$ Hz, 3H), 1.54 (H-17', p, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.49 – 1.41 (H-15', m, 2H), 1.33 – 1.24 (H-16', m, 2H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 178.7 (C-19'), 177.2 (C-8''), 169.6 (C-12'), 168.4 (C-4''), 168.0 (C-6), 149.2 (C-5'), 148.0 (C-6'), 145.1 (C-6''), 144.3 (C-4), 139.0 (C-2), 130.4 (C-3'), 130.1 (C-3), 120.9 (C-8'), 117.0 (C-5), 112.2 (C-4'), 111.6 (C-7'), 101.9 (C-7''), 61.3 (C-3''), 56.1 (C-10'), 56.0 (C-9'), 52.8 (C-2''a), 51.8 (C-11'), 51.3 (C-1'), 48.6 (C-2''b), 42.3 (C-1''a), 41.8 (C-1''b), 39.4 (C-14'), 35.5 (C-18'), 35.1 (C-2'), 29.1 (C-15'), 26.6 (C-16'), 25.1 (C-17'), 22.7 (C-9''), 18.8 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_7$ 653.3657, encontrado 653.3649.

Síntesis de PIP1-4



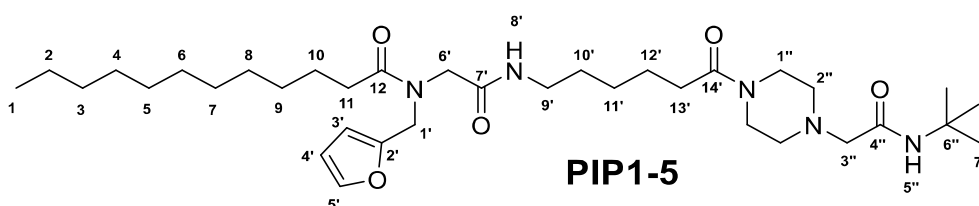
El compuesto **PIP1-4** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-2** y el isonitrilo **IS-18**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 53%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.39 (H-5'', d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.36 (H-5', d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.34 (H-8', d, J = 6.0 Hz, 1H), 6.32 (H-4', dd, J = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 6.26 (H-3', d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.65 (H-6'', td, J = 9.1, 4.8 Hz, 1H), 4.53 (H-1', s, 2H), 3.94 (H-6', s, 2H), 3.72 (H-12'', s, 3H), 3.62 – 3.43 (H-1'', m, 4H), 3.18 (H-9', dt, J = 13.4, 6.9 Hz, 2H), 3.09 (H-3''a, d, J = 16.17 Hz, 1H), 3.00 (H-3''b, d, J = 16.24 Hz, 1H), 2.67 – 2.56 (H-2''a, m, 2H), 2.53 (H-11, t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.46 (H-2''b, m, 2H), 2.29 (H-13', t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.72 – 1.52 (H-10, H-10', H-7'' y H-8'', m, 8H), 1.45 (H-11', p, J = 7.2 Hz, 2H), 1.38 – 1.19 (H-2 a H-9, m, 16H), 0.95 (H-10'', d, J = 2.2 Hz, 2H), 0.94 (H-9'', d, J = 2.3 Hz, 2H), 0.86 (H-1, t, J = 6.8 Hz, 2H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.4 (C-12), 173.6 (C-11''), 171.5 (C-14'), 169.7 (C-4''), 169.2 (C-7'), 149.6 (C-2'), 143.0 (C-5'), 110.6 (C-4'), 109.0 (C-3'), 61.4 (C-3''), 53.6 (C-2''a), 53.3 (C-2''b), 52.4 (C-12''), 50.4 (C-6'), 50.2 (C-6''), 46.0 (C-1'), 45.6 (C-1''a), 45.6 (C-1''b), 41.6 (C-7''), 39.2 (C-9'), 33.1 (C-13'), 33.1 (C-11), 32.0 (C-3), 29.92 – 29.04 (C-4 a C-9 y C-10'), 26.7 (C-11'), 25.2 (C-8''), 25.2 (C-10), 24.8 (C-12'), 23.0 (C-9''), 22.8 (C-2), 22.0 (C-10''), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{38}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_7$ 704.4962, encontrado 704.4946.

Síntesis de PIP1-5



El compuesto **PIP1-5** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-2** y 2-isociano-2-metilpropano. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 71%.

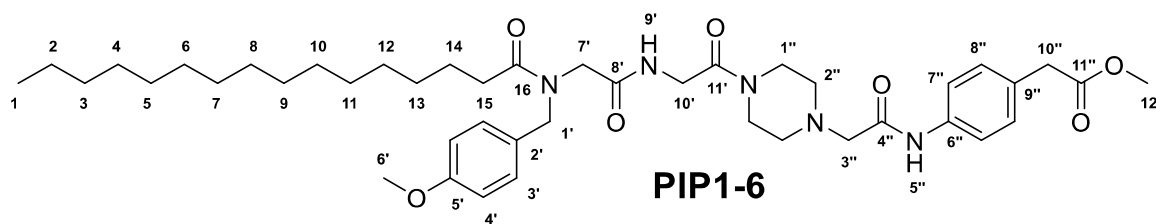
^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.36 (H-5', dd, J = 1.9, 0.7 Hz, 1H), 6.89 (H-5'', s, 1H), 6.32 (H-4', dd, J = 3.2, 1.9 Hz, 1H), 6.29 (H-8', m, 1H), 6.25 (H-3', d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.53 (H-

1', s, 2H), 3.94 (H-6', s, 2H), 3.67 – 3.55 (H-1''a, m, 2H), 3.48 – 3.44 (H-1''b, m, 2H), 3.16 (H-9', q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.91 (H-3'', s, 2H), 2.53 (H-11, t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.48 (H-2'', m, 4H), 2.29 (H-13', t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.72 – 1.56 (H-10 y H-12', m, 4H), 1.45 (H-10', p, J = 6.7 Hz, 2H), 1.35 (H-7'', s, 9H), 1.34 – 1.18 (H-2 a H-9 y H-11', m, 18H), 0.86 (H-1, t, J = 7.0 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.4 (C-12), 171.5 (C-14'), 169.2 (C-7'), 168.7 (C-4''), 149.6 (C-2'), 143.0 (C-5'), 110.6 (C-4'), 109.0 (C-3'), 62.3 (C-3''), 53.6 (C-2a''), 53.2 (C-2''b), 50.7 (C-6''), 50.4 (C-6'), 46.0 (C-1'), 45.7 (C-1''a), 41.7 (C-1''b), 39.2 (C-9'), 33.1 (C-11), 33.1 (C-13'), 32.0 (C-3), 29.9 – 29.1 (C-4 a C-9 y C-10'), 28.9 (C-7''), 26.7 (C-11'), 25.2 (C-10), 24.7 (C-12'), 22.8 (C-2), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₅H₆₂N₅O₅ 632.4751, encontrado 632.4746.

Síntesis de PIP1-6 y PIP-23



El compuesto **PIP1-6** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-3** y el isonitrilo **IS-17**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 80%.

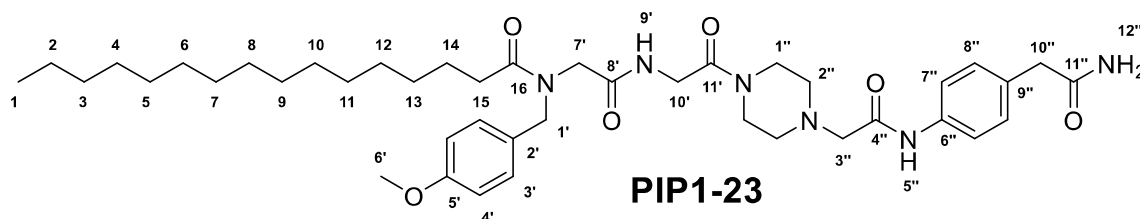
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.86 (H-5'', s, 1H), 7.51 (H-7'', d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.25 (H-8'', d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.09 (H-3', d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.97 (H-9', t, J = 4.3 Hz, 1H), 6.87 (H-4', d, J = 8.6 Hz, 2H), 4.59 (H-1', s, 2H), 4.03 (H-10', d, J = 4.2 Hz, 2H), 4.01 (H-7', s, 2H), 3.80 (H-6', s, 3H), 3.71 (H-1''a, q, J = 4.8 Hz, 2H), 3.68 (H-12'', s, 3H), 3.60 (H-10'', s, 2H), 3.48 (H-1''b, dd, J = 6.6, 3.6 Hz, 2H), 3.17 (H-3'', s, 2H), 2.62 (H-2'', dt, J = 9.8, 5.1 Hz, 4H), 2.46 (H-15, t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.69 (H-14, p, J = 7.7 Hz, 2H), 1.36 – 1.22 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.87 (H-1, t, J = 6.9 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.5 (C-1'), 172.1 (C-11''), 169.1 (C-11'), 167.5 (C-8'), 166.4 (C-4''), 159.4 (C-5'), 136.4 (C-6''), 130.2 (C-2'), 130.1 (C-8'), 128.1 (C-3'), 127.9 (C-9''), 119.8 (C-7'), 114.5 (C-4'), 62.1 (C-3''), 55.4 (C-6'), 53.3 (C-2''), 53.1 (C-2''), 52.2 (C-12''),

51.9 (C-1'), 49.4 (C-7'), 44.5 (C-1''), 42.2 (C-1''), 41.1 (C-10'), 40.7 (C-10''), 33.2 (C-15), 32.0 (C-3), 30 – 29.4 (C-4 a C-13), 25.4 (C-14), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₄₃H₆₆N₅O₇ 764.4962, encontrado 764.4958.

Metodología general para la síntesis de amidas a partir de los aductos Ugi Split: Se preparó una mezcla del éster (0,1 mmol) en una solución saturada de NH₃ en metanol (1 mL) para dar la amida respectiva, que se purificó mediante filtración.



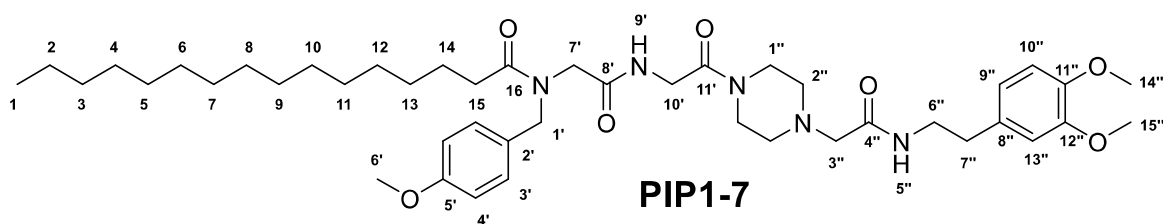
El compuesto **PIP1-23** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de amidas a partir del producto Ugi Split **PIP1-6**. El producto se aisló como un sólido blanco (P.f.: 195 °C). Rendimiento: 67%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.89 (H-5''), s, 1H), 7.56 (H-7'', d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.27 (H-8'', d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.09 (H-3', d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.97 (H-9', t, J = 3.3 Hz, 1H), 6.88 (H-4', d, J = 8.3 Hz, 2H), 5.37 (H-12'', sa, 2H), 4.59 (H-1', s, 2H), 4.04 (H-10', d, J = 4.2 Hz, 2H), 4.01 (H-7', s, 2H), 3.80 (H-6', s, 3H), 3.72 (H-1''a, m, 2H), 3.57 (H-10'', s, 1H), 3.49 (H-1''b, m, 2H), 3.19 (H-3'', s, 2H), 2.64 (H-2'', t, J = 6.3 Hz, 4H), 2.47 (H-15, t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.69 (H-14, q, J = 7.4 Hz, 2H), 1.35 – 1.21 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.88 (H-1, t, J = 6.8 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.6 (C-16), 173.2 (C-11''), 169.1 (C-8'), 167.6 (C-4''), 166.4 (C-11'), 159.4 (C-5'), 136.7 (C-6''), 131.1 (C-9''), 130.3 (C-8''), 128.1 (C-3'), 127.9 (C-2'), 120.3 (C-7''), 114.5 (C-4'), 62.1 (C-3''), 55.5 (C-6'), 53.4 (C-2''a), 53.2 (C-2''b), 52.0 (C-1'), 49.4 (C-7'), 44.5 (C-1''a), 42.8 (C-10''), 42.2 (C-1''b), 41.2 (C-10'), 33.3 (C-15), 32.1 (C-3), 30.03 – 29.21 (C-4 a C-13), 25.4 (C-14), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₄₂H₆₅N₆O₆ 749.4966, encontrado 749.4935.

Síntesis de PIP1-7



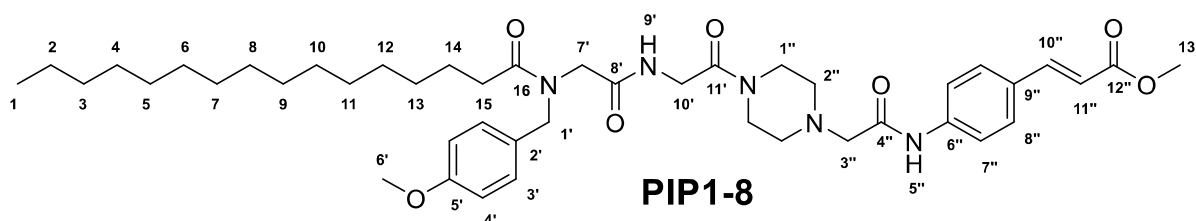
El compuesto **PIP1-7** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-3** y el isonitrilo **IS-14**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 57%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.01 (H-5'', s, 1H), 7.64 (H-10'', d, $J = 15.99$ Hz, 1H), 7.60 (H-7'', d, $J = 8.64$ Hz, 2H), 7.50 (H-8'', d, $J = 8.60$ Hz, 2H), 7.09 (H-3', d, $J = 8.55$ Hz, 2H), 6.98 (H-9', t, $J = 4.26$ Hz, 1H), 6.87 (H-4', d, $J = 8.69$ Hz, 2H), 6.37 (H-11'', d, $J = 15.99$ Hz, 1H), 4.58 (H-1', s, 2H), 4.03 (H-10', d, $J = 3.95$ Hz, 2H), 4.00 (H-7', s, 2H), 3.79 (H-6' y H-13'', s, 6H), 3.72 (H-1''a, m, 2H), 3.49 (H-1''b, m, 2H), 3.19 (H-3'', s, 2H), 2.63 (H-2'', m, 4H), 2.46 (H-15, t, $J = 7.62$ Hz, 2H), 1.69 (H-14, p, $J = 7.50$ Hz, 2H), 1.32 – 1.22 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.87 (H-1, t, $J = 6.88$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.6 (C-16), 169.4 (C-4''), 169.1 (C-11'), 166.3 (C-8'), 159.4 (C-5'), 149.4 (C-11''), 148.0 (C-12''), 131.3 (C-8''), 128.1 (C-3'), 127.9 (C-2'), 120.8 (C-9''), 114.5 (C-4'), 112.0 (C-13''), 111.4 (C-10''), 61.6 (C-3''), 56.2 (C-14''), 56.1 (C-15''), 55.5 (C-6'), 53.3 (C-2''a), 53.1 (C-2''b), 51.9 (C-1'), 49.4 (C-10'), 44.4 (C-1''a), 42.1 (C-1''b), 41.1 (C-7'), 40.0 (C-6''), 35.3 (C-7''), 33.3 (C-15), 32.1 (C-3), 30.0 – 29.4 (C-4 a C-13), 25.4 (C-14), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{N}_5\text{O}_7$ 780.5275, encontrado 780.5289.

Síntesis de PIP1-8



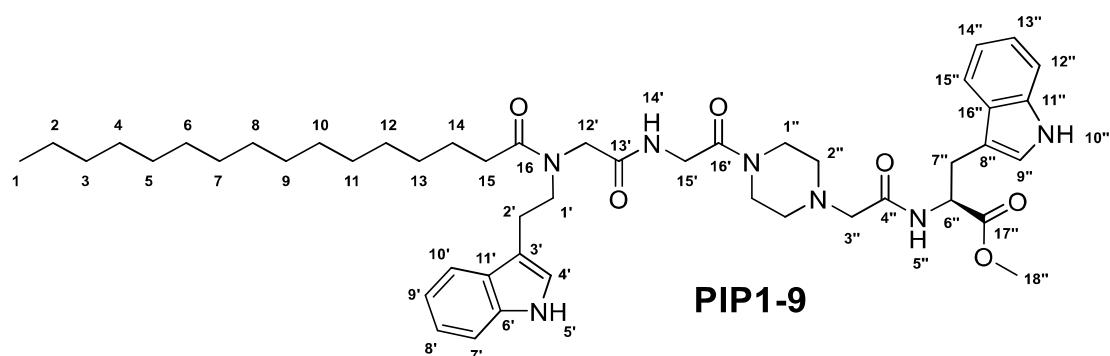
El compuesto **PIP1-8** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-3** y el isonitrilo **IS-15**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 57%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.01 (H-5'', s, 1H), 7.64 (H-10'', d, J = 15.99 Hz, 1H), 7.60 (H-7'', d, J = 8.64 Hz, 2H), 7.50 (H-8'', d, J = 8.60 Hz, 2H), 7.09 (H-3', d, J = 8.55 Hz, 2H), 6.98 (H-9', t, J = 4.26 Hz, 1H), 6.87 (H-4', d, J = 8.69 Hz, 2H), 6.37 (H-11'', d, J = 15.99 Hz, 1H), 4.58 (H-1', s, 2H), 4.03 (H-10', d, J = 3.95 Hz, 2H), 4.00 (H-7', s, 2H), 3.79 (H-6' y H-13'', s, 6H), 3.72 (H-1''a, m, 2H), 3.49 (H-1''b, m, 2H), 3.19 (H-3'', s, 2H), 2.63 (H-2'', m, 4H), 2.46 (H-15, t, J = 7.62 Hz, 2H), 1.69 (H-14, p, J = 7.50 Hz, 2H), 1.32 – 1.22 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.87 (H-1, t, J = 6.88 Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.6 (C-1), 169.1 (C-8'), 167.7 (C-4''), 167.6 (C-12''), 166.4 (C-11'), 159.4 (C-5'), 144.1 (C-10''), 139.2 (C-6''), 131.3 (C-2'), 130.6 (C-9''), 129.2 (C-8''), 128.1 (C-3'), 119.6 (C-7''), 117.0 (C-11''), 114.5 (C-4'), 62.1 (C-3''), 55.4 (C-6'), 53.3 (C-2''a), 53.2 (C-2''b), 51.9 (C-1'), 51.8 (C-13''), 49.4 (C-7'), 44.5 (C-1''a), 42.1 (C-1''b), 41.1 (C-10'), 33.2 (C-15), 32.0 (C-3), 29.98 – 29.21 (C-4 a C-13), 25.4 (C-14), 22.8 (C-2), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_7$ 776.4957, encontrado 776.4949.

Síntesis de **PIP1-9** y **PIP1-24**



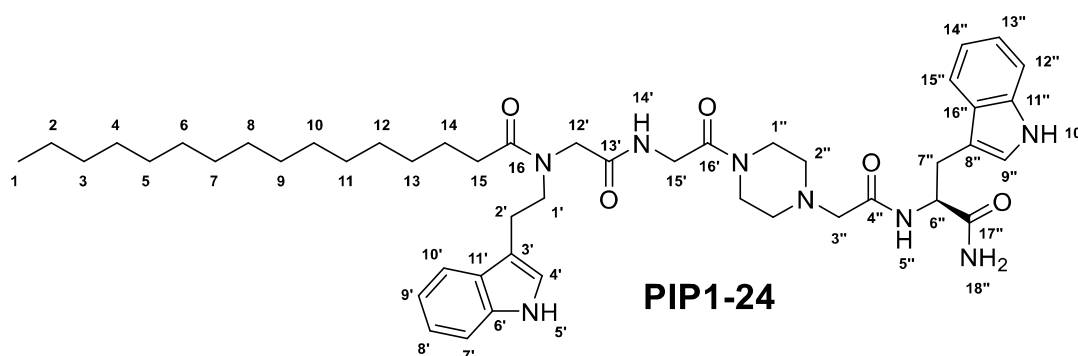
El compuesto **PIP1-9** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-4** y el isonitrilo **IS-19**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 58%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.62 (H-10'', sa, 1H), 8.24 (H-5', sa, 1H), 7.54 (H-10' y H-15'', t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.47 (H-5'', d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.36 (H-7' y H-12'', dd, J = 8.2, 4.5 Hz,

2H), 7.19 (H-8' y H-13'', dt, J = 12.7, 7.6 Hz, 2H), 7.11 (H-9' y H-14'', dt, J = 15.1, 7.3 Hz, 2H), 7.05 (H-14', t, J = 4.9 Hz, 1H), 6.99 (H-4' y H-9'', d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.93 (H-6'', dd, J = 8.6, 5.2 Hz, 1H), 4.06 (H-12', s, 2H), 3.88 (H-15', d, J = 10.9 Hz, 2H), 3.76 (H-18'', s, 3H), 3.69 (H-1', t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.34 (H-7'', qd, J = 14.9, 5.7 Hz, 2H), 3.20 (H-1'', m, 4H), 3.04 (H-2', t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.92 (H-3'', s, 2H), 2.84 (H-2'', td, J = 17.4, 16.9, 11.4 Hz, 4H), 2.18 (H-15, t, J = 7.9 Hz, 2H), 1.51 (H-14, dt, J = 13.9, 7.4 Hz, 2H), 1.33 – 1.12 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.88 (H-1, t, J = 6.7 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.7 (C-16), 172.5 (C-17''), 169.8 (C-4''), 169.4 (C-13'), 166.4 (C-16'), 136.4 (C-11''), 136.3 (C-6'), 127.8 (C-16''), 127.1 (C-11'), 122.8 (C-9''), 122.6 (C-4'), 122.5 (C-13''), 122.5 (C-8'), 119.9 (C-14''), 119.8 (C-9'), 118.6 (C-15''), 118.3 (C-10'), 111.9 (C-3'), 111.6 (C-7'), 111.6 (C-12''), 109.8 (C-8''), 61.0 (C-3''), 52.6 (C-18''), 52.4 (C-6''), 50.5 (C-12'), 50.2 (C-1'), 44.1 (C-2''), 41.9 (C-1''), 41.1 (C-15'), 32.8 (C-15), 32.1 (C-3), 29.9 – 29.2 (C-3 a C-13), 27.2 (C-7''), 25.3 (C-14), 24.9 (C-2'), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₄₈H₇₀N₇O₆ 840.5388, encontrado 840.5390.



El compuesto **PIP1-24** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del éster a partir del producto Ugi Split **PIP1-9**. El producto se aisló como un sólido blanco (P.f.: 193 °C). Rendimiento: 80%.

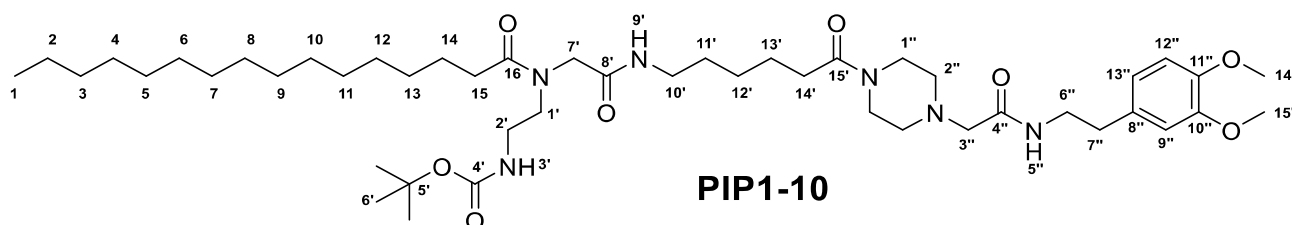
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.58 (H-10'', sa, 1H), 8.20 (H-5', sa, 1H), 7.66 (H-15'', d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.55 (H-8', d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.53 (H-5'', d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.37 (H-11' y H-12'', d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.20 (H-10' y H-13'', q, J = 7.3 Hz, 2H), 7.16 – 7.11 (H-9' y H-14'', m, 2H), 7.11 (H-9'', d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.06 – 7.03 (H-14', m, 1H), 7.01 (H-4', d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.17 (H-18''a, sa, 1H), 5.53 (H-18''b, sa, 1H), 4.81 (H-6'', q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.06 (H-12', s, 2H), 3.90 (H-15', d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.70 (H-1', t, J = 7.4 Hz, 2H), 3.67 – 3.61 (H-1''a, m, 2H), 3.38 – 3.26 (H-7'', m, 2H), 3.26 – 3.21 (H-1''b, m, 2H), 3.04 (H-2', t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.01 –

2.84 (H-3'', m, 2H), 2.84 – 2.80 (H-2'', m, 4H), 2.18 (H-15, t, J = 7.8 Hz, 2H), 1.51 (H-14, p, J = 7.5 Hz, 2H), 1.32 – 1.13 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.88 (H-1, t, J = 6.7 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.7 (C-16), 173.6 (C-17''), 170.2 (C-4''), 169.4 (C-13'), 166.3 (C-16''), 136.4 (C-6' y C-11''), 127.6 (C-11' y C-16''), 123.3 (C-9''), 122.6 (C-8' y C-13''), 122.5 (C-4'), 120.0 (C-14''), 119.9 (C-9'), 118.8 (C-15''), 118.3 (C-10'), 112.0 (C-3'), 111.6 (C-7' y C-12''), 110.3 (C-8''), 61.2 (C-3''), 52.8 (C-6''), 50.6 (C-12'), 50.2 (C-1'), 44.1 (C-2''), 41.8 (C-1''), 41.2 (C-15'), 32.8 (C-15), 32.2 – 29.1 (C-2 a C-13), 27.3 (C-7''), 25.3 (C-14), 24.9 (C-2'), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₄₇H₆₉N₈O₅ 825.5385, encontrado 825.5289.

Síntesis de PIP1-10 y PIP1-18



El compuesto **PIP1-10** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-5** y el isonitrilo **IS-14**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 71%.

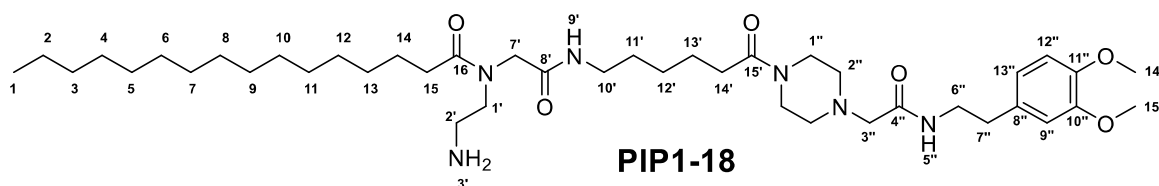
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.05 (H-5'', t, J = 5.7 Hz, 1H), 6.79 (H-12'', d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.74 – 6.69 (H-9'' y H-13'', m, 2H), 6.62 (H-9', t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.63 – 5.55 (H-3', m, 1H), 3.85 (H-7', s, 2H), 3.84 (H-14'' y H-15'', s, 6H), 3.54 (H-6'', q, J = 6.8 Hz, 2H), 3.51 – 3.44 (H-1' y H-1''a, m, 4H), 3.35 – 3.24 (H-2' y H-1''b, m, 4H), 3.22 (H-10', q, J = 7.0, 6.6 Hz, 2H), 2.96 (H-3'', s, 2H), 2.78 (H-7'', t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.40 – 2.35 (H-2'', m, 4H), 2.33 (H-15, t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.26 (H-14', t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.59 (H-14 y H-13', p, J = 7.5 Hz, 4H), 1.51 (H-11', p, J = 7.2 Hz, 2H), 1.40 (H-6', s, 9H), 1.30 – 1.18 (H-2 a H-13 y H-12', m, 26H), 0.85 (H-1, t, J = 6.8 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.8 (C-16), 171.4 (C-15'), 169.8 (C-8'), 169.6 (C-4''), 156.2 (C-4'), 149.2 (C-10''), 147.9 (C-11''), 131.3 (C-8''), 120.8 (C-13''), 111.9 (C-9''), 111.4 (C-12''), 79.5 (C-5'), 61.5 (C-3''), 56.1 (C-14''), 56.0 (C-15''), 53.6 (C-2''a), 53.2 (C-2''b), 51.3 (C-7'), 49.8 (C-1'), 45.5 (C-1''a), 41.6 (C-1''b), 39.9 (C-6''), 39.3 (C-10'), 39.0 (C-2'), 35.2 (C-

7''), 33.0 (C-14'), 32.9 (C-15), 32.0 (C-3), 29.8 – 29.4 (C-4 a C-13), 29.2 (C-11'), 28.5 (C-6'), 26.6 (C-12'), 25.3 (C-14), 24.6 (C-13'), 22.8 (C-2), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+Na⁺] C₄₇H₈₂N₆O₈Na 881.6092, encontrado 881.6085.

Metodología general para la hidrólisis del Boc²³ de los aductos Ugi Split: Se preparó una solución que contenía el compuesto *N*-Boc (0,1 mmol) en una mezcla 1:1 de ácido trifluoroacético y CH₂Cl₂ (1 mL), y se agitó durante 2 h. para generar la amina libre correspondiente. El producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando un gradiente de AcOEt/MeOH con la adición de 1% de trietilamina.



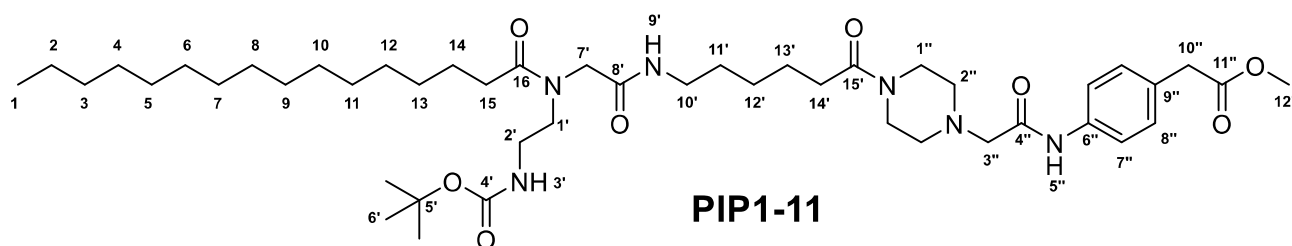
El compuesto **PIP1-18** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del *N*-Boc a partir del producto Ugi Split **PIP1-10**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 67%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.05 (H-5'', d, J = 4.4 Hz, 1H), 6.82 (H-6', sa, 1H), 6.79 (H-12'', d, J = 8.65 Hz, 1H), 6.75 – 6.70 (H-9'' y H-13'', m, 2H), 3.87 (H-4', s, 2H), 3.87 (H-14'', s, 3H), 3.85 (H-15'', s, 3H), 3.66 (H-1', t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.54 (H-6'', q, J = 6.2 Hz, 2H), 3.52 – 3.47 (H-1''a, m, 2H), 3.33 (H-1''b, sa, 2H), 3.26 – 3.19 (H-7', m, 2H), 2.98 (H-3'', s, 2H), 2.83 – 2.76 (H-2' y H-7'', m, 4H), 2.43 – 2.31 (H-15 y H-2'', m, 6H), 2.28 (H-11', t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.67 – 1.53 (H-14, H-8' y H-10', m, 6H), 1.32 – 1.19 (H-2 a H-13 y H-9', m, 26H), 0.88 (H-1, t, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.4 (C-16), 171.2 (C-4''), 170.8 (C-12'), 168.5 (C-5'), 149.2 (C-10''), 147.9 (C-11''), 131.3 (C-8''), 120.8 (C-13''), 112.0 (C-9''), 111.9 (C-12''), 60.6 (C-3''), 57.6 (C-4'), 56.0 (C-14''), 55.9 (C-15''), 53.6 (C-2''a), 53.2 (C-2''b), 48.8 (C-1'), 45.5 (C-1''a), 45.4 (C-7'), 41.6 (C-1''b), 40.6 (C-2'), 39.1 (C-6''), 35.2 (C-7''), 33.0 (C-11'), 32.9 (C-15), 32.0 (C-3), 29.8 – 29.4 (C-4 a C-13), 29.2 (C-8'), 28.5 (C-6'), 26.6 (C-12'), 25.3 (C-14), 24.6 (C-13'), 22.8 (C-2), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₄₂H₇₅N₆O₆ 759.5748, encontrado 759.5742.

Síntesis de PIP1-11 y PIP1-19

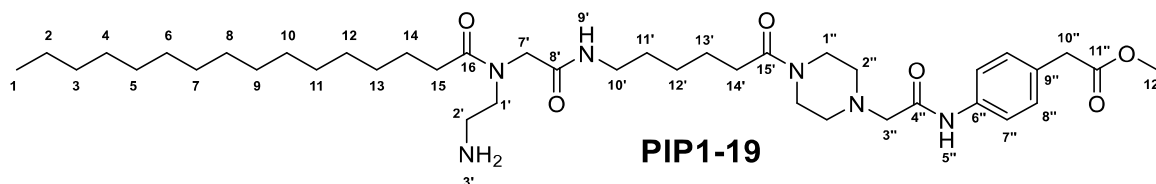


El compuesto **PIP1-11** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-5** y el isonitrilo **IS-17**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 55%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.96 (H-5''), s, 1H), 7.53 (H-7'', d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.26 (H-8'', d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.53 (H-9', t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 5.55 (H-3', t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.87 (H-7', s, 2H), 3.73 (H-1''a, m, 2H), 3.69 (H-12'', s, 3H), 3.61 (H-10'', s, 2H), 3.54 (H-1''b, m, 2H), 3.50 (H-1', t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.30 (H-2', dt, $J = 12.0, 5.8$ Hz, 2H), 3.25 (H-10', dt, $J = 14.7, 8.3$ Hz, 2H), 3.17 (H-3'', s, 2H), 2.65 – 2.56 (H-2'', m, 4H), 2.38 – 2.30 (H-15 y H-14', m, 4H), 1.63 (H-14 y H-13', m, 4H), 1.54 (H-11', p, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.43 (H-6', s, 9H), 1.37 (H-12', p, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.33 – 1.22 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.88 (H-1, t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.8 (C-16), 172.1 (C-11''), 171.5 (C-15'), 169.8 (C-8'), 167.7 (C-4''), 156.2 (C-4'), 136.5 (C-6''), 130.2 (C-9''), 130.1 (C-8''), 119.8 (C-7''), 79.6 (C-5'), 62.1 (C-3''), 53.7 (C-2''a), 53.4 (C-2''b), 52.2 (C-12''), 51.4 (C-7'), 49.8 (C-1'), 45.6 (C-1''a), 41.7 (C-1''b), 40.7 (C-10''), 39.4 (C-10'), 39.1 (C-2'), 33.0 (C-15), 33.0 (C-14'), 32.1 (C-3), 30.1 – 29.4 (C-4 a C-13), 29.2 (C-11'), 28.5 (C-6'), 26.6 (C-12'), 25.4 (C-13'), 24.6 (C-14), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{46}\text{H}_{79}\text{N}_6\text{O}_8$ 843.5954, encontrado 843.5927.



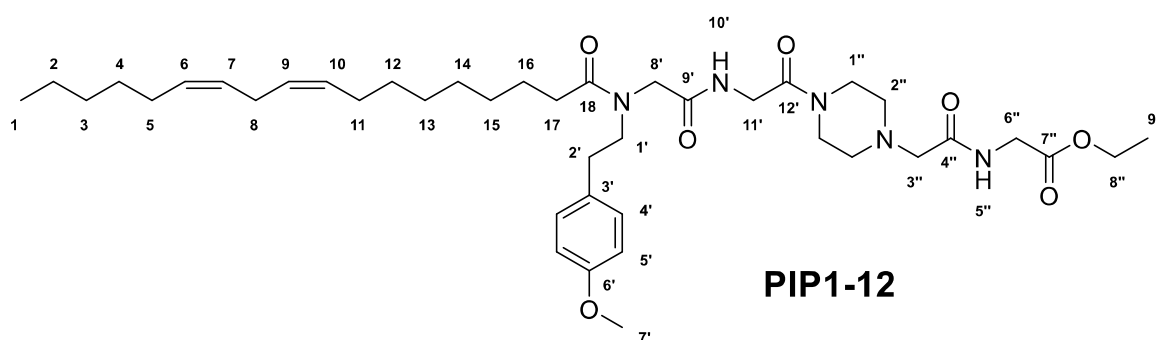
El compuesto **PIP1-19** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del *N*-Boc a partir del producto Ugi Split **PIP1-11**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 76%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.95 (H-5'', s, 1H), 7.52 (H-7'', d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.25 (H-8'', d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.45 – 6.41 (H-9', m, 1H), 3.87 (H-4', s, 2H), 3.75 – 3.69 (H-1''a, m, 2H), 3.69 (H-12'', s, 3H), 3.60 (H-10'', s, 2H), 3.56 – 3.52 (H-1''b, m, 2H), 3.44 (H-1', t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.25 (H-7', q, J = 6.56 Hz, 2H), 3.17 (H-3'', s, 2H), 2.91 – 2.87 (H-2', m, 2H), 2.63 – 2.57 (H-2'', m, 4H), 2.38 – 2.31 (H-15 y H-11', m, 4H), 1.69 – 1.62 (H-14 y H-10', m, 4H), 1.53 (H-8', p, J = 7.1 Hz, 2H), 1.37 (H-9', p, J = 8.1 Hz, 2H), 1.32 – 1.20 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.88 (H-1, t, J = 6.8 Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.4 (C-16), 172.5 (C-11''), 171.6 (C-12'), 170.8 (C-5'), 169.5 (C-4''), 135.9 (C-6''), 130.3 (C-8''), 129.2 (C-9''), 120.0 (C-7''), 62.1 (C-3''), 53.6 (C-2''a), 53.5 (C-2''b), 52.2 (C-12''), 51.1 (C-4'), 48.6 (C-1'), 46.1 (C-1''a), 45.2 (C-2'), 41.8 (C-1''b), 40.7 (C-10''), 39.4 (C-7'), 34.1 (C-15), 33.0 (C-11'), 32.1 (C-3), 30.1 – 29.4 (C-4 a C-13), 29.2 (C-8'), 26.6 (C-9'), 25.4 (C-10'), 24.6 (C-14), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{41}\text{H}_{71}\text{N}_6\text{O}_6$ 743.5435, encontrado 743.5393.

Síntesis de PIP1-12 y PIP1-25



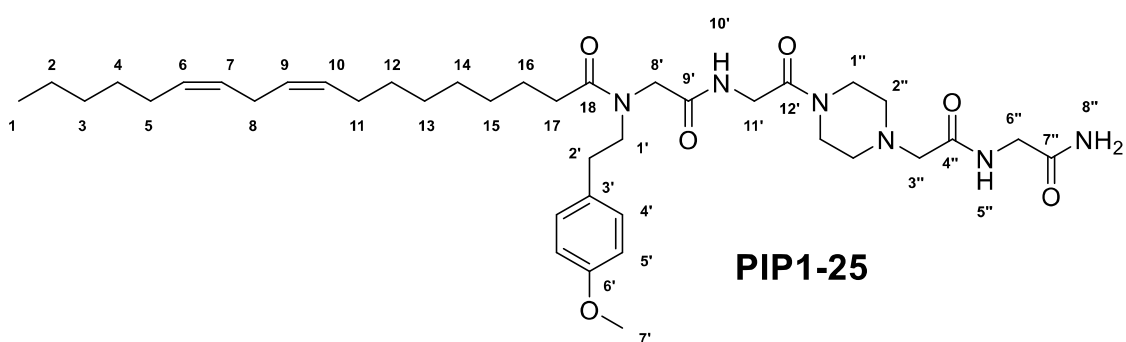
El compuesto **PIP1-12** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-6** e isocianoacetato de etilo. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 84%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.48 (H-10', t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.05 (H-5'', m, 1H), 7.05 (H-4', d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.82 (H-5', d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.43 – 5.27 (H-6, H-7, H-9 y H-10, m, 4H), 4.20 (H-8'', q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.06 (H-11', d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.02 (H-6'', d, J = 4.4 Hz, 2H), 4.00 (H-8', s, 2H), 3.77 (H-7', s, 3H), 3.66 (H-1''a, t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.56 (H-1', t, J = 7.4 Hz, 2H), 3.44 (H-1''b, t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.07 (H-3'', s, 2H), 2.80 (H-2', t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.75 (H-8, t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.56 (H-2'', dt, J = 10.3, 5.0 Hz, 4H), 2.20 (H-17, t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.03

(H-5 y H-11, q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.59 (H-16, dt, J = 14.7, 8.2 Hz, 2H), 1.37 – 1.20 (H-2 a H-4, H-12 a H-15, m, 14H), 1.28 (H-9'', t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.87 (H-1, t, J = 6.8 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.3 (C-18), 170.0 (C-4''), 169.9 (C-7''), 169.3 (C-9'), 166.3 (C-12'), 158.6 (C-6'), 130.9 (C-3'), 130.3 (C-6), 130.2 (C-10), 129.8 (C-4'), 128.1 (C-7), 128.0 (C-9), 114.3 (C-5'), 61.7 (C-8''), 61.3 (C-3''), 55.4 (C-7'), 53.2 (C-2''a), 53.0 (C-2''b), 51.3 (C-8'), 50.3 (C-1'), 44.5 (C-6''), 42.1 (C-1''a), 41.2 (C-1''b), 40.9 (C-11'), 34.4 (C-17), 32.8 (C-2'), 31.6 (C-3), 29.8 – 29.2 (C-4 y C-12 a C-15), 27.3 (C-11), 27.3 (C-5), 25.7 (C-8), 25.2 (C-16), 22.7 (C-2), 14.3 (C-9''), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₄₁H₆₆N₅O₇ 740.4962, encontrado 740.4969.



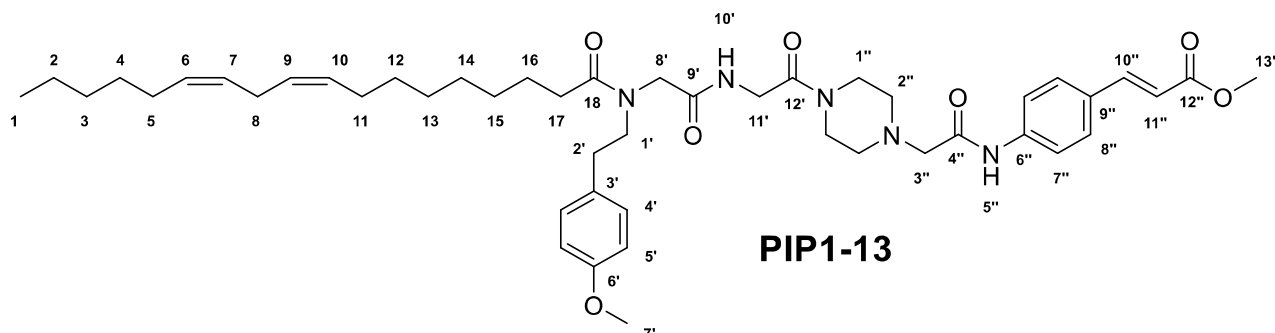
El compuesto **PIP1-25** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del éster a partir del producto Ugi Split **PIP1-12**. El producto se aisló como un sólido blanco (P.f.: 113 °C). Rendimiento: 83%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.72 (H-10', t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.56 (H-8'', m, 2H), 7.13 (H-5'', m, 1H), 7.08 (H-4', d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (H-5', d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.45 – 5.29 (H-6, H-7, H-9 y H-10, m, 4H), 4.08 (H-11', d, J = 6.3 Hz, 2H), 4.06 (H-8', s, 2H), 3.95 (H-6'', d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.81 (H-7', s, 3H), 3.72 – 3.65 (H-1'', m, 4H), 3.59 (H-1', t, J = 7.4 Hz, 2H), 3.11 (H-3'', q, J = 7.3 Hz, 0H), 2.89 (H-2', t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.86 – 2.78 (H-2'', m, 4H), 2.57 (H-8, t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.36 (H-17, t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.22 (H-5 y H-11, q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.64 (H-16, m, 2H), 1.34 – 1.16 (H-2 a H-4 y H-12 a H-15, m, 14H), 0.90 (H-1, t, J = 6.7 Hz, 7H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.4 (C-18), 173.3 (C-7''), 170.9 (C-4''), 168.7 (C-9'), 165.9 (C-12'), 157.8 (C-6'), 131.0 (C-3'), 130.3 (C-6), 130.2 (C-10), 129.8 (C-4'), 128.0 (C-7), 128.0 (C-9), 113.8 (C-5'), 61.1 (C-3''), 55.2 (C-7'), 52.7 (C-2''a), 52.5 (C-2''b), 50.8 (C-8'), 49.9 (C-1'), 45.0 (C-6''), 43.0 (C-1''a), 42.4 (C-1''b), 41.1 (C-11'), 34.5 (C-17), 33.0 (C-2'), 31.8 (C-3), 29.8 – 29.2 (C-4 y C-12 a C-15), 27.3 (C-11), 27.3 (C-5), 25.7 (C-8), 25.2 (C-16), 22.7 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₉H₆₃N₆O₆ 711.4809, encontrado 711.4858.

Síntesis de PIP1-13



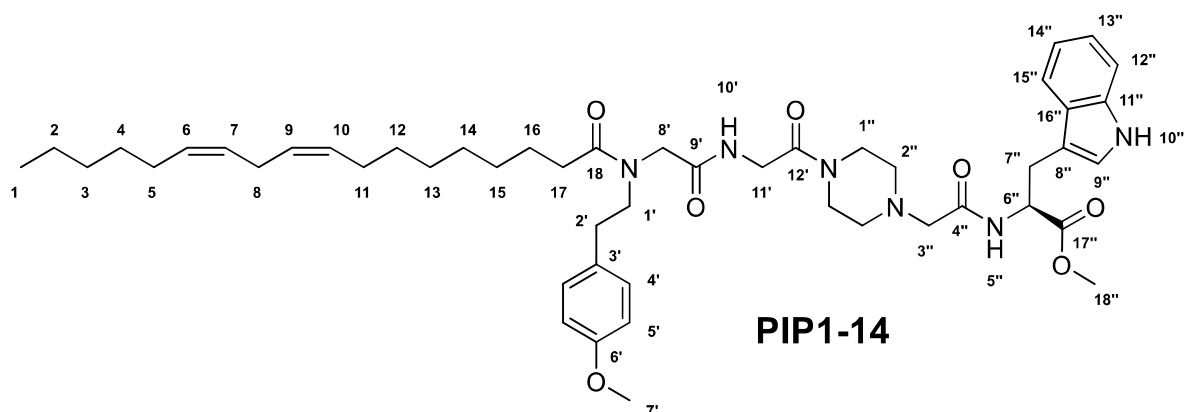
El compuesto **PIP1-13** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-6** y el isonitrilo **IS-15**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 58%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.00 (H-5'', s, 1H), 7.64 (H-10'', d, J = 16.2 Hz, 1H), 7.59 (H-7'', d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.50 (H-8'', d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.09 (H-10', m, 1H), 7.06 (H-4', d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.83 (H-5', d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.37 (H-11'', d, J = 16.0 Hz, 1H), 5.42 – 5.25 (H-6, H-7, H-9 y H-10, m, 4H), 4.04 (H-11', d, J = 4.4 Hz, 2H), 4.01 (H-8', s, 2H), 3.79 (H-7', s, 3H), 3.78 (H-13'', s, 3H), 3.70 (H-1''a, d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.57 (H-1', t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.48 (H-1''b, t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.18 (H-3'', s, 2H), 2.81 (H-2', t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.76 (H-8, t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.62 (H-2'', dt, J = 11.0, 4.9 Hz, 4H), 2.20 (H-17, t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.04 (H-5 y H-11, q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.58 (H-16, p, J = 7.6 Hz, 2H), 1.41 – 1.19 (H-2 a H-4 y H-12 a H-15, m, 14H), 0.88 (H-1, t, J = 6.8 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.3 (C-18), 169.3 (C-9'), 167.6 (C-4''), 167.6 (C-12''), 166.4 (C-12'), 158.6 (C-6'), 144.1 (C-10''), 139.2 (C-6''), 131.3 (C-3'), 130.6 (C-9''), 130.4 (C-10), 130.2 (C-6), 129.8 (C-4'), 129.2 (C-8''), 128.1 (C-9), 128.0 (C-7), 119.6 (C-7''), 117.0 (C-11''), 114.3 (C-5'), 62.1 (C-3''), 55.4 (C-7'), 53.3 (C-2''), 53.1 (C-2''), 51.8 (C-13''), 51.3 (C-1'), 50.4 (C-8'), 44.5 (C-1''), 42.1 (C-1''), 41.2 (C-11') 34.4 (C-2'), 32.8 (C-17), 32.0 – 28.6 (C-3, C-4 y C-12 a C-15), 27.3 (C-11), 27.3 (C-5), 25.7 (C-8), 25.3 (C-16), 22.7 (C-2), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₄₇H₆₈N₅O₇ 814.5119, encontrado 814.5127.

Síntesis de PIP1-14



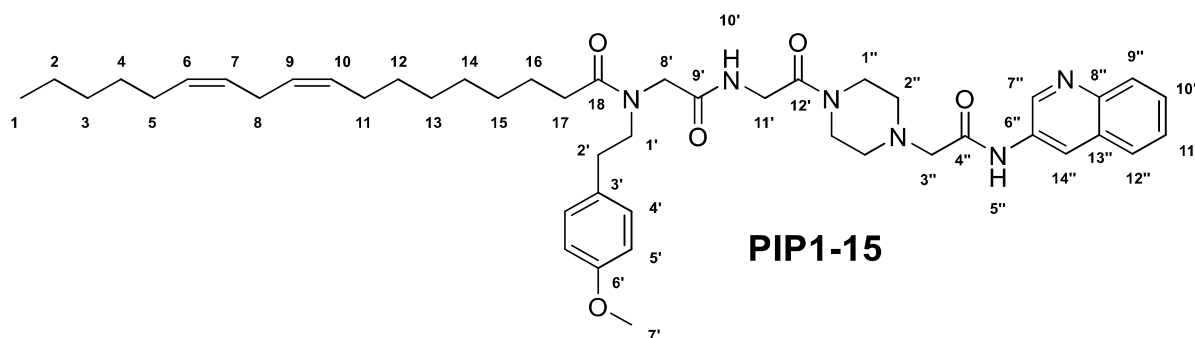
El compuesto **PIP1-14** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-6** y el isonitrilo **IS-19**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 57%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.46 (H-10'', sa, 1H), 7.54 (H-15'', d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.47 (H-5'', d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.36 (H-12'', d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.18 (H-13'', t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.10 (H-14'', t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.06 (H-4', d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.00 (H-10', t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 6.99 (H-9'', d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.84 (H-5', d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.44 – 5.29 (H-6, H-7, H-9 y H-10, m, 4H), 4.93 (H-6'', dt, $J = 8.3, 5.6$ Hz, 1H), 4.01 (H-8', s, 2H), 3.91 (H-11', d, $J = 4.4$ Hz, 2H), 3.78 (H-7', s, 3H), 3.76 (H-18'', s, 3H), 3.57 (H-1', t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.35 (H-7'', qd, $J = 14.9, 5.8$ Hz, 2H), 3.26 – 3.14 (H-1''a, m, 2H), 2.93 (H-3'', s, 2H), 2.91 – 2.83 (H-1''b, m, 2H), 2.81 (H-2', t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.77 (H-8, t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.49 – 2.25 (H-2'', m, 4H), 2.21 (H-17, t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.11 – 1.93 (H-5 y H-11, m, 4H), 1.64 – 1.53 (H-16, m, 2H), 1.41 – 1.14 (H-2 a H-4 y H-12 a H-15, m, 14H), 0.88 (H-1, t, $J = 6.7$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.4 (C-18), 172.5 (C-17''), 169.7 (C-4''), 169.2 (C-9'), 166.3 (C-12'), 158.7 (C-6'), 136.3 (C-11''), 130.4 (C-6), 130.2 (C-10), 129.9 (C-3'), 129.9 (C-4'), 128.2 (C-9), 128.0 (C-7), 127.9 (C-16''), 122.8 (C-9''), 122.6 (C-13''), 119.9 (C-14''), 118.6 (C-15''), 114.4 (C-5'), 111.6 (C-12''), 109.9 (C-8''), 61.1 (C-3''), 55.4 (C-7'), 52.7 (C-2''a), 52.6 (C-2''b), 52.6 (C-18''), 52.5 (C-6''), 51.4 (C-1'), 50.3 (C-8'), 44.1 (C-1''a), 41.9 (C-1''b), 41.1 (C-11'), 34.4 (C-2'), 32.8 (C-17), 31.7 (C-3), 30.3 – 28.9 (C-4 y C-12 a C-15), 27.4 (C-11), 27.3 (C-5), 27.2 (C-7''), 25.8 (C-8), 25.3 (C-16), 22.7 (C-2), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{N}_6\text{O}_7$ 855.5384, encontrado 855.5342.

Síntesis de PIP1-15



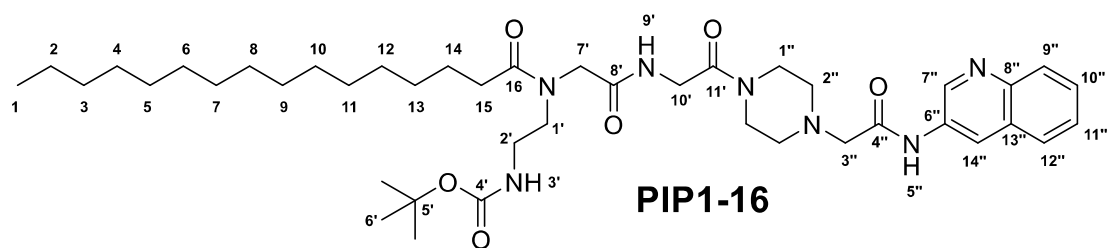
El compuesto **PIP1-15** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-6** y el isonitrilo **IS-13**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 46%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.19 (H-5'', s, 1H), 8.80 (H-14'', d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.76 (H-7'', d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 8.06 (H-9'', d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.82 (H-12'', d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.65 (H-10'', t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.55 (H-11'', t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.11 (H-10', t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.07 (H-4', d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.84 (H-5', d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.35 (H-6, H-7, H-9 y H-10, tdd, $J = 18.1, 11.0, 7.2$ Hz, 4H), 4.07 (H-11', d, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.02 (H-8', s, 2H), 3.78 (H-7', s, 3H), 3.74 (H-1''a, d, $J = 15.9$ Hz, 2H), 3.58 (H-1', t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.54 (H-1''b, t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.27 (H-3'', s, 2H), 2.82 (H-2', t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.77 (H-8, t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.68 (H-2'', dt, $J = 11.9, 5.1$ Hz, 4H), 2.22 (H-17, t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.22 (H-5 y H-11, m, 4H), 1.61 (H-16, m, 2H), 1.40 – 1.17 (H-2 a H-4 y H-12 a H-15, m, 14H), 0.88 (H-1, t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.4 (C-18), 169.4 (C-9'), 168.3 (C-4''), 166.4 (C-12'), 158.7 (C-3'), 145.5 (C-8''), 143.7 (C-7''), 131.0 (C-3'), 130.9 (C-6''), 130.4 (C-10), 130.2 (C-6), 129.9 (C-4'), 129.2 (C-9''), 128.6 (C-10''), 128.3 (C-13''), 128.2 (C-9), 128.0 (C-7), 127.9 (C-12''), 127.6 (C-11''), 123.9 (C-14''), 114.4 (C-5'), 62.1 (C-3''), 55.4 (C-7'), 53.4 (C-2''a), 53.3 (C-2''b), 51.4 (C-1'), 50.4 (C-8'), 44.5 (C-1''a), 42.1 (C-1''b), 41.2 (C-11'), 34.4 (C-2'), 32.9 (C-17), 31.7 (C-3), 29.8 (C-4), 29.6 (C-14), 29.5 (C-15), 29.5 (C-13), 29.3 (C-12), 27.4 (C-5), 27.3 (C-11), 25.8 (C-8), 25.3 (C-16), 22.7 (C-2), 14.2 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{N}_6\text{O}_5$ 781.5016, encontrado 781.5008.

Síntesis de PIP1-16 y PIP1-20

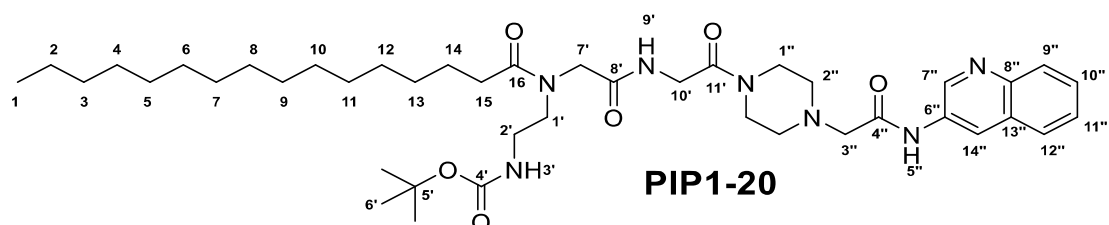


El compuesto **PIP1-16** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-7** y el isonitrilo **IS-13**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 76%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.21 (H-5'', s, 1H), 8.80 (H-14'', d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 8.77 (H-7'', d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 8.05 (H-12'', d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.82 (H-9'', dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 1H), 7.64 (H-11'', ddd, $J = 8.4, 6.8, 1.4$ Hz, 1H), 7.55 (H-10'', ddd, $J = 8.1, 6.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.13 (H-9', t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 6.21 (H-3', t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.10 (H-10', d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.99 (H-7', s, 2H), 3.75 (H-1', t, $J = 2.9$ Hz, 2H), 3.54 (H-1'', dt, $J = 7.0, 3.6$ Hz, 4H), 3.28 (H-3'', s, 2H), 3.28 – 3.21 (H-2', m, 2H), 2.68 (H-2'', dt, $J = 11.9, 4.9$ Hz, 4H), 2.37 (H-15, t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 1.61 (H-14, p, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.42 (H-6', s, 5H), 1.33 – 1.19 (H-2 a H-13, m, 14H), 0.87 (H-1, t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 175.2 (C-16), 170.3 (C-8'), 168.4 (C-4''), 166.8 (C-11'), 156.5 (C-4'), 145.4 (C-8''), 143.8 (C-7''), 130.9 (C-6''), 129.1 (C-12''), 128.6 (C-11''), 128.3 (C-13''), 127.9 (C-9''), 127.5 (C-10''), 123.9 (C-14''), 79.3 (C-5'), 62.1 (C-3'), 53.4 (C-2''a), 53.2 (C-2''b), 51.7 (C-7'), 50.2 (C-1''a), 44.5 (C-1''b), 42.2 (C-1'), 41.0 (C-10'), 39.1 (C-2'), 33.0 (C-15), 32.1 (C-3), 30.6 – 29.2 (C-4 a C-13), 28.6 (C-6'), 25.3 (C-14), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{N}_7\text{O}_6$ 766.5231, encontrado 766.5234.



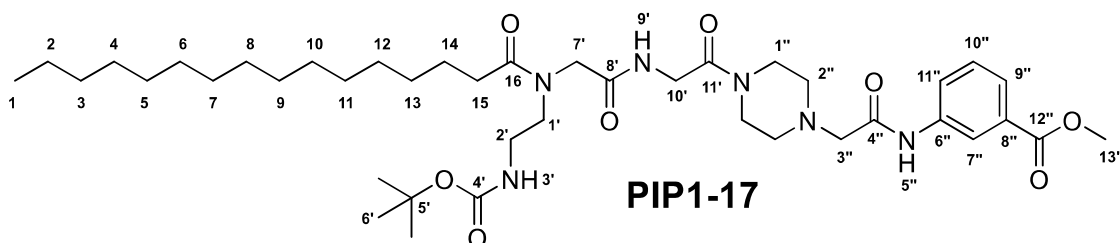
El compuesto **PIP1-20** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del *N*-Boc a partir del producto Ugi Split **PIP1-16**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 65%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.25 (H-5'', s, 1H), 8.87 – 8.74 (H-7'' a H-14'', m, 2H), 8.05 (H-12'', d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.83 (H-9'', d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.65 (H-11'', sa, 1H), 7.55 (H-10'', sa, 1H), 7.20 (H-6', s, 1H), 4.15 (H-'4', s, 2H), 4.10 (H-7', d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.75 – 3.71 (H-1', m, 2H), 3.63 – 3.52 (H-1'', m, 4H), 3.43 – 3.36 (H-2', m, 2H), 3.30 (H-3'', s, 2H), 2.77 – 2.58 (H-2'', m, 4H), 2.32 (H-15, d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.72 – 1.54 (H-14, m, 2H), 1.35 – 1.19 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.88 (H-1, t, $J = 5.6$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 175.0 (C-16), 171.8 (C-5'), 171.0 (C-8'), 168.2 (C-4''), 145.7 (C-8''), 144.0 (C-7''), 129.1 (C-12''), 129.0 (C-6''), 128.4 (C-11''), 128.2 (C-13''), 127.8 (C-9''), 127.4 (C-10''), 123.7 (C-14''), 62.0 (C-3''), 53.3 (C-2''a), 53.1 (C-2''b), 48.8 (C-4'), 44.5 (C-1''a), 44.5 (C-1''b), 43.4 (C-2'), 42.1 (C-1'), 40.9 (C-7'), 33.3 (C-15''), 32.3 – 29.0 (C-2 a C-13), 25.2 (C-14''), 14.1 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{N}_7\text{O}_4$ 666.4701, encontrado 666.4769.

Síntesis de **PIP1-17** y **PIP1-21**



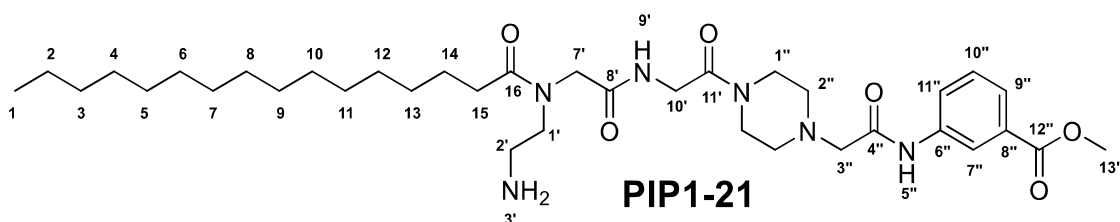
El compuesto **PIP1-17** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del éster, seguido de la técnica A del procedimiento general para reacciones de Ugi Split usando el éster **U-7** y el isonitrilo **IS-16**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 76%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.99 (H-5'', s, 1H), 8.02 (H-9'', d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.97 (H-7'', s, 1H), 7.80 (H-11'', d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.43 (H-10'', t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.07 (H-9', t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 6.22 (H-3', t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.09 (H-10', d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.98 (H-7', s, 2H), 3.92 (H-13'', s, 3H), 3.76 – 3.70 (H-1''a, m, 2H), 3.53 (H-1' y H-1''b, dt, $J = 10.8, 5.0$ Hz, 4H), 3.29 – 3.23 (H-2', m, 2H), 3.20 (H-3'', s, 2H), 2.64 (H-2'', dt, $J = 11.9, 5.0$ Hz, 4H), 2.37 (H-15, t, $J =$

7.7 Hz, 2H), 1.62 (H-14, p, J = 7.2 Hz, 2H), 1.43 (H-6', s, 9H), 1.32 – 1.22 (H-2 a H-13, s, 24H), 0.87 (H-1, t, J = 6.8 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.2 (C-16), 170.2 (C-8'), 167.7 (C-4''), 166.8 (C-12''), 166.7 (C-11'), 156.5 (C-4'), 137.6 (C-6''), 131.1 (C-8''), 129.5 (C-10''), 125.6 (C-11''), 124.2 (C-9''), 120.4 (C-7''), 79.3 (C-5'), 62.1 (C-3''), 53.4 (C-2''a), 53.2 (C-2''b), 52.5 (C-13''), 51.7 (C-7'), 50.2 (C-1'), 44.5 (C-1''a), 42.2 (C-1''b), 41.0 (C-10'), 39.1 (C-2'), 33.0 (C-15), 32.1 (C-3), 30.2 – 29.2 (C-4 a C-13), 28.6 (C-6'), 25.3 (C-14), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+Na⁺] C₄₁H₆₈N₆O₈Na 795.4996, encontrado 795.4999.



El compuesto **PIP1-21** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis del *N*-Boc a partir del producto Ugi Split **PIP1-17**. El producto se aisló como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Rendimiento: 72%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.74 (H-3', sa, 2H), 9.15 (H-5'', s, 1H), 8.07 – 7.92 (H-7'' y H-9'', m, 2H), 7.80 (H-11'', d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.42 (H-10'', t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.22 (H-6', t, J = 4.9 Hz, 1H), 4.09 (H-7', d, J = 4.9 Hz, 2H), 3.98 (H-4', s, 2H), 3.92 (H-13'', s, 3H), 3.78 – 3.71 (H-1''a, m, 2H), 3.57 – 3.50 (H-1''b, m, 2H), 3.28 (H-3'', s, 2H), 3.28 – 3.22 (H-2', m, 2H), 2.88 (H-1', t, J = 5.1 Hz, 2H), 2.77 – 2.67 (H-2'', m, 4H), 2.37 (H-15, t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.61 (H-14, p, J = 6.72 Hz, 2H), 1.31 – 1.21 (H-2 a H-13, m, 24H), 0.87 (H-1, t, J = 6.8 Hz, 3H).

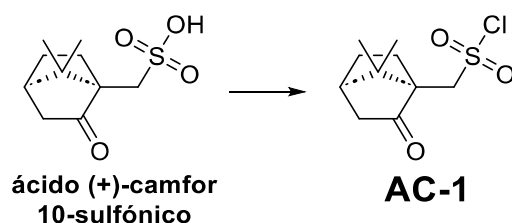
¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175.2 (C-16), 170.1 (C-5'), 167.2 (C-4''), 166.8 (C-8'), 162.7 (C-12''), 137.7 (C-6''), 131.1 (C-8''), 129.5 (C-10''), 125.7 (C-11''), 124.2 (C-9''), 120.5 (C-7''), 61.9 (C-3''), 53.2 (C-2''a), 53.1 (C-2''b), 52.4 (C-13''), 51.6 (C-4'), 49.4 (C-1'), 44.3 (C-1''a), 43.5 (C-2'), 41.9 (C-1''b), 41.0 (C-7'), 33.0 (C-15), 32.1 (C-3), 30.0 – 28.4 (C-4 a C-13), 25.3 (C-14), 22.8 (C-2), 14.3 (C-1).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₆H₆₁N₆O₆ 673.4653, encontrado 673.4635.

Técnicas sintéticas experimentales y caracterización de los compuestos obtenidos en el Capítulo 4

Metodología para la síntesis de los bloques AC

Síntesis de AC-2

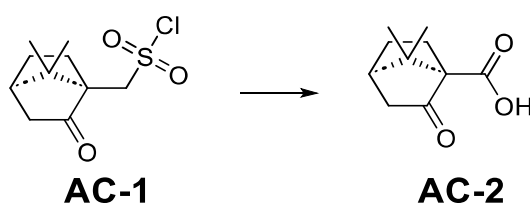


Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (4 eq) con agitación vigorosa a ácido (+)-camfor-10-sulfónico (1 eq). La mezcla resultante se agitó a reflujo durante 30 min, luego se dejó enfriar y se vertió sobre hielo. La suspensión se repartió entre Et₂O y agua, y la fase acuosa se extrajo con Et₂O, se secó sobre MgSO₄ anhidro y el solvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo el producto **AC-1** como un sólido blanco. Rendimiento: 96%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.30 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 3.72 (d, J = 14.7, 1H), 2.49 – 2.40 (m, 2H), 2.17 – 2.12 (t, J = 4.6 Hz, 1H), 2.12 – 2.05 (m, 1H), 1.99 (d, J = 18.8 Hz, 1H), 1.80 – 1.73 (m, 1H), 1.51 – 1.42 (m, 1H), 1.13 (s, 3H), 0.92 (s, 3H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 212.9, 64.3, 59.8, 48.3, 42.9, 42.4, 27.0, 25.4, 19.9, 19.8.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²⁴



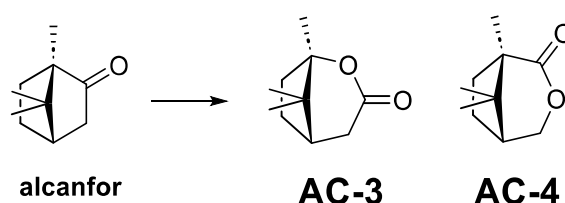
Se añadió con agitación, una solución de **AC-1** (1 eq) en MeCN a una suspensión que consistía en Na₂CO₃, KMnO₄ (2,2 eq), H₂O y MeCN. La mezcla resultante se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y luego se calentó a 70 °C y se agitó durante 1 hora más. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se añadió gota a gota una solución compuesta por H₂SO₄ 3M y Na₂SO₃ 2M a una velocidad lo suficientemente lenta para evitar la formación excesiva de espuma. Se añadió más H₂SO₄ 3M hasta que la solución se volvió verde claro. La mezcla se extrajo con Et₂O y las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaCl (ss), se secaron sobre MgSO₄ anhidro y el solvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo el producto **AC-2** como un sólido blanco. Rendimiento: 94%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.99 (s, sa, 1H), 2.62 – 2.55 (m, 1H), 2.44 – 2.37 (m, 1H), 2.16 – 2.06 (m, 2H), 2.02 (d, $J = 18.8$ Hz, 1H), 1.83 – 1.76 (m, 1H), 1.48 – 1.42 (m, 1H), 1.19 (s, 3H), 1.11 (s, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 213.3, 174.7, 67.0, 49.9, 44.2, 43.7, 27.1, 26.8, 20.9, 19.9.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²⁴

Síntesis de AC-5



A una solución de alcanfor (1 g, 6,57 mmol) en 50 mL de CH_2Cl_2 a 0 °C, se agregaron 20 mL de una mezcla 7:1 de anhídrido trifluoroacético / peróxido de hidrógeno 30% (ac). Luego de 3 h. se agregó NaHSO_3 (ss) y se extrajo con AcOEt . La mezcla se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando mezclas de CH_2Cl_2 : AcOEt como eluyente. Se obtuvo el producto **AC-3** como un sólido blanco. Rendimiento: 65%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.89 (dd, $J = 9.2, 17.9$ Hz, 1H), 2.59 (dd, $J = 2.3, 10.6$ Hz, 1H), 2.35 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 2.17 – 2.05 (m, 1H), 1.92 – 1.70 (m, 1H), 1.47 – 1.33 (m, 2H), 1.30 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.90 (s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 177.4, 98.9, 45.3, 43.0, 38.5, 37.9, 30.2, 23.9, 21.9, 18.7.

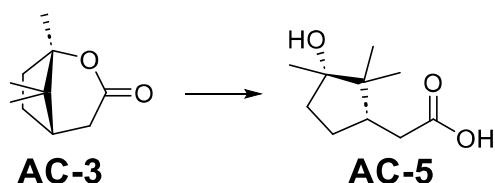
Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²⁵

Se obtuvo el producto **AC-4** como un sólido blanco. Rendimiento: 19%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.47 (m, 1H), 4.10 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 2.17 – 2.05 (m, 2H), 1.92 – 1.70 (m, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.97 (s, 3H).

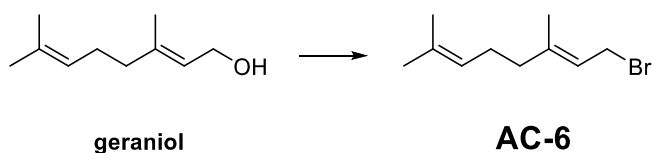
^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 175.3, 74.2, 44.6, 36.7, 36.2, 27.0, 24.7, 22.5, 20.0, 14.3.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²⁵



La lactona **AC-3** se saponificó en 5 mL de NaOH 5% agitando a 70 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se acidificó mediante la adición gota a gota de H₂SO₄ 20% hasta que se alcanzó un pH de aproximadamente 4-5. La solución resultante se extrajo 3 veces con 10 mL de AcOEt, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el solvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo el producto **AC-5** como un sólido blanco (P.f.: 123 °C). Rendimiento: 90%.

Síntesis de AC-7

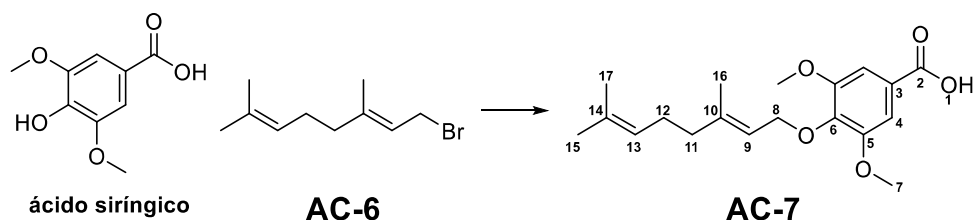


Se disolvió geraniol (1 eq) en CH₂Cl₂. A esta solución se le añadieron trifenilfosfina (1 eq) y tetrabromuro de carbono (1,2 eq). La reacción se agitó durante 2,5 h. a temperatura ambiente. Después de eliminar el solvente, se añadió hexano al residuo y se formó un precipitado blanco. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante transparente se concentró. El residuo resultante se recogió con hexano y se repitió el proceso. Después de 3 ciclos adicionales de precipitación/centrifugación, se obtuvo producto **AC-6** como un líquido incoloro que se usó directamente en el siguiente paso. Rendimiento: 79%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.53 (t, J = 8.26 Hz, 1H), 5.07 (m, 1H), 4.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 2.15 – 2.03 (m, 4H), 1.73 (d, J = 1.2 Hz, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.60 (s, 3H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 143.7, 132.1, 123.7, 120.8, 39.7, 29.7, 26.4, 25.8, 17.8, 16.1.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²⁶



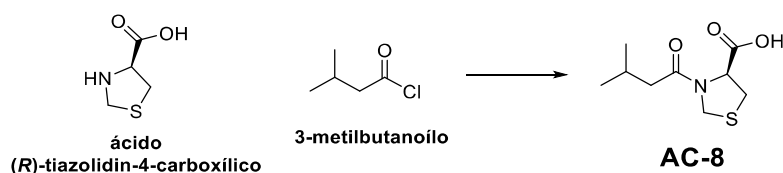
A partir de ácido siríngico se obtuvo 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato de metilo mediante reacción con cloruro de tionilo en MeOH. Luego se disolvió el éster (1 eq) en acetona anhidra, y a esta solución se añadieron K₂CO₃ anhidro (1,3 eq) y **AC-6** (1,1 eq). La mezcla resultante se agitó a 60 °C durante 2 h., luego se añadió NaOH 2N y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 3 h. más. Una vez que llegó a temperatura ambiente, la solución se diluyó con H₂O y se extrajo dos veces con Et₂O. La fase acuosa se acidificó a pH 2 con HCl 10% y se extrajo con Et₂O. Después la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y el solvente se evaporó a presión reducida. La mezcla se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando hexano:AcOEt (6:4) como eluyente. Se obtuvo el producto **AC-7** como un sólido blanco (P.f.: 141 °C). Rendimiento: 79%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36 (H-4, s, 2H), 5.54 (H-9, tdq, J = 7.2, 5.9, 1.3 Hz, 1H), 5.06 (H-13, tdd, J = 6.7, 2.8, 1.3 Hz, 1H), 4.64 (H-8, d, J = 6.6 Hz, 2H), 3.91 (H-7, s, 6H), 2.11 – 1.89 (H-11 y H-12, m, 4H), 1.72 – 1.62 (H-15 y H-16, m, 6H), 1.59 (H-17, s, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.6 (C-2), 153.6 (C-5), 142.3 (C-6), 141.9 (C-10), 131.8 (C-14), 124.2 (C-3), 124.1 (C-13), 120.0 (C-9), 107.4 (C-4), 69.6 (C-8), 56.3 (C-7), 39.7 (C-11), 26.5 (C-12), 25.8 (C-15), 17.8 (C-17), 16.5 (C-16).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₁₉H₂₇O₅ 335.1853, encontrado 335.1848.

Síntesis de AC-8



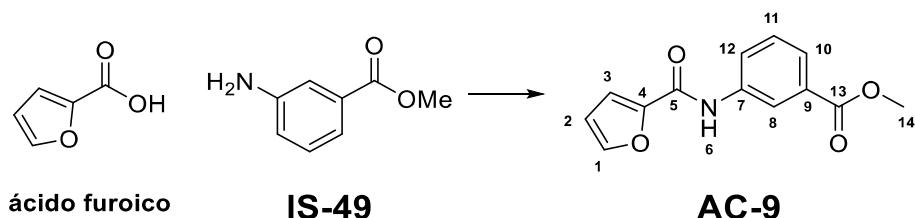
Se disolvió ácido (R)-tiazolidin-4-carboxílico (200,00 mg, 1,50 mmol) en piridina (6 mL). La solución resultante se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Bajo agitación, se añadió gota a gota cloruro de 3-metilbutanoilo (199,20 mg, 1,65 mmol, 1,10 eq). Una vez finalizada la adición, se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente, se agregó agua y se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo el producto **AC-8** como un aceite incoloro. Rendimiento: 69%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.50 (sa, 1H), 5.30 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 3.35 – 3.20 (m, 2H), 3.05 – 2.95 (m, 2H), 2.35 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.20 (m, 1H), 0.98 (d, J = 6.5 Hz, 6H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.0, 173.5, 65.5, 48.8, 43.8, 30.8, 25.8, 22.5.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.

Síntesis de AC-10

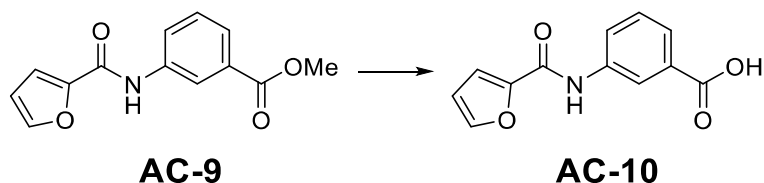


Se preparó una solución de ácido furoico (0,1 g, 0,9 moles), DCC (1,05 eq) y DMAP (1,5 eq) en CH_2Cl_2 y se dejó agitando 1 h. a temperatura ambiente. Luego se agregó lentamente una solución de **IS-49** (1,1 eq) preparado previamente en CH_2Cl_2 y TEA (1,1 eq). Se dejó agitando 24 h. a temperatura ambiente. Se filtró, se lavó con HCl (5%), NaHCO_3 (ss), se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de hexano/ AcOEt). Se obtuvo el producto **AC-9** como un sólido blanco (P.f.: 155-157 °C). Rendimiento: 71%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.18 (H-6, s, 1H), 8.16 (H-8, t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.05 (H-12, ddd, $J = 8.1, 2.3, 1.1$ Hz, 1H), 7.82 (H-10, ddd, $J = 7.8, 1.6, 1.1$ Hz, 1H), 7.53 (H-1, dd, $J = 1.8, 0.8$ Hz, 1H), 7.45 (H-11, t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.27 (H-3, dd, $J = 3.5, 0.9$ Hz, 1H), 6.58 (H-2, dd, $J = 3.5, 1.8$ Hz, 1H), 3.93 (H-14, s, 3H).

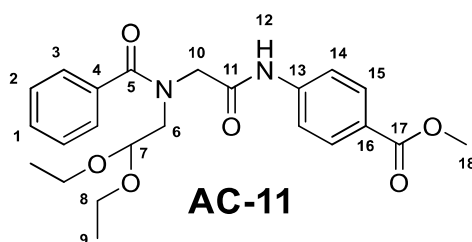
^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.8 (C-13), 156.3 (C-5), 147.7 (C-4), 144.5 (C-1), 137.7 (C-7), 131.2 (C-9), 129.5 (C-11), 125.7 (C-12), 124.5 (C-10), 120.9 (C-8), 115.8 (C-3), 112.9 (C-2), 52.4 (C-14).

HRMS (ESI $^+$): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{NO}_4$ 246.0761, encontrado 246.0808.



El compuesto **AC-10** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis de ésteres descrito previamente en el Capítulo 3 a partir de **AC-9**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 100%.

Síntesis de AC-14

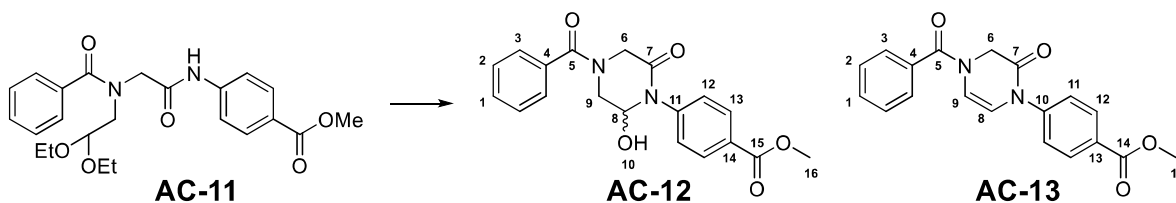


El compuesto **AC-11** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi descrita previamente en el Capítulo 3 usando ácido benzoico, formaldehído, el isonitrilo **IS-30** y 2,2-dietoxietilamina. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 69%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.17 (H-12, s, 1H), 8.13 – 7.32 (H-1 a H-3, H-14 y H-15, m, 9H), 4.58 (H-7, t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.05 (H-10, s, 2H), 3.90 (H-18, s, 3H), 3.56 – 3.45 (H-6 y H-8, m, 6H), 1.18 – 1.07 (H-9, m, 6H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.9 (C-5), 167.7 (C-11), 166.7 (C-17), 138.63 – 120.17 (C-1 a C-4 y C-13 a C-16), 100.9 (C-7), 63.8 (C-8), 53.9 (C-10), 53.4 (C-6), 52.2 (C-18), 15.2 (C-9).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$ 429.2020, encontrado 429.2017.



Se siguió la metodología descrita por Zhang *et. al.*²⁷ El aducto Ugi **AC-11** se disolvió en 4 mL de acetonitrilo y se añadieron 0,2 mL de ácido metanosulfónico. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se inactivó con NaHCO_3 (ss) a 0-5 °C. La solución resultante se extrajo con CH_2Cl_2 , y el solvente se evaporó a presión reducida. La mezcla se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando hexano:AcOEt como eluyente.

Se obtuvo el producto **AC-12** como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 2%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.04 – 7.37 (H-1 a H-3, H-12 y H-13, m, 9H), 5.30 – 5.26 (H-8, m, 1H), 4.12 (H-6, q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.92 (H-16, s, 3H), 3.71 – 3.64 (H-9, m, 2H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.5 (C-5), 167.6 (C-7), 166.4 (C-15), 139.5 – 120.5 (C-1 a C-4 y C-11 a C-14), 80.4 (C-8), 53.3 (C-16), 51.4 (C-6), 46.7 (C-9).

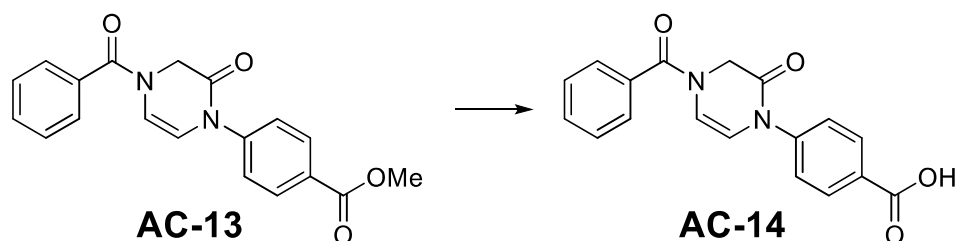
HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5$ 355.1288, encontrado 355.1298.

Se obtuvo el producto **AC-13** como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 98%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.02 – 7.40 (H-1 a H-3, H-11 y H-12, m, 9H), 6.22 (H-8, sa, 1H), 5.81 (H-9, sa, 1H), 4.64 (H-6, sa, 2H), 3.90 (H-15, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.5 (C-5), 168.9 (C-14), 162.8 (C-7), 139.8 – 126.0 (C-1 a C-4 y C-10 a C-13), 113.5 (C-9), 112.7 (C-8), 52.5 (C-15), 47.4 (C-6).

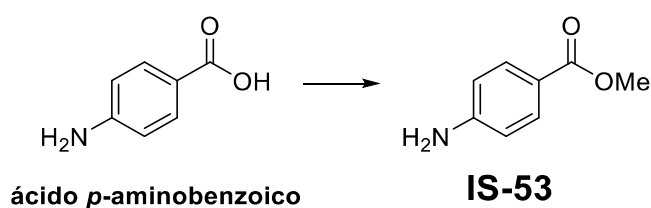
HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$ 337.1183, encontrado 337.1169.



El compuesto **AC-14** se obtuvo siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis de ésteres descrito previamente en el Capítulo 3 a partir de **AC-13**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 89%.

Metodología para la síntesis de los bloques IS

Síntesis de IS-30

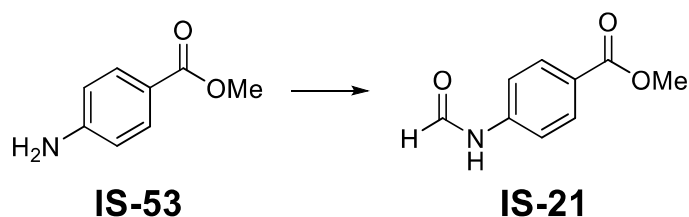


El compuesto **IS-53** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de ésteres a partir de ácido *p*-aminobenzoico. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 100%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.64 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.31 (s, 3H), 4.22 – 4.07 (sa, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.9, 150.8, 131.7, 120.3, 113.9, 60.5.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²⁸

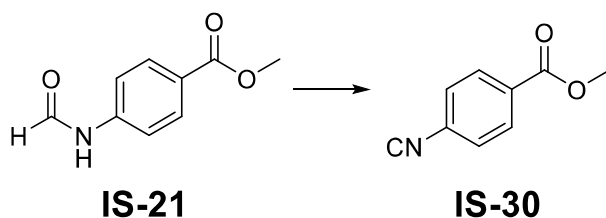


El compuesto **IS-21** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de **IS-53**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 81%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.85 (s, 1H), 8.42 (rotámero mayoritario, s, 0.52H), 8.08 (rotámero minoritario, sa, 0.49H), 8.01 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.39 – 4.33 (m, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): rotámero mayoritario 166.1, 159.3, 141.0, 130.8, 126.3, 119.0, 61.0, 14.3; rotámero minoritario 165.9, 162.1, 140.9, 131.4, 126.8, 117.1, 61.1.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²⁹



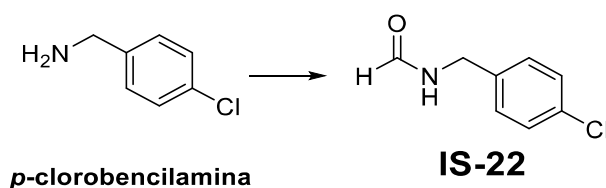
El compuesto **IS-30** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-21**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 81%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.09 (dt, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 2H), 7.45 (dq, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 2H), 4.40 (s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167.3, 165.4, 131.7, 131.2, 130.1, 123.8, 62.0.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁰

Síntesis de IS-31

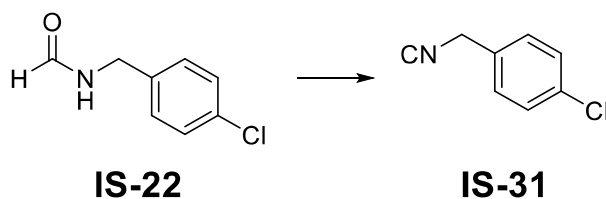


El compuesto **IS-22** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de *p*-clorobencilamina. El producto se aisló como un sólido blanco. Rendimiento: 75%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): rotámero mayoritario: 8.13 (s, 1H), 7.28 – 7.16 (m, 2H), 7.16 – 7.06 (m, 2H), 6.34 (s, 1H), 4.32 (d, J = 6.0 Hz, 2H); rotámero minoritario: 8.03 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 7.28 – 7.16 (m, 2H), 7.16 – 7.06 (m, 2H), 4.28 (d, J = 6.5 Hz, 2H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): rotámero mayoritario: 161.3, 136.3, 133.5, 129.1, 128.9, 41.5; rotámero minoritario: 164.8, 136.1, 133.9, 128.4, 45.1.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³¹



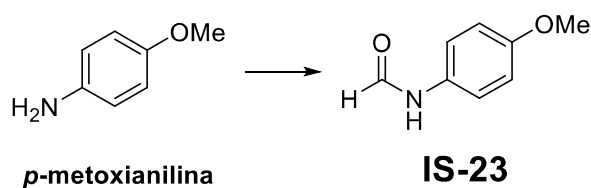
El compuesto **IS-31** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-22**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 75%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.38 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.62 (s, 2H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 158.4, 134.6, 130.9, 129.3, 128.1, 45.1.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³²

Síntesis de IS-32

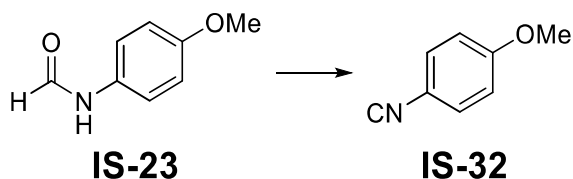


El compuesto **IS-23** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de *p*-metoxianilina. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 86%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.47 (s, 0.5H), 8.46 – 8.21 (m, 1H), 7.79 (s, 0.5H), 7.42 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 13.7, 8.9$ Hz, 2H), 3.76 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 163.2, 159.1, 157.6, 156.7, 130.0, 129.6, 121.8, 121.5, 114.9, 114.2, 55.5, 55.4.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³³



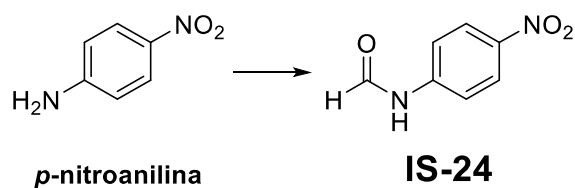
El compuesto **IS-32** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-23**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 86%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.87 (s, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 163.1, 134.2, 119.4, 115.0, 104.3, 55.7.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁴

Síntesis de IS-33

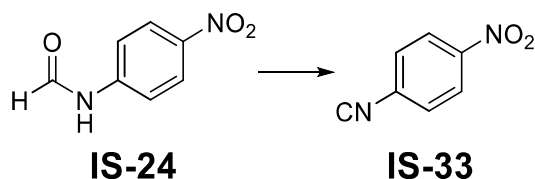


El compuesto **IS-24** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de *p*-nitroanilina. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 88%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): (trans/cis= 25/75) 10.80 (s, 1H, cis), 10.69 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, trans), 9.04 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, trans), 8.39 (s, 1H, cis), 8.21 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, trans, 2H, cis), 7.80 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, cis), 7.40 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, trans).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 163.2, 161.0, 144.7, 142.9, 125.9, 125.5, 119.4, 118.4, 117.0.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁵



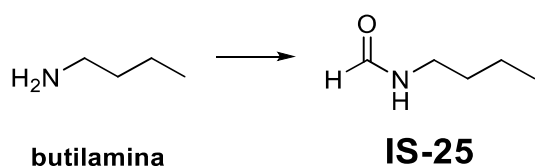
El compuesto **IS-33** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-24**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 53%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 150.3, 133.7, 124.5, 118.6, 116.9.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁴

Síntesis de IS-34

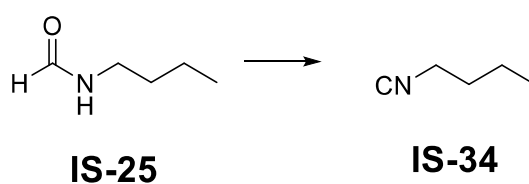


El compuesto **IS-25** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de butilamina. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 79%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.18 (s, 0.83H), 8.04 (d, $J = 12.0$ Hz, 0.17H), 3.32 (q, $J = 6.7$ Hz, 1.66H), 3.23 (q, $J = 6.7$ Hz, 0.34H), 1.59 – 1.46 (m, 2H), 1.44 – 1.27 (m, 2H), 0.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 161.30, 37.18, 31.52, 19.91, 13.79.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.



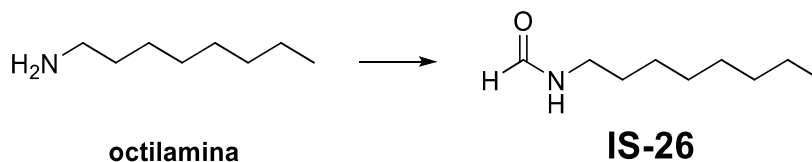
El compuesto **IS-34** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-25**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 67%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.99 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 1.78 (p, $J = 5.8$ Hz, 2H), 1.46 (qt, $J = 6.7, 5.8$ Hz, 2H), 0.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 155.75, 41.43, 30.50, 20.79, 13.76.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.

Síntesis de IS-35

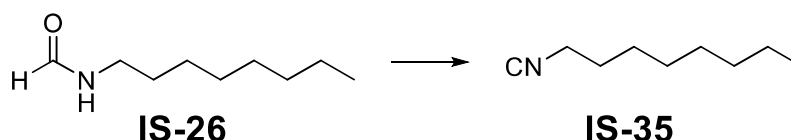


El compuesto **IS-26** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de octilamina. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 79%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): (mezcla de rotámeros trans/cis: 27/73) 8.14 (s, 0.73H), 8.02 (d, $J = 12.0$ Hz, 0.27H), 5.70 (s, 1H), 3.29–3.17 (m, 2H), 1.53–1.23 (m, 12H), 0.88–0.85 (m, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): (mezcla de rotámeros) 164.7, 161.3, 41.9, 38.3, 31.9, 31.8, 31.4, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 27.0, 26.0, 22.7, 22.6, 14.2.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.⁴



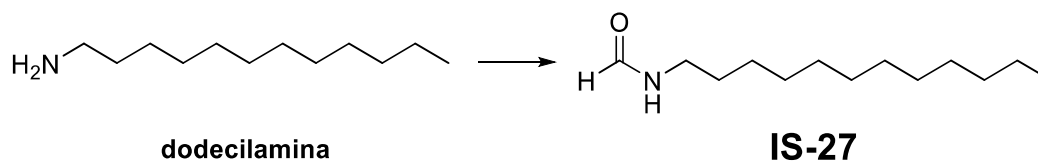
El compuesto **IS-35** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-26**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 79%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.36 (tt, $J = 6.8, 1.9$ Hz, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.29–1.25 (m, 12H), 0.87 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 155.6, 41.7, 32.0, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 28.8, 26.4, 22.8, 14.2.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.²¹

Síntesis de IS-36

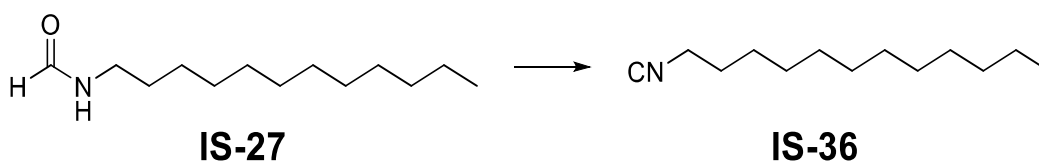


El compuesto **IS-27** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de dodecilamina. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 98%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.04 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 3.23–3.06 (m, 2H), 1.43 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.19 (d, $J = 14.6$ Hz, 18H), 0.79 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 161.5, 38.2, 31.9, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 26.9, 22.6, 14.1

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁶



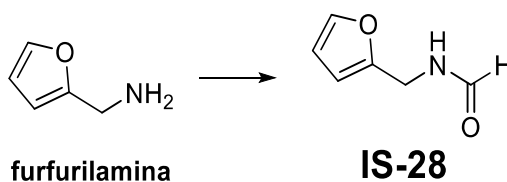
El compuesto **IS-36** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-27**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 98%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.04 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 3.23 – 3.06 (m, 2H), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.19 (d, J = 14.6 Hz, 18H), 0.79 (t, J = 6.6 Hz, 3H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 161.5, 38.2, 31.9, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 26.9, 22.6, 14.1.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁶

Síntesis de IS-37

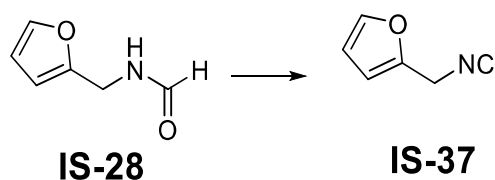


El compuesto **IS-28** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de furfurilamina. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 98%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.18 (rotámero mayoritario, s, 0.86), 8.14 (rotámero minoritario, d, J = 11.9 Hz, 0.14H), 7.38 – 7.36 (rotámero minoritario, m, 0.14H), 7.36 – 7.31 (rotámero mayoritario, m, 0.86H), 6.33 – 6.30 (m, 1.00H), 6.24 – 6.21 (m, 1.08H), 4.45 (rotámero mayoritario, d, J = 5.7 Hz, 1.72H), 4.35 (rotámero minoritario, d, J = 6.3 Hz, 0.28H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): rotámero mayoritario 161.0, 150.7, 142.4, 110.6, 107.8, 35.1, rotámero minoritario 164.7, 150.8, 142.9, 110.6, 107.6, 38.9.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.



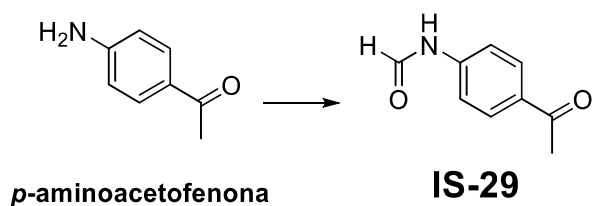
El compuesto **IS-37** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-28**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 41%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.42 (s, 1H, CH aromático), 6.37 (s, 2H, 2 CH aromático), 4.59 (s, 2H, CH_2).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 158.0, 145.6, 143.4, 110.8, 109.1, 38.9.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.

Síntesis de IS-38

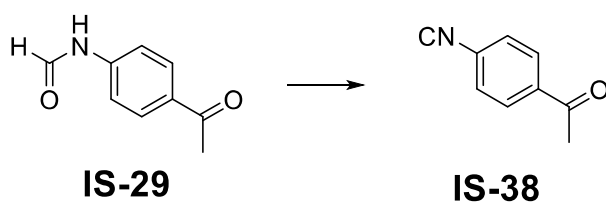


El compuesto **IS-29** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de *p*-aminoacetofenona. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 98%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.87 (d, $J = 11.2$ Hz, 0.39H), 8.62 (d, $J = 11.2$ Hz, 0.37H), 8.44 (d, $J = 1.7$ Hz, 0.58H), 7.98-7.93 (m, 2.56H), 7.68-7.65 (m, 1.20H), 7.17 (dt, $J = 9.3, 2.3$ Hz, 0.81H), 2.59 (s, 1.24H), 2.58 (s, 1.76H)

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.



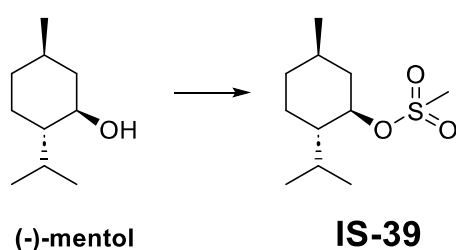
El compuesto **IS-38** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-29**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 82%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.15 – 7.97 (m, 2H), 7.87 – 7.66 (m, 2H), 2.65 (s, 3H)

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 196.7, 140.0, 132.7, 128.8, 118.1, 116.6, 26.9.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.

Síntesis de IS-42

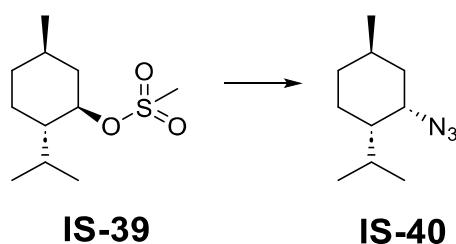


Una solución de (-)-mentol (1,0 g) y NEt_3 (2 eq) en CH_2Cl_2 se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se enfrió a 0 °C con un baño de hielo, después de lo cual se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (MsCl) (1,5 eq) disuelto en CH_2Cl_2 durante un lapso de 20 min. Una vez completada la adición, se retiró el baño de hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se detuvo con NH_4Cl (ss) y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 . Después la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y el solvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida. La mezcla se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando hexano:AcOEt (5:1) como eluyente. Se obtuvo el producto **IS-39** como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 95%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.55 (dt, $J = 15.5, 5.0$ Hz, 1H), 3.01 (s, 3H), 2.28 – 2.24 (m, 1H), 2.10 – 2.04 (m, 1H), 1.75 – 1.67 (m, 2H), 1.53 – 1.39 (m, 2H), 1.31 – 1.24 (m, 2H), 1.10 – 1.05 (m, 1H), 0.94 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 83.2, 47.3, 42.1, 39.0, 33.7, 31.5, 25.7, 23.0, 21.7, 20.7, 15.6.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.^{37,38}

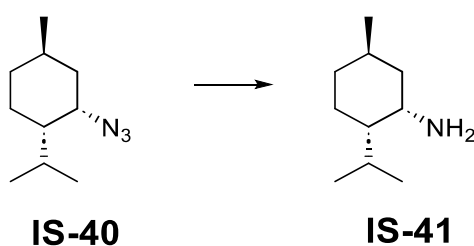


Se preparó una solución de **IS-39** (1 eq) y NaN_3 (3 eq) en DMF y se agitó a 80 °C durante 48 h. Se añadió H_2O y CH_2Cl_2 , la mezcla se extrajo y la fase acuosa se lavó con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y el solvente se eliminó por evaporación a presión reducida. La mezcla se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando hexano:AcOEt (9:1) como eluyente. Se obtuvo el producto **IS-40** como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 63%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.97 (s, 1H), 1.99–2.02 (m, 1H), 1.62–1.74 (m, 4H), 1.48–1.53 (m, 1H), 1.15–1.25 (m, 2H), 0.93 (d, $J = 7$ Hz, 4H), 0.89 (d, $J = 6$ Hz, 6H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 60.7, 47.5, 39.1, 35.0, 29.6, 26.7, 25.0, 22.3, 21.0, 20.8.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁸

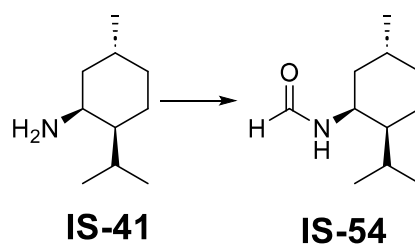


Se preparó una solución de **IS-40** (1 eq) y paladio sobre carbón (Pd/C) en una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:2) y se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. bajo una atmósfera de hidrógeno, mantenida mediante un globo lleno de H_2 a presión atmosférica. Finalizada la reacción, la mezcla se filtró sobre tierra de diatomeas, se lavó con metanol de 3 a 4 veces y el solvente se eliminó por evaporación de presión reducida. Se obtuvo el producto **IS-41** como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 91%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.07 (bs, 2H), 1.68–1.60 (m, 2H), 1.57–1.52 (m, 2H), 1.51–1.35 (m, 2H), 1.23–1.19 (m, 2H), 1.02–0.99 (m, 2H), 0.86–0.79 (m, 3H), 0.77 (d, $J = 7.1$ Hz, 6H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 52.0, 49.0, 43.1, 33.7, 31.2, 29.9, 24.3, 22.6, 15.6.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁸

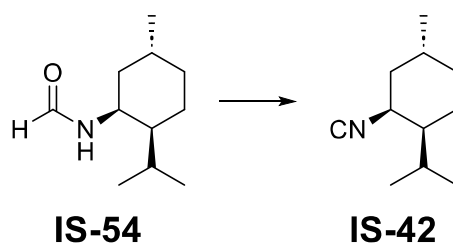


El compuesto **IS-54** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de **IS-41**. El producto se aisló como un sólido en forma de agujas blancas. Rendimiento: 77%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): (8.15, s), 8.06 (d, $J = 12\text{Hz}$, 1H), (6.02, sa), 5.67 (sa, 1H), (4.43, m), 3.82 (m, 1H), 1.90 – 1.71 (m, 3H), 1.52 – 1.18 (m, 2H), 1.09 – 0.85 (m, 13H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): (164.2), 160.6, (49.4), (46.2), 46.0, 44.9, (42.5), 40.0, 34.6, (34.4), 29.4, (28.7), 26.7, (26.2), 25.2, (24.7), 22.1, 20.9, 20.6, (20.4).

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁹



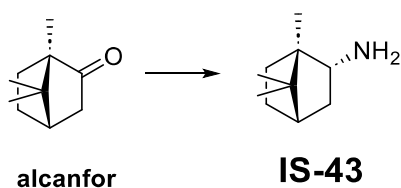
El compuesto **IS-42** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de **IS-54**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 77%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.00 (s, 1H), 1.98 (dd, $J = 13.7, 2.3\text{ Hz}$, 1H), 1.81 – 1.72 (m, 3H), 1.57 (m, 1H), 1.30 (dq, $J = 2.9, 12.6\text{ Hz}$, 1H), 1.08 (m, 1H), 0.94 – 0.81 (m, 11H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 155.4, 53.4, 46.2, 39.6, 34.2, 29.5, 26.1, 24.6, 21.6, 20.6, 20.2.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.³⁹

Síntesis de IS-44

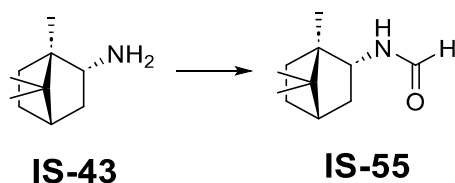


Se agrega alcanfor (1.0 eq) a una solución acuosa de clorhidrato de hidroxilamina (1.5 eq) y acetato de sodio (2.0 eq). La mezcla se calienta a reflujo y se agrega metanol hasta disolver el alcanfor. Se mantiene en agitación durante 24 h. Tras completarse la reacción, la mezcla se enfría, lo que provoca la precipitación de la oxima de alcanfor como un sólido blanco. El sólido se aísla por filtración, se lava con agua fría para eliminar las sales residuales y se seca. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Seguido, se prepara el catalizador de Níquel Raney en un balón. Para ello, se añade lentamente la aleación de níquel-aluminio a una solución acuosa fría de NaOH. Se añade la oxima de alcanfor. La suspensión se calienta y se agita vigorosamente durante 4 h. Finalizada la reacción, la mezcla se enfría y el catalizador de níquel se separa por filtración. La amina (**IS-43**) se aísla del filtrado acuoso, mediante extracción con AcOEt. Rendimiento: 79%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.91 (t, $J = 3.9$ Hz, 1H, CH-NH₂), 1.85 – 1.60 (m, 3H), 1.45 (s, 2H, NH₂), 1.35 – 1.21 (m, 2H), 1.05 (s, 3H, CH₃), 1.03 – 0.95 (m, 2H), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.86 (s, 3H, CH₃).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 57.1, 49.3, 47.0, 45.4, 36.6, 30.1, 27.2, 20.6, 20.2, 12.0.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.

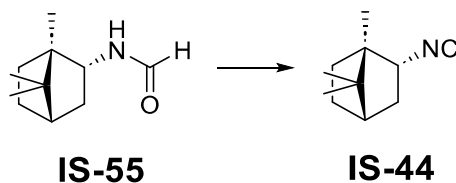


El compuesto **IS-55** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de **IS-43**. El producto se aisló como aceite de color amarillo. Rendimiento: 87%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.12 (s, 1H, CHO), 5.75 (br d, 1H, NH), 3.93 (m, 1H, CH-NH), 1.90 – 1.60 (m, 4H), 1.45 – 1.30 (m, 2H), 1.15 – 1.05 (m, 1H), 0.93 (s, 3H, CH₃), 0.89 (s, 3H, CH₃), 0.87 (s, 3H, CH₃).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 161.1, 53.6, 49.0, 47.1, 45.1, 36.3, 33.6, 27.1, 20.2, 19.9, 11.7.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.



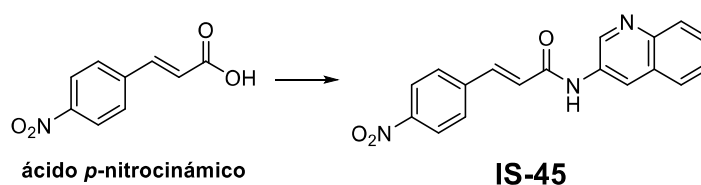
El compuesto **IS-44** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de **IS-55**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 68%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.65 (m, 1H, CH-NC), 1.95 – 1.65 (m, 4H), 1.50 – 1.35 (m, 2H), 1.25 – 1.10 (m, 1H), 1.01 (s, 3H, CH_3), 0.93 (s, 3H, CH_3), 0.88 (s, 3H, CH_3).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 156.5, 58.9, 48.7, 46.8, 44.9, 36.0, 33.1, 26.8, 20.0, 19.8, 11.4.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.

Síntesis de IS-48



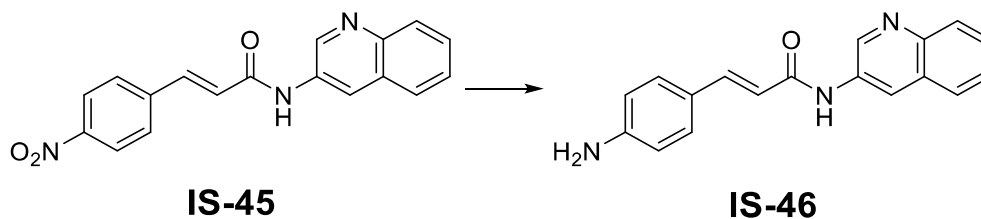
La mezcla de ácido *p*-nitrocinnámico (2,46 g, 0,02 moles) y cloruro de tionilo (20 mL) se sometió a reflujo durante 2 h. Después de eliminar el exceso de cloruro de tionilo mediante evaporación a presión reducida, se añadió piridina (20 mL) a la mezcla. Después se añadió 3-aminoquinolina (3,18 g, 0,025 moles) a la mezcla anterior en un baño de agua helada, la mezcla de reacción se agitó en este baño durante 30 min y luego a temperatura ambiente durante 24 h. Cuando se añadió agua (200 mL) a la mezcla de reacción a 0 °C precipitó el compuesto de acoplamiento. El producto **IS-45** se obtuvo como un sólido amarillo pálido (P.f.: 286-288 °C). Rendimiento: 78%.

^1H RMN (500 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.97 (H-8, sa, 1H), 9.07 (H-10, sa, 1H), 8.89 (H-17, sa, 1H), 8.30 (H-2, d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.01 (H-12, d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.94 (H-3, d, $J = 8.9$ Hz, 2H),

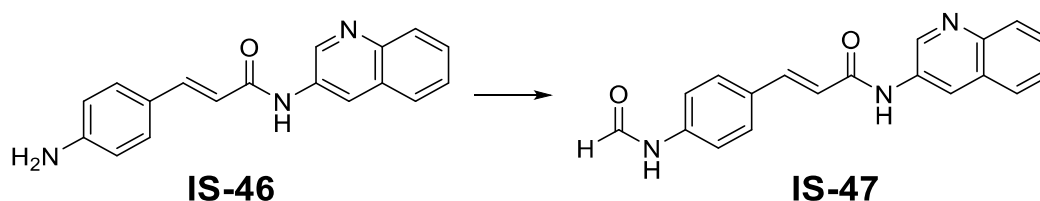
7.82 (H-15, d, J = 15.7 Hz, 1H), 7.67 (H-13, ddd, J = 8.4, 6.8, 1.5 Hz, 1H), 7.59 (H-14, t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.41 – 7.33 (H-5, m, 1H), 7.11 (H-6, d, J = 15.3 Hz, 1H).

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO) δ (ppm): 163.9 (C-7), 149.7 (C-1), 148.0 (C-11), 144.6 (C-5), 141.2 (C-4), 138.8 (C-10), 133.0 (C-9), 129.4 (C-16), 129.1 (C-3), 128.8 (C-13), 128.2 (C-12), 127.4 (C-14), 125.9 (C-15), 124.3 (C-2), 122.7 (C-6), 118.9 (C-17).

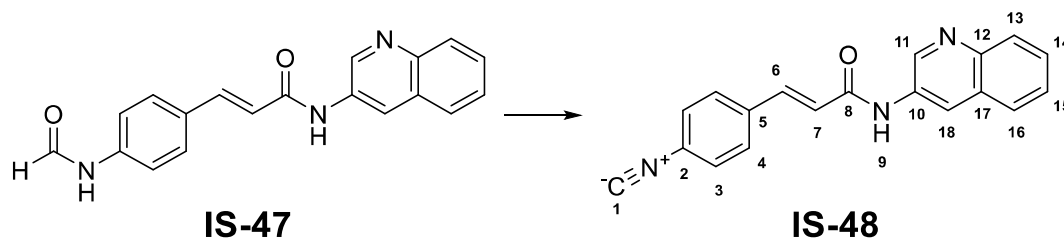
HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3$ 320.1030, encontrado 320.1036.



El compuesto **IS-46** se obtuvo siguiendo la metodología general para la reducción de grupo NO_2 aromático a partir de **IS-45**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 98%.



El compuesto **IS-47** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de la amina **IS-46**. El producto se aisló como un sólido amarillo (P.f.: 314-316 °C). Su caracterización por RMN no pudo realizarse debido a la nula solubilidad en los solventes deuterados disponibles en el laboratorio. Rendimiento: 69%.



El compuesto **IS-48** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-47**. El producto se aisló como un sólido amarillo (P.f.: 280-290 °C). Rendimiento: 69%.

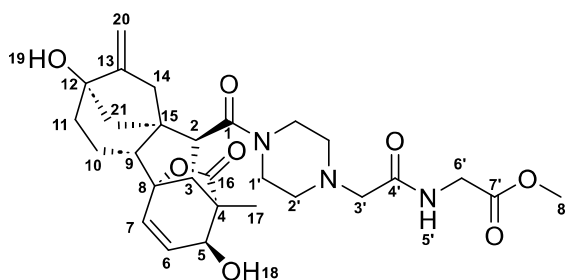
^1H RMN (500 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.90 (H-9, sa, 1H), 9.11 (H-11, sa, 1H), 8.87 (H-18, sa, 1H), 8.02 (H-13, d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.84 (H-16, d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 7.66 (H-14, ddd, $J = 8.4, 6.8, 1.5$ Hz, 1H), 7.63 (H-15, t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.51 (H-6, d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 7.45 (H-3, d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.99 (H-7, d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 6.89 (H-4, dd, $J = 7.6, 0.7$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO) δ (ppm): 166.0 (C-1), 165.0 (C-8), 145.0 (C-12), 143.4 (C-6), 140.1 (C-5), 139.8 (C-11), 133.0 (C-10), 129.9 (C-17), 129.1 (C-14), 128.6 (C-13), 128.0 (C-4), 127.1 (C-15), 126.1 (C-16), 126.0 (C-3), 123.5 (C-2), 121.7 (C-7), 118.8 (C-18).

HRMS (ESI $^+$): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}$ 300.1131, encontrado 300.1093.

Metodología para la síntesis de los bloques PIP2

Síntesis de PIP2-1



PIP2-1

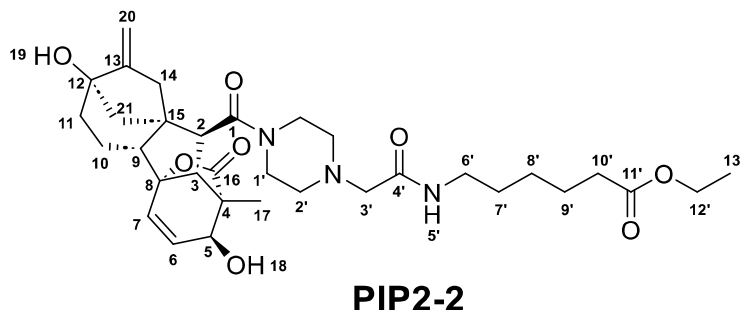
El compuesto **PIP2-1** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido giberélico e isocianoacetato de etilo. El producto se aisló como un sólido blanco (P.f.: 232 °C). Rendimiento: 55%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.45 (H-5', t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 6.25 (H-7, dd, $J = 9.3, 1.0$ Hz, 1H), 5.88 (H-6, dd, $J = 9.3, 3.6$ Hz, 1H), 5.20 (H-20a, dd, $J = 3.3, 1.7$ Hz, 1H), 4.92 (H-20b, t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.06 (H-6'a, d, $J = 17.9$ Hz, 1H), 4.02 (H-5, dd, $J = 3.6, 1.0$ Hz, 1H), 3.92 (H-6'b, d, $J = 17.9$ Hz, 1H), 3.71 (H-8', s, 3H), 3.69 (H-3, s, 1H), 3.61–3.52 (H-1'a, m, 2H), 3.50–3.42 (H-1'b, m, 2H), 3.41 (H-3', s, 2H), 3.19 (H-2, d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 2.91–2.81 (H-2', m, 4H), 2.67–1.61 (H-9 a H-11, H-14, H-18, H-19 y H-21, m, 11H), 1.22 (H-17, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 179.9 (C-16), 172.3 (C-1), 172.2 (C-7'), 170.5 (C-4'), 157.1 (C-13), 133.3 (C-6), 132.1 (C-7'), 107.3 (C-20), 91.1 (C-8), 78.1 (C-12), 69.8 (C-5), 59.3 (C-3'), 54.0–42.7 (C-2 a C-4, C-9, C-14, C-15, C-21, C-1', C-2' y C-8'), 41.1 (C-6'), 38.3 (C-11), 17.1 (C-10), 14.4 (C-17).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₂₈H₃₈N₃O₈ 544.2653, encontrado 544.2624.

Síntesis de PIP2-2



El compuesto **PIP2-2** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido giberélico y el isonitrilo **IS-20**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 71%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.88 (H-5', t, J = 5.8 Hz, 1H), 6.25 (H-7, d, J = 9.3 Hz, 1H), 5.88 (H-6, dd, J = 9.3, 3.6 Hz, 1H), 5.21 (H-20a, d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.91 (H-20b, d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.08 (H-12', q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.01 (H-5, d, J = 3.6 Hz, 1H), 3.69 (H-3', s, 2H), 3.66 – 3.62 (H-3, m, 1H), 3.44 – 3.12 (H-2, H-1' y H-6', m, 7H), 2.90 – 2.82 (H-2', m, 4H), 2.63 (H-18, sa, 1H), 2.49 (H-14a, d, J = 10.5 Hz, 1H), 2.27 (H-10', t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.23 – 1.46 (H-9 a H-11, H-14b, H-21, H-7' y H-9', m, 12H), 1.32 (H-8', tdd, J = 15.5, 10.1, 7.0 Hz, 2H), 1.22 (H-13', t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.20 (H-17, s, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.9 (C-16), 174.3 (C-11'), 171.6 (C-1), 171.5 (C-4'), 157.1 (C-13), 133.3 (C-6), 132.1 (C-7), 107.3 (C-20), 91.2 (C-8), 78.1 (C-12), 69.9 (C-5), 60.7 (C-12'), 59.3 (C-3'), 54.3 – 38.1 (C-2 a C-4, C-9, C-11, C-14, C-15, C-1', C-2' y C-6'), 34.0 (C-10'), 29.0 (C-7'), 26.4 (C-8'), 24.4 (C-9'), 17.1 (C-10), 14.4 (C-13'), 14.2 (C-17).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₃H₄₈N₃O₈ 614.3436, encontrado 614.3453.

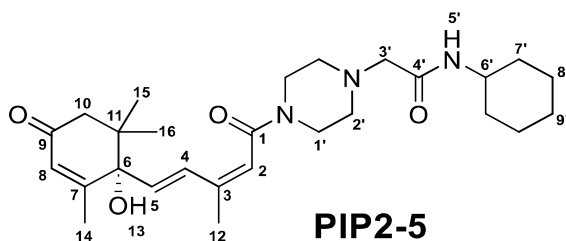
El compuesto **PIP2-4** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido giberélico y el isonitrilo **IS-19**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 49%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.61 (H-10', s, 1H), 7.66 (H-5', d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.55 (H-15', ddt, $J = 7.2, 1.1, 0.5$ Hz, 1H), 7.39 (H-12', ddd, $J = 7.7, 1.1, 0.5$ Hz, 1H), 7.18 (H-13', td, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H), 7.11 (H-14', td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 1H), 7.02 (H-9', sa, 1H), 6.22 (H-7, d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 5.88 (H-6, dd, $J = 10.5, 5.8$ Hz, 1H), 5.13 (H-20a, sa, 1H), 5.03 – 4.95 (H-6', m, 1H), 4.93 (H-20b, sa, 1H), 4.10 – 4.03 (H-5, m, 1H), 3.70 (H-18', s, 3H), 3.67 – 3.61 (H-3, m, 1H), 3.49 – 3.35 (H-7', m, 2H), 3.31 – 3.18 (H-2 y H-1', m, 5H), 3.11 – 2.98 (H-3', m, 2H), 2.88 – 2.77 (H-2', m, 4H), 2.40 – 1.52 (H-9 a H-11, H-14 y H-21, m, 8H), 1.35 (H-17, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 179.3 (C-16), 172.9 (C-17'), 171.8 (C-1), 170.0 (C-4'), 156.5 (C-13), 136.4 (C-11'), 133.6 (C-6), 131.9 (C-7), 128.1 (C-16'), 123.9 (C-9'), 122.4 (C-13'), 119.5 (C-14'), 118.3 (C-15'), 111.4 (C-12'), 110.0 (C-8'), 107.6 (C-20), 91.6 (C-8), 78.3 (C-12), 70.6 (C-5), 60.6 (C-3'), 56.2 – 37.7 (C-2 a C-4, C-9, C-11, C-14, C-15, C-21, C-1', C-2' y C-18'), 27.8 (C-7'), 17.5 (C-10), 14.0 (C-17).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_8$ 673.3232, encontrado 673.3326.

Síntesis de **PIP2-5**



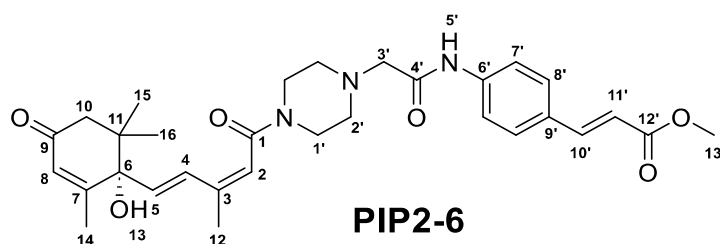
El compuesto **PIP2-5** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido abscísico y ciclohexilisociano. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 75%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.95 (H-5, d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.91 (H-5', d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 5.96 (H-4, d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 5.93 – 5.86 (H-2, H-8 y H-13, m, 3H), 3.84 – 3.74 (H-6', m, 1H), 3.74 – 3.60 (H-1'a, m, 2H), 3.59 – 3.43 (H-1'b, m, 2H), 3.00 (H-3', s, 2H), 2.61 – 2.45 (H-2', m, 4H), 2.42 (H-10a, d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 2.27 (H-10b, d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 1.93 (H-12, s, 3H), 1.88 (H-14, s, 3H), 1.73 – 1.12 (H-7' a H-9', m, 10H), 1.08 (H-16, s, 3H), 0.99 (H-15, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 198.0 (C-9), 168.5 (C-4'), 166.4 (C-1), 163.1 (C-7), 141.4 (C-3), 134.0 (C-4), 128.4 (C-5), 126.9 (C-8), 121.6 (C-2), 79.6 (C-6), 61.6 (C-3'), 58.2 (C-6'), 53.6 (C-2'a), 53.2 (C-2'b), 49.9 (C-10), 47.6 (C-1'a), 46.5 (C-1'b), 41.6 (C-11), 33.2 (C-7'), 25.6 (C-9'), 24.8 (C-8'), 24.5 (C-15), 23.2 (C-16), 20.4 (C-12), 19.2 (C-14).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_4$ 472.3170, encontrado 472.3088.

Síntesis de PIP2-6



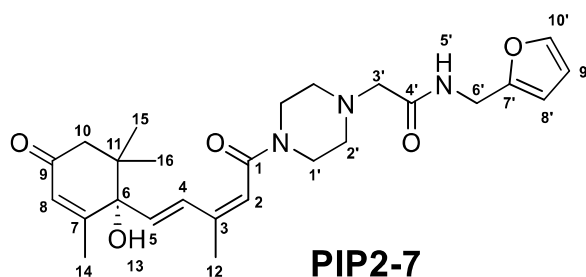
El compuesto **PIP2-6** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido abscísico y el isonitrilo **IS-15**. El producto se aisló como un sólido blanco (P.f.: 198 °C). Rendimiento: 68%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.11 (H-5', s, 1H), 8.04 (H-4, d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.65 (H-10', d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.62 – 7.46 (H-7' y H-8', m, 4H), 7.24 (H-13, s, 1H), 6.38 (H-11', d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.17 (H-5, d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 5.93 (H-8, sa, 1H), 5.77 (H-2, sa, 1H), 3.80 (H-13', s, 3H), 3.76 – 3.69 (H-1', m, 4H), 3.22 (H-3', s, 2H), 2.79 – 2.69 (H-2', m, 4H), 2.50 (H-10a, d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 2.32 (H-10b, d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 2.04 (H-12, s, 3H), 1.93 (H-14, s, 3H), 1.11 (H-16, s, 3H), 1.02 (H-15, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 198.3 (C-9), 168.0 (C-4'), 167.2 (C-12'), 166.5 (C-1), 163.2 (C-7), 144.1 (C-10'), 141.7 (C-3), 138.5 (C-6'), 136.2 (C-5), 130.8 (C-9'), 129.1 (C-8'), 128.0 (C-4), 127.0 (C-8), 120.9 (C-2), 119.8 (C-7'), 116.9 (C-11'), 79.8 (C-6), 61.9 (C-3'), 53.4 (C-2'a), 53.2 (C-2'b), 51.7 (C-13'), 50.0 (C-10), 44.5 (C-1'a), 44.0 (C-1'b), 41.9 (C-11), 24.3 (C-15), 23.1 (C-16), 21.3 (C-12), 18.9 (C-14).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_6$ 550.2912, encontrado 550.2959.

Síntesis de PIP2-7



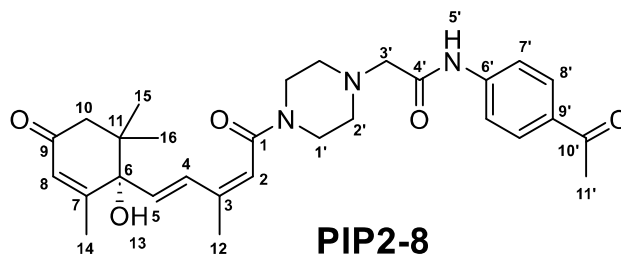
El compuesto **PIP2-7** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido abscísico y el isonitrilo **IS-37**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 71%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.38 – 7.32 (H-5' y H-10', m, 2H), 6.95 (H-5, d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.32 (H-9', dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.21 (H-8', d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.96 (H-4, d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 5.88 (H-2 y H-8, dd, $J = 2.9, 1.5$ Hz, 2H), 4.47 (H-6', d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 4.10 (H-13, q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.73 – 3.58 (H-1'a, m, 2H), 3.47 (H-1'b, m, 2H), 3.06 (H-3', s, 2H), 2.66 – 2.62 (m, 1H), 2.62 – 2.41 (H-10 y H-2', m, 6H), 1.93 (H-12, s, 3H), 1.88 (H-14, s, 3H), 1.08 (H-16, s, 3H), 0.98 (H-15, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 197.8 (C-9), 166.3 (C-1), 162.9 (C-7), 151.3 (C-7'), 142.2 (C-3), 142.2 (C-10'), 133.9 (C-5), 128.3 (C-4), 127.1 (C-8), 121.5 (C-2), 110.5 (C-9'), 107.3 (C-8'), 79.5 (C-6), 61.4 (C-3'), 53.5 (C-2'a), 53.5 (C-2'b), 49.8 (C-10), 46.4 (C-1'a y C-1'b), 41.5 (C-11), 36.0 (C-6'), 24.4 (C-15), 23.1 (C-16), 20.3 (C-12), 19.1 (C-14).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_5$ 470.2677, encontrado 469.2683.

Síntesis de PIP2-8



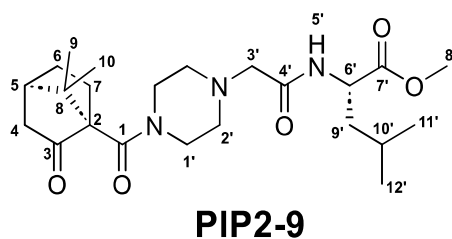
El compuesto **PIP2-8** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido abscísico y el isonitrilo **IS-38**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 69%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.21 (H-5', s, 1H), 7.98 (H-8', d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.68 (H-7', d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.28 (H-13, s, 1H), 6.97 (H-5, d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.40 (H-4, d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 6.11 – 5.86 (H-2 y H-8, m, 2H), 4.13 (H-1, m, 4H), 3.23 (H-3', s, 2H), 2.69 – 2.63 (H-2', m, 4H), 2.60 (H-11', s, 3H), 2.50 – 2.25 (H-10, m, 2H), 2.06 (H-12, s, 3H), 1.93 (H-14, s, 3H), 1.13 (H-16, s, 3H), 1.03 (H-15, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 197.9 (C-9), 197.0 (C-10'), 168.2 (C-4'), 166.5 (C-1), 163.0 (C-7), 142.9 (C-3), 141.7 (C-5), 141.7 (C-6'), 134.1 (C-9'), 133.6 (C-4'), 129.9 (C-8'), 127.0 (C-8), 121.6 (C-2), 118.9 (C-7'), 79.7 (C-6), 62.1 (C-3'), 53.8 (C-2'a), 53.3 (C-2'b), 49.9 (C-10), 46.5 (C-1'), 41.6 (C-11), 26.6 (C-11'), 24.5 (C-15), 23.2 (C-16), 20.4 (C-12), 19.2 (C-14).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_5$ 508.2811, encontrado 508.2816.

Síntesis de PIP2-9



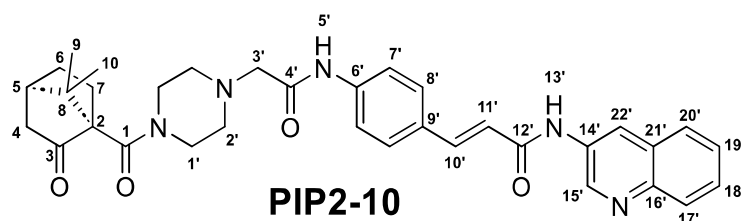
El compuesto **PIP2-9** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-2** y el isonitrilo **IS-18**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 47%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.43 – 7.29 (H-5', m, 1H), 4.88 (H-6', dq, $J = 16.8, 7.1$ Hz, 1H), 3.77 – 3.64 (H-1'a, m, 2H), 3.69 (H-8', s, 3H), 3.55 – 3.40 (H-1'b, m, 2H), 3.39 – 3.19 (m, 11H), 2.71 – 2.53 (H-2', m, 2H), 2.50 – 1.38 (H-4 a H-7, H-9' y H-10', m, 10H), 1.13 (H-10, s, 3H), 1.04 (H-9', s, 12H), 0.95 (H-11', d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.87 (H-12', d, $J = 6.7$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 210.2 (C-3), 175.5 (C-7'), 175.1 (C-1), 173.8 (C-4'), 69.6 (C-2), 63.4 (C-3'), 56.3 (C-6'), 53.1 (C-2'a), 53.0 (C-2'b), 52.5 (C-8'), 51.9 (C-8), 44.0 (C-1'a), 43.7 (C-1'b), 43.3 (C-5), 39.2 (C-4), 38.4 (C-9'), 27.7 (C-7), 25.4 (C-6), 25.0 (C-10'), 23.0 (C-12'), 22.8 (C-11'), 21.5 (C-10), 21.0 (C-9).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_5$ 436.2806, encontrado 436.2719.

Síntesis de PIP2-10



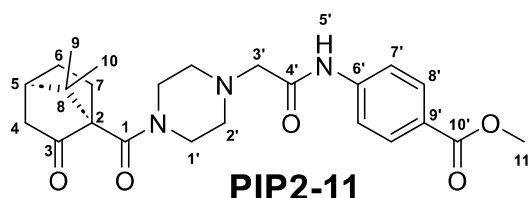
El compuesto **PIP2-10** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-2** y el isonitrilo **IS-48**. El producto se aisló como un sólido amarillo pálido (P.f.: 197 °C). Rendimiento: 32%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.91 (H-5', s, 1H), 8.90 (H-13' y H-22', sa, 2H), 8.80 (H-15', d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.05 (H-17', d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.85 (H-20', d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.78 (H-10', d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.69 (H-7', d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.64 (H-18', ddd, J = 8.4, 6.8, 1.4 Hz, 1H), 7.59 – 7.53 (H-8' y H-19', m, 3H), 6.56 (H-11', d, J = 15.4 Hz, 1H), 3.73 – 3.64 (H-1'a, m, 2H), 3.54 – 3.47 (H-1'b, m, 2H), 3.24 (H-3', s, 2H), 3.02 – 2.89 (H-2', m, 4H), 2.65 – 2.55 (H-4, m, 2H), 2.27 – 2.18 (H-5, m, 1H), 2.18 – 1.46 (H-6 y H-7, m, 4H), 1.36 (H-10, s, 3H), 1.05 (H-9, s, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 218.1 (C-3), 174.4 (C-1), 167.8 (C-4'), 164.0 (C-12'), 145.1 (C-16'), 144.1 (C-15'), 143.0 (C-10'), 139.9 (C-6'), 131.8 (C-14'), 130.3 (C-21'), 129.2 (C-19'), 129.1 (C-8'), 128.5 (C-18'), 128.1 (C-17'), 127.5 (C-20'), 126.2 (C-9'), 124.1 (C-22'), 120.4 (C-7'), 118.8 (C-11'), 65.0 (C-2), 62.0 (C-3'), 52.7 (C-2'), 50.9 (C-8), 45.4 (C-1'a), 45.1 (C-1'b), 43.9 (C-5), 43.4 (C-4), 29.3 (C-7), 28.1 (C-6), 21.3 (C-10), 20.6 (C-9).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₄H₃₈N₅O₄ 580.2918, encontrado 580.2949.

Síntesis de PIP2-11



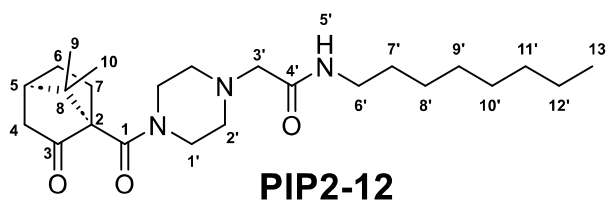
El compuesto **PIP2-11** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-2** y el isonitrilo **IS-30**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 49%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.86 (H-5', sa, 1H), 8.09 (H-7', d, $J = 8.79$ Hz, 2H), 7.75 (H-8', d, $J = 8.74$ Hz, 2H), 4.21 (H-11', s, 3H), 3.70 – 3.62 (H-1'a, m, 2H), 3.48 – 3.40 (H-1'b, m, 2H), 3.07 (H-3', s, 2H), 2.83 – 2.71 (H-2', m, 4H), 2.64 – 2.55 (H-4'a, m, 1H), 2.47 – 2.37 (H-4'b, m, 1H), 2.18 – 2.00 (H-5 y H-7, m, 3H), 1.80 (H-7'a, ddd, $J = 14.0, 9.3, 4.7$ Hz, 1H), 1.46 (H-7'b, ddd, $J = 12.7, 9.4, 4.1$ Hz, 1H), 1.21 (H-9, s, 3H), 1.11 (H-8', s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 215.0 (C-3), 173.2 (C-1), 166.5 (C-10'), 166.0 (C-4'), 141.6 (C-6'), 131.3 (C-8'), 126.7 (C-9'), 118.8 (C-7'), 66.8 (C-2), 61.5 (C-11'), 61.0 (C-3'), 53.1 (C-2'a), 52.7 (C-2'b), 46.7 (C-8'), 44.9 (C-1'a), 44.6 (C-1'b), 43.7 (C-5), 43.1 (C-4), 27.7 (C-7), 27.1 (C-6), 20.8 (C-10), 20.0 (C-9).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_5$ 442.2336, encontrado 442.2311.

Síntesis de PIP2-12



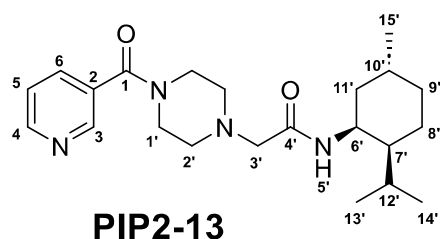
El compuesto **PIP2-12** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-2** y el isonitrilo **IS-35**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 56%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.70 (H-5', sa, 1H), 3.60 – 3.40 (H-1', m, 4H), 3.48 (H-3'a, d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 3.34 (H-3'b, d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 3.20 – 3.13 (H-6', m, 2H), 2.61 – 2.47 (H-4 y H-2', m, 6H), 2.37 – 1.60 (H-5 a H-7, m, 5H), 1.48 (H-7', m, 2H), 1.33 – 1.23 (H-8' a H-12', m, 10H), 1.22 (H-10, s, 3H), 1.17 (H-9, s, 3H), 0.86 (H-13', t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 210.7 (C-3), 175.0 (C-1), 173.7 (C-4'), 70.1 (C-2), 63.3 (C-3'), 53.1 (C-2'), 51.7 (C-8), 44.9 (C-1'), 43.9 (C-5), 43.5 (C-4), 32.4 – 22.4 (C-6, C-7 y C-7' a C-13'), 21.5 (C-9), 21.4 (C-10), 14.2 (C-13').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_3$ 420.3221, encontrado 420.3313.

Síntesis de PIP2-13



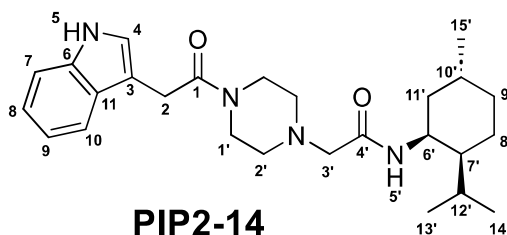
El compuesto **PIP2-13** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido nicotínico y el isonitrilo **IS-42**. El producto se aisló como un sólido amarillo pálido (P.f.: 152-154 °C). Rendimiento: 69%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.66 (H-4, dd, J = 4.9, 1.7 Hz, 1H), 8.65 (H-3, dd, J = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 7.75 (H-6, dt, J = 7.8, 1.9 Hz, 1H), 7.36 (H-5, ddd, J = 7.8, 4.9, 0.9 Hz, 1H), 7.24 (H-5', sa, 1H), 4.31 (H-6', ddd, J = 13.2, 8.0, 4.9 Hz, 1H), 3.89 – 3.72 (H-1'a, m, 2H), 3.58 – 3.38 (H-1'b, m, 2H), 3.08 (H-3'a, d, J = 16.2 Hz, 1H), 3.03 (H-3'b, d, J = 16.2 Hz, 1H), 2.69 – 2.43 (H-2', m, 4H), 1.91 – 0.97 (H-6' a H-12', m, 9H), 0.95 – 0.79 (H-13' a H-15', m, 12H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.3 (C-4'), 168.0 (C-1), 151.1 (C-4), 148.0 (C-3), 135.2 (C-6), 131.4 (C-2), 123.7 (C-5), 61.7 (C-3'), 53.6 (C-2'a), 53.3 (C-2'b), 48.1 (C-1'a), 46.4 (C-7'), 45.7 (C-6'), 42.6 (C-1'b), 40.2 (C-11'), 34.8 (C-9'), 30.1 (C-10'), 27.4 (C-7'), 25.9 (C-8'), 22.4 (C-15'), 21.2 (C-14'), 20.8 (C-13').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₂₂H₃₅N₄O₂ 387.2755, encontrado 387.2844.

Síntesis de PIP2-14



El compuesto **PIP2-14** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido 3-indolacético y el isonitrilo **IS-42**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 75%.

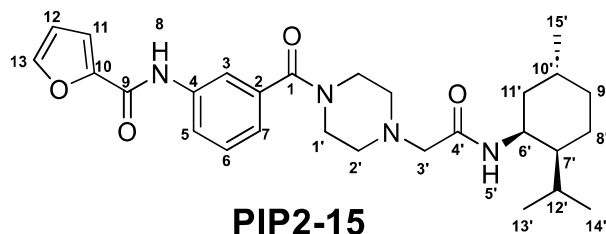
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.15 (H-5, sa, 1H), 7.62 (H-10, dd, J = 7.9, 0.9 Hz, 1H), 7.38 (H-7, dd, J = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.29 (H-5', sa, 1H), 7.22 (H-8, ddd, J = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H),

7.14 (H-9, ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.0$ Hz, 1H), 7.11 (H-4, d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.34 – 4.28 (H-6', m, 1H), 3.86 (H-2, s, 2H), 3.71 – 3.64 (H-1'a, m, 2H), 3.51 (H-1'b, t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 2.99 (H-3'a, d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 2.94 (H-3'b, d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 2.49 (H-2'a, t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 2.34 (H-2'b, t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 1.90 – 1.01 (H-7' a H-12', m, 9H), 0.99 – 0.84 (H-13' a H-15', m, 9H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.1 (C-1), 168.5 (C-4'), 136.2 (C-6), 127.0 (C-11), 122.4 (C-8), 122.2 (C-4), 119.8 (C-9), 118.7 (C-10), 111.3 (C-7), 109.3 (C-3), 61.6 (C-3'), 53.5 (C-2'a), 53.2 (C-2'b), 46.3 (C-1'a), 45.6 (C-6'), 41.9 (C-1'b), 40.1 (C-11'), 34.7 (C-9'), 31.4 (C-2), 29.9 (C-10'), 27.2 (C-7'), 25.8 (C-8'), 22.2 (C-15'), 21.1 (C-13'), 20.7 (C-14').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_2$ 439.3068, encontrado 439.2997.

Síntesis de PIP2-15



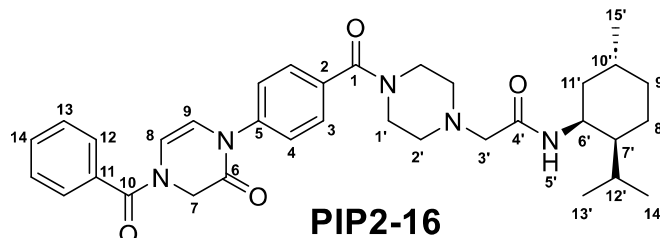
El compuesto **PIP2-15** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-10** y el isonitrilo **IS-42**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 61%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.32 (H-8, sa, 1H), 7.81 (H-3, t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.61 (H-5, ddd, $J = 8.2, 2.2, 1.0$ Hz, 1H), 7.51 (H-13, dd, $J = 1.8, 0.8$ Hz, 1H), 7.39 (H-6, t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.33 (H-5', d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.24 (H-11, dd, $J = 3.5, 0.8$ Hz, 1H), 7.17 (H-7, dt, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H), 6.55 (H-12, dd, $J = 3.5, 1.8$ Hz, 1H), 4.31 (H-6', dq, $J = 9.7, 3.3$ Hz, 1H), 3.84 – 3.71 (H-1'a, m, 2H), 3.58 – 3.48 (H-1'b, m, 2H), 3.07 (H-3'a, d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 3.03 (H-3'b, d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 2.67 – 2.49 (H-2', m, 4H), 1.92 – 0.90 (H-7' a H-12', m, 9H), 0.90 – 0.85 (H-13' a H-15', m, 9H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.0 (C-4'), 168.6 (C-9), 156.4 (C-1), 147.6 (C-10), 144.6 (C-13), 137.7 (C-4), 136.4 (C-2), 129.6 (C-6), 123.2 (C-5), 121.4 (C-7), 118.8 (C-3), 115.7 (C-11), 112.8 (C-12), 61.7 (C-3'), 53.7 (C-2'a), 53.3 (C-2'b), 48.0 (C-1'a), 46.4 (C-7'), 45.7 (C-6'), 42.5 (C-1'b), 40.2 (C-11'), 34.8 (C-9'), 30.1 (C-10'), 27.3 (C-12'), 25.9 (C-8'), 22.3 (C-15'), 21.2 (C-13'), 20.8 (C-14').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₂₈H₃₉N₄O₄ 495.2966, encontrado 495.3043.

Síntesis de PIP2-16



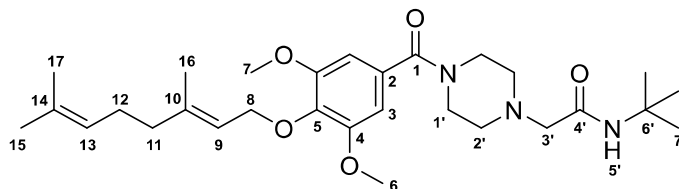
El compuesto **PIP2-16** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-14** y el isonitrilo **IS-42**. El producto se aisló como un aceite de color marrón. Rendimiento: 43%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.83 – 7.43 (H-3, H-4 y H-12 a H-14, m, 9H), 7.32 (H-5', d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.30 (H-9, sa, 1H), 5.97 (H-8, sa, 1H), 4.69 (H-7, s, 2H), 4.35 – 4.25 (H-6', m, 1H), 3.74 – 3.66 (H-1'a, m, 2H), 3.56 – 3.48 (H-1'b, m, 2H), 3.17 – 3.04 (H-3', m, 2H), 2.69 – 2.55 (H-2', m, 4H), 1.92 – 0.98 (H-7' a H-12', m, 9H), 0.91 – 0.83 (H-13' a H-15', m, 12H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.3 (C-4'), 168.6 (C-10), 163.0 (C-6), 158.0 (C-1), 140.9 – 124.2 (C-2 a C-5 y C-11 a C-14), 113.9 (C-8), 113.0 (C-9), 61.4 (C-3'), 53.0 (C-2'a), 52.7 (C-2'b), 48.2 (C-1'a), 47.2 (C-7), 46.3 (C-7'), 46.0 (C-6'), 43.0 (C-1'b), 39.9 (C-11'), 34.3 (C-9'), 30.1 (C-10'), 27.5 (C-12'), 25.5 (C-8'), 22.1 (C-15'), 21.0 (C-13'), 20.9 (C-14').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₄H₄₄N₅O₄ 586.3388, encontrado 586.3384.

Síntesis de PIP2-17



PIP2-17

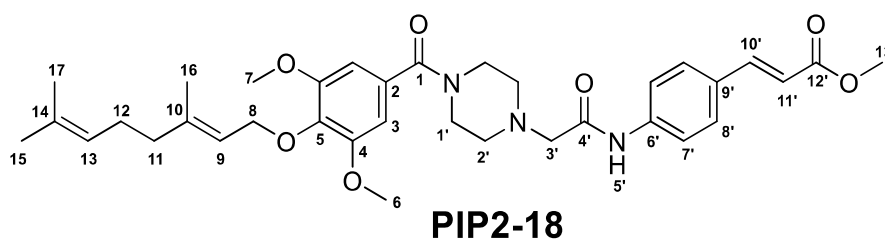
El compuesto **PIP2-17** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-7** y *t*-butilisociano. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 78%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.88 (H-5', s, 1H), 6.60 (H-3, s, 2H), 5.55 (H-9, t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.08 (H-13, t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.54 (H-8, d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.85 (H-6, s, 6H), 3.78 – 3.70 (H-1'a, m, 2H), 3.61 – 3.51 (H-1'b, m, 2H), 3.23 (H-3', s, 2H), 2.63 – 2.46 (H-2', m, 4H), 2.11 – 1.99 (H-11 y H-12, m, 4H), 1.67 (H-16, s, 3H), 1.66 (H-15, s, 3H), 1.59 (H-17, s, 3H), 1.36 (H-7', s, 9H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.5 (C-4'), 168.6 (C-1), 153.9 (C-4), 141.7 (C-5), 138.3 (C-10), 131.8 (C-14), 130.7 (C-2), 124.1 (C-13), 120.1 (C-9), 104.4 (C-3), 69.7 (C-8), 59.5 (C-3'), 56.3 (C-6 y C-7), 53.2 (C-2'a), 53.1 (C-2'b), 50.8 (C-6'), 39.8 (C-11), 39.2 (C-1'a), 37.5 (C-1'b), 28.9 (C-7'), 26.6 (C-12), 25.8 (C-15), 17.8 (C-17), 16.5 (C-16).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_5$ 516.3432, encontrado 516.3367.

Síntesis de PIP2-18



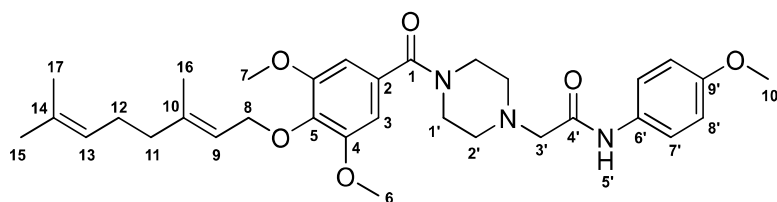
El compuesto **PIP2-18** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-7** y el isonitrilo **IS-15**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 71%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.06 (H-5', s, 1H), 7.69 – 7.48 (H-7', H-8' y H-10', m, 5H), 6.62 (H-3, s, 2H), 6.37 (H-11', d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 5.55 (H-9, t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.08 (H-13, t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.54 (H-8, d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.86 (H-6 y H-7, s, 6H), 3.80 (H-13', s, 3H), 3.77 – 3.63 (H-1', m, 4H), 3.20 (H-3', s, 2H), 2.73 – 2.59 (H-2', m, 4H), 2.11 – 1.93 (H-11 y H-12, m, 4H), 1.67 (H-16, s, 3H), 1.66 (H-15, s, 3H), 1.59 (H-17, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.5 (C-1), 167.8 (C-4'), 167.6 (C-12'), 153.9 (C-4), 144.1 (C-10'), 143.1 (C-5), 141.8 (C-10), 139.2 (C-6'), 131.4 (C-14), 130.6 (C-9'), 130.6 (C-2), 129.2 (C-8'), 124.1 (C-13), 120.1 (C-9), 119.6 (C-7'), 117.0 (C-11'), 104.5 (C-3), 69.7 (C-8), 62.2 (C-3'), 56.4 (C-6 y C-7), 53.7 (C-2'a), 53.4 (C-2'b), 51.8 (C-13'), 39.8 (C-11), 39.2 (C-1'a), 37.5 (C-1'b), 26.6 (C-12), 25.8 (C-15), 17.8 (C-17), 16.5 (C-16).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_7$ 620.3330, encontrado 620.3367.

Síntesis de PIP2-19



PIP2-19

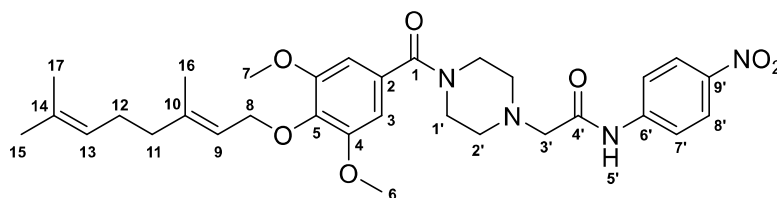
El compuesto **PIP2-19** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-7** y el isonitrilo **IS-32**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 59%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.81 (H-5', s, 1H), 7.46 (H-7', d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.87 (H-8', d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.62 (H-3, d, $J = 0.9$ Hz, 2H), 5.55 (H-9, t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 5.08 (H-13, t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.54 (H-8, d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.86 (H-6 y H-7, s, 6H), 3.79 (H-10', s, 3H), 3.69 – 3.61 (H-1'a, m, 2H), 3.56 – 3.48 (H-1'b, m, 2H), 3.18 (H-3', s, 2H), 2.71 – 2.61 (H-2', m, 4H), 2.10 – 1.94 (H-11 y H-12, m, 4H), 1.67 (H-16, s, 3H), 1.66 (H-15, s, 3H), 1.59 (H-17, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.5 (C-1), 167.4 (C-4'), 156.7 (C-9'), 153.9 (C-4), 141.8 (C-5), 138.4 (C-10), 131.8 (C-14), 130.6 (C-6'), 130.6 (C-2), 124.1 (C-13), 121.4 (C-7'), 120.1 (C-9), 114.4 (C-8'), 104.5 (C-3), 69.7 (C-8), 62.1 (C-3'), 56.4 (C-6 y C-7), 55.6 (C-10'), 53.8 (C-2'a), 53.7 (C-2'b), 39.8 (C-11), 39.2 (C-1'a), 37.5 (C-1'b), 26.6 (C-12), 25.8 (C-15'), 17.8 (C-17), 16.5 (C-16).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_6$ 566.3225, encontrado 566.3173.

Síntesis de PIP2-20



PIP2-20

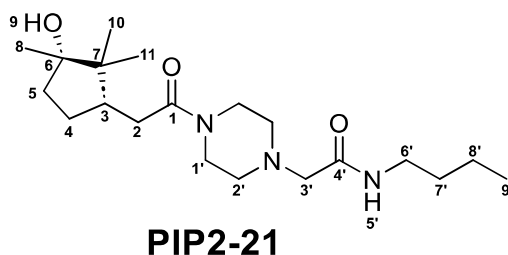
El compuesto **PIP2-20** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-7** y el isonitrilo **IS-32**. El producto se aisló como un sólido amarillo (P.f.: 178-180 °C). Rendimiento: 67%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.32 (H-5', s, 1H), 8.24 (H-8', d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.75 (H-7', d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.62 (H-3, s, 2H), 5.56 (H-9, t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5.11 – 5.07 (H-13, m, 1H), 4.55 (H-8, d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.86 (H-6 y H-7, s, 6H), 3.79 – 3.70 (H-1'a, m, 2H), 3.56 – 3.46 (H-1'b, m, 2H), 3.26 (H-3', s, 2H), 2.85 – 2.61 (H-2', m, 4H), 2.10 – 1.95 (H-11 y H-12, m, 4H), 1.67 (H-16, s, 3H), 1.66 (H-15, s, 3H), 1.59 (H-17, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.4 (C-1), 168.9 (C-4'), 153.8 (C-4), 145.1 (C-9'), 144.1 (C-6'), 141.8 (C-5), 138.3 (C-10), 131.6 (C-14), 130.6 (C-2), 125.1 (C-8'), 124.0 (C-13), 120.2 (C-9), 117.0 (C-7), 104.9 (C-3), 69.6 (C-8), 60.5 (C-3'), 56.3 (C-6 y C-7), 53.1 (C-2'a), 52.5 (C-2'b), 43.2 (C-1'a), 42.4 (C-1'b), 39.6 (C-11), 26.8 (C-12), 25.8 (C-15), 17.9 (C-17), 16.5 (C-16).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_7$ 581.2970, encontrado 581.2977.

Síntesis de PIP2-21



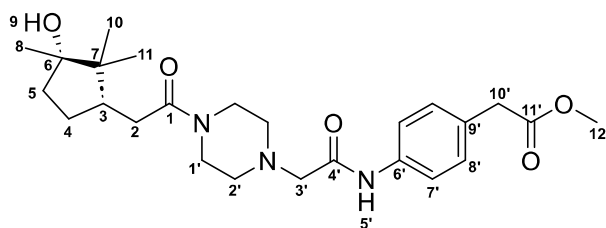
El compuesto **PIP2-21** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-5** y **IS-34**. El producto se aisló como un sólido blanco (P.f.: 130-132 °C). Rendimiento: 47%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.92 (H-5', t, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.70 – 3.61 (H-1'a, m, 2H), 3.53 – 3.43 (H-1'b, m, 2H), 3.08 – 3.01 (H-6', m, 2H), 2.97 (H-3', s, 2H), 2.70 – 2.58 (H-2', m, 4H), 2.44 – 1.27 (H-2 a H-5, H-7' y H-8', m, 11H), 1.17 (H-8, s, 3H), 1.11 (H-11, s, 3H), 1.03 (H-10, s, 3H), 0.84 (H-9', t, $J = 6.7$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.0 (C-1), 168.9 (C-4'), 79.9 (C-6), 59.9 (C-3'), 52.9 (C-2'a), 52.6 (C-2'b), 45.7 (C-1'a), 43.8 (C-1'b), 42.0 (C-7), 41.3 – 26.1 (C-2 a C-5, C-6' y C-7'), 25.3 (C-8), 24.8 (C-10), 22.9 (C-11), 19.6 (C-8'), 14.2 (C-9').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_3$ 368.2908, encontrado 368.2866.

Síntesis de PIP2-22



PIP2-22

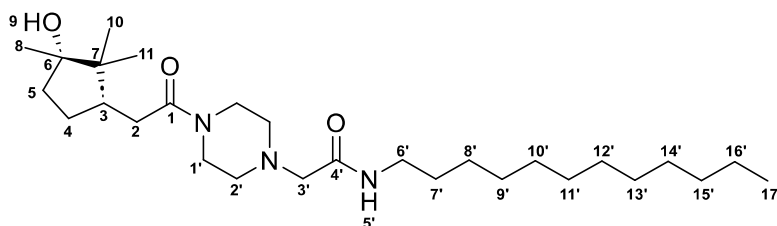
El compuesto **PIP2-22** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-5** y el isonitrilo **IS-17**. El producto se aisló como un aceite de color naranja. Rendimiento: 51%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.88 (H-5', s, 1H), 7.53 (H-7', d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.26 (H-8', d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.77 – 3.69 (H-1'a, m, 2H), 3.68 (H-12', s, 3H), 3.61 (H-10', s, 2H), 3.52 – 3.43 (H-1'b, m, 2H), 3.19 (H-3', s, 2H), 2.71 – 2.59 (H-2', m, 4H), 2.33 – 1.49 (H-2 a H-5, m, 7H), 1.16 (H-8, s, 3H), 1.05 (H-11, s, 3H), 1.03 (H-10, s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.3 (C-11'), 171.9 (C-1), 166.7 (C-4'), 136.9 (C-6'), 130.1 (C-8'), 129.0 (C-9'), 120.4 (C-7'), 79.9 (C-6), 62.0 (C-3'), 53.1 (C-2'a), 53.0 (C-2'b), 52.0 (C-12'), 44.6 (C-1'a), 43.4 (C-1'b), 43.1 – 26.9 (C-2 a C-5 y C-7), 24.4 (C-8), 23.5 (C-10), 22.5 (C-11).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_5$ 460.2806, encontrado 460.2890.

Síntesis de PIP2-23



PIP2-23

El compuesto **PIP2-23** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-5** y el isonitrilo **IS-36**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 45%.

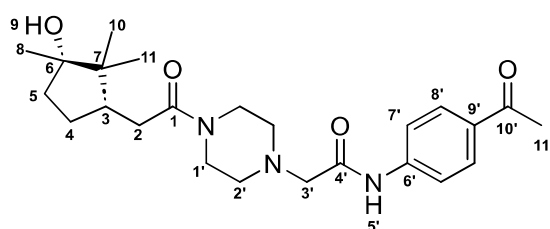
^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.90 (H-5', sa, 1H), 3.57 – 3.49 (H-1'a, m, 2H), 3.43 – 3.33 (H-1'b, m, 2H), 3.00 (H-3', s, 2H), 2.98 – 2.93 (H-6', m, 2H), 2.79 – 2.68 (H-2', m, 4H), 2.40 –

1.44 (H-2 a H-5 y H-7', m, 9H), 1.34 – 1.22 (H-8' a H-16', m, 18H), 1.17 (H-8, s, 3H), 1.09 (H-11, s, 3H), 1.03 (H-10, s, 3H), 0.94 – 0.85 (H-17', m, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.8 (C-1), 170.0 (C-4'), 79.7 (C-6), 60.2 (C-3'), 53.2 (C-2'a), 52.8 (C-2'b), 46.8 (C-1'a), 45.8 (C-1'b), 44.3 (C-6'), 43.3 – 25.5 (C-2 a C-5, C-7 y C-7' a C-15'), 24.5 (C-8), 23.9 (C-10), 22.4 (C-11), 22.0 (C-16'), 14.1 (C-17').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₂₈H₅₄N₃O₃ 480.4160, encontrado 480.4072.

Síntesis de PIP2-24



PIP2-24

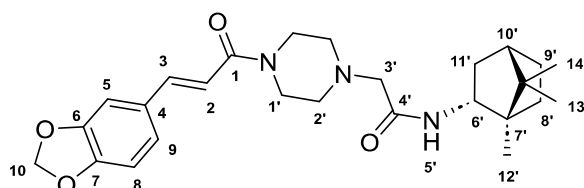
El compuesto **PIP2-24** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-5** y el isonitrilo **IS-38**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 54%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.21 (H-5', s, 1H), 7.98 (H-8', d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.68 (H-7', d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.75 – 3.65 (H-1'a, m, 2H), 3.55 – 3.45 (H-1'b, m, 2H), 3.23 (H-3', s, 2H), 2.70 – 2.60 (H-2', m, 4H), 2.60 (H-11', s, 3H), 2.35 (H-2, t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.90 – 1.50 (H-3, H-4, H-5, H-8, y H-9, m, 9H), 1.15 (H-11, s, 3H), 1.05 (H-10, s, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 197.0 (C-10'), 173.5 (C-1), 168.2 (C-4'), 141.7 (C-6'), 134.1 (C-9'), 129.9 (C-8'), 118.9 (C-7'), 78.5 (C-6), 62.1 (C-3'), 53.5 (C-2'a), 53.1 (C-2'b), 45.5 (C-7), 45.0 (C-1'a), 43.8 (C-1'b), 42.1 (C-5), 38.4 (C-3), 35.2 (C-2), 28.8 (C-8), 28.1 (C-11), 26.6 (C-11'), 25.9 (C-10), 24.5 (C-4).

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₂₄H₃₆N₃O₄ 430.2706, encontrado 430.2721.

Síntesis de PIP2-25



PIP2-25

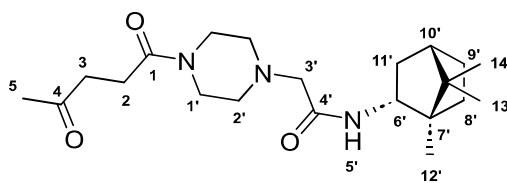
El compuesto **PIP2-25** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido 3,4-metilendioxicinámico y el isonitrilo **IS-44**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 62%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.55 (H-3, d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.05 (H-5, d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.00 (H-5', d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.90 (H-9, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 6.80 (H-8, d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.25 (H-2, d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.00 (H-10, s, 2H), 3.90 (H-6', m, 1H), 3.70 – 3.60 (H-1'a, m, 2H), 3.55 – 3.45 (H-1'b, m, 2H), 3.05 (H-3', s, 2H), 2.60 – 2.50 (H-2', m, 4H), 2.10 – 1.20 (H-9', H-10', H-11', m, 7H), 0.95 (H-14', s, 3H), 0.90 (H-13', s, 3H), 0.85 (H-12', s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168.0 (C-4'), 166.0 (C-1), 149.5 (C-6), 148.3 (C-7), 142.0 (C-3), 128.5 (C-4), 124.0 (C-9), 118.0 (C-2), 108.5 (C-8), 106.0 (C-5), 101.8 (C-10), 61.8 (C-3'), 58.0 (C-6'), 53.4 (C-2'a), 53.0 (C-2'b), 47.5 (C-7'), 46.0 (C-1'a), 45.5 (C-1'b), 45.0 (C-8'), 38.0 (C-11'), 26.0 (C-10'), 25.0 (C-9'), 20.5 (C-14'), 20.1 (C-13'), 12.5 (C-12').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_4$ 454.2706, encontrado 454.2711.

Síntesis de PIP2-26

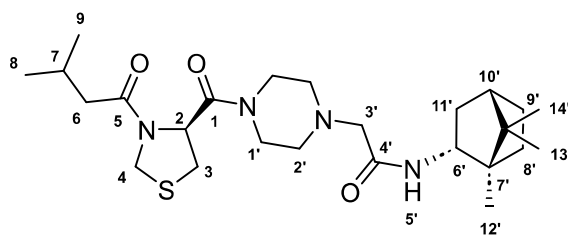


PIP2-26

El compuesto **PIP2-26** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido levulínico y el isonitrilo **IS-44**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 71%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.00 (H-5', d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.90 (H-6', m, 1H), 3.65 – 3.55 (H-1'a, m, 2H), 3.50 – 3.40 (H-1'b, m, 2H), 3.05 (H-3', s, 2H), 2.80 (H-3, t, $J = 6.5$ Hz, 2H),

Síntesis de PIP2-28



PIP2-28

El compuesto **PIP2-28** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir del ácido **AC-8** y el isonitrilo **IS-44**. El producto se aisló como un aceite incoloro. Rendimiento: 69%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.05 (H-5', d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.25 (H-2, t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.92 (H-6', m, 1H), 3.70 – 3.60 (H-1'a, m, 2H), 3.55 – 3.45 (H-1'b, m, 2H), 3.30 – 3.15 (H-4, m, 2H), 3.08 (H-3', s, 2H), 3.00 – 2.90 (H-3, m, 2H), 2.65 – 2.55 (H-2', m, 4H), 2.30 (H-6, d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.15 (H-7, m, 1H), 2.10 – 1.20 (H-9', H-10', H-11', m, 7H), 0.98 (H-8 y H-9, d, $J = 6.5$ Hz, 6H), 0.95 (H-14', s, 3H), 0.90 (H-13', s, 3H), 0.85 (H-12', s, 3H).

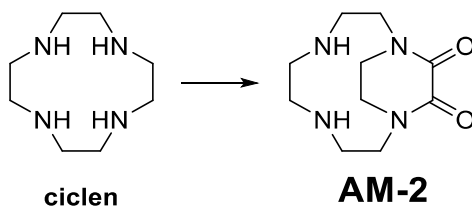
^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.0 (C-5), 171.5 (C-1), 168.2 (C-4'), 65.0 (C-2), 61.9 (C-3'), 58.3 (C-6'), 53.6 (C-2'a), 53.2 (C-2'b), 48.5 (C-4), 47.7 (C-7'), 46.1 (C-1'a), 45.9 (C-1'b), 45.2 (C-8'), 43.5 (C-6), 38.2 (C-11'), 30.5 (C-3), 26.2 (C-10'), 25.5 (C-7), 25.1 (C-9'), 22.5 (C-8 y C-9), 20.6 (C-14'), 20.2 (C-13'), 12.5 (C-12').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ 497.3056, encontrado 497.3051.

Técnicas sintéticas experimentales y caracterización de los compuestos obtenidos en el Capítulo 5

Metodología para la síntesis de los bloques AM

Síntesis de AM-2



Se secó ciclen (2 mmol) mediante destilación azeotrópica en 50 mL de tolueno. Después de eliminar el solvente a presión reducida, el residuo se disolvió en etanol seco (10 mL) y

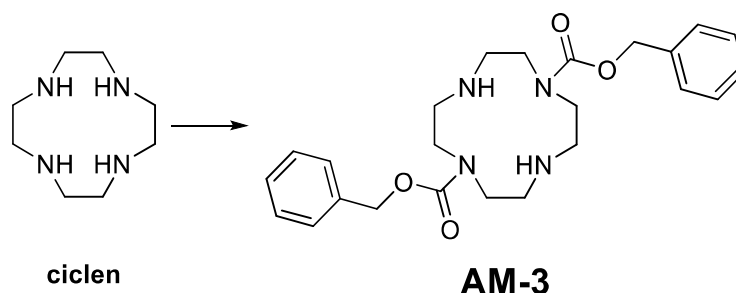
se añadió oxalato de dietilo (1,1 eq). La solución se agitó durante 48 h. a temperatura ambiente. La mezcla se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando CHCl_3 -TEA (5:1) como eluyente. Se obtuvo el producto **AM-2** como un sólido blanco. Rendimiento: 96%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.47 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.68 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 3.59 – 3.47 (m, 4H), 3.02 – 2.87 (m, 4H), 2.70 – 2.63 (m, 4H), 2.55 (m, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 160.2, 47.6, 44.9, 47.7, 42.9.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.⁴⁰

Síntesis de AM-3



Se acidificó una solución de ciclen (2 mmol) en una mezcla de agua (4 mL) y THF (6 mL) hasta pH 3 con HCl_{cc} . Se añadió gota a gota una solución de cloroformiato de bencilo (3 eq) en THF (10 mL) con agitación vigorosa y el pH se mantuvo en 3 mediante la adición continua de NaHCO_3 durante 2 h. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Después de la conversión completa del sustrato (controlada por CCD, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 6:3:1), la mezcla se extrajo con éter de petróleo, luego la capa acuosa se basificó con Na_2CO_3 y se extrajo con CH_2Cl_2 . El solvente se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y Na_2CO_3 , se filtró y evaporó a presión reducida. Se obtuvo el producto **AM-3** como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 93%.

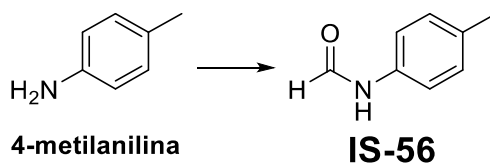
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.35 (m, 10H), 5.15 (s, 4H), 3.42 (sa, 8H), 2.85 (m, 8H).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 156.6, 136.6, 128.3, 127.8, 127.7, 66.9, 50., 50.6, 50.5, 50.1, 49.4, 48.9, 48.3, 48.0.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura⁴¹.

Metodología para la síntesis de los bloques IS

Síntesis de IS-57

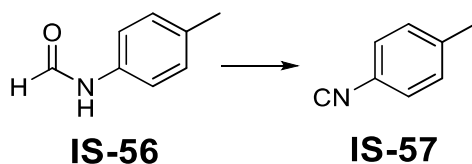


El compuesto **IS-56** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de formamidas a partir de 4-metilanilina. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 84%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): rotámero mayoritario: 8.62 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.14 (dd, $J = 13.9, 8.1$ Hz, 2H), 2.33 (s, 3H); rotámero minoritario: 8.33 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.14 (dd, $J = 13.9, 8.1$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.31 (s, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): rotámero mayoritario: 163.0, 135.3, 134.2, 130.3, 119.3, 20.9; rotámero minoritario: 159.2, 134.6, 134.5, 129.7, 120.2, 21.0.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.⁴²

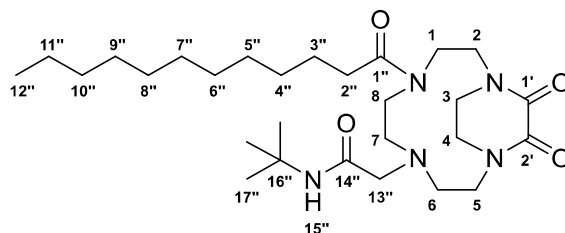


El compuesto **IS-57** se obtuvo siguiendo la metodología general para la síntesis de isonitrilos a partir de la formamida **IS-56**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo. Rendimiento: 73%.

Los datos espectroscópicos coincidieron con los informados en literatura.

Metodología para la síntesis de los bloques CIC1

Síntesis de CIC1-1 y CIC1-7



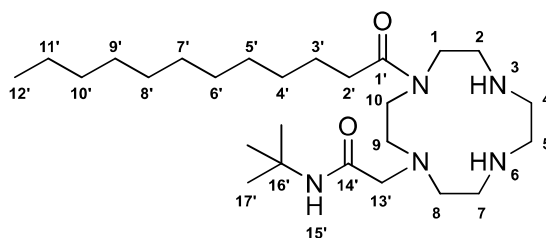
CIC1-1

El compuesto **CIC1-1** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido láurico, la amina **AM-2** y *t*-butilisociano. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 59%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.84 (H-15'', s, 1H), 3.38 (H-13'', s, 2H), 3.54 – 2.73 (H-1 a H-8, m, 16H), 2.29 (H-2'', t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.60 (H-3'', dq, $J = 12.1, 6.0$ Hz, 2H), 1.39 (H-17'', s, 9H), 1.32 – 1.17 (H-4'' a H-11'', m, 16H), 0.87 (H-12'', t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.7 (C-1''), 170.0 (C-14''), 160.2 (C-2'), 160.0 (C-1'), 58.2 (C-13''), 55.1 – 43.4 (C-1 a C-8 y C-16''), 34.5 (C-2''), 32.4 – 21.9 (C-3'' a C-11'' y C-17''), 14.1 (C-12'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{N}_5\text{O}_4$ 522.4014, encontrado 522.4045.



CIC1-7

Metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,4-diprottegidos⁴⁰: Se disolvió el aducto Ugi Split (50 mg) en agua (5 mL) y se añadió NaOH (10 M; 5 mL). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante la noche. El producto se extrajo con CH_2Cl_2 . El solvente se evaporó a presión reducida.

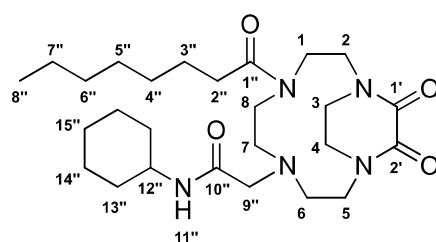
El compuesto **CIC1-7** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,4-diprottegidos a partir de **CIC1-1**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 89%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.80 (H-15', s, 1H), 3.31 (H-13', s, 2H), 3.45 – 2.70 (H-1 a H-10, m, 18H), 2.42 (H-2', t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.64 (H-3', p, $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.36 (H-17', s, 9H), 1.31 – 1.23 (H-4' a H-11', m, 16H), 0.89 (H-12', t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.7 (C-1'), 171.0 (C-14'), 58.1 (C-13'), 54.1 – 43.5 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-7 a C-10 y C-16'), 35.6 – 21.9 (C-2' a C-11'), 14.1 (C-12').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_2$ 468.4272, encontrado 468.4345.

Síntesis de **CIC1-2** y **CIC1-8**



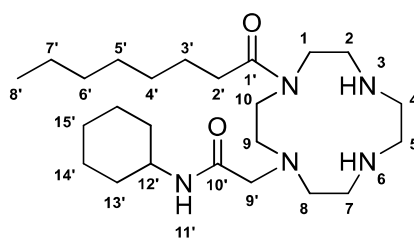
CIC1-2

El compuesto **CIC1-2** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido caprílico, la amina **AM-2** y ciclohexilisociano. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 45%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.41 (H-11'', sa, 1H), 4.29 – 4.17 (H-12'', m, 1H), 3.45 – 2.58 (H-1 a H-8, m, 16H), 3.60 (H-9'', s, 2H), 2.19 (H-2'', t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.63 – 1.16 (H-3'' a H-7'' y H-13'' a H-15'', m, 20H), 0.89 (H-8'', t, $J = 6.90$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.0 (C-1''), 170.5 (C-10''), 160.3 (C-2'), 159.9 (C-1'), 58.3 (C-9''), 52.0 – 44.3 (C-1 a C-8 y C-13''), 35.8 – 21.5 (C-3'' a C-7'' y C-13'' a C-15''), 14.1 (C-8'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_4$ 492.3544, encontrado 492.3535.



CIC1-8

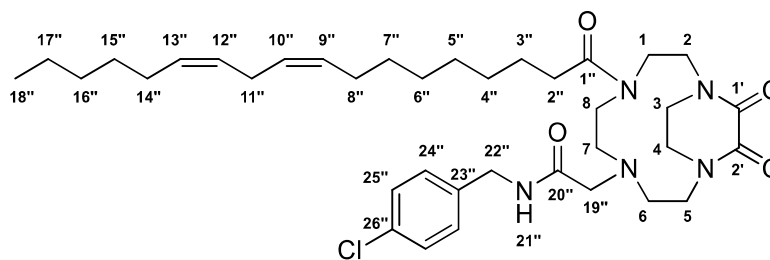
El compuesto **CIC1-8** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,4-diprottegidos a partir de **CIC1-2**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 81%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.60 (H-11', sa, 1H), 4.01 – 3.90 (H-12', m, 1H), 3.55 (H-9', s, 2H), 3.43 – 2.71 (H-1 a H-10, m, 20H), 2.41 (H-2', t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.76 – 1.21 (H-3' a H-7' y H-13' a H-15', m, 20H), 0.89 (H-8', t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.5 (C-1'), 170.7 (C-10'), 58.2 (C-9'), 53.9 – 43.9 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-7 a C-10 y C-12'), 35.9 – 21.5 (C-3' a C-7' y C-13' a C-15'), 14.1 (C-8').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_2$ 438.3803, encontrado 438.3746.

Síntesis de **CIC1-3** y **CIC1-9**



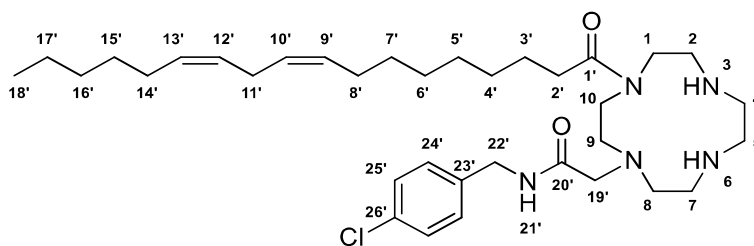
CIC1-3

El compuesto **CIC1-3** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido linoleico, la amina **AM-2** y el isonitrilo **IS-31**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 61%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.50 (H-21'', a, 1H), 7.77 – 6.92 (H-24'' y H-25'', m, 4H), 5.43 – 5.28 (H-9'', H-10'', H-12'' y H-13'', m, 4H), 4.40 (H-22'', d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.19 (H-19'', s, 2H), 3.61 – 2.92 (H-1 a H-8, m, 16H), 2.77 (H-11'', t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.34 (H-2'', t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.05 (H-8'' y H-14'', q, $J = 6.7$ Hz, 4H), 1.69 – 1.58 (H-3'', m, 2H), 1.40 – 1.22 (H-4'' a H-7'' y H-15'' a H-17'', m, 14H), 0.89 (H-18'', t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 178.5 (C-1''), 173.2 (C-20''), 164.6 (C-2'), 163.4 (C-1'), 137.6 – 127.6 (C-9'', C-10'', C-12'', C-13'' y C-23'' a C-26''), 55.3 (C-19''), 52.3 – 42.9 (C-1 a C-8 y C-22''), 37.7 – 21.7 (C-2'' a C-8'', C-11'' y C-14'' a C-17''), 14.2 (C-18'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{ClN}_5\text{O}_4$ 670.4094, encontrado 670.4093.



CIC1-9

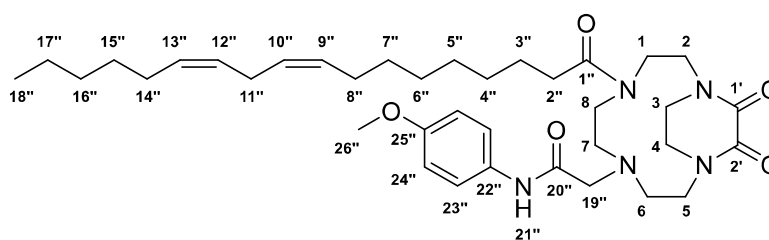
El compuesto **CIC1-9** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,4-diprottegidos a partir de **CIC1-3**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 97%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.36 – 7.15 (H-21', H-24' y H-25', m, 5H), 5.43 – 5.28 (H-9', H-10', H-12' y H-13', m, 4H), 4.41 (H-22', d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.33 (H-19', s, 2H), 3.43 – 2.62 (H-1 a H-10 y H-11'', m, 20H), 2.42 (H-2', t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 2.09 – 1.99 (H-8' y H-14', m, 4H), 1.71 – 1.19 (H-3' a H-7' y H-15' a H-17', m, 16H), 0.89 (H-18', t, $J = 6.5$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 178.7 (C-1'), 172.6 (C-20'), 138.1 – 127.0 (C-9', C-10', C-11', C-12' y C-23' a C-26'), 56.6 (C-19'), 54.1 – 42.9 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-7 a C-10 y C-22'), 35.4 – 22.2 (C-3' a C-7' y C-15' a C-17'), 14.0 (C-18').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{35}\text{H}_{59}\text{ClN}_5\text{O}_2$ 616.4352, encontrado 616.4423.

Síntesis de CIC1-4 y CIC1-10



CIC1-4

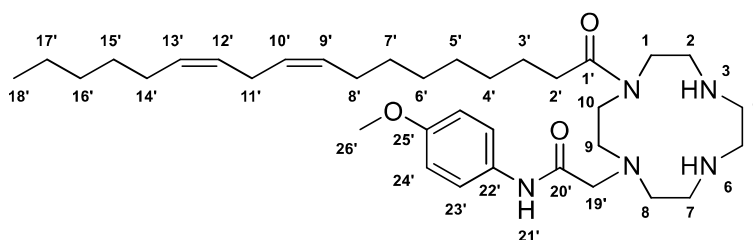
El compuesto **CIC1-4** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido linoleico, la amina **AM-2** y el isonitrilo **IS-32**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 53%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.43 (H-23'', d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.14 (H-21'', sa, 1H), 6.87 (H-24'', d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 5.44 – 5.31 (H-9'', H-10'', H-12'' y H-13'', m, 4H), 3.81 (H-26'', s, 3H), 3.51 (H-19'', s, 2H), 3.61 – 2.94 (H-1 a H-8, m, 16H), 2.83 – 2.75 (H-11'', m, 2H), 2.36

(H-2'', t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.07 (H-8'' y H-14'', q, J = 6.7 Hz, 4H), 1.74 (H-3'', p, J = 7.7 Hz, 2H), 1.65 (H-15'', p, J = 7.5 Hz, 2H), 1.43 – 1.26 (H-4'' a H-7'', H-16'' y H-17'', m, 12H), 0.91 (H-18'', t, J = 6.1 Hz, 2H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.2 (C-1''), 171.4 (C-20''), 159.4 (C-2'), 158.7 (C-1'), 156.5 (C-25''), 131.2 (C-22''), 130.5 – 127.8 (C-9'', C-10'', C-12'' y C-13''), 121.9 (C-23''), 114.3 (C-24''), 58.0 (C-19''), 55.6 (C-26''), 51.7 – 43.5 (C-1 a C-8), 38.4 – 21.7 (C-2'' a C-8'' y C-14'' a C-17''), 14.2 (C-18'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₇H₅₈N₅O₅ 652.4432, encontrado 652.4464.



CIC1-10

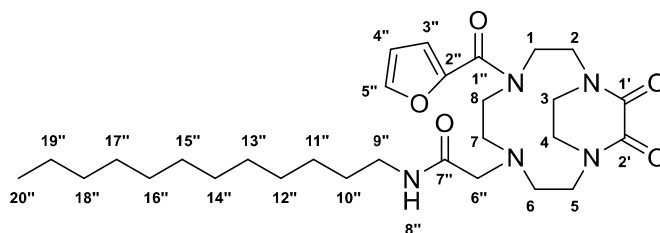
El compuesto **CIC1-10** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,4-diprottegidos a partir de **CIC1-4**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 82%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.88 (H-23', d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.20 (H-21', sa, 1H), 6.97 (H-24', d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.45 – 5.29 (H-9', H-10', H-12' y H-13', m, 4H), 3.80 (H-26', s, 3H), 3.44 (H-19', s, 2H), 3.43 – 2.62 (H-1 a H-10 y H-11', m, 20H), 2.40 (H-2', t, J = 7.9 Hz, 2H), 2.08 – 2.00 (H-8' y H-14', m, 4H), 1.69 – 1.20 (H-3' a H-7' y H-15' a H-17', m, 16H), 0.90 (H-18', t, J = 6.45 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.7 (C-1'), 170.6 (C-20'), 156.3 (C-25'), 132.2 (C-22'), 131.0 – 127.9 (C-9', C-10', C-12 y C-13'), 122.1 (C-23'), 114.2 (C-24'), 58.0 (C-19'), 55.4 (C-26'), 54.1 – 47.8 (C-1, C-2, C-4, C-5 y C-7 a C-10), 35.8 – 21.2 (C-2' a C-8' y C-14' a C-17'), 14.4 (C-18').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₅H₆₀N₅O₃ 598.4691, encontrado 598.4666.

Síntesis de CIC1-5 y CIC1-11



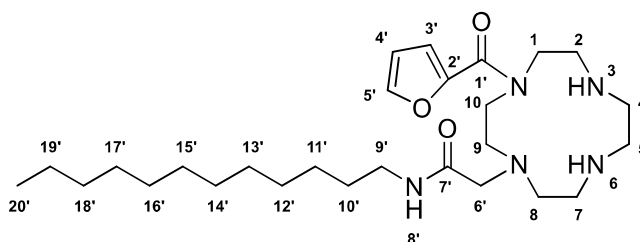
CIC1-5

El compuesto **CIC1-5** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido furoico, la amina **AM-2** y el isonitrilo **IS-36**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 57%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.71 (H-5'', dd, $J = 1.8, 0.8$ Hz, 1H), 7.68 (H-8'', sa, 1H), 7.04 (H-3'', dd, $J = 3.5, 0.8$ Hz, 1H), 6.58 (H-4'', dd, $J = 3.5, 1.8$ Hz, 1H), 3.29 (H-6'', s, 2H), 3.62 – 2.93 (H-1 a H-8 y H-9'', m, 18H), 1.53 – 1.21 (H-10'' a H-19'', m, 20H), 0.89 (H-20'', t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.1 (C-7''), 163.0 (C-1''), 159.4 (C-2'), 158.8 (C-1'), 147.9 (C-2''), 144.6 (C-5''), 116.7 (C-3''), 111.8 (C-4''), 57.8 (C-6''), 52.3 – 42.5 (C-1 a C-8 y C-9''), 33.6 – 21.2 (C-10'' a C-19''), 14.1 (C-20'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_5$ 546.3650, encontrado 546.3671.



CIC1-11

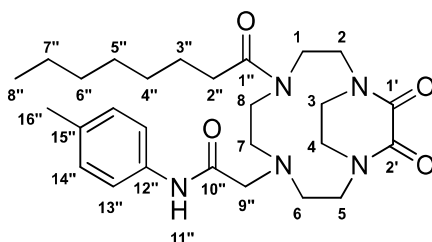
El compuesto **CIC1-11** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,4-diprottegidos a partir de **CIC1-5**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 79%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.72 (H-5', t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.08 (H-3', dd, $J = 5.3, 1.7$ Hz, 1H), 6.90 (H-8', sa, 1H), 6.56 (H-4', dd, $J = 5.3, 1.6$ Hz, 1H), 3.30 (H-6', s, 2H), 3.47 – 2.54 (H-1 a H-10 y H-9', m, 20H), 1.53 – 1.46 (H-10', m, 2H), 1.33 – 1.23 (H-11' a H-19', m, 18H), 0.88 (H-20', t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.0 (C-7'), 162.9 (C-1'), 148.0 (C-2'), 144.2 (C-5'), 117.0 (C-3'), 111.5 (C-4'), 58.1 (C-6'), 55.2 – 42.9 (C-1, C-2, C-4, C-5, C-7 a C-10 y C-9'), 33.0 – 21.5 (C-10' a C-19'), 14.0 (C-20').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_3$ 492.3908, encontrado 492.3972.

Síntesis de CIC1-6 y CIC1-12



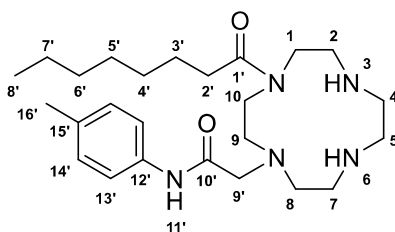
CIC1-6

El compuesto **CIC1-6** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido caprílico, la amina **AM-2** y el isonitrilo **IS-57**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 63%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.02 (H-11'', sa, 1H), 7.40 (H-13'', d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.11 (H-14'', d, J = 7.9 Hz, 2H), 3.62 – 2.97 (H-1 a H-8 y H-9'', m, 18H), 2.40 (H-2'', t, J = 7.9 Hz, 2H), 2.36 (H-16'', s, 3H), 1.64 (H-3'', p, J = 7.7 Hz, 2H), 1.37 – 1.23 (H-4'' a H-7'', m, 7H), 0.88 (H-8'', t, J = 6.8 Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.7 (C-1''), 169.8 (C-10''), 159.3 (C-2'), 158.7 (C-1'), 135.2 (C-12''), 132.3 (C-15''), 128.8 (C-14''), 120.8 (C-13''), 57.7 (C-9''), 51.9 – 42.3 (C-1 a C-8), 36.5 – 22.0 (C-2'' a C-7''), 20.8 (C-16''), 14.1 (C-8'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_4$ 500.3231, encontrado 500.3182.



CIC1-12

El compuesto **CIC1-12** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,4-diprottegidos a partir de **CIC1-6**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 87%.

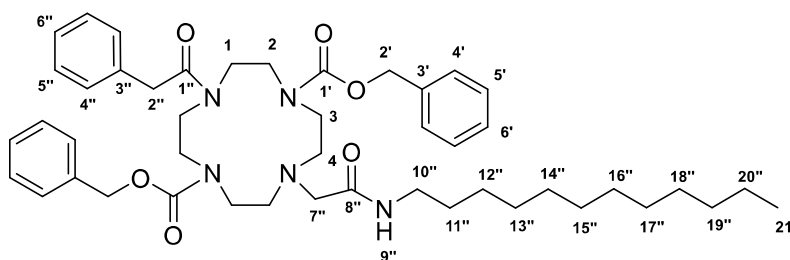
^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.10 (H-11', s, 1H), 7.42 (H-13', d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.15 (H-14', d, J = 7.9 Hz, 2H), 3.43 – 2.71 (H-1 a H-10 y H-9', m, 20H), 2.43 (H-2', t, J = 7.9 Hz, 2H), 2.34 (H-16', t, J = 0.7 Hz, 3H), 1.66 (H-3', p, J = 7.7 Hz, 2H), 1.39 – 1.20 (H-4' a H-7', m, 8H), 0.87 (H-8', t, J = 6.9 Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.1 (C-1'), 168.9 (C-10'), 136.6 (C-12'), 132.4 (C-15'), 129.1 (C-14'), 120.1 (C-13'), 55.9 (C-9'), 53.73–43.79 (C-1, C-2, C-4, C-5 y C-7 a C-10), 37.7 – 21.8 (C-2' a C-7'), 20.4 (C-16'), 14.2 (C-8').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_2$ 446.3490, encontrado 446.3445.

Metodología para la síntesis de los bloques **CIC2**

Síntesis de **CIC2-1 y **CIC2-7****



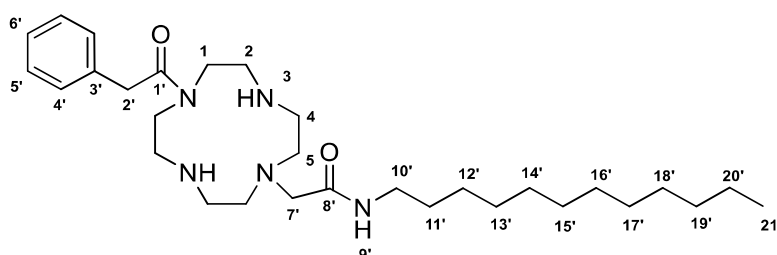
CIC2-1

El compuesto **CIC2-1** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido fenilacético, la amina **AM-3** y el isonitrilo **IS-36**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 59%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.71 (H-9'', sa, 1H), 7.38 – 7.21 (H-4' a H-6' y H-4'' a H-6'', m, 15H), 5.16 (H-2', m, 4H), 3.82 (H-2'', s, 2H), 3.46 (H-7'', s, 2H), 3.25 – 2.51 (H-1 a H-4 y H-10'', m, 18H), 1.54 – 1.45 (H-11'', m, 2H), 1.33 – 1.25 (H-12'' a H-20'', m, 18H), 0.89 (H-21'', t, J = 6.92 Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.2 (C-8''), 170.6 (C-1''), 156.5 (C-1'), 136.6 (C-3'), 135.1 (C-3''), 128.7 – 127.0 (C-4' a C-6' y C-4'' a C-6''), 67.0 (C-2'), 57.8 (C-7''), 51.0 – 43.8 (C-1 a C-4 y C-10''), 40.8 (C-2''), 31.8 – 22.7 (C-11'' a C-20''), 14.1 (C-21'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₄₆H₆₆N₅O₆ 784.5008, encontrado 784.5013.



CIC2-7

Metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,7-diprottegidos⁴¹: Se disolvió el compuesto de partida (0,5 mmol) en EtOH absoluto (5 mL) y se añadió Pd/C (contenido de Pd 10%, 0,01 g). La mezcla se hidrogenó en un aparato de hidrogenación Parr (20-25 psi) durante 48 h. El catalizador se separó por filtración y el EtOH se eliminó por evaporación a presión reducida. El aceite resultante se disolvió en Et₂O y la solución se extrajo con una solución acuosa fría de NaOH 20%. Se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el solvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida.

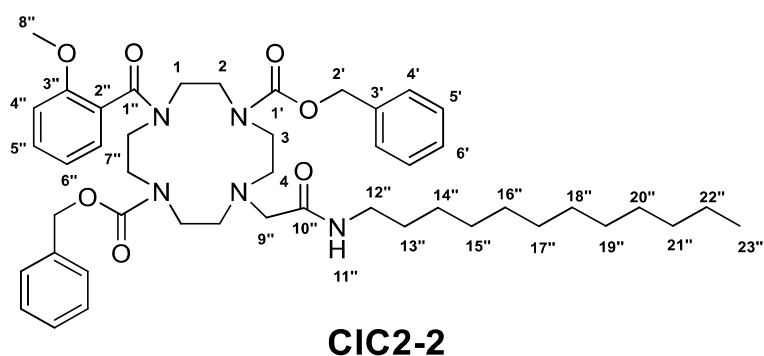
El compuesto **CIC2-7** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,7-diprottegidos a partir de **CIC2-1**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 90%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.33 – 7.22 (H-4' a H-6', m, 5H), 6.95 (H-9', t, J = 4.9 Hz, 1H), 3.53 (H-2', s, 2H), 3.43 – 3.38 (H-1, m, 4H), 3.26 (H-7', s, 2H), 3.19 – 3.14 (H-10', m, 2H), 2.90 – 2.78 (H-2, H-4 y H-5, m, 12H), 1.54 – 1.45 (H-11', m, 2H), 1.32 – 1.24 (H-12' a H-20', m, 18H), 0.89 (H-21', t, J = 7.2 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.8 (C-8'), 171.0 (C-1'), 134.9 (C-3'), 128.9 – 128.7 (C-4' y C-5'), 127.1 (C-6'), 58.0 (C-7'), 53.9 – 46.1 (C-1 a C-4), 46.0 (C-10'), 41.5 (C-2'), 32.0 – 27.2 (C-11' a C-19'), 22.8 (C-20'), 14.2 (C-21').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₀H₅₄N₅O₂ 516.4272, encontrado 516.4349.

Síntesis de CIC2-2 y CIC2-8

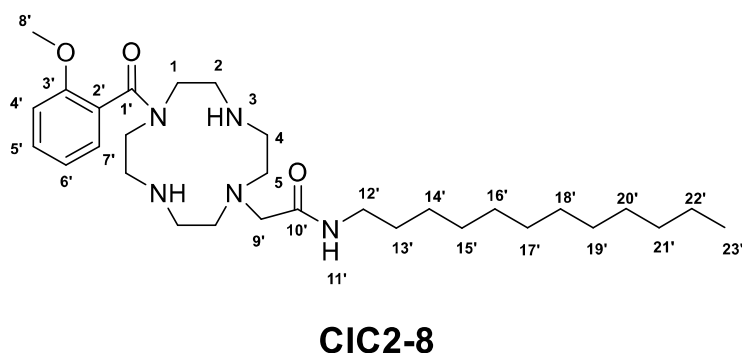


El compuesto **CIC2-2** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido 2-metoxibenzoico, la amina **AM-3** y el isonitrilo **IS-36**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 56%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.50 – 6.76 (H-4' a H-6', H-4'' a H-7'' y H-11'', m, 15H), 5.15 (H-2', s, 4H), 3.95 – 2.51 (H-1 a H-4 y H-12'', m, 18H), 3.70 (H-8'', s, 3H), 3.48 (H-9'', s, 2H), 1.50 – 1.36 (H-13'', m, 2H), 1.37 – 1.13 (H-14'' a H-22'', m, 18H), 0.87 (H-23'', t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.2 (C-10''), 169.7 (C-1''), 156.1 (C-3''), 155.1 (C-1'), 139.3 – 108.3 (C-3' a C-6', C-2'', C-4' a C-7''), 67.0 (C-2'), 58.0 (C-9''), 55.7 (C-8''), 52.7 – 43.3 (C-1 a C-4), 35.0 – 21.6 (C-14'' a C-22''), 14.1 (C-23'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{46}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_7$ 800.4957, encontrado 800.4951.



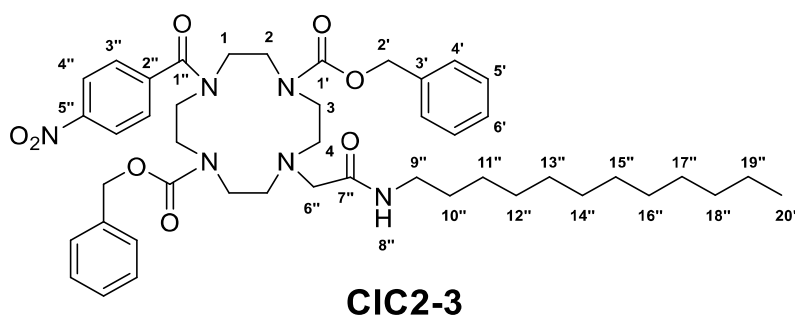
El compuesto **CIC2-8** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,7-diprotégidos a partir de **CIC2-2**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 91%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.52 – 6.92 (H-4' a H-7' y H-11', m, 5H), 3.83 (H-8', s, 3H), 3.57 – 2.77 (H-1 a H-5 y H-12', m, 20H), 3.26 (H-9', s, 2H), 1.54 – 1.46 (H-13', m, 2H), 1.33 – 1.23 (H-14' a H-22', m, 18H), 0.89 (H-23', t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.2 (C-10'), 168.9 (C-1'), 159.5 – 110.0 (C-2' a C-7'), 58.2 (C-9'), 55.8 (C-8'), 53.8 – 42.9 (C-1, C-2, C-4 y C-5), 32.8 – 21.9 (C-12' a C-22'), 14.1 (C-23').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_3$ 532.4221, encontrado 532.4138.

Síntesis de **CIC2-3** y **CIC2-9**

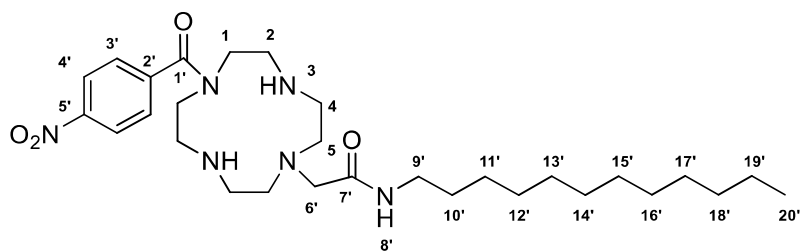


El compuesto **CIC2-3** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido *p*-nitrobenzoico, la amina **AM-3** y el isonitrilo **IS-36**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 61%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.34 – 7.95 (H-3'' y H-4'', m, 4H), 7.42 – 7.16 (H-4' a H-6', m, 10H), 7.11 – 7.04 (H-8'', m, 1H), 5.15 (H-2', s, 4H), 3.87 – 2.69 (H-1 a H-4 y H-9'', m, 18H), 3.33 (H-6'', s, 2H), 1.52 – 1.37 (H-10'', m, 2H), 1.30 – 1.17 (H-11'' a H-19'', m, 18H), 0.87 (H-20'', t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.2 (C-7''), 169.9 (C-1''), 155.9 (C-1'), 149.8 – 121.6 (C-3' a C-6' y C-2'' a C-5''), 67.4 (C-2'), 58.7 (C-6''), 53.3 – 42.4 (C-1 a C-4 y C-9''), 33.9 – 20.2 (C-10'' a C-19''), 14.1 (C-20'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{45}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_8$ 815.4702, encontrado 815.4714.



CIC2-9

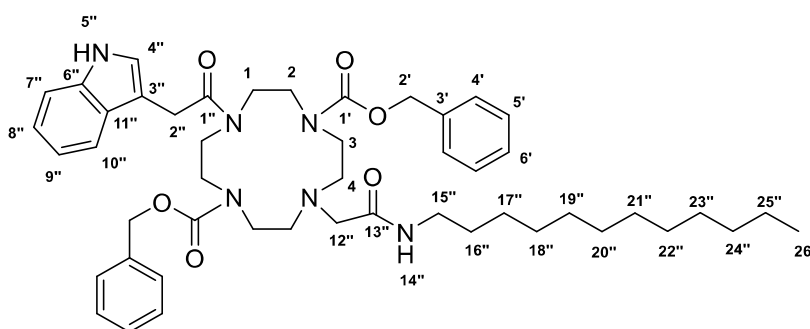
El compuesto **CIC2-9** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,7-diprottegidos a partir de **CIC2-3**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 87%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.22 (H-3', d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.09 (H-4', d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.11 – 7.04 (H-8', m, 1H), 3.54 – 2.78 (H-1 a H-5 y H-9', m, 18H), 3.26 (H-6', s, 2H), 1.52 – 1.46 (H-10', m, 2H), 1.33 – 1.24 (H-11' a H-19', m, 18H), 0.89 (H-20', t, J = 6.9 Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.2 (C-7'), 170.1 (C-1'), 148.5 (C-5'), 142.1 (C-2'), 127.9 (C-3'), 123.2 (C-4'), 58.2 (C-6'), 54.0 – 42.3 (C-1, C-2, C-4, C-5 y C-9'), 34.0 – 20.3 (C-10' a C-19'), 14.1 (C-20').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{N}_6\text{O}_4$ 547.3966, encontrado 547.4054.

Síntesis de CIC2-4 y CIC2-10



CIC2-4

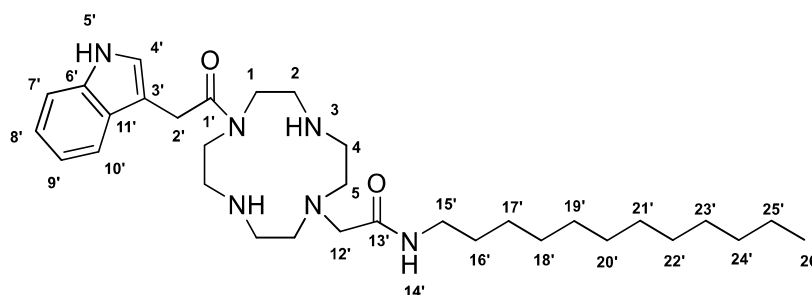
El compuesto **CIC2-4** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido 3-indolacético, la amina **AM-3** y el isonitrilo **IS-36**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 52%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.99 (H-5'', s, 1H), 7.76 – 6.41 (H-4' a H-6', H-4'', H-7'' a H-10'' y H-14'', m, 16H), 5.09 (H-2', s, 4H), 3.77 (H-2'', s, 2H), 3.93 – 2.43 (H-1 a H-4 y H-

15'', m, 18H), 3.04 (H-12'', s, 2H), 1.50 – 1.35 (H-16'', m, 2H), 1.36 – 1.13 (H-17'' a H-25'', m, 18H), 0.86 (H-26'', t, J = 6.9 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.2 (C-13''), 170.4 (C-1''), 156.5 (C-1'), 139.3 – 107.1 (C-3' a C-6', C-3'', C-4'' y C-6'' a C-11''), 67.0 (C-2'), 57.8 (C-12''), 52.2 – 43.0 (C-1 a C-4 y C-15''), 34.8 (C-2''), 33.2 – 21.9 (C-16'' a C-15''), 14.1 (C-26'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₄₈H₆₇N₆O₆ 823.5117, encontrado 823.5136.



CIC2-10

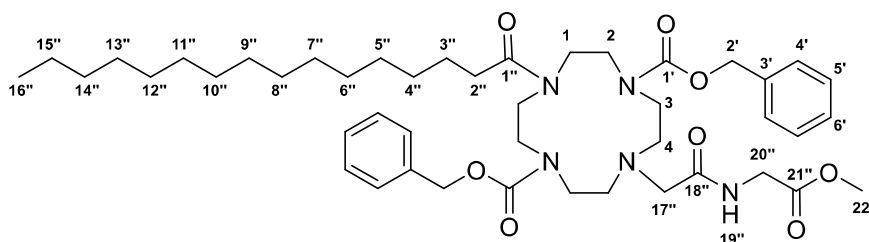
El compuesto **CIC2-10** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,7-diprottegidos a partir de **CIC2-4**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 89%.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.98 (H-5', sa, 1H), 7.63 – 6.89 (H-4', H-7' a H-10' y H-14', m, 6H), 3.80 (H-2', s, 2H), 3.43 – 2.77 (H-1 a H-5 y H-15', m, 16H), 3.06 (H-12', s, 2H), 1.53 – 1.44 (H-16', m, 2H), 1.33 – 1.23 (H-17' a H-25', m, 18H), 0.89 (H-26', t, J = 6.9 Hz, 3H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.2 (C-13'), 170.5 (C-1'), 138.5 – 108.2 (C-3', C-4' y C-6' a C-11'), 58.2 (C-12'), 54.0 – 41.7 (C-1, C-2, C-4, C-5 y C-15'), 34.8 (C-2'), 33.0 – 21.7 (C-16' a C-25'), 14.1 (C-26').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para [M+H⁺] C₃₂H₅₅N₆O₂ 555.4381, encontrado 555.4320.

Síntesis de CIC2-5 y CIC2-11



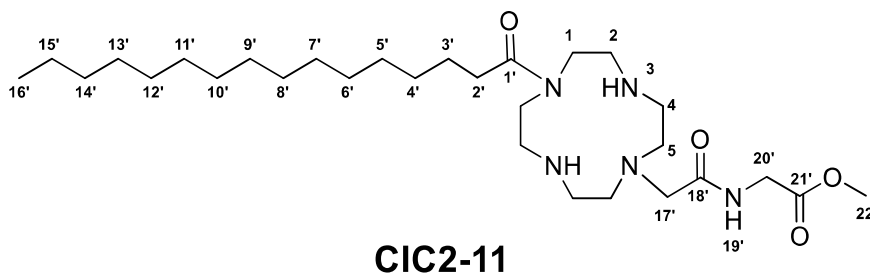
CIC2-5

El compuesto **CIC2-5** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido palmítico, la amina **AM-3** e isocianoacetato de metilo. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 66%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.38 – 7.26 (H-4' a H-6' y H-19'', m, 11H), 5.16 (H-2', s, 4H), 3.98 (H-20'', d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.71 (H-22'', s, 3H), 3.45 – 2.90 (H-1 a H-4 y H-17'', m, 18H), 2.42 (H-2'', t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.64 (H-3'', m, 2H), 1.33 – 1.22 (H4'' a H-15'', m, 24H), 0.89 (H-16'', t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.3 (C-21''), 172.8 (C-1''), 170.8 (C-18''), 156.5 (C-1'), 136.6 (C-3'), 129.3 – 127.2 (C-4' a C-6'), 67.0 (C-2'), 57.1 (C-17''), 52.3 (C-22''), 51.4 – 45.4 (C-1 a C-4), 40.9 (C-20''), 34.9 (C-2''), 31.8 (C-14''), 30.4 – 28.6 (C-4'' a C-13''), 25.5 (C-3''), 22.7 (C-15''), 14.1 (C-16'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{N}_5\text{O}_8$ 808.5219, encontrado 808.5196.



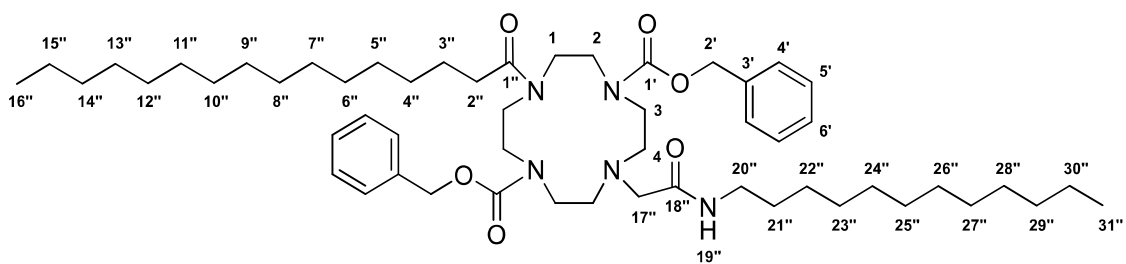
El compuesto **CIC2-11** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,7-diprottegidos a partir de **CIC2-5**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 96%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.70 (H-19', t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 3.81 (H-20', d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.62 (H-22', s, 3H), 3.28 (H-17', s, 3H), 3.19 – 2.68 (H-1, H-2, H-4 y H-5, m, 16H), 2.27 (H-2', t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.59 (H-3', p, $J = 7.7$ Hz, 2H), 1.33 – 1.18 (H-4' a H-15', m, 24H), 0.86 (H-16', t, $J = 7.0$ Hz, 6H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 176.1 (C-21'), 174.8 (C-1'), 170.8 (C-18'), 60.5 (C-17'), 52.7 – 46.3 (C-1, C-2, C-4, C-5 y C-22'), 43.4 (C-20'), 33.6 (C-2'), 32.0 (C-14'), 30.6 – 28.9 (C-4' a C-13'), 25.4 (C-3'), 22.8 (C-15'), 14.2 (C-16').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{29}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_4$ 540.4483, encontrado 540.4577.

Síntesis de CIC2-6 y CIC2-12



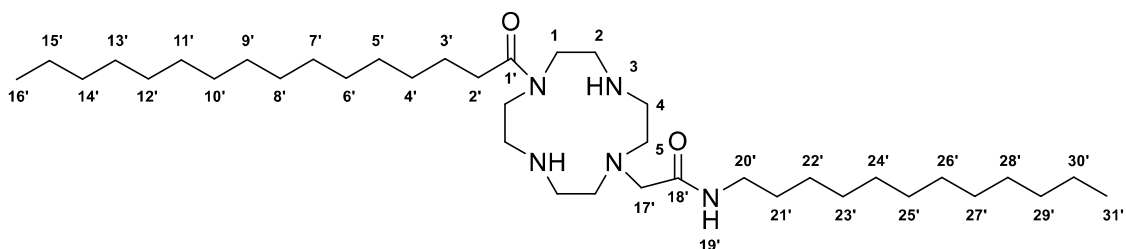
CIC2-6

El compuesto **CIC2-6** se obtuvo siguiendo la metodología general para reacciones de Ugi Split a partir de ácido palmítico, la amina **AM-3** y el isonitrilo **IS-36**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 47%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.44 – 7.28 (H-4' a H-6', m, 10H), 7.11 (H-19'', sa, 1H), 5.11 (H-2', s, 4H), 3.23 – 3.14 (H-20'', m, 2H), 3.10 (H-17'', s, 2H), 3.82 – 2.67 (H-1 a H-4, m, 16H), 2.51 (H-2'', t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.64 – 1.38 (H-3'' y H-21'', m, 4H), 1.36 – 1.07 (H-4'' a H-15'' y H-22'' a H-30'', m, 42H), 0.87 (H-16'' y H-31'', t, $J = 6.9$ Hz, 6H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.5 (C-1''), 170.8 (C-18''), 156.2 (C-1'), 136.4 (C-3'), 130.3 – 126.2 (C-4' a C-6'), 67.0 (C-2'), 58.5 (C-17''), 52.1 – 42.5 (C-1 a C-4 y C-20''), 34.9 (C-2''), 32.4 – 22.1 (C-3'' a C-15'' y C-21'' a C-30''), 14.1 (C-16'' y C-31'').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_5\text{O}_6$ 904.6886, encontrado 904.6869.



CIC2-12

El compuesto **CIC2-12** se obtuvo siguiendo la metodología general para la hidrólisis del grupo protector de los aductos Ugi Split 1,7-diprottegidos a partir de **CIC2-6**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: 93%.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.11 (H-19', t, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.26 (H-17', s, 2H), 3.50 – 2.70 (H-1 a H-5 y H-20', m, 20H), 2.42 (H-2', t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.79 – 1.43 (H-3' y H-21', m, 4H), 1.34 – 1.20 (H-4' a H-15' y H-22' a H-30', m, 42H), 0.97 – 0.84 (H-16' y H-31', m, 6H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.6 (C-1'), 170.9 (C-18'), 58.2 (C-17'), 53.9 – 42.3 (C-1, C-2, C-4, C-5 y C-20'), 36.8 – 20.6 (C-2' a C-15' y C-21' a C-30'), 14.1 (C-16'), 14.1 (C-31').

HRMS (ESI⁺): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}^+]$ $\text{C}_{38}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_2$ 636.6150, encontrado 636.6097.

Análisis quimioinformático

Preparación de las bases de datos

Todas las bases de datos compiladas en esta Tesis consisten en archivos de texto donde las estructuras de los compuestos se codificaron en formato SMILES. Las moléculas sintéticas presentadas en esta Tesis se dibujaron en ChemDraw (versión 22.0.0.22) y se convirtieron con ese mismo programa en los correspondientes códigos SMILES.

La colección de productos naturales se tomó de la COCONUT (COLlection of Open Natural ProdUcTs) y se depuró reteniendo únicamente aquellas entradas con organismo de origen reportado. El conjunto final, denominado PN-T, incluyó 180.399 compuestos, utilizados como referencia para el espacio químico natural.

Como contraparte sintética se empleó la Enamine Hit Locator Library-200, una biblioteca comercial de 200.000 compuestos orientada a *high-throughput screening*, utilizada como referencia del espacio químico sintético convencional.

Los conjuntos de moléculas fueron preparados en formato SMILES, eliminando duplicados y sales. El procesamiento se realizó en Python, empleando *pandas* y *numpy* para manipulación de tablas y RDKit para la estandarización de estructuras.

Cálculo de los descriptores moleculares

Se calcularon 22 descriptores fisicoquímicos y topológicos. Para ello se usaron las funciones *Chem.Descriptors* y *rdMolDescriptors* de RDKit (versión 2023.09) y el software DataWarrior (v06.05.02), complementando propiedades básicas con medidas de complejidad molecular y fragmentos funcionales.

Los descriptores calculados fueron:

- *Molweight*: peso molecular, suma de las masas atómicas.
- *cLogS*: solubilidad acuosa calculada en escala logarítmica.

- *cLogP*: logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua.
- *Relative PSA*: superficie polar relativa.
- *Non-H Atoms*: número total de átomos pesados, excluyendo hidrógenos.
- *sp³-Carbon Fraction*: fracción de carbonos en hibridación sp³ respecto al total de carbonos.
- *Rings Closures*: número de cierres de anillo presentes en la estructura.
- *Largest Ring Size*: tamaño del anillo más grande de la molécula, expresado en número de átomos.
- *NumO_norm*: número de átomos de oxígeno normalizado por átomos pesados.
- *NumN_norm*: número de átomos de nitrógeno normalizado por átomos pesados.
- *NumS_norm*: número de átomos de azufre normalizado por átomos pesados.
- *NumX_norm*: número de átomos halogenados (F, Cl, Br, I) normalizado por átomos pesados.
- *Bridgeheads_norm*: número de carbonos en posiciones de puente en sistemas policíclicos, normalizado por átomos pesados.
- *Spiro_norm*: número de átomos espiro compartidos por dos ciclos, normalizado por átomos pesados.
- *H-Acceptors_norm*: número de aceptores de enlaces de hidrógeno (O, N con pares libres), normalizado por átomos pesados.
- *H-Donors_norm*: número de donores de enlaces de hidrógeno (N-H, O-H), normalizado por átomos pesados.
- *Electronegative Atoms_norm*: número de átomos electronegativos (O, N, S, halógenos) normalizado por átomos pesados.
- *Aromatic Atoms_norm*: número de átomos aromáticos normalizado por átomos pesados.
- *Rotable Bonds_norm*: proporción de enlaces rotables respecto al total de enlaces de la molécula.
- *Amides_norm*: número de grupos amida, normalizado por átomos pesados.
- *Basic Nitrogens_norm*: número de nitrógenos básicos (por ejemplo, aminas, imidazoles), normalizado por átomos pesados.

- *Acidic Oxygens_norm*: número de oxígenos ácidos (carboxilos, fenoles), normalizado por átomos pesados.

Construcción de bibliotecas virtuales

La enumeración combinatoria de compuestos se realizó con el módulo específico de DataWarrior (v06.05.02), que permitió combinar bloques de construcción definidos siguiendo reglas preestablecidas. Las bibliotecas generadas se exportaron en formato SMILES para su posterior análisis.

Análisis exploratorio y reducción de dimensionalidad

El Análisis de Componentes Principales (PCA) se implementó en *scikit-learn* y permitió explorar la diversidad estructural de las bibliotecas mediante la reducción de dimensionalidad. La extensión de cada colección en el espacio químico se evaluó calculando el volumen ocupado, estimado a partir de elipsoides robustos ajustados mediante el método de covarianza mínima determinante (*MinCovDet*). Para la representación gráfica se utilizaron *matplotlib* y *seaborn*, generando proyecciones bidimensionales, histogramas y diagramas comparativos.

Análisis supervisado y clasificación

Con el fin de explorar diferencias sistemáticas entre conjuntos, se aplicaron técnicas supervisadas. El Análisis Discriminante Lineal (LDA) se llevó a cabo con *scikit-learn*, construyendo funciones discriminantes capaces de maximizar la separación entre clases predefinidas. Los modelos de *Random Forest* también se implementaron en *scikit-learn*, utilizándose tanto para la clasificación como para la evaluación de desempeño mediante métricas de exactitud, matrices de confusión y validación cruzada.

Visualización de agrupamientos

Como herramienta complementaria, se empleó el algoritmo t-SNE (*scikit-learn*) para la representación en dos dimensiones de las relaciones de vecindad entre compuestos en espacios de alta dimensionalidad.

Medidas de similitud con productos naturales

La semejanza con metabolitos especializados se evaluó calculando el *NP-likeness score*, implementado mediante un script local en Java que procesa archivos en formato SMILES. De este modo fue posible comparar cuantitativamente las distribuciones de distintas colecciones con bases de productos naturales y sintéticos.

Selección racional de subconjuntos

La priorización de compuestos dentro de las bibliotecas se realizó considerando la diversidad estructural. Para ello se calcularon distancias multivariadas, en particular la distancias euclideas y de Mahalanobis, empleando las librerías *scipy* y *numpy*.

Ensayos de actividad

Ensayos antifúngicos

Las cepas de hongos ensayadas *Fusarium tucumaniae* (FT), *Fusarium graminearum* (FG) (Centro de Referencia de Micología, Facultad de Ciencias Bioquímica y Farmacéuticas, Universidad de Rosario N CCC220.05) y *F. solani* (Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata N LPSC868) se cultivaron en medio de agar extracto de malta al 3% (p/v) (Oxoid Ltd, Basingstoke Hants, Inglaterra) en placas de Petri de 9 cm a 25 °C y en la oscuridad. Para obtener las esporas, se cultivaron hongos durante 7 a 10 días. La recolección se realizó suspendiendo las esporas en agua esterilizada (con oligoelementos).⁴³

Para el ensayo de bioautografía directa en CCD, se marcaron puntos de siembra en una placa de sílica separados por 3 cm, y se sembró cada compuesto en una concentración de 50 µg/punto de siembra. La placa se sumergió en la suspensión de esporas del hongo correspondiente y se incubó a 25 °C, en la oscuridad y bajo humedad controlada. La medición del diámetro de los halos de inhibición se efectuó luego de 48 h. de incubación.⁴⁴

Para aquellos compuestos con actividad significativa se determinó la mínima concentración inhibitoria mediante el método de microdilución. Para ello los compuestos se disolvieron en etanol a una concentración de 1 µg/mL y se agregaron alícuotas de cada uno en placas de 96 pocillos conteniendo 0,2 mL de caldo extracto de malta estéril al 3% (m/v) hasta concentraciones finales en el rango de 0 a 100 µM de compuesto.

La suspensión del inóculo se ajustó a 105 unidades formadoras de colonias/mL y se agregaron 10 μ L a cada pocillo, excepto a la primera fila, que solamente contenía caldo extracto de malta como control negativo de contaminación. La placa se incubó a 25 °C durante 72 h. en oscuridad y con humedad controlada la mínima concentración inhibitoria (MIC) se determinó como la concentración de compuesto más baja capaz de inhibir la germinación de esporas. La máxima concentración usada de etanol no mostró efecto inhibitorio. En cada caso el ensayo se realizó por duplicado.

Ensayos antiproliferativos

Se cultivaron células Vero (ATCC CCL-81), células CRFK (ATCC CCL-94) y células A549 de pulmón humano (ATCC CCL-185) en medio mínimo esencial Eagle (MEM, Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con 5% de suero bovino recién nacido inactivado por calor (NBS, Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las células Vero E6 y las células CRFK se cultivaron en MEM suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10% (FBS, Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se cultivaron células Calu-3 de pulmón humano y células Huh-7 de hepatoma humano en D-MEM (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con FBS al 10%. Las líneas celulares se cultivaron y mantuvieron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

La citotoxicidad se determinó inicialmente observando alteraciones en la morfología celular bajo un microscopio de luz invertida (Nikon Eclipse TS100).

La concentración requerida para reducir la viabilidad celular en un 50% (CC50) se obtuvo como se describió anteriormente (Vicente et al., 2023). Las células se sembraron a una concentración de 104 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivaron a 37 °C durante 24 h. Luego, las células se trataron con compuestos por triplicado. Después de 72 h. de tratamiento, la viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El control con DMSO al 1% no mostró ningún efecto sobre la viabilidad celular. La CC50 se determinó a partir de curvas de concentración-respuesta equipadas con el software GraphPad Prism 6.0.

Se sembraron células Vero a una concentración de 104 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivaron a 37 °C durante 1 día. Luego, las células se trataron con diversas concentraciones de los compuestos probados por triplicado.

Se utilizó DMSO como control. Después de 24 h. de tratamiento, la viabilidad celular se determinó utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS, CellTiter 96 Reactivo de una solución acuosa; Promega). Se obtuvo la concentración requerida para reducir la viabilidad celular en un 50% (CC50).

El control con DMSO al 1% no mostró ningún efecto sobre la viabilidad celular. La citotoxicidad también se determinó utilizando células Vero confluentes que no estaban en crecimiento después de 72 h. de tratamiento con la concentración máxima de los compuestos empleados.

La viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 104 células/pocillo en los cuales se añadieron soluciones de diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Después de 72 h. de incubación, se agregó a las células en el medio de cultivo una solución de MTT (5 mg/mL en agua destilada). Las placas se incubaron durante 2 h. a 37 °C. Luego el formazán producido se solubilizó mediante la adición de 0,2 mL de etanol y los valores de absorbancia se midieron inmediatamente utilizando un lector de placas ELISA (Eurogenetics MPR-A 4i) a una longitud de onda de control de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. Los resultados para cada cultivo celular tratado se normalizaron como un porcentaje de la absorbancia con respecto a los controles no tratados. Las desviaciones estándar (DE) de los datos normalizados se calcularon a partir de las DE de las células y los controles tratados y los valores medios de las absorbancias correspondientes (usando datos de tres experimentos independientes) como:

$$DE \text{ de los datos normalizados} = \frac{A_{\text{células tratadas}}}{A_{\text{control}}} \sqrt{\left(\frac{DE_{\text{control}}}{A_{\text{control}}}\right)^2 + \left(\frac{DE_{\text{células tratadas}}}{A_{\text{células tratadas}}}\right)^2}$$

La concentración de compuesto requerida para inhibir el crecimiento celular en un 50% (IC₅₀) se determinó a partir de un ajuste de los datos dosis – respuesta mediante el software GraphPad Prism 6.0. El modelo utilizado para ajustar las curvas responde a la ecuación:

$$viabilidad = \frac{100}{1 - 10^{(\log(IC_{50}) - \log(concentración))h}}$$

La salida del programa da, por un lado, el valor de IC₅₀, y por el otro el desvío estándar DE del log(IC₅₀); a partir del cual puede calcularse el DE del IC₅₀ mediante la ecuación:

$$DE IC_{50} = DE \log(IC_{50}) \times IC_{50} \times \log(10)$$

En todos los casos se usó 5-fluorouracilo como control positivo.

Ensayos antivirales

Se utilizaron las siguientes cepas virales: adenovirus tipo 5 (Adv-5), herpes simple tipo 1 (HSV-1) cepa KOS, herpes simple tipo 2 (HSV-2) cepa G, virus Zika (ZIKV) cepa Puerto Rico (PRVABC59), coronavirus canino (CCV) y síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) cepa Wuhan. Todas las cepas virales se utilizaron y propagaron con una baja multiplicidad de infección (moi). Todos los trabajos con SARS-CoV-2 infeccioso se realizaron en Nivel de Bioseguridad 3 (ABSL-3) (UOCCB, ANLIS-Malbrán, Buenos Aires, Argentina). Vero E6 y SARS-CoV-2 fueron amablemente proporcionados por el Dr. Jorge Quarleri (INBIRS-Buenos Aires Argentina). Las células Calu-3 fueron proporcionadas amablemente por la Dra. Fernanda Elías (Fundación Pablo Cassará-Buenos Aires, Argentina). Las células CCV y CRFK fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Carlos Palacios (Fundación Pablo Cassará-Buenos Aires, Argentina).

Inhibición viral

La actividad antiviral se realizó como se describió anteriormente. El ensayo de inhibición del efecto citopático (CPE) se utilizó como prueba preliminar para evaluar la actividad antiviral. Las células se infectaron a una moi de 0,1 y se cultivaron durante 1 h. a 37 °C. Luego, las células se trataron con compuestos o no, como virus de control, por triplicado. Después de 48-72 h., se observó el efecto citopático (CPE) causado por el virus examinando la morfología celular a través de un microscopio de luz invertida (Nikon Eclipse TS100). Luego, los sobrenadantes se recogieron y se titularon mediante ensayo de placa, y se determinó la concentración requerida para reducir el rendimiento del virus en un 50% (CE50) a partir de curvas de concentración-respuesta equipadas con el software GraphPad

Prism 6.0. Se utilizó ribavirina como fármaco de referencia para validar el ensayo de actividad antiviral.

Referencias

- (1) Chan, H. L.; Lyu, L.; Aw, J.; Zhang, W.; Li, J.; Yang, H.-H.; Hayashi, H.; Chiba, S.; Xing, B. Unique Fluorescent Imaging Probe for Bacterial Surface Localization and Resistant Enzyme Imaging. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (7), 1890–1896. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00172>.
- (2) Gerack, C.; McElwee-White, L. Formylation of Amines. *Molecules* **2014**, *19* (6), 7689–7713. <https://doi.org/10.3390/molecules19067689>.
- (3) Salami, S. A.; Siwe-Noundou, X.; Krause, R. W. M. Catalytic Performance of Immobilized Sulfuric Acid on Silica Gel for N-Formylation of Amines with Triethyl Orthoformate. *Molecules* **2022**, *27* (13), 4213. <https://doi.org/10.3390/molecules27134213>.
- (4) Cuccu, F.; Basoccu, F.; Fattuoni, C.; Porcheddu, A. N-Formylsaccharin: A Sweet(Able) Formylating Agent in Mechanochemistry. *Molecules* **2022**, *27* (17), 5450. <https://doi.org/10.3390/molecules27175450>.
- (5) Škoch, K.; Císařová, I.; Štěpnička, P. Selective Gold-Catalysed Synthesis of Cyanamides and 1-Substituted 1 H -Tetrazol-5-Amines from Isocyanides. *Chemistry A European J* **2018**, *24* (52), 13788–13791. <https://doi.org/10.1002/chem.201803252>.
- (6) Rivera, D. G.; Wessjohann, L. A. Supramolecular Compounds from Multiple Ugi Multicomponent Macrocyclizations: Peptoid-Based Cryptands, Cages, and Cryptophanes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (22), 7122–7123. <https://doi.org/10.1021/ja060720r>.
- (7) Okandeji, B. O.; Greenwald, D. M.; Wroten, J.; Sello, J. K. Synthesis and Evaluation of Inhibitors of Bacterial Drug Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (24), 7679–7689. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.10.011>.
- (8) Outin, J.; Quellier, P.; Bélanger, G. Sequential One-Pot Vilsmeier–Haack and Organocatalyzed Mannich Cyclizations to Functionalized Benzoindolizidines and Benzoquinolizidines. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (7), 4712–4729. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03449>.

- (9) Aryanasab, F. Mizoroki–Heck Coupling Reaction on the Surface of Sepiolite Clay-Supported Pd/Cu Nanoalloy. *Synthetic Communications* **2022**, *52* (4), 521–534. <https://doi.org/10.1080/00397911.2022.2034883>.
- (10) Yao, L.; Mustafa, N.; Tan, E. C.; Poulsen, A.; Singh, P.; Duong-Thi, M.-D.; Lee, J. X. T.; Ramanujulu, P. M.; Chng, W. J.; Yen, J. J. Y.; Ohlson, S.; Dymock, B. W. Design and Synthesis of Ligand Efficient Dual Inhibitors of Janus Kinase (JAK) and Histone Deacetylase (HDAC) Based on Ruxolitinib and Vorinostat. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (20), 8336–8357. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00678>.
- (11) Hochberger-Roa, F.; Cortés-Mendoza, S.; Gallardo-Rosas, D.; Toscano, R. A.; Ortega-Alfaro, M. C.; López-Cortés, J. G. Synthesis and Catalytic Applications of [N,N]-Pyrrole Ligands for the Regioselective Synthesis of Styrene Derivatives. *Adv Synth Catal* **2019**, *361* (17), 4055–4064. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900365>.
- (12) Ghatak, A.; Bhar, S. Chemoselective Reduction of Nitroaromatics Using Recyclable Alumina-Supported Nickel Nanoparticles in Aqueous Medium—Exploration to One Pot Synthesis of Benzimidazoles. *Synthetic Communications* **2022**, *52* (3), 368–379. <https://doi.org/10.1080/00397911.2021.2024853>.
- (13) Shen, N.; Zhai, S.-J.; Cheung, C. W.; Ma, J.-A. Direct *N*-Formylation of Nitroarenes with CO₂. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (67), 9620–9623. <https://doi.org/10.1039/D0CC03098H>.
- (14) Suć Sajko, J.; Ljoljić Bilić, V.; Kosalec, I.; Jerić, I. Multicomponent Approach to a Library of *N*-Substituted γ -Lactams. *ACS Comb. Sci.* **2019**, *21* (1), 28–34. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.8b00147>.
- (15) Gynther, M.; Laine, K.; Ropponen, J.; Leppänen, J.; Mannila, A.; Nevalainen, T.; Savolainen, J.; Järvinen, T.; Rautio, J. Large Neutral Amino Acid Transporter Enables Brain Drug Delivery via Prodrugs. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (4), 932–936. <https://doi.org/10.1021/jm701175d>.
- (16) Lalithamba, H. S.; Raghavendra, M.; Uma, K.; Yatish, K. V.; Mousumi, D.; Nagendra, G. Capsicum Annuum Fruit Extract: A Novel Reducing Agent for the Green Synthesis of ZnO Nanoparticles and Their Multifunctional Applications. *ACS*i** **2018**, 354–364. <https://doi.org/10.17344/acsi.2017.4034>.

- (17) Carney, D. W.; Truong, J. V.; Sello, J. K. Investigation of the Configurational Stabilities of Chiral Isocyanoacetates in Multicomponent Reactions. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (24), 10279–10285. <https://doi.org/10.1021/jo201817k>.
- (18) Patil, P.; Ahmadian-Moghaddam, M.; Dömling, A. Isocyanide 2.0. *Green Chem.* **2020**, *22* (20), 6902–6911. <https://doi.org/10.1039/D0GC02722G>.
- (19) Menezes, R.; Smith, M. B. A Mild and Facile Route to ω -Amino Esters. *Synthetic Communications* **1988**, *18* (14), 1625–1636. <https://doi.org/10.1080/00397918808081323>.
- (20) Maraswami, M.; Goh, J.; Loh, T.-P. Macrolactam Synthesis via Ring-Closing Alkene–Alkene Cross-Coupling Reactions. *Org. Lett.* **2020**, *22* (24), 9724–9728. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c03801>.
- (21) Leech, M. C.; Petti, A.; Tanbouza, N.; Mastrodonato, A.; Goodall, I. C. A.; Ollevier, T.; Dobbs, A. P.; Lam, K. Anodic Oxidation of Aminotetrazoles: A Mild and Safe Route to Isocyanides. *Org. Lett.* **2021**, *23* (24), 9371–9375. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c03475>.
- (22) Boltjes, A. Ugi Multicomponent Reaction. *Org. Synth.* **2017**, *94*, 54–65. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.094.0054>.
- (23) Vercillo, O. E.; Andrade, C. K. Z.; Wessjohann, L. A. Design and Synthesis of Cyclic RGD Pentapeptoids by Consecutive Ugi Reactions. *Org. Lett.* **2008**, *10* (2), 205–208. <https://doi.org/10.1021/ol702521g>.
- (24) Huynh, U.; McDonald, S. L.; Lim, D.; Uddin, Md. N.; Wengryniuk, S. E.; Dey, S.; Coltart, D. M. Formation, Alkylation, and Hydrolysis of Chiral Nonracemic *N*-Amino Cyclic Carbamate Hydrazones: An Approach to the Enantioselective α -Alkylation of Ketones. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (21), 12951–12964. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00655>.
- (25) Suginome, H.; Yamada, S. Replacement of a Carbonyl Group of Camphor by an Oxygen Atom. Synthesis of 1,7,7-Trimethyl-2-Oxabicyclo[2.2.1]Heptane. *BCSJ* **1985**, *58* (10), 3055–3056. <https://doi.org/10.1246/bcsj.58.3055>.
- (26) Zahn, T. J.; Eilers, M.; Guo, Z.; Ksebati, M. B.; Simon, M.; Scholten, J. D.; Smith, S. O.; Gibbs, R. A. Evaluation of Isoprenoid Conformation in Solution and in the Active Site of Protein-Farnesyl Transferase Using Carbon-13 Labeling in Conjunction with Solution- and Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (30), 7153–7164. <https://doi.org/10.1021/ja000860f>.

- (27) Zhang, B.; Kurpiewska, K.; Dömling, A. Highly Stereoselective Ugi/Pictet–Spengler Sequence. *J. Org. Chem.* **2022**, *87* (11), 7085–7096. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00244>.
- (28) Chugh, V.; Chatterjee, B.; Chang, W.; Cramer, H. H.; Hindemith, C.; Randel, H.; Weyhermüller, T.; Farès, C.; Werlé, C. An Adaptive Rhodium Catalyst to Control the Hydrogenation Network of Nitroarenes. *Angew Chem Int Ed* **2022**, *61* (36), e202205515. <https://doi.org/10.1002/anie.202205515>.
- (29) Zhang, Y.; Zhang, H.; Gao, K. Borane–Trimethylamine Complex as a Reducing Agent for Selective Methylation and Formylation of Amines with CO₂. *Org. Lett.* **2021**, *23* (21), 8282–8286. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c03023>.
- (30) Hase, Y.; Nagai, K.; Iida, H.; Maeda, K.; Ochi, N.; Sawabe, K.; Sakajiri, K.; Okoshi, K.; Yashima, E. Mechanism of Helix Induction in Poly(4-Carboxyphenyl Isocyanide) with Chiral Amines and Memory of the Macromolecular Helicity and Its Helical Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (30), 10719–10732. <https://doi.org/10.1021/ja904128d>.
- (31) Ortega, N.; Richter, C.; Glorius, F. N-Formylation of Amines by Methanol Activation. *Org. Lett.* **2013**, *15* (7), 1776–1779. <https://doi.org/10.1021/ol400639m>.
- (32) Laviós, A.; Sanz-Marco, A.; Vila, C.; Muñoz, M. C.; Pedro, J. R.; Blay, G. Metal-Free Diastereo- and Enantioselective Dearomative Formal [3 + 2] Cycloaddition of 2-Nitrobenzofurans and Isocyanoacetate Esters. *Org. Lett.* **2022**, *24* (11), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.2c00427>.
- (33) Nishikawa, Y.; Nakamura, H.; Ukai, N.; Adachi, W.; Hara, O. Tetraethylorthosilicate as a Mild Dehydrating Reagent for the Synthesis of N-Formamides with Formic Acid. *Tetrahedron Letters* **2017**, *58* (9), 860–863. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.01.056>.
- (34) Zhang, Y.; Zhang, Z.; Hu, Y.; Liu, Y.; Jin, H.; Zhou, B. Nickel-Catalyzed Cyanation Reaction of Aryl/Alkenyl Halides with Alkyl Isocyanides. *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20* (41), 8049–8053. <https://doi.org/10.1039/D2OB01240E>.
- (35) Chen, Z.; Cao, Y.; Tian, Z.; Zhou, X.; Xu, W.; Yang, J.; Teng, H. An Efficient Reduction of N-Substituted Carbonylimidazolides into Formamides by NaBH₄. *Tetrahedron Letters* **2017**, *58* (22), 2166–2170. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.072>.

- (36) Song, Z.; Liu, J.; Xing, S.; Shao, X.; Li, J.; Peng, J.; Bai, Y. PNP-Type Ligands Enabled Copper-Catalyzed *N*-Formylation of Amines with CO₂ in the Presence of Silanes. *Org. Biomol. Chem.* **2023**, *21* (4), 832–837. <https://doi.org/10.1039/D2OB01986H>.
- (37) Mohan, A.; Ramkumar, V.; Sankararaman, S. Synthesis and Structures of (–) Menthyl and (+) Neomenthyl Substituted Enantio Pure Bis(1,2,3-Triazol-5-Ylidene)PdI₂ Complexes and PEPPSI Type (1,2,3-Triazol-5-Ylidene) (Pyridine)PdI₂ Complexes. Comparison of Catalytic Activities for C–C Coupling. *Journal of Organometallic Chemistry* **2015**, 799–800, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2015.09.019>.
- (38) Baev, D. S.; Blokhin, M. E.; Chirkova, V. Yu.; Belenkaya, S. V.; Luzina, O. A.; Yarovaya, O. I.; Salakhutdinov, N. F.; Shcherbakov, D. N. Triterpenic Acid Amides as Potential Inhibitors of the SARS-CoV-2 Main Protease. *Molecules* **2022**, *28* (1), 303. <https://doi.org/10.3390/molecules28010303>.
- (39) Saito, K.; Nishimori, A.; Mimura, R.; Nakano, K.; Kotsuki, H.; Masuda, T.; Ichikawa, Y. A Biomimetic Approach to the Synthesis of the Core Structure of the Marine Sponge Terpene Halichonadin G. *Eur J Org Chem* **2013**, *2013* (31), 7041–7043. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201301206>.
- (40) Bellouard, F.; Chuburu, F.; Kervarec, N.; Toupet, L.; Triki, S.; Le Mest, Y.; Handel, H. Cis-Diprotected Cyclams and Cyclens: A New Route to Symmetrically or Asymmetrically 1,4-Disubstituted Tetraazamacrocycles and to Asymmetrically Tetrasubstituted Derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, No. 23, 3499–3505. <https://doi.org/10.1039/a905701c>.
- (41) Kovacs, Z.; Sherry, A. D. pH-Controlled Selective Protection of Polyaza Macrocycles. *Synthesis* **1997**, *1997* (07), 759–763. <https://doi.org/10.1055/s-1997-1418>.
- (42) Siddique, M.; Boity, B.; Rit, A. Heteroditopic Chelating NHC Ligand-Supported Co^{III} Complexes: Catalysts for the Reductive Functionalization of Carbon Dioxide under Ambient Conditions. *Organometallics* **2023**, *42* (12), 1395–1403. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.2c00670>.
- (43) Jacob, M. R.; Walker, L. A. Natural Products and Antifungal Drug Discovery. In *Antifungal Agents*; Humana Press: New Jersey, 2005; Vol. 118, pp 083–110. <https://doi.org/10.1385/1-59259-943-5:083>.

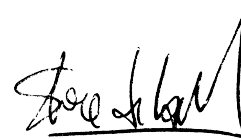
(44) Hadacek, F.; Greger, H. Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11* (3), 137–147. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200005/06\)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I).



Galilea, Agustín



Ramírez, Javier A.



Acebedo, Sofía L.