



DESARROLLO DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS MEDIANTE METODOLOGÍAS DE QUÍMICA VERDE.

Lic. Mariana Ingold

Doctorado en Química

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República
Laboratorio de Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo

Diciembre, 2020
Montevideo, Uruguay



DESARROLLO DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS MEDIANTE METODOLOGÍAS DE QUÍMICA VERDE.

Lic. Mariana Ingold

Tesis de Doctorado presentada a la Facultad de Química de la Universidad de la República y al Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctora en Química.

Directores:

Dra. Gloria Virginia López

Dr. Williams Porcal

Integrantes del Tribunal:

Dra. Viviana Huguaburu

Dr. Mauricio Cabrera

Dr. David González

Diciembre, 2020

Montevideo, Uruguay

A Ana, Catita, Luis y Tata.

Agradecimientos

A las entidades que de una manera u otra apoyaron este proyecto:

- Programa de Posgrado, Facultad de Química, Universidad de la República (Udelar)
- PEDECIBA-Química (Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas); Ministerio de Educación y Cultura (MEC).
- Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Udelar.
- Grupo de Química Orgánica Medicinal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Udelar.
- Laboratorio de Biología Vascul y Desarrollo de Fármacos, Instituto Pasteur de Montevideo.
- Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, La Laguna, Tenerife, España.
- Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), MEC.
- Agencia Nacional de Investigación e Innovación. (ANII), Becas de Maestría y Doctorado, Proyectos ANII-FCE _2011_5717 y ANII_FCE_2014_1_104399.
- Proyecto de Cooperación CSIC, España-Udelar
- Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Udelar) a través de sus programas de pasantías y congresos en el exterior.
- EOLO Pharma Inc.

A las personas que me acompañaron y colaboraron en este proyecto:

- A mis directores de tesis Dra. Virginia López y Dr. Williams Porcal, por sus enseñanzas, paciencia, cariño y amistad. Por todas las oportunidades que me han brindado, así como su tiempo y conocimiento. Muchas gracias por todo, no podría haber tenido mejores tutores.
- A mis compañeros del Laboratorio de Biología Vascul y Desarrollo de Fármacos del IPMont, por siempre estar dispuestos a ayudarme. A Lu, por acompañarme en este camino de RMC,

nitroalquenos y células con su gran sonrisa. A Fede por musicalizar el laboratorio. A María por sus charlas de columnas eternas. A Ro, por hacer juntas el camino, Ciencias-Tenerife-IPMont y ayudarme con los ensayos de inflamasoma y ELISA. A Viro y a Thiago, que se sumaron recientemente al lab y me acompañaron este último tiempo. A Germán por hacer los ensayos de citotoxicidad con células THP-1 de la Serie I y enseñarme para que yo pudiera hacerlo para la Serie III. Además por su colaboración ante cualquier duda con cualquier ensayo biológico. A Jorge por siempre estar dispuesto a ayudarme con el HPLC, con las células o con el espectrofotómetro. Al Dr. Carlos Batthyany por sus comentarios siempre positivos hacia la síntesis orgánica y sus aportes en la biología de los nitroalquenos.

- A los compañeros del Grupo de Química Orgánica Medicinal de Facultad de Ciencias por su compañía en mis primeros años en la Química Orgánica y siempre ayudarme cuando lo necesite. En especial a Natalia con quien compartimos mesada, viajes, congresos y más. A los Dres. Hugo Cerecetto y Mercedes González por ser mis primeros docentes de Orgánica y su apoyo en el laboratorio.

- A los integrantes del Departamento de Química Orgánica de Facultad de Química, por siempre estar dispuestos a prestar algún reactivo o socorrerme cuando tuve problemas en el masas. Al Laboratorio de Química Farmacéutica por permitirme utilizar el equipo de microondas.

- A la Dra. Paola Hernandez del Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica del IIBCE, por enseñarme a cultivar células, a hacer el ensayo de SRB con células HacaT y de medida de NO.

- A los Dres. Fernando García-Tellado y David Tejedor y la Dra. Mary Cruz Prieto del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC, La Laguna, Tenerife, España. Por recibirme en su laboratorio, enseñarme y permitirme desarrollar gran parte de la síntesis de esta tesis.

- Al Dr. José Manuel Padrón Carrillo, BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González”, Universidad de La Laguna, Tenerife, España. Por realizar los ensayos de actividad antiproliferativa de las tres series.

- A la Dra. Mariella Bollati y la Lic. Sabina Victoria de la Unidad de Biología Celular del IPMont, por realizar los ensayos de apoptosis y ciclo celular para la Serie I.

- A Horacio Pezaroglio por realizar los espectros de RMN de los compuestos preparados en esta tesis.
- A mi Mamá y mi Papá por siempre apoyarme en todas mis decisiones con amor. No me podrían haber tocado mejores padres.
- A mis hermanos, Ceci y Nacho, por cuidarme de los duendes y acompañarme incondicionalmente.
- A mis abuelas y abuelos, a quienes dedico este trabajo, gracias por ser y estar, siempre.
- A mis tios, Titi, Toto y Gabriel y mis primos, Fede y Nico. Por estar pendientes y siempre dispuestos a ayudarme.
- A Alexis por hacer este camino juntos. Por el amor, la compañía, las charlas, las series, los viajes, Leia y todo lo que vendrá.

*"Este es el comienzo de mi viaje,
es el final de mi camino.
No llevo prisa ni equipaje,
solo cenizas en el mar
de este remendado corazón,
para viajar..."*

Tabaré Cardozo

*"We're all in the same boat,
and we only have one boat"*

Dr. Paul Anastas

Resumen

El objetivo principal de la presente tesis fue la generación de nuevas moléculas bioactivas mediante reacciones multicomponente (RMC), reacciones de Passerini y de Ugi, siguiendo principios de la química verde y el estudio preliminar de su actividad anticancerígena.

En este siglo, uno de los mayores desafíos de la química orgánica y la química médica, es la obtención de nuevos compuestos orgánicos estructuralmente diversos, de manera rápida y eficiente, para estudiar sistemas biológicos y acelerar el proceso de descubrimiento de fármacos. La química también enfrenta retos como la reducción del impacto ambiental de los residuos generados y el manejo adecuado de recursos ambientales. En este sentido, en el presente trabajo de tesis se estudiaron y optimizaron rutas sintéticas basadas en RMC con alta eficiencia atómica, utilizando condiciones de reacción alternativas amigables con el medio ambiente (empleo de disolventes verdes o reacciones en ausencia de disolvente) y en muchos casos minimizando el consumo energético y el tiempo de reacción mediante el empleo de irradiación de microondas o ultrasonido.

En la actualidad una estrategia terapéutica muy prometedora contra el cáncer es el diseño y desarrollo de potenciales fármacos híbridos. Es así que se diseñaron y sintetizaron tres series de compuestos mediante hibridación de tres farmacóforos con potencial actividad antitumoral: grupos liberadores de óxido nítrico (GLNO), funcionalidad nitroalqueno y análogos de tocoferol. Se sintetizaron 76 compuestos derivados de RMC de Passerini o de Ugi, además de compuestos que se utilizaron como componentes de partida, siempre que fuera posible, en condiciones verdes. Se obtuvieron en general con rendimientos de moderados a buenos y en algunos casos, excelentes.

La quimioteca así generada fue sometida a una evaluación biológica primaria in vitro con el objetivo de estudiar su actividad antiproliferativa frente a un panel de 6 líneas celulares tumorales humanas. Como aproximación al estudio del mecanismo de acción de estas familias de compuestos se llevaron a cabo experimentos de: i) apoptosis; ii) análisis del ciclo celular; iii) capacidad de liberar óxido nítrico; iv) efecto sobre la activación del inflammasoma NLRP3. Para ello se seleccionaron algunos de los compuestos más prometedores en cuanto a su relación actividad antiproliferativa /citotoxicidad. De los 76 compuestos sintetizados entre las tres series, 8 resultaron con una actividad biológica relevante. Entre ellos destaca el rol de

los furoxanos (GLNO) como farmacóforo antitumoral, en los compuestos **12i** y el **13e**, con valores de IC_{50} entre 0.11 a 3.5 μ M y 0.021 a 3.0 μ M respectivamente en las diferentes líneas celulares tumorales. Los 8 compuestos destacados, presentaron además selectividad hacia células tumorales sobre células normales, demostrando ser prometedores candidatos para el desarrollo de potentes y selectivos agentes terapéuticos contra el cáncer.

Abreviaturas

AcOEt - acetato de etilo

AcOH - ácido acético

ADME - Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

AEH - Enlaces de hidrógeno aceptores

AFIR – Artificial force induced reaction

AFQ – Ácido fosfórico quiral

AMS – Ácido metano sulfónico

aq. – Acuoso

ATP - Adenosín -5- trifosfato

β ME – β -mercaptoetanol

Boc - *t*-butiloxicarbonilo

Boc₂O – dicarbonato de di-*tert*-butilo

CE₅₀ – Concentración efectiva 50

COSY – espectroscopia de correlación (Correlation Spectroscopy)

DBU – 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno

DCE – Dicloroetano

DCM – Diclorometano

DDAB - didodecildimetilamonio

DEC – Densidad de energía cohesiva

DEH - Enlaces de hidrógeno dadores

DFT – Density functional theory

DMAc – Dimetilacetamida

DMAP – 4-Dimetilaminopiridina

DME – dimetoxietano

DMF – dimetilformamida

DMPU – N,N'-dimetilpropileneurea

DMSO – dimetilsulfóxido

DS – Desviación estandar

ECNT - Enfermedades crónicas no transmisibles

EA - Economía Atómica

ee – Exceso enantiomérico

EMR - Eficiencia de masa de la reacción

ELISA - Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

ENT - Enfermedades no transmisibles

GI - Gastrointestinal

GLNO – Grupo liberador de óxido nítrico

GNA – Grupo nitroalqueno

Hb - Hemoglobina

HMBC - Correlación de enlace múltiple heteronuclear (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

HMPA – Hexametilfosforamida

HMTA - Hexametenetetramina

HSQC - Correlación cuántica simple heteronuclear (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

IC₅₀ – 50% de inhibición del crecimiento

IL-1 β – Interleuquina 1 β

IL-18 – Interleuquina 18

i-ProAc - Acetato de isopropilo

IS – Índice de selectividad

ITBA – Ioduro de tetrabutilamonio

J - Constante de acoplamiento

LDL – Lipoproteína de baja densidad

LogP – logaritmo del coeficiente de reparto compuesto entre n-octanol y agua

LPS – Lipopolisacárido

MEK - Metiletilcetona

Me-THF - 2-metiltetrahidrofurano

MIEBK - Metilisobutilcetona

MS - espectrometría de masa

MTBE – Metil *tert*-butil eter

MW - Microondas

n-BuOAc – Acetato de butilo

ND – No detectado

NER – Número de enlaces rotables

NEt₃ - Trietilamina

NF-κB - Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Factor nuclear de alargamiento de la cadena liviana kappa de células B activadas)

NMP – N-metil-2-pirrolidona

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintasa

P.F. - Punto de fusión

PM - Peso molecular

PS – Fosfatidil-serina

p-TsCl - Cloruro de *p*-toluensulfonilo

REA – Relación estructura actividad

RMC – Reacción multicomponente

RMCI - Reacción multicomponente que utiliza isonitrilo

RMN - Resonancia Magnética Nuclear

sd – sin disolvente

SFB - Suero Fetal Bovino

SOD – Síntesis orientada a la diversidad

SRB – Sulforodamina B

TA - Temperatura ambiente

TEMPO - N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina

TFA – Ácido trifluoroacético

TFE - Trifluoroetanol

THF – Tetrahidrofurano

TLC- Cromatografía en capa fina

TMSN₃ – Trimetilsilil azida

TPSA - Área Superficial Polar

US - Ultrasonido

Δ - calentamiento a reflujo

Tabla de contenidos

Capítulo 1. Introducción.....	16
1.1- Introducción.....	17
1.2- Química verde.....	18
1.3- Técnicas verdes en síntesis orgánica	25
1.3.1- Disolventes verdes.....	25
1.3.1.1- Síntesis libre de disolvente	28
1.3.1.2- Síntesis orgánica en medio acuoso.....	29
1.3.2- Síntesis orgánica asistida por microondas.....	33
1.3.3- Síntesis orgánica asistida por ultrasonido	35
1.3.4- Reacciones multicomponente	37
1.3.4.1- Reacción de Passerini	43
1.3.4.2- Reacción de Ugi	49
1.4- Química medicinal del siglo XXI	56
1.5- Enfermedades no transmisibles	59
1.5.1- Cáncer: diseño de compuestos bioactivos antitumorales.....	60
1.5.1.1. Antitumorales liberadores de óxido nítrico	61
1.5.1.2. Nitroalquenos Antitumorales	64
1.5.1.3. Antitumorales derivados del sistema α -Tocoferol.....	66
Capítulo 2. Antecedentes.....	69
Capítulo 3. Objetivos y Estrategia de trabajo	78
3. 1 Objetivo General	79
3.2 Objetivos específicos.....	79
3.3 Estrategia de trabajo.....	79
Capítulo 4. Resultados y Discusión	82
4.1 Serie I. Estructuras híbridas tocoferol-miméticas liberadoras de óxido nítrico obtenidas mediante RMC.	83
4.1.1. Química.	83
4.1.2 Elucidación estructural.....	97
4.1.3 Biología.....	99
4.1.3.1 Actividad Antiproliferativa	99
4.1.3.2 Índice de Selectividad	102
4.1.3.3 Apoptosis	103

4.1.3.4 Análisis del Ciclo Celular.....	104
4.1.4 Conclusiones	106
4.2 Serie II. Estructuras híbridas tocoferol-miméticas liberadoras de óxido nítrico obtenidas mediante RMC.	108
4.2.1 Química	108
4.2.2 Elucidación estructural.....	118
4.2.3 Biología.....	121
4.2.3.1 Actividad Antiproliferativa	121
4.2.3.3 Índice de Selectividad	125
4.2.3.4 Medida de la liberación de ·NO.....	126
4.2.4 Conclusiones	128
4.3 Serie III. Síntesis de nitroalquenos obtenidos mediante RMC de Ugi.....	130
Capítulo 5. Conclusiones, Perspectivas y Alcance.....	131
5.1 Conclusiones Generales	132
5.2 Perspectivas	134
5.3 Alcance de la tesis	134
Capítulo 6. Parte Experimental	136
6.1 Química	137
6.1.1 Generalidades	137
6.1.2 Síntesis de la Serie I.....	138
6.1.3 Síntesis de la Serie II.....	152
6.2 Biología.....	170
6.2.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo	170
6.2.2 Actividad Antiproliferativa	170
6.2.3 Estudios de citotoxicidad	171
6.2.4 Ensayo de apoptosis.....	172
6.2.5 Análisis del ciclo celular	172
6.2.6 Liberación de óxido nítrico.....	173
6.2.7 Actividad antiproliferativa en presencia de hemoglobina.....	174

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1- Introducción

El desarrollo e investigación de nuevos fármacos o moléculas bioactivas es una de las metas de la ciencia, tanto en el pasado como en la actualidad. Las estrategias y métodos sintéticos del siglo XX alcanzaron sus límites con moléculas como la palitoxina, para obtener dicha molécula el número de pasos sintéticos supera los 100. El objetivo del siglo XXI debe ser lograr más con menos, y para hacerlo, los químicos debemos analizar los factores que limitan la síntesis orgánica tradicional.¹ Para ello, la química actual, en particular la química medicinal, tiene como desafío llegar a productos activos con eficiencia química, es decir crear selectivamente moléculas complejas, en una secuencia sintética única, sin intermedios ni refuncionalizaciones, con buenos rendimientos,² llegando directamente a la molécula objetivo obteniendo no solamente su esqueleto, sino que también el correcto ordenamiento de los grupos funcionales.³ A su vez, también se debería tener en cuenta la economía temporal, energética y de trabajo de la reacción, así como el uso de condiciones amigables con el medio ambiente, reduciendo su toxicidad y peligrosidad,⁴ siguiendo los principios de la química verde.⁵ El desarrollo sustentable se ha convertido en un ideal fundamental del siglo XXI, la conservación y gestión de los recursos es el aspecto más importante. El desarrollo sustentable, fue definido por la *World Commission on Environment and Development* en 1987 en el informe Brundtland, “*Our Common Future*” como: “la capacidad que para satisfacer las necesidades de las generaciones actuales sin comprometer los recursos y oportunidades para el crecimiento y desarrollo de las generaciones futuras” El mismo debe integrar tres aspectos, la sostenibilidad social, ambiental y económica, es decir lograr una prosperidad económica sostenida en el tiempo protegiendo al mismo tiempo los sistemas naturales del planeta y proveyendo una alta calidad de vida para las personas.⁶ La química tiene un papel significativo que desempeñar para lograr la sustentabilidad y los químicos deben ser conscientes de la necesidad de lograr este reto y tomar la iniciativa a la hora de desarrollar nuevas tecnologías.⁷

¹ Timothy Newhouse, T; Baran, P; Hoffmann, R.W. *Chem.Soc.Rev.* **2009**, 38, 3010–3021

² a) Vilches, A.; Gil Pérez, D. *Educación Química.* **2013**, 24, 199-206; b) DuPont, J. *Química Nova* **2000**, 23, 825-831.

³ Gaich, T.; Baran, P.S. Aiming for the ideal synthesis. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4657-4673.

⁴ Zimmerman, J; Anastas, P. *Science.* **2015**, 347, 1198-1199.

⁵ a) Anastas, P., Eghbali, N. *Green Chem.* **1999**, 1, 1-8; b) Kirchhoff, M.M. *Resources, Conservation and Recycling.* **2005**, 44, 237–243.

⁶ Goodland, R. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1995**, 26, 1–24.

⁷ a) Matlin, S. A; Mehta, G; Hopf, H; Krief, A. *Nat. Chem.* **2016**, 8, 393–399; b) Collins, T. *Science* **2001**, 291, 48-49. c) Clark, J. H; Breeden, S. W; Summerton, L. *Future Med. Chem.* **2009**, 1, 3, 409–413. d) Anastas, P; Zimmerman, J. *Green Chem.* **2019**, 21, 6545-6566.

1.2- Química verde

La idea de la química verde se desarrolló inicialmente en EE. UU. como una respuesta a la Ley de Prevención de la Contaminación de 1990, que declaró política nacional eliminar la contaminación mediante un diseño mejorado (incluidos cambios rentables en productos, procesos, uso de materias primas y reciclaje) en lugar de tratamiento y eliminación. En 1991, la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA, por sus siglas en inglés) creó un programa de subvención de investigación que fomentaba el rediseño de productos y procesos químicos existentes para reducir los impactos en la salud humana y el medio ambiente. La presentación de los premios anuales *Presidential Green Chemistry Challenge Awards* en 1996 llamó la atención sobre los éxitos académicos e industriales de la química verde. A mediados y finales de la década de 1990 se produjo un aumento en el número de reuniones internacionales dedicadas a la química verde. Los *12 Principios de la Química Verde* se publicaron en 1998,⁸ proporcionando al nuevo campo un conjunto claro de directrices para un mayor desarrollo. En 1999, la *Royal Society of Chemistry* estableció su revista *Green Chemistry*. En los últimos 20 años, las redes internacionales han proliferado, los temas especiales dedicados a la química verde han aparecido en las principales revistas y los conceptos de química verde han seguido ganando terreno.⁹

La química verde se define como “el diseño de productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen el uso y la generación de sustancias peligrosas”.¹⁰ Esta definición marca un cambio importante en la manera en que las cuestiones ambientales han sido consideradas o ignoradas en el diseño de nuevas moléculas o procesos, e involucra el impacto de los productos y procesos químicos como criterios de diseño. Otro aspecto relevante de dicha definición es la frase "uso y generación", en lugar de centrarse sólo sobre las sustancias indeseables que podrían ser producidas en un proceso, la química verde también incluye todas las sustancias que son parte del proceso. También se incluye el término "peligroso" en esta definición. La química verde intenta reducir los riesgos y prever la contaminación haciendo frente a los peligros intrínsecos de las sustancias en lugar de las circunstancias y

⁸ Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: Oxford, U.K., 1998

⁹ Anastas, P. T.; Beach, E. S. (2009). *Changing the Course of Chemistry. Green Chemistry Education, 1–18*. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC

¹⁰ Anastas, P., Eghbali, N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301–312.

condiciones de su uso que pueda aumentar su riesgo. El riesgo, se define como el producto de los peligros y exposiciones: $\text{Riesgo} = \text{Peligro} \times \text{Exposición}$ ¹¹.

Normalmente la reducción de riesgos se centra en la reducción de la exposición a sustancias peligrosas, por lo que se requieren altas tecnologías de control y tecnología de tratamiento, como también equipamiento de protección personal tales como respiradores o guantes. Reduciendo el riesgo a través de la reducción del peligro, la química verde intenta reducir el costo y el potencial para el fracaso de los controles de exposición.¹²

El concepto “diseño” es el aspecto más importante de esta definición, ya que involucra la intención humana de crear, planear algo nuevo. Los doce principios de la química verde (Figura 1.1) son “reglas de diseño” que ofrecen un marco para los químicos que desean trabajar en el diseño de nuevos materiales, productos, procesos y sistemas que sean benignos para la salud humana y el medio ambiente.¹³ Dichos principios no son una simple lista de objetivos, sino más bien un conjunto de metodologías para lograr un propósito, el diseño ecológico y sustentable. No pretenden ser doce metas independientes, sino que un sistema integrado de diseño que se refuerzan mutuamente.

Antes de continuar hablando de los 12 principios de la química verde, cabe la pena mencionar que química verde y química sustentable, si bien muchas veces en la literatura aparecen como sinónimos no son conceptos totalmente equivalentes. La química sostenible incluye aspectos económicos, sociales y de otro tipo relacionados con la fabricación y aplicación de productos químicos y productos. Su objetivo no es solo la síntesis o la fabricación de productos químicos verdes, sino que también incluye la contribución de dichos productos a la sostenibilidad misma. La integración de la química verde y sustentable, tanto en el laboratorio como en la industria, requiere que los químicos piensen de una manera interdisciplinaria, de mente abierta y tengan en cuenta el mundo fuera del laboratorio desde el comienzo. Esto incluye tener en cuenta no solo las funcionalidades de una molécula que son necesarias para su aplicación, sino también su impacto y significado en las diferentes etapas de su ciclo de vida.

14

¹¹ Poliakoff, M; Fitzpatrick, J.M; Farren, T.R; Anastas, P.T. *Science* **2009**, 297, 807-810.

¹² Tundo, P; Anastas, P; et al. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1207–1228.

¹³ Anastas, P; Zimmerman, J. *Environmental Science & Technology.* **2003**, 95–101.

¹⁴ Kümmerer K., Clark J. (2016) Green and Sustainable Chemistry. In: Heinrichs H., Martens P., Michelsen G., Wiek A. (eds) Sustainability Science. Springer, Dordrecht

- 1. Prevención.** Es preferible evitar la producción de un residuo que tratarlo o limpiarlo una vez que se haya formado.
- 2. Economía atómica.** Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos.
- 3. Uso de metodologías que generen productos con toxicidad reducida.** Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente.
- 4. Generar productos eficaces, pero no tóxicos.** Los productos químicos deberán ser diseñados de manera que mantengan la eficacia y a la vez que reduzcan su toxicidad.
- 5. Utilizar solventes y auxiliares más seguros.** Se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc.) y en el caso de que se utilicen que sean lo más inocuos posible.
- 6. Disminuir el consumo energético.** Los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible. Se intentará llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambientales.
- 7. Utilizar materias primas renovables.** La materia prima ha de ser preferiblemente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.
- 8. Evitar la derivatización innecesaria.** Se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos) ya que dichos pasos requieren reactivos adicionales y pueden generar desechos.
- 9. Potenciación de la catálisis.** Se emplearán catalizadores (lo más selectivos posible), reutilizables en lo posible, en lugar de reactivos estequiométricos
- 10. Generar productos biodegradables.** Los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente, sino que se transformen en productos de degradación inocuos.
- 11. Desarrollar metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real.** Las metodologías analíticas serán desarrolladas posteriormente para permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas
- 12. Minimizar el potencial de accidentes químicos.** Se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios.

Figura 1.1. Los doce *Principios de la Química Verde*.⁸

El primer principio, “Es preferible evitar la producción de un residuo que tratarlo o limpiarlo una vez que se haya formado”, es el que enmarca a todos los demás. La prevención de residuos es una piedra angular de la química verde, los costos de los desechos químicos son

una grave carga económica, ambiental y social, tanto como para la industria como la academia.¹⁵ Existen en la industria farmacéutica ejemplos de prevención de residuos mediante la intensificación de procesos y optimización del diseño de rutas sintéticas.

Por ejemplo para la sertralina, la empresa Pfizer diseñó un proceso combinado para simplificar el proceso de fabricación original de múltiples pasos, en un solo paso (Figura 1.2). Este proceso mejorado de la ruta de la sertralina elimina el uso de materiales peligrosos como $TiCl_4$, reduce significativamente los subproductos indeseables, reduce el número de aislamientos intermedios, mejora el rendimiento general del proceso y la productividad a escala industrial, así como una disminución en la utilización de materia prima, una mejor eficiencia energética, un menor uso del agua y la eliminación de varios disolventes y desechos tóxicos.¹⁶

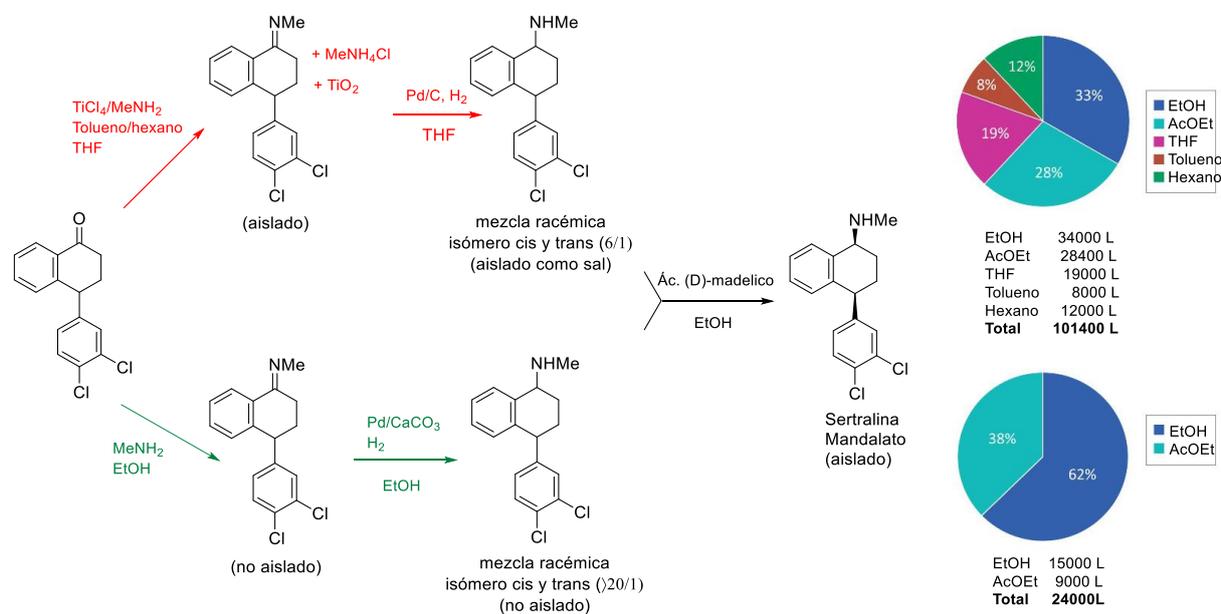


Figura 1.2. Comparación entre la antigua y nueva ruta de síntesis comercial de Sertralina y la utilización de disolventes (L disolvente / 1000 kg de clorhidrato de sertralina) en ambas.¹⁶

Cuando no se pueden evitar los subproductos, se deben considerar otras soluciones innovadoras, por ejemplo, buscar que los desechos puedan convertirse en una nueva materia prima con un valor significativo para otro proceso, así como también el reciclaje, estrategias que pueden ser efectivas para valorizar residuos y avanzar hacia una economía circular.¹⁷

¹⁵ Erythropel, H.C.; Zimmerman, J.B.; de Winter, T.M.; Petitjean, L.; Melnikov, F.; Lam, C.H.; Lounsbury, A.W.; Mellor, K.E.; Jankovic, N.Z.; Tu, Q.S.; Pincus, L.N.; Falinski, M.M.; Shi, W.B.; Coish, P.; Plata, D.L.; Anastas, P.T.. *Green Chem.*, **2018**, 20, 1929-1961.

¹⁶ Taber, G.P.; Pfisterer, D.M.; Colberg, J.C. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, 8, 385-388.

¹⁷ Sheldon, R.A. *Green Chem.* **2016**, 18, 3180-3183.

Los principios pueden utilizarse para determinar si una reacción es ambientalmente benigna o no, pero son principios cualitativos. Por lo que a la hora de evaluar dos procesos distintos con un mismo fin pero que cumplan de igual manera los principios, se genera la duda de cuál es más “verde”. Es entonces que se ve la necesidad de la cuantificación, por lo que la química verde introduce medidas generales (métricas) para dar significado cuantitativo a los procesos químicos. Algunas de las métricas generalmente usadas se muestran en la Figura 3, clasificadas por categorías. Como se observa no existe una única forma de medir si un proceso es verde o no, es decir, no existe una única métrica que pueda abarcar todos los aspectos de la química verde, por lo tanto, de acuerdo con el enfoque y al contexto que se le quiera dar a la evaluación, es la métrica que se va a utilizar. Tampoco hay un consenso con respecto a qué conjunto de métricas usar para determinado proceso.^{18, 19} En este sentido se propuso un conjunto de herramientas con métricas escalonadas para racionalizar la mejora del diseño de rutas sintéticas en diferentes etapas del desarrollo de fármacos.²⁰

El segundo principio: “Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos”, se refiere a la economía atómica (EA) de las reacciones, término ya definido por Trost en 1991.²¹ La EA es una métrica (Figura 1.3) que se calcula dividiendo el peso molecular del producto por la suma total de los pesos moleculares de todas las sustancias formadas en la ecuación estequiométrica para la reacción involucrada, una síntesis ideal tendría una EA del 100%, en donde todos los átomos de los reactivos estarían incorporados en el producto deseado. EA es un número teórico que supone el uso de cantidades estequiométricas exactas de materiales de partida y un rendimiento químico del 100%, y no tiene en cuenta los disolventes y sustancias utilizados en las etapas de aislamiento y purificación de la reacción.

No obstante, es una herramienta extremadamente útil para la evaluación rápida, antes de que se realicen experimentos, de la eficiencia de los recursos y de las cantidades de desechos que se generarán en procesos alternativos.²¹

¹⁸ Curzons, A.D; Constable, D.J.C; Mortimer, D.N; Cunningham, V.L. *Green Chem.* **2001**, 3, 1–6.

¹⁹ Constable, D.J.C; Curzons, A.D; Cunningham, V.L. *Green Chem.* **2002**, 4, 521–527.

²⁰ McElroy, C.R. *Green Chem.* **2015**, 17, 3111-3121.

²¹ Trost, B.M. *Science.* **1991**, 254, 1471-1477.

Categoría	Unidades
Masa	
$\frac{\text{masa total (kg)}}{\text{masa de los productos (kg)}}$ (Intensidad de masa)	Kg/kg
$\frac{\text{masa total de los solventes (kg)}}{\text{masa de los productos (kg)}}$	Kg/kg
$\frac{\text{masa de producto aislado (kg)}}{\text{masa total de reactivos(kg)}} \times 100$ (EMR: Eficiencia de masa de la reacción)	%
$\frac{\text{PM } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \text{ de producto}}{\text{PM total de los reactivos}} \times 100$ (Economía Atómica)	%
Energía	
$\frac{\text{energía total del proceso (MJ)}}{\text{masa de producto (kg)}}$	MJ/kg
$\frac{\text{energía de recuperación de disolventes (MJ)}}{\text{masa de producto (kg)}}$	MJ/kg
Persistencia y Bioacumulación	
$\frac{\text{masa persistente+bioacumulada (kg)}}{\text{masa de producto (kg)}}$	Kg/kg
Ecotoxicidad	
$\frac{\text{masa persistente+bioacumulada (kg)}}{\frac{\text{EC50 material}}{\text{EC50 DDT control}}}$	Kg
Salud Humana	
$\frac{\text{masa del material (kg)}}{\text{limite de exposición (ACGIH)(ppm)}}$	Kg/ppm
Emisiones de gases de efecto invernadero	
$\frac{\text{masa de gases de ef.invernadero (eq.en kg de CO2)}}{\text{masa de producto (kg)}}$	Kg/kg (como CO ₂)
Disolventes	
Número de diferentes disolventes	Número
Eficiencia de recuperación	%
Energía para recuperar disolventes	MJ/kg
Intensidad de masa de disolventes recuperados	Kg/kg

Figura 1.3. Métricas en química verde.¹⁸

Uno de los primeros ejemplos en la industria farmacéutica que aplican dichas ideas y que le valió el premio *Greener Synthetic Pathways* del primer *Presidential Green Chemistry Challenge* del año 1997 a la empresa BHC (ahora BASF Corporation) fue el diseño de una nueva ruta de síntesis para el ibuprofeno.²² Dicha molécula fue preparada y patentada por

²² <https://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-1997-greener-synthetic-pathways-award>

primera vez en 1961. La ruta sintética original implicaba seis pasos consecutivos, donde de la masa de todos los átomos que ingresaron al proceso, el 60% eran residuos. A principios de la década de 1990, la compañía BHC rediseñó la ruta sintética utilizando muchos de los principios de la química verde. El poder de su enfoque se demuestra al comparar el primer paso de las dos rutas (Figura 1.4). Originalmente, se requería tricloruro de aluminio en exceso para promover la reacción, generando hidróxido de aluminio, como desecho sólido. Pero en la ruta verde, en su lugar se utiliza ácido fluorhídrico en cantidades catalíticas, el cual se recicla y se utiliza en el próximo lote de producto. La ruta verde luego es diferente a la del proceso original, solo se requieren dos pasos más (en comparación con cinco más necesarios en el proceso original). Cada paso eliminado reduce los recursos utilizados y los residuos generados. Los dos pasos restantes en la ruta verde son catalíticos, a diferencia de los de la síntesis original, lo que reduce aún más el desperdicio. La ruta verde produce más ibuprofeno en menos tiempo y usa menos energía que el proceso original, lo que significa productos más baratos para el consumidor con mayores ganancias para los fabricantes.²³

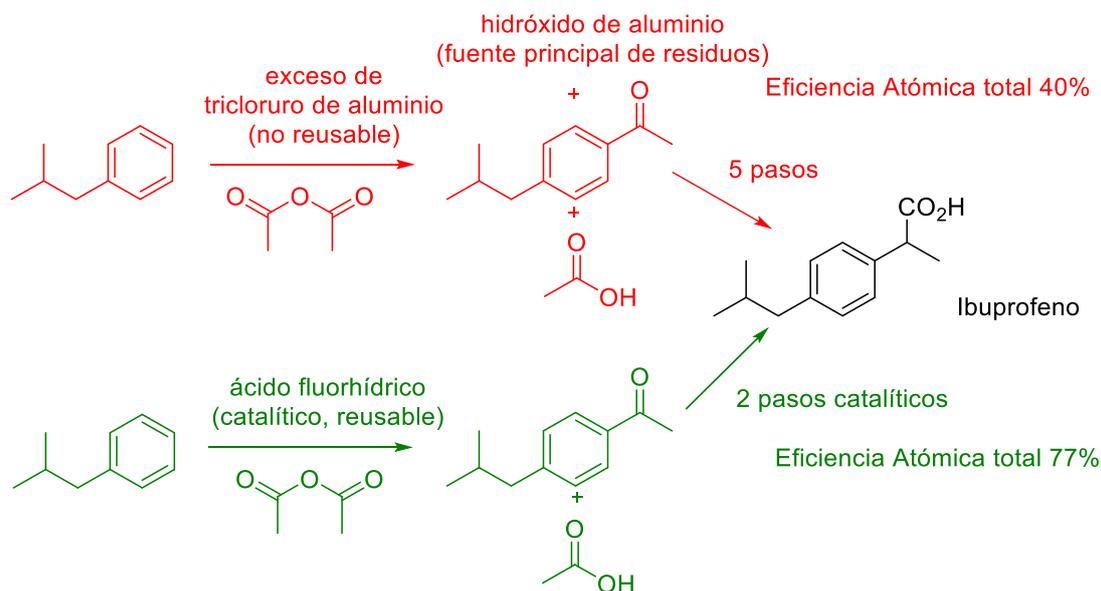


Figura 1.4. Comparación entre la antigua y nueva ruta de síntesis comercial de Ibuprofeno.^{23a}

Otros principios y métricas de interés para este trabajo se comentarán a lo largo de la introducción y resultados.

²³ a) Poliakoff, M; Licence, P. *Nature*. **2007**, 450, 810–812. b) Murphy, M. A. *Found of Chem*. **2018**, 20, 2, 121–165.

1.3- Técnicas verdes en síntesis orgánica

Desde el punto de vista medio ambiental, no es deseable que un químico sintetice una nueva molécula, e ignore las posibles consecuencias de su impacto en nuestra biosfera. La ideología de la química verde requiere el desarrollo de nuevas reactividades químicas y de nuevas condiciones de reacción que puedan proporcionar beneficios para la síntesis química en términos de recursos y eficiencia energética, selectividad del producto, simplicidad operativa, salud y seguridad ambiental.²⁴ En este contexto, a continuación se tratan en mayor profundidad algunos de los 12 principios de la química verde relevantes para esta tesis y también nuevas metodologías de síntesis orgánica, como alternativas a las clásicas que no siempre cumplen con dichos principios.

1.3.1- Disolventes verdes

Las reacciones químicas se han llevado a cabo en disolución durante siglos, cuando pensadores y filósofos creían que la disolución de los reactivos en un disolvente era necesaria para inducir un cambio químico. Esta química ha proporcionado innumerables beneficios a la sociedad moderna, pero junto con el avance industrial, el mundo se ha visto afectado por el mal uso y abuso de sustancias tóxicas para la salud humana y el medio ambiente.²⁵ Es así como uno de los aspectos clave en el que hay que trabajar es en los disolventes. Los disolventes son materiales auxiliares, no son una parte integral de los reactivos, sin embargo, juegan un papel importante en la producción y la síntesis química. La función primaria de los disolventes es facilitar la transferencia de masa para modular las reacciones en términos de velocidad de reacción, rendimientos, conversiones y selectividad. La mayor cantidad de “sustancias auxiliares” de los procesos químicos está asociado con el uso de disolventes orgánicos volátiles,²⁶ el uso de disolventes representa más del 50 % de la masa utilizada para producir un lote en la industria farmacéutica. Este uso de disolvente es un gran problema por muchas razones, incluidos el costo, el tiempo, la energía, la salud ambiental y humana.²⁷ Es así como el quinto principio de la química verde refiere a esta temática: Se evitará, en lo

²⁴ Zimmerman, J.B.; Anastas, P.T. *Scienc.* **2015**, 347, 215–215

²⁵ Zhang, W; Berkeley, W.C. *Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry*, Second Edition. Kendra Leahy Denlinger, K; Mack, J. Capítulo 13. Wiley, 2018.

²⁶ Joshi, D; Adhikari, N. *J. Pharm Res Inter.* **2019**, 28, 1-18.

²⁷ Constable, D.J.C.; Jimenez-Gonzalez, C.; Henderson, R.K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 11, 133–137.

posible, el uso de sustancias prescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc.) y en el caso de que se utilicen que sean lo más inocuos posible.⁸ Por lo tanto, es de suma importancia la búsqueda de alternativas verdes desde la industria farmacéutica pero también en los grupos de investigación académica.²⁸ Como por ejemplo el caso del diclorometano, un disolvente muy utilizado en los laboratorios de química orgánica académicos, que incluso en pequeñas cantidades pueden ser peligroso.²⁹

En este sentido se han estudiado opciones más ecológicas y nuevas metodologías sintéticas han emergido, a destacar las reacciones libres de disolvente, la utilización de disolventes verdes como el agua, los fluidos supercríticos,³⁰ los líquidos iónicos,³¹ los disolventes producidos a partir de recursos renovables,³² entre otros.

Por otro lado, se han desarrollado varias guías y herramientas de selección de disolventes³³, por ejemplo, las publicadas por las compañías farmacéuticas Pfizer,³⁴ Sanofi³⁵ y AstraZeneca.³⁶ También por la *ACS Green Chemistry Institute® Pharmaceutical Roundtable*³⁷ y el proyecto CHEM21 (Figura 1.5).³⁸ En este último caso se realizó una clasificación de disolventes según las siguientes categorías:

- Recomendado (o preferido): disolventes que se probarán primero en una reacción, teniendo en cuenta las condiciones del proceso y evitar incompatibilidad química.
- Problemático: estos disolventes se pueden usar en el laboratorio, pero su implementación en la planta piloto o en la escala de producción requerirá medidas específicas.

²⁸ Nicponski, D. R.; Ramachandran, P. V. *Future Med. Chem.* **2011**, 3, 12, 1469–1473.

²⁹ Vidal, S. *ACS Cent. Sci.* **2020**, 6, 2, 83–86

³⁰ Knez, Ž; Pantić, M; Cör, D.; Novak, Z.; Knez Hrnčič, M. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification.* **2019**, 141, 107532.

³¹ a) Vekariya, R.L. *Journal of Molecular Liquids.* **2017**, 227, 44–60; b) Jessop, P.J. *Faraday Discuss.* **2018**, 206, 587–601.

³² Clark, J.H; Farmer, T.J; Hunt, A.J.; Sherwood, J.. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 17101–17159.

³³ Byrne, F.P; Jin, S; Paggiola, G; Petchey, T.H.M; Clark, J.H; Farmer, T.J; Hunt, A.J; McElroy, C.R; Sherwood, J. *Sustain Chem Process.* **2016**, 4, 7.

³⁴ Alfonsi, K.; Colberg, J.; Dunn, P.J.; Fevig, T.; Jennings, S.; Johnson, T.A.; Kleine, H.P.; Knight, C; Nagy, M.A.; Perry, D.A.; Stefaniak, M. *Green Chem.* **2008**, 10, 31–36.

³⁵ Prat, D., Pardigon, O. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, 17, 1517–1525.

³⁶ Diorazio, L.J.; Hose, D.R.J.; Adlington, N. K. *Org. Proc. Res. Dev.* **2016**, 20, 760–773.

³⁷ ACS Green Chemistry Institute® Pharmaceutical Roundtable. Solvent Selection Guide: Version 2.0. March 21, 2011.

<http://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/research-innovation/tools-for-green-chemistry.html> (23/10/2019)

³⁸ a) Prat, D.; Wells, A.; Hayler, J.; Sneddon, H.; McElroy, R.; Abou-Shehadad, S.; Dunn, P.J. *Green Chem.* **2016**, 18, 288–296;

b) Prat, D., Wells, A.; Hayler, J.; Sneddon, H.; McElroy, R.; Abou-Shehadad, S.; Dunn, P.J. *Green Chem.* **2015**, 17, 4848–4848.

- Peligroso: las limitaciones en el escalado son muy importantes. La sustitución de estos disolventes durante el desarrollo del proceso es una prioridad.

- Altamente peligroso: disolventes que deben evitarse, incluso en el laboratorio.

Esta clasificación puede ser muy útil para la selección rápida de un disolvente, en particular en instituciones académicas o empresas que no tienen sus propias guías de selección de disolventes.

Clasificación	Disolventes
Recomendados	Agua, MeOH, EtOH, <i>i</i> -PrOH, <i>n</i> -BuOH, <i>t</i> -BuOH, Etilenglicol, Acetona, MEK, MIEBK, Acetato de etilo, <i>i</i> -PrOAc, <i>n</i> -BuOAc, Anisol.
Problemáticos	Alcohol bencílico, Ciclohexanona, Acetato de metilo, THF, Me-THF, Heptano, Ciclohexano, Me-ciclohexano, Tolueno, Xileno, Clorobenceno, Acetonitrilo, DMPU, DMSO, Ác. Fórmico, Ác. Acético, Ac ₂ O.
Peligrosos	Di-isopropileter, MTBE, 1,4-dioxano, DME, Pentano, Hexano, DCM, DMF, DMAc, NMP, Sulfolano, Metoxi-etanol, Piridina, NEt ₃ .
Muy peligrosos	Dietileter, Benceno, Cloroformo, CCl ₄ , DCE, HMPA, Nitrometano.

Figura 1.5. Clasificación de disolventes realizada por el proyecto CHEM21. ³⁸

Al momento de buscar un disolvente apropiado para un proceso o producto planeado, no siempre es posible encontrar un disolvente verde con las propiedades deseadas y además existe el problema de cómo saber si dicho disolvente es verde. Por lo tanto, existen todavía grandes desafíos a resolver en el área, por ejemplo: que existan disolventes verdes como reemplazos para disolventes no verdes de cualquier tipo; encontrar un disolvente aprótico polar que sea más fácil de eliminar que los ejemplos existentes; encontrar y usar métodos para evaluar los efectos ambientales de los disolventes, incluyendo su síntesis, uso y disposición; encontrar maneras de eliminar los disolventes sin destilación.³⁹

³⁹ Jessop, P.J. *Green Chem.* **2011**, 13, 1391–1398.

1.3.1.1- Síntesis libre de disolvente

Como ya se mencionó, el quinto principio de la química verde se refiere a que en lo posible se debe evitar el uso de sustancias que no sean imprescindibles, como son los disolventes. Por lo que una situación ideal sería la no utilización de disolventes, es decir llevar a cabo la reacción libre de disolventes. La naturaleza tóxica y volátil de muchos disolventes orgánicos, particularmente los hidrocarburos clorados que se usan comúnmente en grandes cantidades para la síntesis orgánica, son un serio problema para la salud humana y el medio ambiente. Por lo tanto, proponer una reacción sin disolvente ha ganado una atención indiscutible en los últimos tiempos en el área de la síntesis verde.⁴⁰ La síntesis sin disolvente muestra frecuentemente una aceleración en la velocidad de reacción. Son llevadas a cabo a temperatura ambiente o también con diferentes métodos de calentamiento como irradiación de microondas,⁴¹ ultrasonido,⁴² mecanoquímica,⁴³ entre otros.⁴⁴ Se puede llevar a cabo una reacción libre de disolvente usando los reactivos solos o junto a un catalizador para lograr un alto grado de estereoselectividad en el producto deseado, reduciendo así posibles subproductos y maximizando la velocidad de reacción. Por ejemplo, Dey y col. han reportado la síntesis de dihidropirimidinonas mediante una condensación de Biginelli libre de disolventes y catalizadores a escala de kilogramos, en condiciones de reacción suaves que permiten una variedad de funcionalidades sensibles (Figura 1.6). Este heterociclo es un grupo de gran interés para la industria y la academia debido a sus prometedoras actividades biológicas. Anteriormente se habían desarrollado una gran cantidad de procedimientos sintéticos basados en modificaciones de la reacción de Biginelli, pero utilizando catalizadores y disolventes no amigables con el medio ambiente.⁴⁵

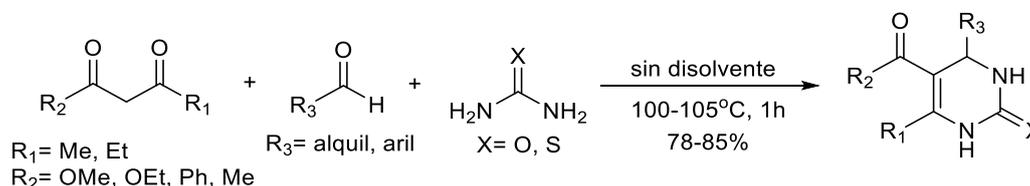


Figura 1.6. Reacción de Biginelli libre de disolventes.⁴⁵

⁴⁰ Gawande, M. B; Bonifacio, V.D.B; Luque, R.; Branco, P.S.; Varma, R.S. *ChemSusChem* **2014**, 7, 24–44.

⁴¹ Gowri, S; Gaonkar, S.L. *UPI Journal of Chemical and Life Sciences*. **2018**, 1, 45-58.

⁴² Crawford, D. E. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, 13, 1850–1856.

⁴³ Andersen, J; Mack, J. *Green Chem.* **2018**, 20, 1435-1443

⁴⁴ Avila-Ortiz, C. G; Juaristi, E. *Molecules*. **2020**, 25, 16, 3579.

⁴⁵ Ranu, B. C; Hajra, A; Dey, S.S. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, 6, 817–818.

Las ventajas de las reacciones sin disolvente son:

- (a) Económico (ahorro de costos)
- (b) No se requiere recolectar, purificar, reciclar y/o eliminar el disolvente después de completar la reacción.
- (c) Debido a la mayor disponibilidad de reactivos, la velocidad de reacción es generalmente alta, es decir, reduce el tiempo de reacción.
- (d) Respetuoso con el medio ambiente
- (e) Disminución del consumo de energía
- (f) Gran reducción en el volumen del tamaño del lote (tamaño del reactor) y la inversión de capital.

La noción anterior de que "ninguna reacción es posible sin el uso de disolvente" ya no es aplicable y podríamos decir que el mejor disolvente es no usar uno.⁴⁶

1.3.1.2- Síntesis orgánica en medio acuoso

En el caso que se necesite, un disolvente verde debe ser natural, no tóxico, barato y fácilmente disponible. Adicionalmente podría tener beneficios, como ayudar a la evolución de la reacción, la separación de la misma, o el reciclaje del catalizador. La utilización de agua, es un excelente ejemplo de esta definición.⁴⁷ La vida tal como la conocemos, es posible gracias a las reacciones químicas que suceden en medio acuoso.⁴⁸ Pero en la química orgánica, generalmente la presencia de agua en una reacción es indeseada, ya que muchas veces es la responsable de reducir el rendimiento y la reproducibilidad de la misma. Es así que muchas veces los químicos nos tomamos grandes molestias para excluir incluso rastros de agua de los medios de reacción.⁴⁹ En general la síntesis orgánica utiliza disolventes orgánicos, derivados del petróleo, que contribuyen a la generación de desechos tóxicos y son riesgosos para la salud y el medio ambiente.

En 1980, Rideout y Breslow fueron pioneros en el estudio sobre la utilización de agua como disolvente en reacciones de Diels-Alder (Figura 1.7) donde observaron una aceleración

⁴⁶ Sarkar, A.; Santra, S.; Kundu, S.K.; Hajra, A.; Zyryanov, G.V.; Chupakhin, O.N.; Charushin, V.N.; Majee A. *Green Chem.* **2016**, *18*, 4475-4525.

⁴⁷ Li, C.-J.; Trost, B. M. *PNAS.* **2008**, *105*, 13197-13202.

⁴⁸ Lipshutz, B. H.; Ghorai, S.; Cortes-Clerget, M. *Chemistry - A European Journal.* **2018**, *24*, 6672-6695.

⁴⁹ Romney, D. K.; Arnold, F. H.; Lipshutz, B. H.; Li, C.-J. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 7319-7322

significativa de dichas reacciones al utilizar reactivos hidrofóbicos y agua como disolvente, en comparación a cuando es llevada a cabo en disolventes orgánicos.⁵⁰

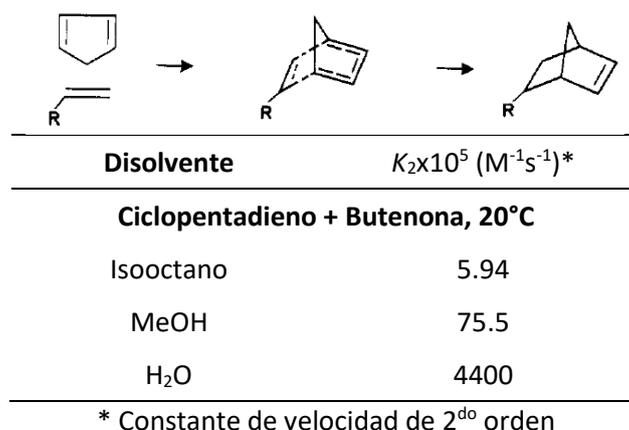


Figura 1.7. Esquema y velocidades de reacción de una reacción de Diels-Alder en distintos disolventes.⁵⁰

Estas observaciones fueron racionalizadas por el efecto hidrofóbico,⁵¹ esta propiedad del agua se da por las interacciones repulsivas entre las moléculas hidrofóbicas y el agua, lo que conduce a la formación de agregados hidrofóbicos, llamados clatratos, que permiten reducir la superficie de contacto entre ellos. Si existen varios clatratos en el medio, estos se unen formando clatratos más grandes (Figura 1.8), aumentando la concentración local de las moléculas hidrofóbicas, lo que explica el aumento de la velocidad de la reacción.⁵²

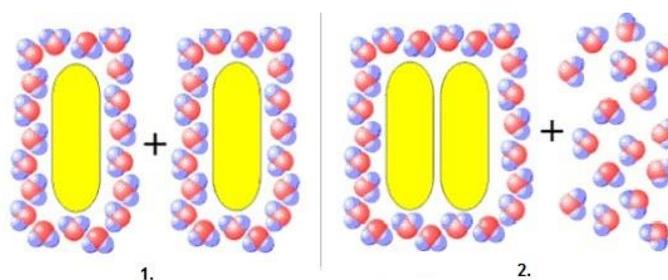


Figura 1.8. Representación de los estados posibles entre moléculas hidrofóbicas y agua: 1. Las dos moléculas hidrofóbicas están separadas y cada una tiene su propia “jaula” de moléculas de agua ordenadas alrededor. 2. Las dos moléculas hidrofóbicas están juntas, compartiendo una “jaula” de moléculas de agua en común. El número total de moléculas de agua que forman el clatrato es menor, por lo que parte de las moléculas que estaban fijas están libres en la disolución.⁵³

⁵⁰ Rideout, D. C; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7816-7817.

⁵¹ Breslow, R. *Acc. Chem. Res.*, **1991**, 24, 159.

⁵² Pirrung, M.C., Sarma, K. D. *Tetrahedron*. **2005**, 61, 11456-11472.

⁵³ Interacciones hidrofóbicas en <http://www.biorom.uma.es/contenido/JCorzo/temascompletos/InteraccionesNC/inicio.htm> (último acceso: 01/04/2020).

Por otro lado, la propiedad de los disolventes llamada densidad de energía cohesiva (DEC), la fuerza intermolecular que le da a los líquidos su cohesividad, puede también explicar el efecto observado. La DEC es la energía necesaria para remover una molécula de sus vecinas más cercanas en el centro del líquido, creando de esta manera una cavidad. Su fórmula está definida por la energía molar de vaporización dividido por el volumen molar (Figura 1.9). Aplicando esta fórmula se ha calculado la DEC para varios líquidos, el agua tiene una de las DEC más altas, 550 cal/cm³ a 25°C. Este concepto de la DEC permite la consideración energética del efecto hidrófobo. En la medida que la DEC está inversamente relacionada con el volumen molar, el agua tiene una de las más grandes DEC debido a su pequeño volumen molar (18 cm³/mol), la más pequeña de cualquier líquido comúnmente usado como un disolvente de reacción. Cuando compuestos orgánicos inmiscibles en agua interaccionan con ella, un vacío se crea y la cápsula de moléculas de agua formada alrededor del compuesto hidrófobo puede ser descrita como un clatrato, como se definió anteriormente. El costo energético de desplazar/liberar agua para formar este vacío en el volumen de agua se refiere a la DEC.⁵⁴

$$DEC = \frac{\Delta H_{vap} - RT}{M_r / \rho}$$

Figura 1.9. Fórmula de la densidad de energía cohesiva (DEC), donde: ΔH_{vap} = entalpía de vaporización, M_r = masa y ρ =densidad.

Para mantener la red de enlaces de hidrógeno (relacionada con su alta densidad de energía cohesiva), el agua se envuelve alrededor de estos agregados, actuando como una presión interna que acelera las reacciones.

Aunque no existe un acuerdo general sobre las bases químicas que rigen estas reacciones ni el lugar exacto donde se producen, evidencias experimentales sugieren que estas reacciones deben estar ocurriendo en la interfase agua-orgánica,⁵⁵ en consecuencia, estarían influenciadas por las propiedades de las moléculas de agua y de los reactivos en dicha interfase.⁵⁶ Es así que una teoría sugiere que la dramática aceleración de reacciones en un

⁵⁴ Pirrung, M.C; Das Sarma, K; Wang, J. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 8723–8730.

⁵⁵ Mellouli, S.; Bousekkine, L.; Theberge, A.B.; Huck, W.T.S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 7981–7984.

⁵⁶ a) Beattie, J.K.; McErlean, C.S.P.; Phippen, C.B.W. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 8972–8974; b) Klijn, J.E.; Engberts, J.B:F.N. *Nature* **2005**, 435, 746 – 747; c) Thomas, L.L.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3097–3104; d) Butler, R.N.; Coyne, A.G. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 6302–6337; e) Butler, R. N; Coyne, A. G. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 3, 1809–1817.

medio acuoso se debe principalmente a la facilidad de conexión de los grupos hidroxilo (OH) de las moléculas de agua interfacial para formar enlaces de hidrógeno con los grupos de enlace H-aceptor, en el estado de transición, en comparación con la de los reactivos, como se muestra en la Figura 1.10. De esta forma, se reduciría la barrera de activación y así mejoraría la tasa de conversión.⁵⁷

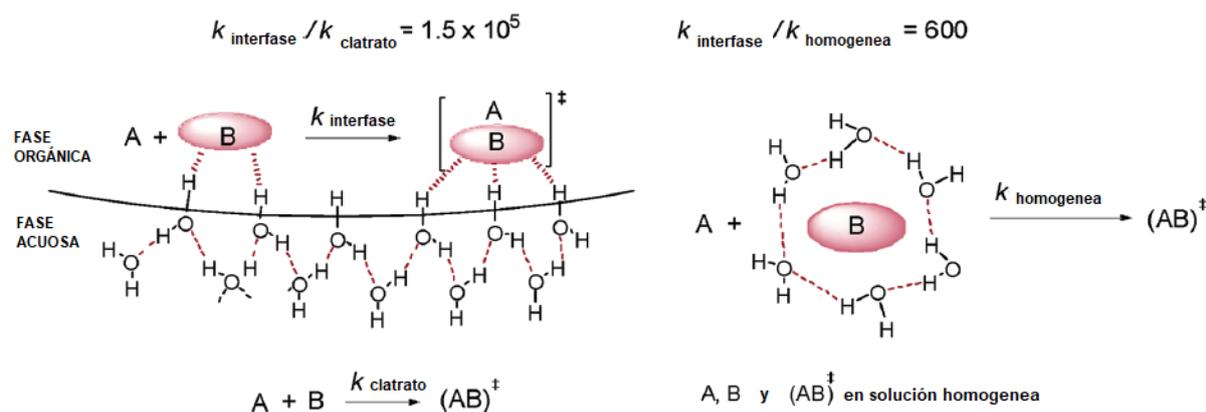


Figura 1.10. Esquema de catálisis en medio acuoso: comparación cuando se forman clatratos y cuando la solución es homogénea.⁵⁷

La utilización de agua como disolvente en distintas condiciones de reacción, ha generado la aparición de nuevos términos en la literatura como "sobre agua" ("on water") o "asistidas por agua" o "en agua" ("in water").

Las suspensiones acuosas, que incluyen reactivos que son insolubles en agua, son llamadas condiciones de reacción "sobre agua" ("on water") o "asistidas por agua", en donde el estado de transición se produce en el lado orgánico de la interfaz agua-fase orgánica. Condiciones "sobre agua" ("on water") se definen como aquellas cuando reactivos insolubles se agitan en emulsiones o suspensiones acuosas sin la adición de cualquier codisolvente orgánico. Este término fue definido como tal por el grupo del Dr. Barry Sharpless en 2005.⁵⁸ "Asistidas por agua" son aquellas condiciones en las que el agua forma una segunda fase que afecta la reacción que ocurre en la fase orgánica concentrada.⁵⁹ Las suspensiones acuosas que incluyen reactivos que son solubles en agua, son llamadas "en agua" ("in water"), en donde el estado de transición ocurre en el medio acuoso. Cuando alguno de los reactivos involucrados es parcialmente soluble en agua, el modo de reaccionar puede estar ocurriendo tanto de forma

⁵⁷ Jung, Y; Marcus, R.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5492-5502.

⁵⁸ Narayan, S.; Muldoon J.; Finn, M.G.; Fokin, V.V.; Kolb, H.C.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3275 – 3279.

⁵⁹ Hayashi, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 8103 –8104.

“on water” como “in water”, el reactivo con la mayor solubilidad en agua determina dónde encaja una reacción a lo largo de este espectro (Figura 1.11).⁶⁰

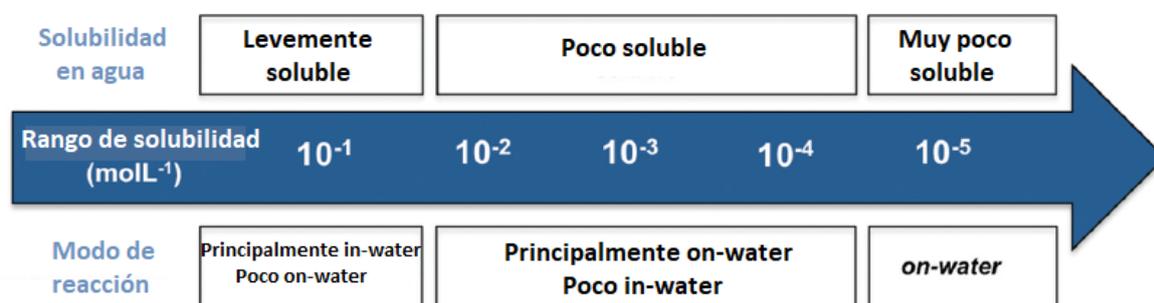


Figura 1.11. Transición gradual a reacciones “on water” a medida que la solubilidad en agua disminuye. Imagen modificada de referencia.⁶⁰

La utilización de agua como disolvente puede utilizarse junto a otras metodologías alternativas a las tradicionales para obtener mejores resultados de una manera más amigable con el medio ambiente, como lo son la irradiación con microondas⁶¹ o el ultrasonido,⁶² entre otras.

1.3.2- Síntesis orgánica asistida por microondas

El sexto principio de la química verde habla de la necesidad de disminuir el consumo energético a la hora de llevar a cabo una reacción. Según el cual lo ideal es llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente. En caso que sea necesario calentar el sistema, se deben buscar métodos eficientes de calentamiento, que reduzcan el consumo energético, como por ejemplo el uso de microondas.⁶³ Debemos tener en cuenta que los métodos de calentamiento convencionales generalmente son de transferencia de energía, ineficaces y lentos, pues dependen de las corrientes de convección y conductividad térmica de los materiales que penetren. En cambio, el calentamiento por irradiación de microondas se produce directamente por interacción con las moléculas del disolvente y/o reactivos presentes en la mezcla de reacción. La transferencia de calor eficiente es lograda por el calentamiento

⁶⁰ Butler, R. N; Coyne, A. G. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 9945–9960.

⁶¹ A) Dallinger, D.; Kappe, C.O. *Chem Rev.* **2007**, 107, 2563-91. B) Polshettiwar, V; Varma, R. S. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1546-1557.

⁶² a) Bandyopadhyay, D; Mukherjee, S.; Turrubiarres L.C.; Banik, B.K. *Ultrasonics Sonochemistry* **2012**, 19, 969–997; b) Xie, L.-Y.; Li, Y.-J.; Qu, J.; Duan, Y.; Hu, J.; Liu, K.-J.; Cao, Z.; He, W.-M. *Green Chem.* **2017**, 19, 5642-5646.

⁶³ a) Gronnow, M.J; White, R.J.; Clark, J.H.; Macquarrie, D.J. *Org. Process Res. Dev.* **2005**, 9, 4, 516–518; b) Gronnow, M.J; White, R.J.; Clark, J.H.; Macquarrie, D.J. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, 11, 2, 293-293.

dieléctrico, la principal ventaja del mismo sobre el calentamiento convencional es que las microondas se acoplan directamente con dipolos o moléculas iónicas presentes en la mezcla de reacción y la transferencia de energía ocurre en menos de un nanosegundo, lo que resulta en un rápido aumento de la temperatura.⁶⁴ Además, la irradiación de microondas provoca un calentamiento volumétrico a través del acoplamiento directo del campo electromagnético con las moléculas en la mezcla de reacción con un mínimo o ningún efecto de pared (Figura 1.12).⁶⁵ Por otro lado, el uso de recipientes sellados en reactores de microondas permite que las mezclas de reacción se calienten muy rápidamente a temperaturas muy superiores al punto de ebullición del disolvente en condiciones atmosféricas.

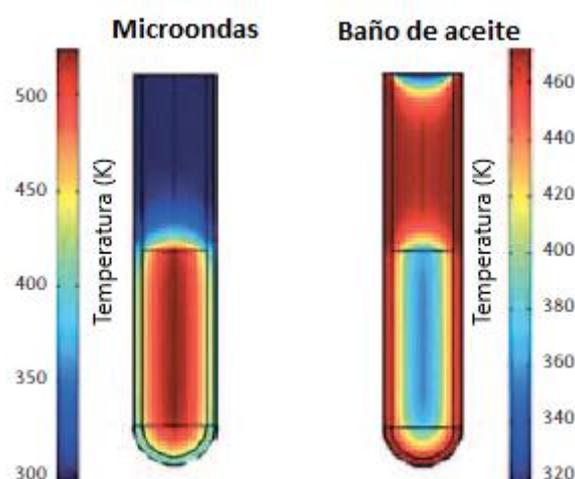


Figura 1.12. Comparación del perfil de temperatura después de 60 segundos de calentamiento por irradiación de microondas (izquierda) en comparación con el tratamiento en un baño de aceite (derecha). La irradiación de microondas eleva la temperatura de todo el volumen de reacción simultáneamente, mientras que en el tubo calentado con aceite, la mezcla de reacción en contacto con la pared del recipiente se calienta primero⁶⁵.

El uso de la energía de microondas ha experimentado un rápido aumento en las últimas dos décadas⁶⁶ con nuevas e innovadoras aplicaciones en síntesis orgánica⁶⁷ y de péptidos,⁶⁸ desarrollo de fármacos,⁶⁹ química de polímeros,⁷⁰ ciencias de los materiales,⁷¹

⁶⁴ Kappe, C. O. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2004**,43, 6250–6284.

⁶⁵ Kappe, C. O.; Dallinger, D. *Nature Reviews Drug Discovery.* **2005**, 5, 1, 51–63

⁶⁶ Kappe, C. O. *Chem. Rec.* **2018**, 18, 1–26

⁶⁷ Das, S; Banik, R.; Kumar, B.; Roy, S.; Noorussabah; Amhad, K.; Sukul, P.K. *Current Organic Synthesis.* **2019**, 16, 5, 730-764.

⁶⁸ Pedersen, S.L; Tofteng, A.P.; Malika, L.; Jensen, K.J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 5, 1826–1844.

⁶⁹ Berrino, E; Supuran, C. T. *Expert Opin. Drug Discov.* **2018**, 1–13.

⁷⁰ Hoogenboom, R; Schubert, U.S. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, 28, 4, 368–386.

⁷¹ Shi, S; Shi, S.; Zhang, S.; Wu, Z.; Wang, T.; Zong, J.; Zhao, M.; Yang, G.. *J. Power Sources.* **2017**, 337, 82-91.

nanotecnología⁷² y química enzimática,⁷³ entre otras. En la mayoría de los casos, se ha demostrado que la irradiación de microondas reduce drásticamente el tiempo de reacción, aumenta el rendimiento y mejora la pureza del producto respecto a los métodos convencionales.

A lo largo de los años ha existido una controversia importante sobre cómo la radiación de microondas puede influir o mejorar una reacción. Los investigadores han especulado que los denominados efectos de microondas específicos o no térmicos podrían ser responsables de estas diferencias. Gran parte del debate se ha centrado en la cuestión de si el campo electromagnético puede ejercer una influencia directa en una transformación química fuera del simple cambio macroscópico en la temperatura de la reacción. Al día de hoy, la existencia de efectos de microondas no térmicos es refutada por grupos de investigación⁷⁴ pero es defendida por otros.⁷⁵

1.3.3- Síntesis orgánica asistida por ultrasonido

Las reacciones químicas se realizan generalmente usando calentamiento convencional como baños de aceite, mantas eléctricas y baños de arena, los cuáles como ya se mencionó, son ineficientes. Se ha buscado reemplazar dichas fuentes de energía con otras técnicas no convencionales más amigables con el medio ambiente y más eficientes siguiendo el sexto principio de la química verde, tales como el ultrasonido.⁷⁶ El ultrasonido se refiere a ondas de sonido más allá de la frecuencia que puede ser detectada por el oído humano, es decir con una frecuencia superior a 20 kHz.⁷⁷ La sonoquímica es el uso del ultrasonido para promover reacciones químicas. Esta fuente de energía no convencional demostró ser mejor en términos de selectividad, tiempo de reacción y simplicidad operativa en muchos casos y se ha utilizado en diversas áreas: síntesis orgánica,⁷⁸ síntesis de nanomateriales⁷⁹ y electroquímica,⁸⁰ entre

⁷² Horikoshi S, Serpone N (eds) (2013) *Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications*. Wiley-VCH, Weinheim.

⁷³ Rejasse, B; Lamare, S.; Marie-Dominique Legoy & Thierry Bessonnet al. *J. Enzyme Inh. Med. Chem.* **2007**, 22, 5, 519–527.

⁷⁴ a) Kappe, C.O; Pieber, B.; Dallinger, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1088 – 1094; b) Kappe, C. O. *Accounts of Chemical Research*, **2013**, 46, 1579–1587.

⁷⁵ Diaz-Ortiz, A; Prieto, P.; de la Hoz, A. *Chem. Rec.* **2019**, 19, 85–97.

⁷⁶ Chatel, G. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2018**, 40, 117–122.

⁷⁷ Bhangu, S.K; Ashokkumar M. *Top Curr Chem (Z)*. **2016**, 374, 56

⁷⁸ Li, J.-T.; Shu-Xiang Wang, Guo-Feng Chen, Tong-Shuang Li. *Current Organic Synthesis*, **2005**, 2, 415-436.

⁷⁹ Bang, J. H; Suslick, K. S. *Advanced Materials*. **2010**, 22, 1039–1059.

⁸⁰ Cagnet, P; Wilhelm, A.M.; Delmas, H.; Lyazidi, H.A.; Fabre, P.L. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2000**, 7, 163–167.

otras. Una onda acústica consiste en compresiones alternativas y rarefacciones transmitiéndose en el medio a lo largo de la dirección de propagación de la onda. Cuando se aplica una gran presión negativa a un líquido, las fuerzas intermoleculares de Van der Waals no son lo suficientemente fuertes como para mantener la cohesión y se forman pequeñas cavidades o microburbujas. El fenómeno responsable por los efectos observados durante las reacciones orgánicas es la cavitación, un proceso físico que crea, agranda e implosiona las cavidades gaseosas en el líquido irradiado (Figura 1.13). La cavitación induce temperaturas y presiones locales muy altas dentro de las burbujas, lo que conduce a un flujo turbulento del líquido y una mejor transferencia de masa.⁸¹

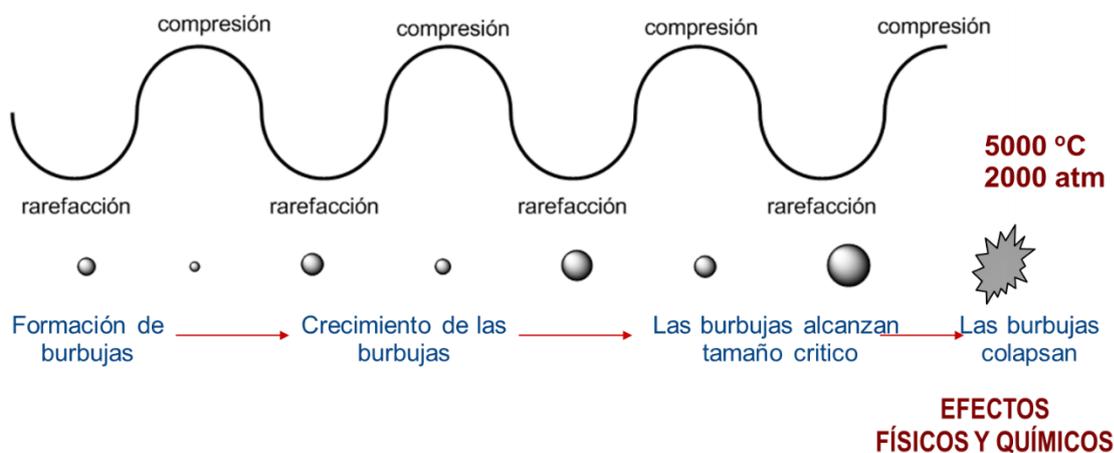


Figura 1.13. Transmisión del sonido a través de un medio líquido. Resumen gráfico del evento de formación, crecimiento y posterior colapso de burbujas durante varios ciclos acústicos. Una burbuja oscila en fase con la onda de sonido aplicada, contrayéndose durante la compresión y expandiéndose durante las rarefacciones.

Según la teoría térmica del "hot spot", se producen temperaturas y presiones extremas localmente dentro de las burbujas y en sus interfaces cuando colapsan. La duración del evento de cavitación es muy corto (menos de 100 ns) y la velocidades de enfriamiento de los "hot spot" es muy alta. El repentino colapso violento de una burbuja de cavitación da lugar a una serie de efectos físicos y químicos en el líquido, como *microstreaming*, agitación, turbulencia, *microjet*, ondas de choque, generación de radicales, sonoluminiscencia, etc.⁷⁶ En consecuencia, este proceso de alta energía casi adiabático suministra la energía cinética que

⁸¹ Leong, T; Ashokkumar, M; Kentish, S. *Acoustics Australia*. 2011, 39, 54 – 63.

impulsa una reacción química. El esquema de una burbuja en cavitación que se observa en la Figura 1.14 muestra las tres regiones de temperatura coexistentes.⁸²

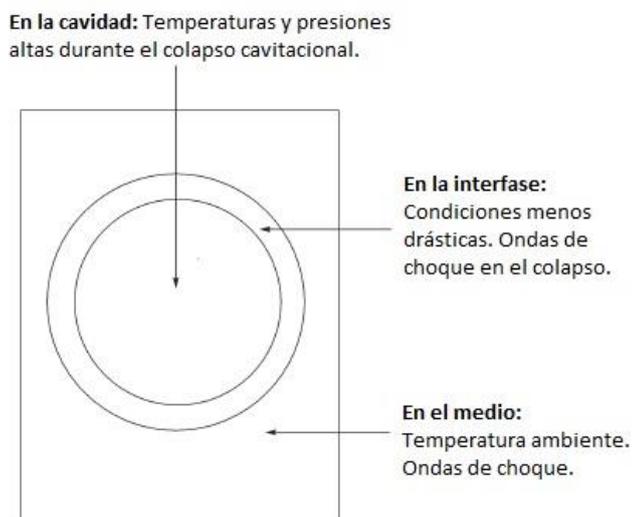


Figura 1.14. Esquema de una burbuja en cavitación.⁸²

Cabe destacar que esta metodología alternativa se puede utilizar conjuntamente a otras condiciones verdes, como son la síntesis sin disolvente, con disolventes verdes o con enzimas,⁸³ también la combinación del calentamiento por microondas e irradiación con ultrasonido se han llevado a cabo con éxito en la química aplicada. Además de ahorrar energía, estas técnicas verdes promueven transformaciones más rápidas y más selectivas.⁸⁴

1.3.4- Reacciones multicomponente

Una manera de clasificar las reacciones en química orgánica es de acuerdo a la cantidad de reactivos que participan en la misma. Tradicionalmente se sintetiza una molécula única, a partir de un reactivo que reacciona consigo mismo o dos que reaccionan entre sí y se requieren varios pasos de reacción para llegar a productos complejos. También existen las reacciones poliméricas, donde uno o varios materiales de partida se combinan repetidamente para formar un polímero de longitud variable. Por otro lado están las reacciones multicomponente (RMC), son aquellas en las cuales se forman productos a partir de tres o más compuestos diferentes en un único paso de reacción y que en

⁸² Cravotto, G; Cintas, P. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 180–196.

⁸³ Draye, M; Kardos, N. *Top. Curr. Chem. (Z)* **2016**, 374, 74.

⁸⁴ Martina, K; Tagliapietra, S.; Barge, A.; Cravotto, G. *Top. Curr. Chem. (Z)*. **2016**, 374, 79.

general incorporan todos los átomos de los reactivos.⁸⁵ Los materiales de partida no reaccionan de forma simultánea, sino más bien en una secuencia de pasos elementales. En la síntesis clásica después de cada paso, el producto intermedio debe ser aislado y purificado por lo que cuantos más pasos, más trabajo debe llevarse a cabo y más material debe gastarse, además con cada uno de dichos pasos disminuye el rendimiento del producto final. Por el contrario, las RMC tienen la ventaja de que se llevan a cabo simplemente mediante la mezcla de reactivos, sin tener que llevar a cabo la reacción secuencialmente (Figura 1.15), sin tener que aislar y purificar los intermedios, dando como resultado un producto con un rendimiento más alto que lo convencional, utilizando menos reactivos, minimizando el esfuerzo sintético, el tiempo y la formación de subproductos. Su economía atómica, está de acuerdo con el segundo principio de la química verde, además su eficiencia, las condiciones suaves, alta convergencia, economía de pasos y que es posible llevarlas a cabo utilizando disolventes verdes,⁸⁶ hacen que sean una gran metodología sintética sostenible.⁸⁷ Además por lo general, los materiales de partida están disponibles, o se pueden preparar de una manera sencilla. Por lo que, las RMC están muy cerca de la idea de una “síntesis ideal”.⁸⁸ Las RMC también permiten una gran diversidad molecular en un único paso, son una poderosa herramienta para abarcar grandes regiones del espacio químico. Es así que son una buena estrategia sintética para la generación de colecciones de moléculas pequeñas, es decir como herramienta de la química combinatoria en la cual se producen una gran cantidad de compuestos, que luego se evalúan para identificar cual presenta propiedades biológicas interesantes o de interés.⁸⁹

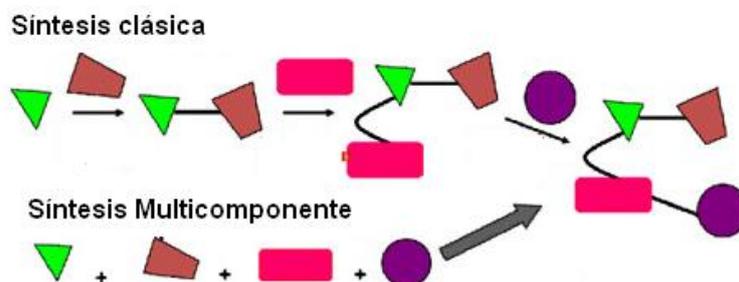


Figura 1.15. Esquema Síntesis Clásica vs. Síntesis Multicomponente.

⁸⁵ Zarganes-Tzitzikas, T; Chandgude, A.L.; Dömling, A. *Chem. Rec.* **2015**, *15*, 981–996.

⁸⁶ Gu, Y. *Green Chemistry.* **2012**, *14*, 2091-2128.

⁸⁷ Cioc, R. C; Ruijter, E; Orru, R. V. A. *Green Chem.* **2014**, *16*, 2958–2975.

⁸⁸ Dömling, A; Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168-3210.

⁸⁹ a) Ugi, I; Dömling, A; Hörl, W. *Endeavour, New Series*, **1994**, *18*, 115-122; b) Ruijter, E; Scheffelaar, R; Orru, R. V. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6234 – 6246.

Además estas reacciones pueden sufrir modificaciones post condensación⁹⁰ o participar de otras RMC como componentes,⁹¹ ampliando así la diversidad química estructural que se puede obtener.

Aunque las RMC se han investigado desde los primeros días de la química orgánica, son todavía poco utilizadas. En este sentido la mayoría de los libros de texto de química orgánica general, así como los cursos, tratan de las reacciones a partir de uno o dos reactivos y polimerizaciones. Sorprendentemente, la riqueza de las RMC no está adecuadamente representada en la enseñanza moderna de la química orgánica a pesar de las muchas e importantes aplicaciones que tienen actualmente.⁸⁵

En los últimos 170 años la química de las RMC se ha desarrollado, la mayoría de las reacciones creadas tienen un nombre en honor a su autor. La primera RMC importante fue descubierta en 1850 por A. Strecker, en ella participan tres componentes, amoníaco, un aldehído, y el ácido cianhídrico, para obtener α -cianoaminas, que pueden ser fácilmente hidrolizadas en α -aminoácidos (Tabla 1.1). En la Tabla 1.1 se pueden ver las RMC más conocidas en orden cronológico, en donde además se observa su alta eficiencia atómica.

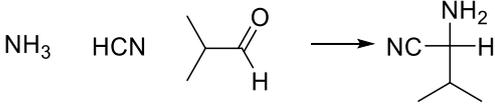
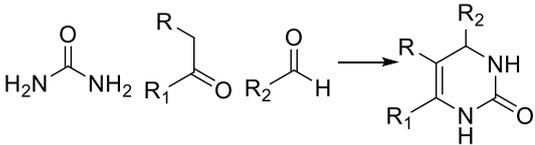
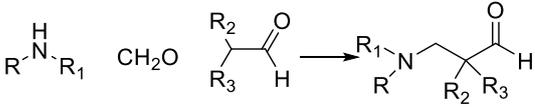
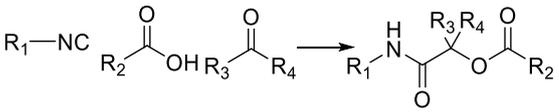
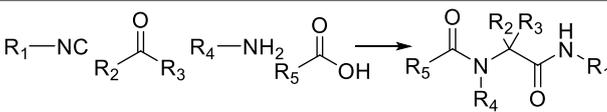
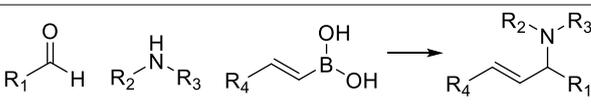
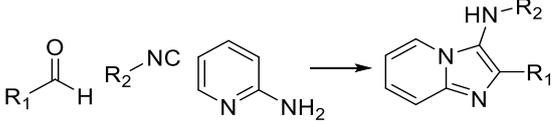
Varias de las RMC mencionadas en la Tabla 1.1 han demostrado su amplia aplicabilidad en la industria química con nuevos productos farmacéuticos en el mercado o siendo parte de una nueva ruta de síntesis de fármacos ya conocidos, haciéndola más corta, convergente y económica.⁹²

⁹⁰ A) Bariwal, J; Kaur, R.; Voskressensky, L.G.; Van der Eycken, E.V. *Frontiers in Chemistry* **2018**, 6, 557; b) Mohammadi-Khanaposhtani, M; Jalalimanesh, N.; Saeedi, M.; Larijani, B.; Mahdavi, M. *Mol Divers.* **2019**.

⁹¹ a) Ghashghaei, O; Seghetti, F; Lavilla, R. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, 15, 521–534; b) Zhi, S; Ma, X; Zhang, W. *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, 17, 7632-7650.

⁹² a) Ruijter, E; Orru, R. V. A. *Drug Discovery Today: Technologies.* **2013**, 10, e15–e20. B) Cao, H; Liu, H; Domling, A. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 12296 – 12298.

Tabla 1.1 RMC más conocidas

Reacción	Año	Esquema	EA ^a	Subproducto
Strecker ⁹³	1850		80%	H ₂ O
Biginelli ⁹⁴	1891		84%	2H ₂ O
Mannich ⁹⁵	1912		89%	H ₂ O
Passerini ⁹⁶	1921		100%	Ninguno
Ugi ⁹⁷	1959		91%	H ₂ O
Petasis ⁹⁸	1993		65%	B(OH) ₃
Groebke/ Blackburn/ Bienaymé ⁹⁹	1998		90%	H ₂ O

^a Economía Atómica = PM Producto / PM Reactivos, los cálculos consideran R = Me. Por lo tanto, en ejemplos prácticos, la economía atómica sería mayor a medida que aumentara el PM de reactivos y productos. Adaptado de 87

⁹³ Strecker, A. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1850**, 75, 27–45.

⁹⁴ Biginelli, P. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1891**, 24, 1317–1319.

⁹⁵ Mannich, C; Krösche, W. *Arch. Pharm.* **1912**, 250, 647–667.

⁹⁶ Passerini, M. *Gazz. Chim. Ital.*, **1921**, 51, 126–129.

⁹⁷ Ugi, I; et al. *Angew.Chem.* **1959**, 71, 386.

⁹⁸ Petasis, N. A; Akritopoulou, I. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 583–586.

⁹⁹ a) Groebke, K; ; Weber, L.; Mehlin, F. *Synlett*, **1998**, 661–663; b) Blackburn, C; Guan, B.; Fleming, P.; Shiosaki, K.; Tsai, S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3635–3638; c) Bienaymé, H; Bouzid, K. *Angew. Chem., Int.Ed.* **1998**, 37, 2234–2237.

Las reacciones multicomponente que utilizan isonitrilos (RMCI) como uno de los reactivos han sido de particular interés debido a la gran cantidad de distintos reactivos disponibles, así como a la variedad de transformaciones que pueden ser realizadas. Es así que estas reacciones son una herramienta ideal para abarcar grandes regiones del espacio químico.¹⁰⁰

Los isonitrilos o isocianuros (Figura 1.16) representan un tipo único de grupo funcional debido a su capacidad para actuar como nucleófilo y electrófilo. Lo cual les permite formar parte de un gran número de reacciones.¹⁰¹

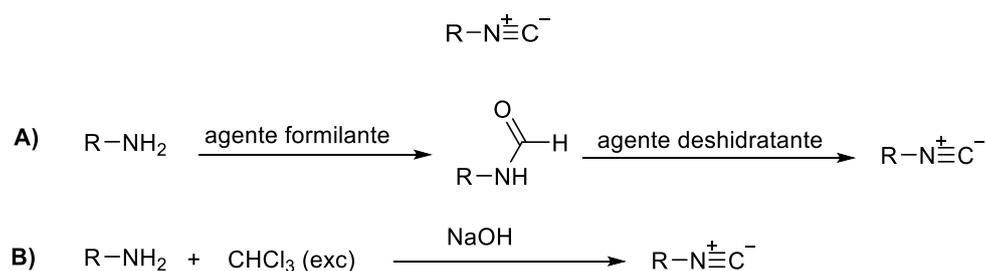


Figura 1.16. Estructura general de un isonitrilo (isocianuro) y síntesis clásicas.

Desde su primera síntesis reportada por Lieke en 1859,¹⁰² se han descrito varias a partir de diferentes precursores. Hoy en día, las *N*-formamidas se usan con mayor frecuencia como materiales de partida para formar isonitrilos utilizando un reactivo de deshidratación en condiciones básicas (Figura 1.16 A).¹⁰³ La mayoría de los agentes deshidratantes, son altamente tóxicos o se sintetizaron mediante el uso de precursores tóxicos. Además, se producen grandes cantidades de desechos durante la síntesis, por lo tanto, no pueden considerarse sostenibles. Recientemente, Wang y col. describió un reactivo de deshidratación menos tóxico utilizando PPh₃ e iodo obteniendo rendimientos de hasta 90% para formamidas principalmente aromáticas.¹⁰⁴ Por otra parte Meier y col. optimizaron las síntesis de isocianuros empleando *p*-TsCl, como agente deshidratante a través de un procedimiento que ofrece un acceso más fácil y verde para la obtención de isonitrilos alifáticos.¹⁰⁵ Si bien la

¹⁰⁰ Dömling, A. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 17-89.

¹⁰¹ Liu, Y.L.; Luo, J.; Chen, G.S.; Chen, S.J.; Li, Z.D. *Chem. Eur. J.* **2020**. doi: 10.1002/chem.202003224

¹⁰² Lieke, W. *Liebigs Ann. der Chemie*, **1859**, 112, 316.

¹⁰³ Bode, M.L.; Gravestock, D.; Rousseau, A.L. *Org. Prep. Proced. Intern.* **2016**, 48, 89-221.

¹⁰⁴ Wang, X.; Wang, Q. *Synthesis*, **2015**, 47, 49.

¹⁰⁵ Waibel, K.A.; Nickisch, R.; Möhl, N.; Seim, R.; Meier, M.A.R. *Green Chem.* **2020**, 22, 933-941

mayoría de los isonitrilos todavía se preparan siguiendo esta ruta vía *N*-formamida, otra alternativa clásica es el procedimiento de Hofmann, descrito hace más de 150 años.¹⁰⁶ (Figura 1.16 B). Porcheddu et al. fueron capaces de mejorar el enfoque inicialmente informado por Hoffmann a un procedimiento más sostenible mediante la aplicación de activación mecanoquímica mediante molienda, reduciendo la cantidad requerida de cloroformo a una cantidad estequiométrica. De este modo, pudieron obtener isocianuros alifáticos, bencílicos y aromáticos con rendimientos de hasta el 71%.¹⁰⁷ Por otro lado Dömling y col., desarrollaron recientemente, una metodología para la obtención de isonitrilos que quita el paso de “*work up*” acuoso e implica una purificación rápida, lo cual permite sintetizar isonitrilos inestables, y además en comparación con enfoques tradicionales, el método es más rápido, produce menos residuos orgánicos y acuosos, y también reduce el tiempo de contacto del operador con sustancias peligrosas.¹⁰⁸

En las últimas dos décadas, el campo de las RMC ha tenido un enorme crecimiento, varias universidades y compañías farmacéuticas han utilizado estas RMC con el fin de desarrollar fármacos para distintas dianas.¹⁰⁹ Además, se han realizado varias optimizaciones para mejorar el rendimiento, reducir el costo, el impacto ecológico y el tiempo de reacción de estas. En este sentido, se han optimizado en condiciones libre de disolvente,¹¹⁰ se ha estudiado el uso de disolventes amigables con el medio ambiente, como por ejemplo agua¹¹¹ y otros métodos de activación alternativos al calentamiento convencional, como son el ultrasonido¹¹² o las microondas.¹¹³ Sobre todo en la investigación y desarrollo de nuevas variaciones de las clásicas reacciones de Passerini y de Ugi (Figura 1.17) que son aquellas que estudiamos en el transcurso de la presente tesis. La reacción de Passerini y la reacción de Ugi son RMC que permiten generar una estructura compleja, α -aciloxiamida y *bis*-amida, respectivamente, a partir de moléculas simples: un isonitrilo, un aldehído o cetona, y un ácido carboxílico, y en la reacción de Ugi, además una amina.

¹⁰⁶ Hofmann A. W. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1867**, *144*, 114-120.

¹⁰⁷ Mocci, R; Murgia, S; De Luca, L; Colacino, E; Delogu, F; Porcheddu, A. *Org. Chem. Front.* **2018**, *5*, 531.

¹⁰⁸ Patil, P; Ahmadian-Moghaddama, M; Dömling, A. *Green Chem.*, **2020**, *22*, 6902-6911

¹⁰⁹ a) Bienayme, H; Hulme, C; Odon, G; Schmitt, P. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 18, 3321-2239; b) Akritopoulou-Zanze, I. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 324-331.

¹¹⁰ Shankar Singh, M; Chowdhury, S. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 4547-4592.

¹¹¹ Pirrung M.C., Das Sarma K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 444.

¹¹² a) Banerjee, B. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *35*, 15-35; b) Rouhani, M; Ramazani, A.; Joo, S.W. *Ultrason. Sonochem.* **2015**, *22*, 391-396.

¹¹³ Hugel, H.M. *Molecules* **2009**, *14*, 4936.

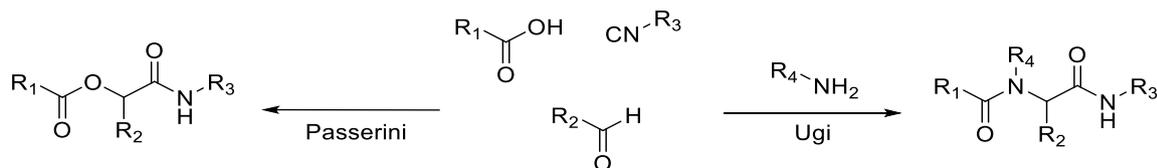


Figura 1.17. Reacciones generales de Passerini y de Ugi.

1.3.4.1- Reacción de Passerini

La reacción de Passerini es una RMCI en donde un aldehído, un isonitrilo y un ácido carboxílico reaccionan para dar una α -aciloxamida con una eficiencia atómica perfecta, 100%, es decir todos los átomos presentes en los tres reactivos, están en el producto final, sin formación de subproductos. Dicha reacción fue descubierta por Mario Passerini en 1921,⁹⁶ pero es en los últimos 20 años que esta reacción ha cobrado interés por parte de la academia y la industria, aumentando el número de publicaciones significativamente (Figura 1.18).

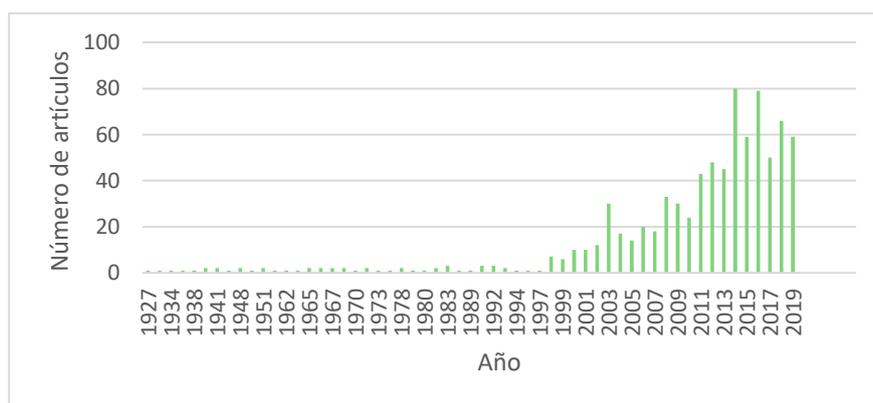


Figura 1.18. Número de publicaciones por año que involucran a la reacción de Passerini (resultado derivado de la consulta en *SciFinder* "Passerini Reaction").

Diferentes publicaciones han mostrado diferentes intermedios para el mecanismo de reacción de Passerini, el cual no ha sido del todo definido. Un mecanismo generalmente aceptado comienza con la protonación del carbonilo (Figura 1.19). Seguido de la adición del isonitrilo para formar el nitrilo intermedio. Este último es atrapado por el carboxilato, y se da una reorganización del tipo Mumm¹¹⁴ para formar el producto final α -aciloxamida.¹¹⁵

¹¹⁴ Mumm, O. *Chem. Ber.* **1910**, 43, 886-893.

¹¹⁵ Alvim, H. G. O; da Silva Júnior, E. N; Neto, B. A. D. *RSC Adv.* **2014**, 4, 54282–54299.

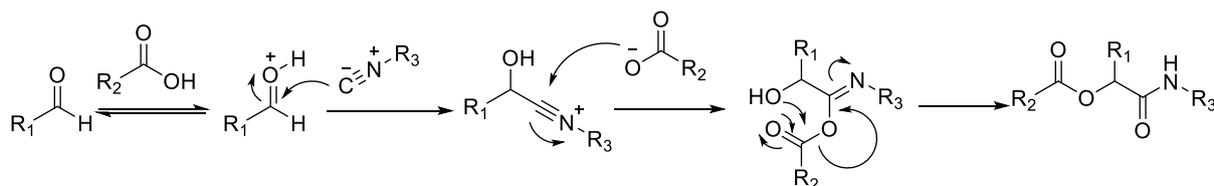


Figura 1.19. Mecanismo de reacción propuesto para la Reacción de Passerini.

En 2011 se vio que en realidad esta RMC es una reacción de *pseudo* 4 componentes y no de 3, ya que el mecanismo implica un componente ácido extra, lo cual fue demostrado usando el método AFIR.¹¹⁶ Más recientemente, Ramozzi y Morokuma, apoyaron dicha teoría a través de cálculos DFT de alto nivel, además encontraron que el intermedio nitrilo es estable en solución y su formación es determinante de la velocidad. Este paso es catalizado por una segunda molécula de ácido carboxílico, seguido del rearrreglo de Mumm (Figura 1.20).¹¹⁷

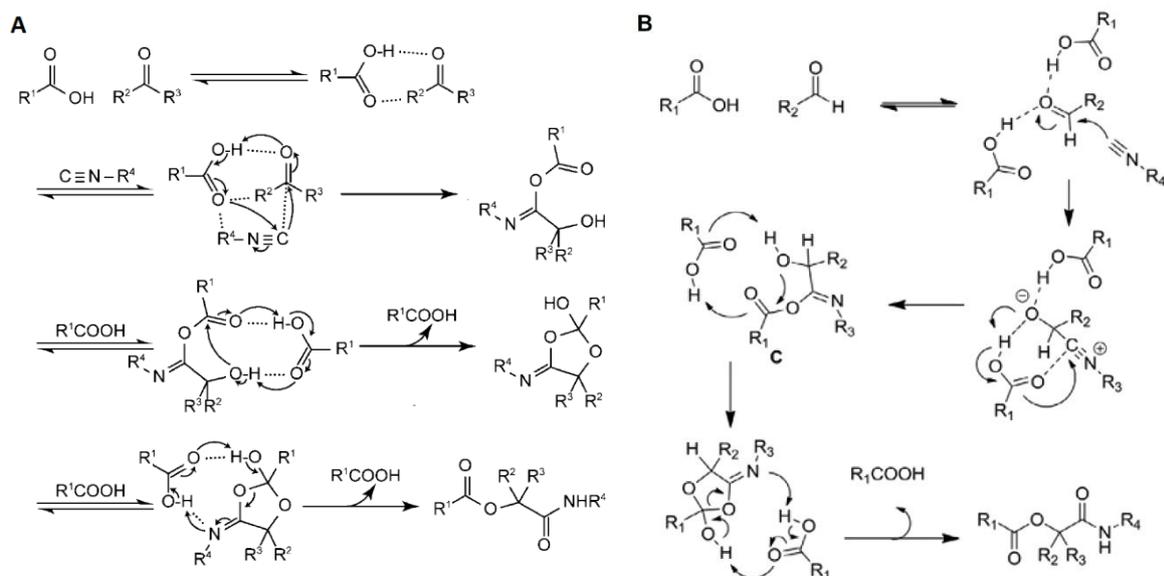


Figura 1.20. A) Mecanismo de reacción de Passerini (reacción de *pseudo*-cuatro componentes) basado en el método AFIR en fase gaseosa. B) Mecanismo de reacción de Passerini (reacción de *pseudo*-cuatro componentes) basado en DFT de alto nivel en solución.¹¹⁸

¹¹⁶ Maeda, S; Komagawa, S; Uchiyama, M; Keiji Morokuma, K.. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2011**, 50, 644-649.

¹¹⁷ Ramozzi, R; Morokuma, K. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 5652-5657.

¹¹⁸ Chandgude, A. Tesis de doctorado. Multicomponent reactions: development, scope, and applications, University of Groningen. 2017 ([https://www.rug.nl/research/portal/nl/publications/multicomponent-reactions-development-scope-and-applications\(b613c465-1170-41ff-a83d-d890c9a535a9\).html](https://www.rug.nl/research/portal/nl/publications/multicomponent-reactions-development-scope-and-applications(b613c465-1170-41ff-a83d-d890c9a535a9).html)), último acceso: 22/08/2020)

Además de los clásicos tres componentes, ácido carboxílico, aldehído e isonitrilo, se han estudiado variantes de esta reacción cambiando alguno de dichos componentes por moléculas análogas, obteniéndose así productos con nuevas estructuras diversas, ampliando el espacio químico posible.¹¹⁹ Por ejemplo se ha cambiado el ácido carboxílico por HN_3 , $\text{Al}(\text{N}_3)_3$, NaN_3 o TMSN_3 para obtener tetrazoles.¹²⁰ También por fenoles, que se conoce como Passerini-Smiles, obteniéndose compuestos *O*-arilados,¹²¹ que a su vez pueden sufrir modificaciones posteriores para obtener nuevas moléculas, como por ejemplo heterociclos,¹²² entre otras.

Dado que en la reacción de Passerini es posible formar un centro quiral, es así que uno de los desafíos más grandes que presenta la reacción es obtener el producto de forma enantioselectiva, lo cual expandiría significativamente su utilidad sintética. Mientras que se han encontrado varios catalizadores quirales que posibilitan obtener el producto deseado enantioselectivamente, el progreso en el desarrollo de reacciones selectivas ha sido lento, a pesar del esfuerzo dedicado.¹²³ En este sentido Liu, Tan, y colaboradores reportaron hasta la fecha el protocolo más eficiente para realizar esta reacción de manera enantioselectiva utilizando un ácido fosfórico quiral como catalizador (Figura 1.21).¹²⁴

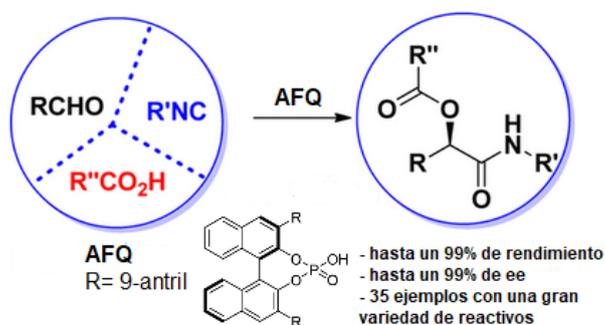


Figura 1.21. Reacción de Passerini asimétrica, catalizada por ácidos fosfóricos quirales.¹²⁴

Clásicamente esta RMC se ha llevado a cabo en disolventes orgánicos, pero en los últimos años se han explorado condiciones más amigables con el medio ambiente o más “verdes”, encontrándose que en esas condiciones la reacción de Passerini se ve favorecida,

¹¹⁹ Kazemizadeh, A. R; Ramazani, A. *Current Organic Chemistry*, **2012**, 16, 418-450.

¹²⁰ Chandgude, A. L; Dömling, A. *Green Chem.* **2016**, 18, 3718-3721

¹²¹ El Kaim, L; Gizolme, M; Grimaud, L. *Organic Letters*. **2006**, 8, 22, 5021–5023.

¹²² Martinand-Lurin, E; Dos Santos, A.; Robineau, E.; Retailleau, P.; Dauban, P.; Grimaud, L.; El Kaïm, L. *Molecules* **2016**, 21, 1257.

¹²³ Wang, Q; Wang, D.-X.; Wang, M.-X.; Zhu, J. *Accounts of Chemical Research*. **2018**, 51, 1290–1300.

¹²⁴ Zhang, J; Lin, S.-X.; Cheng, D.-J.; Liu, X.-Y.; Tan, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 14039–14042.

aumentando el rendimiento y disminuyendo el tiempo de reacción con respecto a utilizar disolventes orgánicos volátiles. En este sentido Bousquet y colaboradores ensayaron esta reacción sin disolvente, bajo calentamiento convencional.¹²⁵ Optimizaron la reacción entre ácido benzoico, benzaldehído y *tert*-butilisocianuro (Figura 1.22), resultando las mejores condiciones a 180°C por 4 minutos, obteniendo el producto deseado de Passerini con un muy buen rendimiento. Luego demostraron que estas condiciones eran aplicables a una amplia gama de reactivos, obteniéndose el producto de la reacción de Passerini con rendimientos siempre superiores al 75%.

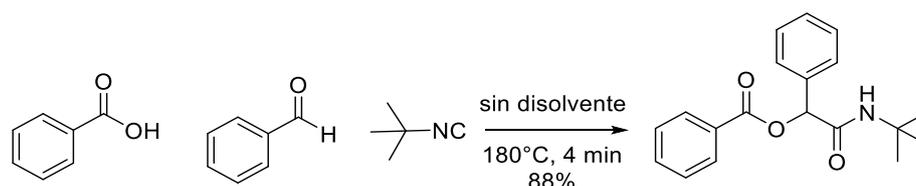
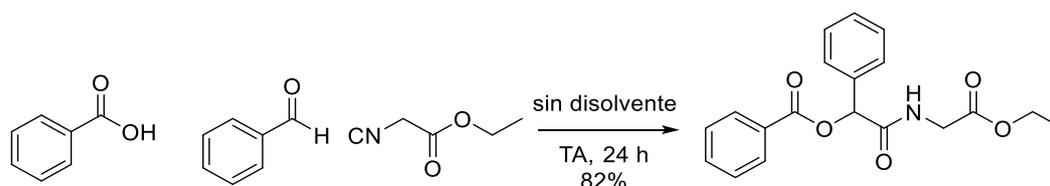


Figura 1.22. Reacción de Passerini optimizada sin utilizar disolvente.

Por otro lado Koszelewski y colaboradores, con objeto de obtener la α -aciloxiamida formulada en la Figura 1.23, llevaron a cabo la reacción entre ácido benzoico, benzaldehído y 2-isocianoacetato de etilo, sin disolvente a TA por 24 h, obteniéndose el producto deseado con muy buen rendimiento. En paralelo ensayaron la reacción utilizando diclorometano como disolvente, obteniendo un rendimiento mucho menor (29%).¹²⁶ Estos resultados animaron a los autores a realizar un estudio sistemático en el que se compararon los rendimientos de la reacción en condiciones clásicas (diclorometano a TA) y sin disolvente. Demostraron que la reacción de Passerini se puede llevar a cabo de manera eficiente en condiciones libres de disolvente. Incluso en el caso de los aldehídos alifáticos, para los que la reacción transcurrió de manera menos eficiente, es una alternativa interesante al enfoque clásico, simplificando el aislamiento y purificación del producto.



¹²⁵ Bousquet, T; Jida, M.; Soueidan, M.; Deprez-Poulain, R.; Agbossou-Niedercorn, F.; Pelinski, L. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 306–308.

¹²⁶ Koszelewski, D; Szymanski, W; Krysiak, J; Ostaszewski, R. *Syn. Comm.* **2008**, 38, 7, 1120–1127.

Figura 1.23. Reacción de Passerini realizada sin utilizar disolvente.

También Pirrung y Das Armas han estudiado el efecto del agua como disolvente en RMC. Por ejemplo, para la reacción de Passerini entre el ácido 3-metilbutenoico, butanal y *tert*-butilisocianuro (figura 1.24), encontraron que llevandola a cabo en agua a TA por 3.5 h, se obtiene un rendimiento mucho mayor que utilizando condiciones clásicas: diclorometano a TA por 18 h (45%).⁵²

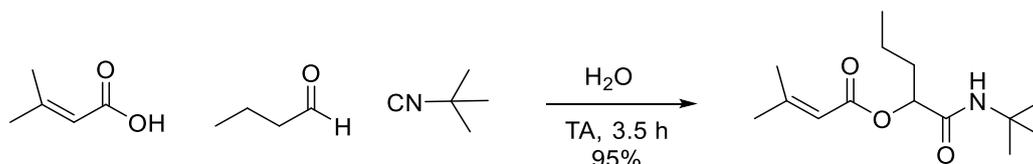


Figura 1.24. Reacción de Passerini realizada utilizando agua como disolvente.

Por otra parte, se han obtenido muy buenos resultados en cuanto a rendimientos y tiempos de reacción llevando a cabo esta RMC utilizando métodos más eficientes de calentamiento como a través de irradiación de microondas. Es así que se ha reportado la síntesis de una serie de compuestos derivados de la reacción de Passerini (Figura 1.25), sin disolvente bajo irradiación de microondas, en tiempos muy cortos con rendimientos muy buenos.¹²⁷

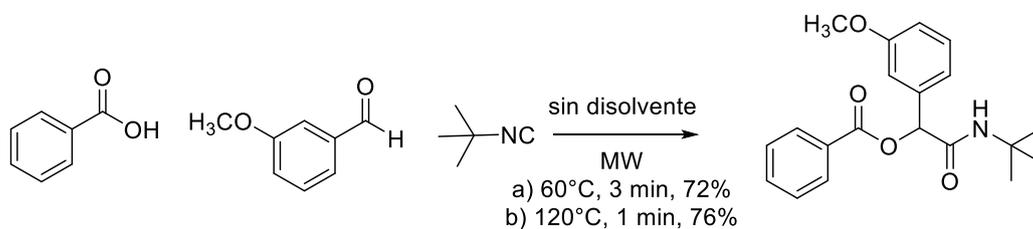


Figura 1.25. Reacción de Passerini utilizando irradiación de microondas como método de calentamiento.

Por otro lado Zhao y colaboradores describieron un procedimiento para reacciones de Passerini con cetonas impedidas estéricamente bajo irradiación ultrasónica en condiciones sin disolvente (Figura 1.26), obteniendo rendimientos moderados. Sin embargo, cuando esta reacción se ensayó en iguales condiciones pero utilizando disolventes orgánicos como

¹²⁷ Barreto, A. F. S; Vercillo, O. E; Andrade, C.K.Z. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 3, 462-467.

diclorometano, acetato de etilo, THF, éter de petróleo ó en agua y se siguió por 3 h, no fue posible obtener el producto deseado.¹²⁸

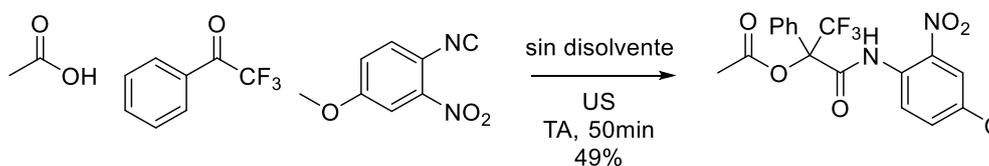


Figura 1.26. Reacción de Passerini utilizando ultrasonido como método de calentamiento.

Recientemente se describe un trabajo donde se optimizaron las condiciones de síntesis de derivados de Passerini en sistemas de flujo continuo (Figura 1.27), obteniendo excelentes rendimientos.¹²⁹

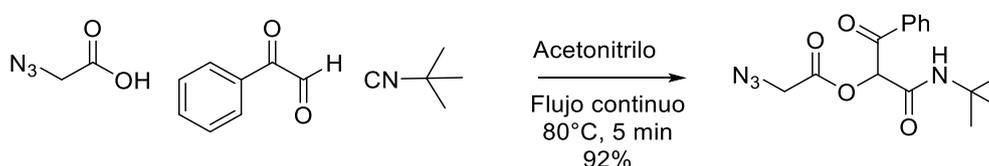


Figura 1.27. Reacción de Passerini obtenida mediante sistema en flujo continuo.

Aunque esta nueva tecnología emergente no fue utilizada en esta tesis vale la pena hacer una breve descripción de la misma ya que está en consonancia con principios de química verde.¹³⁰ Los sistemas de flujo continuo consisten en microreactores en donde, los reactivos de partida se introducen continuamente en un extremo de una columna, y el producto se eluye continuamente desde el extremo opuesto de la misma, es decir las sustancias se cargan y descargan simultáneamente (Figura 1.28).¹³¹ A diferencia de los métodos convencionales de síntesis en donde los productos se producen en “batch” o lotes, es decir colocando todos los reactivos y sustancias necesarias en un balón al inicio de la reacción, luego de la cuál se aísla y purifica el producto deseado.

¹²⁸ Cui, C; Zhu, C; Du, X; Wang, Z; Li, Z; Zhao, W. *Green Chemistry*. **2012**, 14, 11, 3157.

¹²⁹ Salvador, C.E.M.; Andrade, C.K.Z. *Frontiers in Chemistry*. **2019**, 7, 531.

¹³⁰ Lummiss, J. A. M; Morse, P. D; Beingessner, R. L; Jamison, T. F. *Chem. Rec.* **2017**, 17,7, 667–680.

¹³¹ Akwi, F. M; Watts, P. *Chem. Comm.* **2018**, 54,13894

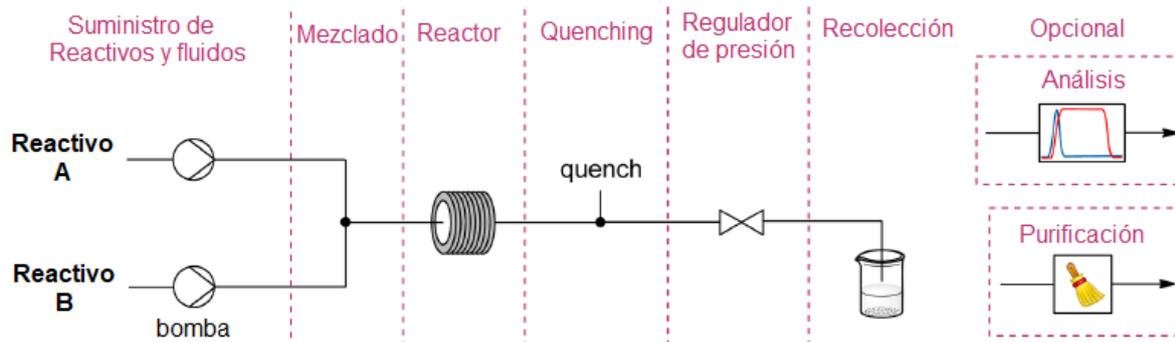


Figura 1.28. Zonas de una configuración estándar de flujo continuo para dos reactivos. ¹³¹

Los métodos de flujo tienen ciertas ventajas sobre los métodos en batch, ¹³²son seguros y además permiten una rápida transferencia de calor y masa, aumentando la eficiencia de los procesos, lo cual está dado por la alta relación entre el área superficial y el volumen en el reactor. ¹³³ Es destacable que esta metodología juega un papel cada vez más importante en el desarrollo y procesos de fabricación de principios activos en la industria farmacéutica y química fina. ¹³⁴

1.3.4.2- Reacción de Ugi

La reacción de cuatro componentes de Ugi es una de las RMCI más importantes que permite acceder a estructuras péptido-miméticas. La transformación fue reportada por primera vez en 1959 por Ivar Ugi.⁹⁷ Dicha reacción tiene una alta eficiencia atómica, ya que solo una molécula de agua se pierde, mientras que se crean cuatro nuevos enlaces, lo que condice con los principios de la química verde. Participan un isonitrilo, un aldehído o cetona, un ácido carboxílico y una amina, para dar una estructura *bis*-amida, cuyas aplicaciones son muy numerosas, lo cual se observa en el gran aumento en la cantidad de publicaciones en los últimos 20 años acerca de dicha reacción (Figura 1.29).

¹³² Plutschack, M. B; Pieber, B; Gilmore, K; Seeberger, P. H. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 18, 11796–11893.

¹³³ Naber, J.R; Kappe, K.O; Pesti, J.A. *Org.ProcessRes.Dev.* **2020**, 24, 1779–1780

¹³⁴ Hughes, D. L. *Org. Process. Res. Dev.* **2018**, 22, 1, 13–20.

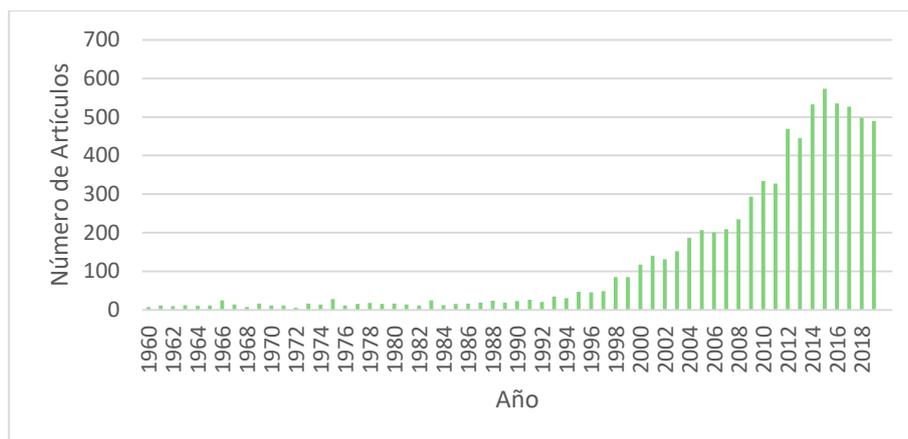


Figura 1.29. Número de publicaciones por año sobre la reacción de Ugi (resultado derivado de la consulta en SciFinder "Ugi Reaction").

En cuanto al mecanismo de esta reacción, se ha propuesto que hay más de uno posible, es así que la reacción de Ugi procedería a través de dos vías de reacción competitivas,¹³⁵ como se ve en la Figura 1.30.

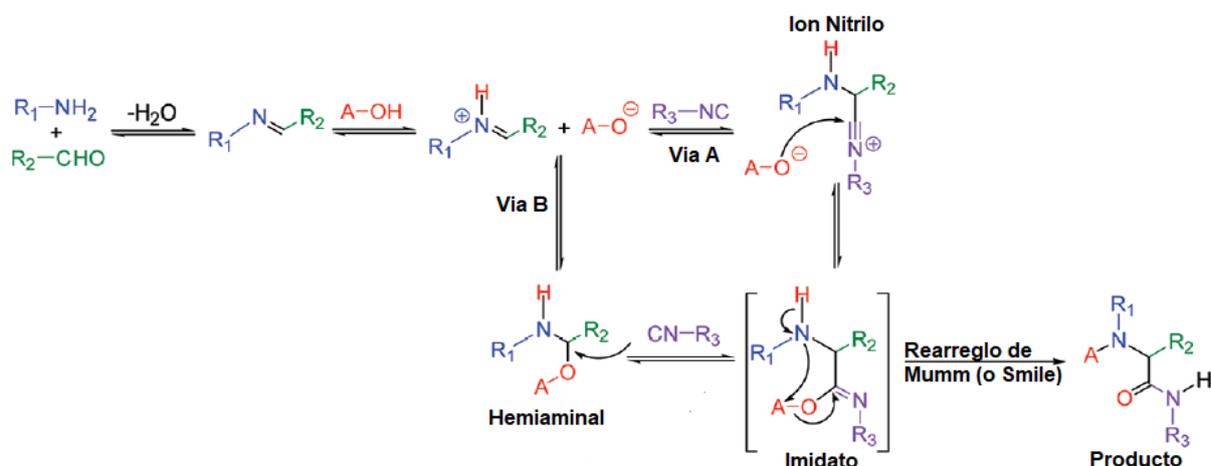


Figura 1.30. Posibles Mecanismos de la reacción de Ugi. A-OH puede ser un ácido carboxílico, o un fenol (Ugi-Smiles).¹³⁷

A pesar del hecho de que no hay un acuerdo en cual vía de reacción es la preferida, algunos de los pasos son ampliamente aceptados. En primer lugar la formación de la imina como primer intermedio. Este intermedio juega un papel clave en la conducción de la reacción hacia el aducto final. Luego hay dos posibilidades, por un lado el mecanismo clásico, planteado por Ugi en 1961,¹³⁶ en donde se da la adición del isocianuro que proporciona el ion nitrilio, o por

¹³⁵ Rocha, R.O.; Rodrigues, M.O.; Neto, B.A.D. *ACS Omega* **2020**, 5, 2, 972-979.

¹³⁶ Ugi, I; Mayr, R. *Chem. Ber.* **1961**, 94, 2229-2233.

el otro, la inserción de ácido carboxílico para dar un intermedio hemiaminal, como se propuso hace algunos años.¹³⁷ Ambas propuestas convergen en el intermedio imidato, que a su vez sufre el reordenamiento de Mumm obteniéndose el producto final de Ugi.

La visión clásica del mecanismo de reacción fue aceptada por mucho tiempo hasta que fue cuestionada por el trabajo de Cherón y col.¹³⁷ Sin embargo, más recientemente, el estudio publicado por el Dr. Brenno A. D. Neto permitió la detección y caracterización de intermedios claves y señaló firmemente la preferencia de la visión clásica de la reacción con la formación del ion nitrilio, no observándose ningún intermedio de la ruta hemiaminal.¹³⁸ El mecanismo clásico también es avalado por el estudio de Iacobucci y col.; en donde todos los datos apoyan firmemente la hipótesis original de Ugi, quien propuso que el mecanismo procede a través de un ion nitrilio.¹³⁹ Ya en 2010, se probó la existencia del imidato intermedio. En este sentido, Faggi y colaboradores aislaron aductos imidato estables antes de que se sometieran al reordenamiento de Mumm.¹⁴⁰

La adición del isocianuro al carbonilo o imina que conduce al nitrilio intermedio se ha considerado durante mucho tiempo como un proceso reversible. Sin embargo, el estudio teórico de Iacobucci y col. antes mencionado, mostró que la formación de este intermedio era un paso limitante en esta RMC, concluyendo que el enlace clave C – C donde se crea el estereocentro era irreversible,¹³⁹ contradiciendo hipótesis anteriores. Esta visión mecanística es de importancia crítica para el desarrollo del proceso enantioselectivo.

La comprensión adecuada de una transformación química es vital para el desarrollo de una versión enantioselectiva de la reacción. El conocimiento del mecanismo es, en este sentido, la piedra angular y el conocimiento más importante para determinar el proceso de inducción quiral de la reacción.¹⁴¹ Como se mencionó la discusión sobre el mecanismo de reacción de esta RMC no está saldada. En consecuencia, hoy día, tiene más de una vía de reacción posible, los parámetros clave que determinan la preferencia por una u otra vía no están claros, y por tanto, tampoco lo es cómo seleccionar un camino de reacción en lugar del otro. Es así que el control estereoquímico deficiente siempre ha estado asociado a los peores problemas con la

¹³⁷ Cherón, N; Ramozzi, R.; El Kaïm, L.; Grimaud, L.; Fleurat-Lessard, P. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1361-1366.

¹³⁸ Medeiros, G. A; da Silva, W.A.; Bataglion, G.A.; Ferreira, D.A.C.; de Oliveira, H.C.B.; Eberlin, M.N.; Neto, B.A.D. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 338-340.

¹³⁹ Iacobucci, C; Reale, S.; JGal, J.-F.; De Angelis, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *32*, 7087-7090.

¹⁴⁰ Faggi, C; García-Valverde, M.; Marcaccini, S.; Menchi, G. *Org.Lett.* **2010**, *12*, 788-791.

¹⁴¹ Ramos, L. M; Rodrigues, M.O.; Neto, B.A.D. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 7260-7269.

reacción de Ugi, si bien se han realizado muchos estudios para lograrlo.¹⁴² Los mecanismos competitivos son un problema importante que no se observa en la reacción de Passerini, incluso considerando algunas discusiones mecanísticas de la reacción y los estados de transición que ya se mencionaron. Esta puede ser la razón por la cual el control estereoquímico de la reacción de Passerini con catalizadores quirales se ha realizado con mayor éxito, mientras que estos catalizadores generalmente muestran poco o ningún efecto en la reacción de Ugi.¹³⁸ Muy recientemente, Zhang y colaboradores han informado una versión enantioselectiva efectiva de la reacción de Ugi utilizando ácidos fosfóricos quirales (AFQ) como catalizadores (Figura 1.31).¹⁴³

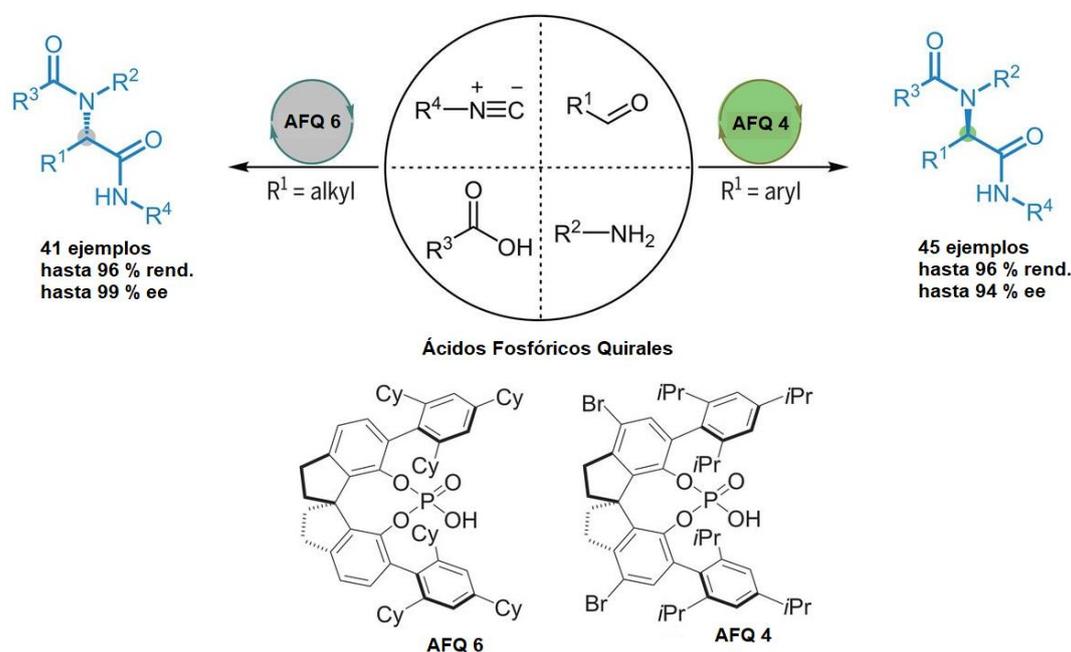


Figura 1.31. Reacción de Ugi asimétrica, catalizada por ácidos fosfóricos quirales.¹⁴³

La reacción fue compatible con una gran cantidad de reactivos de diferente naturaleza obteniéndose una enantioselectividad de buena a excelente (hasta un 99% de exceso enantiomérico). La activación de la imina podría lograrse mediante catálisis heterodimérica AFQ-ácido carboxílico a través de un modo de activación bifuncional, que fue respaldado por evidencias experimentales y teóricas. El perfil de energía libre calculado para la reacción catalítica de Ugi dio tres estados de transición clave combinados con AFQ, que resaltaron la propiedad bifuncional del catalizador. En los estados de transición favorecedores para la

¹⁴² Wang, Q.; Wang, D.X.; Wang, M.X.; Zhu, J. *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51, 1290–1300.

¹⁴³ Zhang, J.; Yu, P.; Li, S.-Y.; Sun, H.; Xiang, S.-H.; Wang, J.; Houk, K.N.; Tan, B. *Science*. **2018**, 361, eaas8707.

determinación de enantioselectividad, los grupos arilo encajan en una bolsa formada por los dos sustituyentes (ciclohexilo) del catalizador, revelando la importancia de las interacciones no covalentes en el control estereoquímico de esta reacción. La propiedad bifuncional del AFQ desempeña un papel relevante en los procesos de reacción con respecto a la generación del heterodímero, la activación de la imina para la adición de isocianuro, el control de la enantioselectividad y la promoción del rearrreglo de Mumm.

Como en el caso de la Passerini, también la reacción de Ugi se ha llevado a cabo cambiando alguno de sus clásicos cuatro componentes (aldehído, amina, ácido carboxílico e isonitrilo), por otros compuestos análogos, ampliando así la diversidad estructural alcanzada por la reacción. Por ejemplo, se ha cambiado el ácido carboxílico por fenoles que se conoce como Ugi-Smile, obteniéndose compuestos *N*-arilados,¹⁴⁴ también se ha sustituido por TMSN₃, obteniéndose tetrazoles 1,5-disustituídos, que a su vez pueden reaccionar para dar bis-heterociclos lactama-tetrazoles.¹⁴⁵ Por otro lado también han realizado transformaciones post condensación obteniéndose otros heterocíclicos,¹⁴⁶ macrociclos,¹⁴⁷ polímeros,¹⁴⁸ entre otros compuestos, así como también la unión con otras RMC.¹⁴⁹

En cuanto a las condiciones de reacción, la Ugi generalmente se ha llevado a cabo en disolventes polares próticos (como el metanol, etanol, trifluoroetanol), también en disolventes polares apróticos (DMF, diclorometano, cloroformo, THF, dioxano). Se ha demostrado que esta RMC puede realizarse con muy buen rendimiento en disolventes amigables con el medio ambiente.

Pirrung y Das Arma fueron los primeros en reportar la reacción de Ugi utilizando agua como disolvente,^{52, 111} con excelentes rendimientos utilizando gran diversidad de reactivos como componentes. Por ejemplo, para la reacción de Ugi mostrada en la figura 1.32, observaron un incremento de 50 veces en la velocidad de reacción del producto deseado con respecto a la utilización de MeOH como disolvente.

¹⁴⁴ El Kaïm, L.; Grimaud L.; Oble, J. *Angew. Chem. International Edition*. **2005**, 44, 7961–7964.

¹⁴⁵ Gunawan, S; Hulme, C. *Org. Biomol.Chem.* **2013**, 11, 6036.

¹⁴⁶ a) Zhu, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1133–1144; b) Akritopoulou-Zanze, I; Djuric, S. W. *Heterocycles* **2007**, 73, 125–147; c) Sharma, U. K; et al. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 1836–1860.

¹⁴⁷ Dannecker, P. K; Sehlinger A.; Meier, M.A.R. *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, 1800748.

¹⁴⁸ a) Kakuchi, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 46–48; b) Sehlinger, A; Meier, M. A. R. *Adv. Polym. Sci.* **2015**, 269, 61–86.

¹⁴⁹ Zhi, S; Ma, X; Zhang, W. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 7632–7650

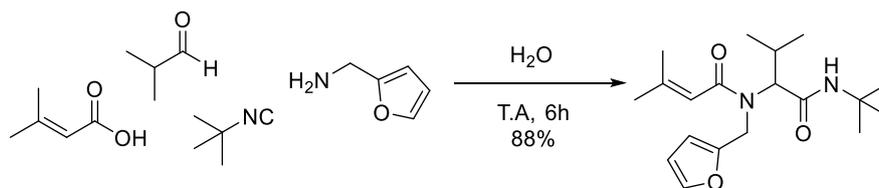


Figura 1.32. Reacción de Ugi utilizando agua como disolvente.⁵²

Más recientemente, Madej y colaboradores demostraron que el agregado de tensioactivos al medio acuoso puede acelerar la reacción (Figura 1.33), debido probablemente a un aumento en la solubilidad de los compuestos orgánicos por la formación de agregados (micelas o vesículas) y mayor concentración de las especies que reaccionan en el área de los agregados.

150

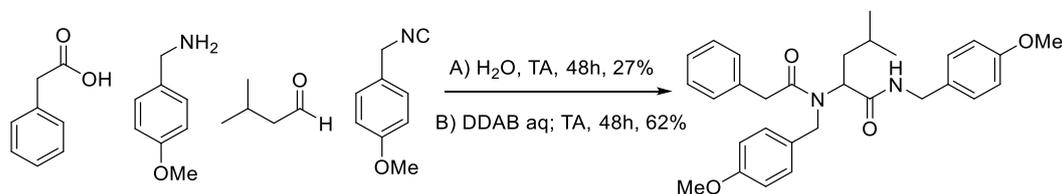


Figura 1.33. Ejemplo de reacción de Ugi utilizando agua como disolvente (A) comparado con el uso de una solución acuosa de tensioactivo DDAB (B).¹⁵⁰

Por otro lado, también se ha reportado la reacción de Ugi libre de disolventes, utilizando métodos de calentamiento eficiente como la irradiación de microondas. Por ejemplo Jida y colaboradores, para la síntesis de lactamas de cinco miembros, optimizaron la reacción de Ugi con 3 componentes, involucrando al ácido levulínico, plataforma química derivada de biomasa, obteniendo rendimientos cuantitativos (Figura 1.34).¹⁵¹

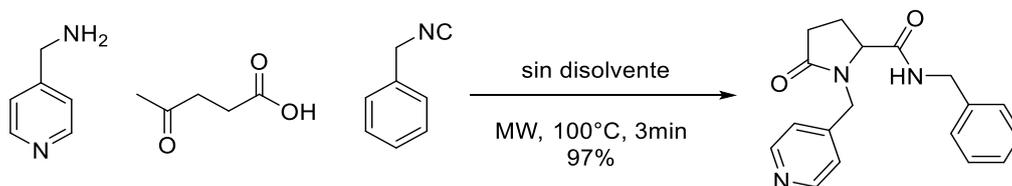


Figura 1.34. Reacción de Ugi con ácido levulínico como componente utilizada en la formación de lactamas.

También se ha llevado a cabo una variante de esta RMC sin la utilización de disolventes bajo la irradiación de ultrasonido. Es así que se reportó la obtención de tetrazoles 1,5-

¹⁵⁰ Madej, A; Paprocki, D.; Koszelewski, D.; Źądło-Dobrowolska, A.; Brzozowska, A.; Walde, P.; Ostaszewski, R. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 33344-33354.

¹⁵¹ Jida, M; Malaquin, S.; Deprez-Poulain, R.; Laconde, G.; Deprez, B. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5109-5111.

disustituidos, a través de una reacción de Ugi cambiando el componente ácido carboxílico por trimetilsililazida, en rendimientos cuantitativos (Figura 1.35).¹⁵²



Figura 1.35. Reacción de Ugi con TMSN_3 utilizada para la formación de tetrazoles.

Recientemente Ali El-Remaily y colaboradores estudiaron esta RMC sin la utilización de disolventes, ni catalizadores, con activación mecanoquímica, utilizando extrusión de doble tornillo como métodos de calentamiento verde.¹⁵³ Obtuvieron el producto deseado (Figura 1.36) en un corto tiempo con excelente rendimiento.

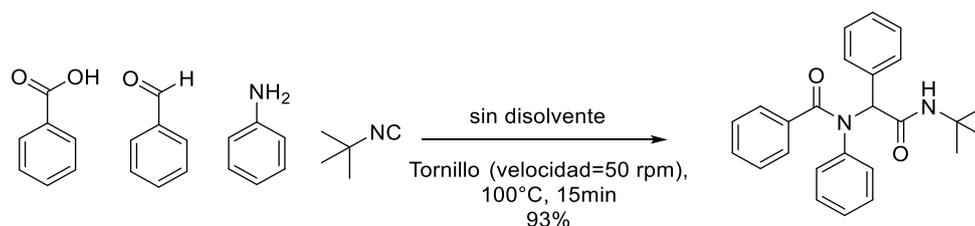


Figura 1.36. Reacción de Ugi optimizada sin la utilización de disolventes con extrusión de doble tornillo.

La mecanoquímica proporciona un método para reducir o eliminar el uso de disolventes mediante la realización de reacciones mediante la molienda de los reactivos. La extrusión de doble tornillo (Figura 1.37), que anteriormente se utilizaba ampliamente en la industria alimentaria, de polímeros y farmacéutica, ha demostrado un gran potencial para la síntesis mecanoquímica en química orgánica.¹⁵⁴

¹⁵² Pharande, S. G; Corrales Escobosa, A.R.; Gámez-Montaño, R. *Green Chem.* **2017**, *19*, 1259-1262.

¹⁵³ Ali El-Remaily, M. A. E. A. A; Soliman, A. M. M; Elhady, O. M. *ACS Omega.* **2020**, *5*, 11, 6194–6198

¹⁵⁴ Crawford, D. E; Miskimmin, C. K. G; Albadarin, A. B; Walker, G; James, S. L. *Green Chemistry.* **2017**, *19*, 6, 1507–1518.



Figura 1.37. (a) Extrusora de doble tornillo y (b) tornillos co-rotativos entrelazados encajados en el cilindro de la extrusora.¹⁵⁴

Por último, es destacable que en la mayoría de los casos la reacción de Ugi y la de Passerini, se han optimizado en todas estas condiciones verdes con reactivos comerciales simples, en cambio en el presente trabajo se van a llevar a cabo las mismas con moléculas más complejas ampliando el espacio químico explorado.

1.4- Química medicinal del siglo XXI

Además de ser amigable con el medio ambiente, siguiendo los principios de la química verde, el desarrollo de fármacos tiene otro gran desafío en este siglo XXI, sintetizar de manera rápida y diversa, la mayor cantidad de moléculas posibles, ampliando el espacio químico conocido.¹⁵⁵ Tradicionalmente en la química orgánica, en particular en relación a la química medicinal, se sintetiza una molécula única y bien caracterizada a partir de una secuencia sintética de varios pasos que se diseña haciendo un análisis retrosintético a partir de dicha molécula objetivo, la cual es pensada a partir de un blanco particular.¹⁵⁶ En cambio, la química combinatoria surgió como una estrategia rápida para lograr una gran cantidad de compuestos, en menor tiempo. Implica la generación de una variedad de compuestos, llamada biblioteca o colección de compuestos, a través del enlace sistemático, repetitivo y covalente de varios "bloques de construcción". Una vez preparados, con los compuestos de la biblioteca se realizan evaluaciones en dianas biológicas de interés para identificar cual presenta propiedades

¹⁵⁵ a) Kennedy, J. P; Williams L, Bridges TM, Daniels RN, Weaver D, Lindsley CW. *J. Comb. Chem.* **2008**, 10, 3, 345–354; b) Dobson, C.M. *Nature.* **2004**, 432, 824–828.

¹⁵⁶ Schreiber, S. L. *Science.* **2000**, 287, 1964–1969.

biológicas interesantes.¹⁵⁷ Es por esto que la química combinatoria es una estrategia interesante en el descubrimiento de fármacos ya que permite generar de manera rápida, eficiente y simultánea un conjunto de moléculas distintas pero relacionadas entre sí, con potencial actividad biológica.¹⁵⁸ A lo largo de los años se vio que el tamaño de la biblioteca no lo es todo al momento de encontrar nuevas moléculas líder, en cambio la diversidad de la biblioteca, en términos de estructura molecular es crucial. Es así que dentro de la química combinatoria surge el término Síntesis Orientada a la Diversidad (SOD).¹⁵⁹ La SOD se define como la síntesis de colecciones de moléculas (bibliotecas) estructuralmente diversas, es decir que cubren grandes áreas de espacio químico, creadas con el fin de descubrir alguna nueva actividad biológica pero sin una diana particular en mente. Por el contrario, la variedad de estructuras moleculares presentes en la biblioteca pueden proporcionar nuevas actividades biológicas interesantes y específicas a través de una serie de dianas.¹⁶⁰

Para lograr esto, la síntesis es abordada desde la dirección opuesta a la síntesis química tradicional. Es decir la planificación o análisis sintético se realiza hacia adelante, se planean los reactivos sin partir del producto, de lo sencillo hacia lo complejo, para así obtener acceso a amplias regiones del espacio químico de manera eficiente (Figura 1.38).¹⁶¹

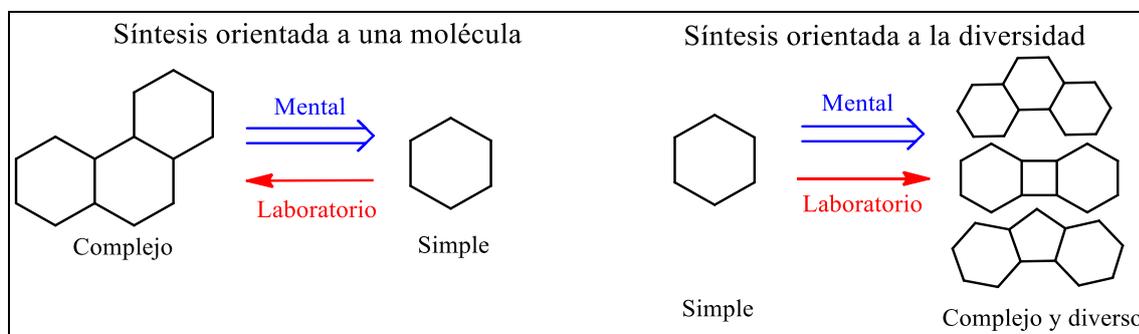


Figura 1.38. Comparación entre la síntesis tradicional y la SOD.

Una pregunta clave en la SOD es cómo diseñar bibliotecas con moléculas que pertenezcan a las regiones biológicamente relevantes del espacio químico. Para abordar este problema, se puede realizar una SOD dirigida, aprovechando la información sobre pequeñas moléculas

¹⁵⁷ Furlan, R.; Mata, E. Química combinatoria, metodologías relacionadas con la generación de diversidad molecular. México, FCE, Sociedad Mexicana de Física, 2012.

¹⁵⁸ Liu, R.; Li, X.; Lam, K. S. *Curr. Op. Chem. Bio.* **2017**, 38, 117–126.

¹⁵⁹ Galloway, W. R. J. D; *Nature Communications.* **2010**, 1, 80.

¹⁶⁰ Gerry, C. J; Schreiber, S.L. *Curr. Op. Chem. Bio.* **2020**, 56, 1–9

¹⁶¹ Burke, M. D; Schreiber, S. L. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, 43, 46–58.

biológicamente activas existentes para generar compuestos que se dirigen de manera similar a estas regiones. Estos pueden basarse en estructuras ya conocidas en la química medicinal por su actividad, es decir en fármacos ya conocidos, o en productos naturales, moléculas derivadas de microbios, plantas u organismos marinos, etc.¹⁶²

Para maximizar la eficiencia, las vías sintéticas no deben ser de más de tres a cinco pasos de reacción. Por lo tanto, para lograr la complejidad del esqueleto es crítico identificar y poner en práctica reacciones generadoras de diversidad que puedan ensamblar rápidamente esqueletos moleculares complejos. Una gran estrategia sintética para la generación de colecciones de moléculas pequeñas son las ya mencionadas reacciones multicomponente, ya que permiten una gran diversidad molecular en un único paso, minimizando el esfuerzo sintético, el tiempo y la formación de subproductos,¹⁶³ abarcando así grandes regiones del espacio químico.

Por ejemplo la reacción de Ugi es una gran herramienta para la SOD en el descubrimiento de fármacos.¹⁶⁴ Ha facilitado el acceso rápido a diversas bibliotecas de moléculas biológicamente importantes debido a su facilidad de operación sintética.¹⁶⁵ En aplicaciones industriales, Dömling y colaboradores informaron una elegante síntesis multicomponente de dos pasos de praziquantel, un fármaco para tratar la esquistosomiasis parasitaria.¹⁶⁶ Dicha síntesis, como se muestra en la figura 1.39, implica en primer lugar a la reacción de Ugi entre paraformaldehído, 2,2-dimetoxietilamina, ácido ciclohexanoico y fenetil isonitrilo, seguida de la reacción de Pictet-Spengler. Esta estrategia redujo los costos de materiales y ofreció una estrategia para la síntesis de análogos.

¹⁶² a) Tan, D. S. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 74–84; b) Shang, S; Tan, D. *Curr. Op. Chem. Bio.* **2005**, *9*, 248–258.

¹⁶³ a) Biggs-Houck, J. E; Younai A; Shaw JT. *Curr. Op. Chem. Bio.* **2010**, *14*, 371–382; b) Ruijter, E; Scheffelaar, R; Orru, R.V.A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6234 – 6246.

¹⁶⁴ Slobbe, P; Ruijter, E.; Orru, R.V.A. *MedChemComm.* **2012**, *3*, 1189–1218.

¹⁶⁵ a) Musonda, C. C; Taylor D.; Lehman, J.; Gut, J.; Rosenthal, P.J.; Chibale, K.. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3901–3905; b) Dömling, A; Achatz, S.; Beck, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5483–5486; c) Richter, H.G.F; Benson, G.M.; Blum, D.; Chaput, E.; Feng, S.; Gardes, C.; Grether, U.; Hartman, P.; Kuhn, B.; Martin, R.E.; Plancher, J.-M.; Rudolph, M.G.; Schuler, F.; Taylor, S.; Bleicher, K.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 191–194; d) Richter, H.G.F; Benson, G.M.; Bleicher, K.H.; Blum, D.; Chaput, E.; Clemann, N.; Feng, S.; Gardes, C.; Grether, U.; Hartman, P.; Kuhn, B.; Martina, R.E.; Plancher, J.-M.; Rudolph, M.G.; Schuler, F.; Taylor, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1134–1140; e) Nayyab, S; O'Connor, M; Brewster, J; Gravier, J; Jamieson, M; Magno, E; Miller, R.D; Phelan, D; Roohani, K; Williard, P; Basu, A; Reid, C.W. *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 421–427.

¹⁶⁶ Cao, H; Liu, H.; Dömling, A. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12296–12298.

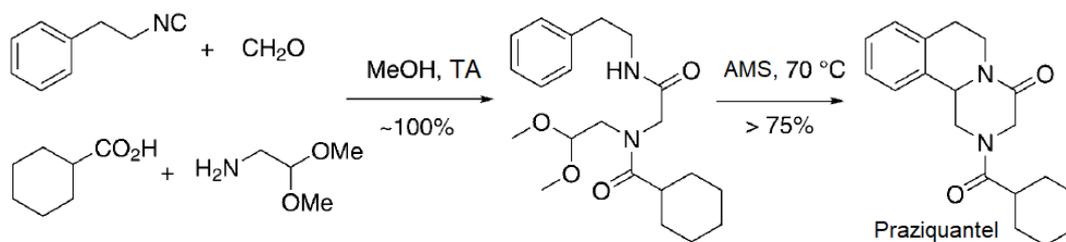


Figura 1.39. Reacción de dos pasos para la obtención del fármaco Praziquantel. RMC de Ugi seguida de la reacción de Pictet-Spengler (AMS = ácido metanosulfónico).

En suma, la SOD dirigida, usando como herramienta las reacciones multicomponente, ha permitido el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento tanto de enfermedades transmisibles como enfermedades no transmisibles.

1.5- Enfermedades no transmisibles

Las enfermedades no transmisibles (ENT), que incluyen cáncer, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades cardiovasculares, afecciones de salud mental, entre otras, son la principal causa de muerte en todo el mundo. Matan a 41 millones de personas cada año, lo que equivale al 71% de todas las muertes en todo el mundo. Las enfermedades cardiovasculares representan la mayoría de las muertes por ENT, 17.9 millones de personas al año, seguidas de cánceres (9.0 millones), enfermedades respiratorias (3.9 millones) y diabetes (1.6 millones).¹⁶⁷

El impacto de las ENT en las poblaciones se extiende más allá de la mala salud y la mortalidad con grandes consecuencias económicas, representan una carga financiera importante para los presupuestos sanitarios de los gobiernos y de las personas enfermas.¹⁶⁸ La Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas reconoció la disminución de las ENT como un desafío importante para el desarrollo sostenible. Se puso como meta reducir en un

¹⁶⁷ World Health Organization, WHO Noncommunicable diseases Fact Sheets (2018).

<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (25/04/2019).

¹⁶⁸ Muka, T.; Imo, D.; Jaspers, L.; Colpani, V.; Chaker, L.; van der Lee, S.J.; Mendis, S.; Chowdhury R.; Bramer, W.M.; Falla, A.; Pazoki, R.; Franco, O.H.. *Eur. J. Epidemiol.* **2015**, 30, 4, 251–277.

tercio la mortalidad prematura por ENT para el 2030, a través de la prevención y el tratamiento.¹⁶⁹

Es así que el estudio de nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades es de suma importancia y por tanto, un desafío para los químicos medicinales actuales.

1.5.1- Cáncer: diseño de compuestos bioactivos antitumorales

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa principal de muerte en el mundo, contando con 9.6 millones de muertes en 2018.¹⁷⁰ Las consecuencias de las muertes prematuras son sustanciales en términos económicos debido a la pérdida de productividad y los costos asociados a terapia y tratamiento.¹⁷¹ En este contexto, son de gran relevancia para nuestra sociedad nuevos medicamentos más seguros y activos para disminuir su incidencia.

En la actualidad una estrategia terapéutica muy prometedora contra el cáncer es el diseño y desarrollo de potenciales fármacos híbridos, ya que potencialmente pueden superar la mayoría de los inconvenientes farmacocinéticos encontrados al usar medicamentos convencionales contra el cáncer. La hibridación molecular es una estrategia de diseño racional de nuevas moléculas bioactivas basada en el reconocimiento de subunidades farmacofóricas en la estructura molecular de dos o más derivados bioactivos conocidos que, mediante la fusión adecuada de las mismas, conducen al diseño de nuevas arquitecturas híbridas que mantienen (y en muchos casos potencian) las características biológicas de las estructuras originales.¹⁷² En este sentido, las reacciones multicomponente son ideales para combinar varios fragmentos en único paso de reacción.¹⁶⁴

El futuro de medicamentos híbridos contra el cáncer es muy alentador para el descubrimiento de moléculas altamente potentes y selectivas, con el potencial de desencadenar dos o más mecanismos farmacológicos citotóxicos de acción, actuando en sinergia para inhibir el

¹⁶⁹ Bennett, J. E.; Stevens, G.A.; Mathers, C.D.; Bonita, R.; Rehm, J.; Kruk, M.E., Riley, L.M.; Dain, K.; Kengne, A.P.; Chalkidou, K.; Beagley, J.; Kishore, S.P.; Chen, W.; Saxena, S.; Bettcher, D.W.; Grove, J.T.; Beaglehole, R.; Ezzati, M. *The Lancet* **2018**, 392, 1072–1088.

¹⁷⁰ Cancer, WHO Cancer Fact Sheets, September 12, 2018, World Health Organization: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (27/03/2019).

¹⁷¹ Hanly, P.; Soerjomataram, I.; Sharp, L. *Int. J. Cancer* **2015**, 136, E136–E145.

¹⁷² Viegas-Junior, C; Barreiro, E.J; Manssour Fraga, C.A. *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14, 1829–1852.

crecimiento tumoral.¹⁷³ En el contexto del presente trabajo de tesis se seleccionaron tres farmacóforos con potencial actividad antitumoral, en base a la experiencia química y biológica del grupo en los últimos 10 años (se desarrollarán estos conceptos en el capítulo de antecedentes). A continuación, se describirán las principales características de los tres farmacóforos seleccionados: liberadores de óxido nítrico, nitroalquenos y análogos de tocoferol.

1.5.1.1. Antitumorales liberadores de óxido nítrico

Recientemente, varios compuestos híbridos donadores de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) han sido reportados con una importante actividad antiproliferativa.¹⁷⁴ El óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), es un radical libre, descrito como una molécula de señalización en el sistema cardiovascular por los ganadores del Premio Nobel: Furchgott, Ignarro y Murad. Desde entonces han sido descritos una amplia variedad de procesos biológicos en los que participa,¹⁷⁵ además de su aplicación en el área de descubrimiento de fármacos.¹⁷⁶

Bajo condiciones fisiológicas, se producen bajos niveles de $\cdot\text{NO}$ a partir de L-arginina por la Óxido Nítrico Sintasa (NOS), expresada constitutivamente en las células neuronales (nNOS, también conocida como NOS1) y las células endoteliales (eNOS o NOS3), que contribuyen a la regulación de procesos fisiológicos normales. Los niveles más altos de $\cdot\text{NO}$ son producidos por una NOS inducible (iNOS o NOS2). El $\cdot\text{NO}$ puede estimular las vías que resultan en el crecimiento celular o la muerte celular, dependiendo del nivel relativo de $\cdot\text{NO}$ y la variedad de factores asociados.¹⁷⁷

El papel del $\cdot\text{NO}$ en el cáncer ha sido estudiado extensamente, se ha determinado que su acción es variable, a veces como agente antineoplásico y otras como proneoplásico.¹⁷⁸ Esto depende principalmente de su concentración intracelular, pero también el microambiente y

¹⁷³ a) Fortin S, et al. *Expert Opin Drug Discov* **2013**, 8:1029-1047; b) Kerru, N.; Singh, P.; Koorbanally, N.; Raj, R.; Kumar, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 142, 179-212.

¹⁷⁴ a) Guo, Y.; Wang, Y.; Li, H.; Wang, K.; Wan, Q.; Li, J.; Zhou, Y.; Chen, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, 9, 502-506; b) Tian, K.; Xu, F.; Gao, X.; Han, T.; Li, J.; Pan, H.; Zang, L.; Li, D.; Li, Z.; Uchita, T.; Gao, M.; Hu, H. *Eur J Med Chem* **2017**, 136: 131-143; c) Chen, J.; Wang, T.; Xu, S.; Zhang, P.; Lin, A.; Wu, L.; Yao, H.; Xie, W.; Zhu, Z.; Xu, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 135: 414-423.

¹⁷⁵ a) Bryan, N.S. *Future Sci. OA* **2015**, 1, FSO48; b) Horton, A.; Schiefer, I.T. *Nitric Oxide* **2019**, 84, 69-78.

¹⁷⁶ Serafim, R.A.M.; Pernichelle, F.G.; Ferreira, E.I. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, 12, 941-953.

¹⁷⁷ Monteiro, H.P.; Rodrigues, E.G.; Amorim Reis, A.K.C.; Longo, L.S, Jr; Ogata, F.T.; Moretti, A.I.S.; da Costa, P.E.; Teodoro, A.C.S.; Toledo, M.S.; Stern, A. *Nitric Oxide* **2019**, 89, 1-13.

¹⁷⁸ Hu, Y; Xiang, J.; Su, L.; Tang, X. *J. Int. Med. Res.* **2020**, 48, 2, 1-9.

tipo celular y la duración de la exposición al $\cdot\text{NO}$. Numerosas investigaciones han demostrado que niveles bajos óptimos de $\cdot\text{NO}$ promueven el crecimiento del cáncer al estimular la progresión de las células cancerosas y al mejorar la angiogénesis y la metástasis. Mientras que niveles superiores o inferiores a este rango óptimo pueden tener el efecto opuesto y activar vías de transducción de señales que contribuyen a la inhibición del crecimiento o a la muerte celular (Figura 1.40). Las concentraciones altas de $\cdot\text{NO}$ detienen la progresión del cáncer al inducir apoptosis, sensibilizar los tumores a la quimioterapia, la radio o la inmunoterapia, revertir la resistencia a la quimioterapia y al retraso de las cascadas angiogénicas y metastásicas.¹⁷⁹

Los altos niveles de $\cdot\text{NO}$ pueden ejercer su actividad antitumoral a través de diversos mecanismos, que incluyen: (i) estimulación de la apoptosis por regulación positiva de p53; (ii) degradación de la molécula proteosómica antiapoptótica; (iii) liberación de citocromo C y aumento de la permeabilidad mitocondrial; (iv) lanzamiento de Smac / DIABLO; y (v) formación de peroxinitrito, que conduce a un aumento de p53,¹⁸⁰ (vi) modificación del loop NF- κ B/Snail/YY1/ RKIP,¹⁸¹ (vii) regulación epigenética.^{179, 182}



Figura 1.40. La respuesta de los tumores a diferentes concentraciones de $\cdot\text{NO}$, brinda una oportunidad terapéutica para el cáncer. Los tumores requieren un concentración óptima de $\cdot\text{NO}$ para la proliferación (zona segura). Los niveles muy bajos de $\cdot\text{NO}$ inhiben el crecimiento tumoral (zona de inhibición) y niveles muy altos de $\cdot\text{NO}$ inducen la muerte de las células tumorales (zona de muerte). Adaptado de Huang y colaboradores.¹⁸⁰

¹⁷⁹ Oronsky, B.; Fanger, G.R.; Knox, S.; Scicinski, J. *Translational Oncology*. **2014**, 7, 167–173

¹⁸⁰ Huang, Z.; Fu, J.; Zhang, Y. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 7617–7635.

¹⁸¹ Bonavida, B.; Baritaki, S. *Nitric Oxide* **2011**, 24, 1–7.

¹⁸² Glynn, S.A. *Current Opinion in Physiology* **2019**, 9, 18–25.

Para alcanzar altos niveles de $\cdot\text{NO}$ intracelulares existen varias estrategias, una de ellas son los compuestos híbridos liberadores de $\cdot\text{NO}$.¹⁸³ En la figura 1.41 se muestran algunos ejemplos de la literatura más reciente.

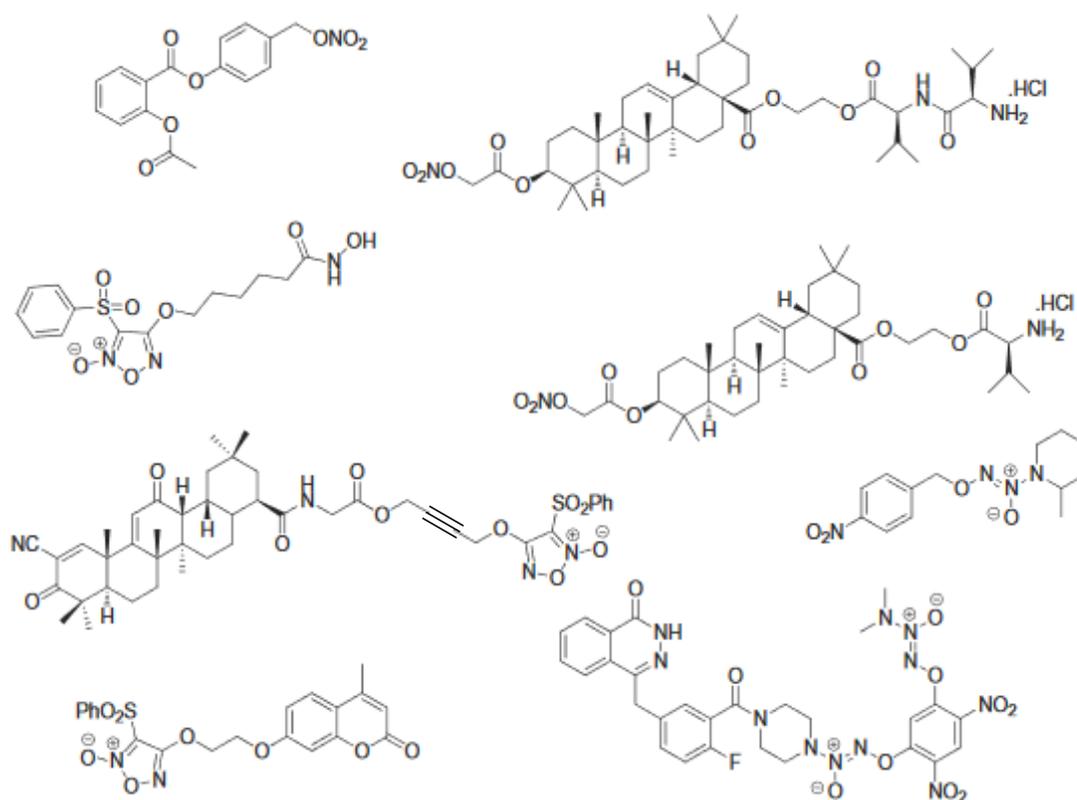


Figura 1.41. Compuestos híbridos, donadores de $\cdot\text{NO}$, con actividad anticancerígena.¹⁸⁵

Existe una amplia variedad de estructuras químicas capaces de liberar altas concentraciones de $\cdot\text{NO}$, como los nitratos orgánicos y 1,2,5-oxadiazol *N*-óxidos (furoxanos)¹⁸⁴ (Figura 1.42), que han sido utilizados como precursores para la síntesis de nuevos potenciales agentes anticancerígenos. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas moléculas híbridas liberadoras de $\cdot\text{NO}$ es un desafío actual en la química medicinal.¹⁸⁵

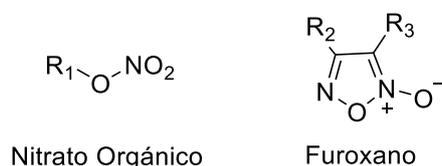


Figura 1.42. Estructuras generales de dos importantes dadores de $\cdot\text{NO}$.

¹⁸³ A) Huerta, S. *Future Sci. OA.* **2015**, 1, FSO44. B. b) Duan, W.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 15, 4481-4488. c) Duan, W.; et al. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 10, 4325-4338 d) Abdel-Aziz, M.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 3839-3849.

¹⁸⁴ L. L. Fershtat, N. N. Makhova, *ChemMedChem* **2017**, 12, 622-638.

¹⁸⁵ R. A. M. Serafim, M. C. Primi, G. H. Trossini, E. I. Ferreira, *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 386-405.

1.5.1.2. Nitroalquenos Antitumorales

En los últimos años, surgen los nitroalquenos con recobrada importancia como agentes antiinflamatorios -activan el sistema Nrf2/Keap-1, inhiben NF- κ B, inhiben el inflamasoma NLRP-3, entre otros- con potencial aplicación en enfermedades con una inflamación crónica asociada (Figura 1.43).¹⁸⁶ El grupo funcional nitroalquenilo presenta características electrofílicas que le permiten reaccionar con aminoácidos nucleófilos presentes en proteínas reguladoras del metabolismo celular (como las proteínas inflamatorias). Se han encontrado varias evidencias de la formación de nitroalquenos en forma endógena formando parte de ácidos grasos (ácido nitrooleico y ácido nitrolinoleico), y que su presencia se ve muy aumentada cuando se produce un proceso inflamatorio.^{186c,187}

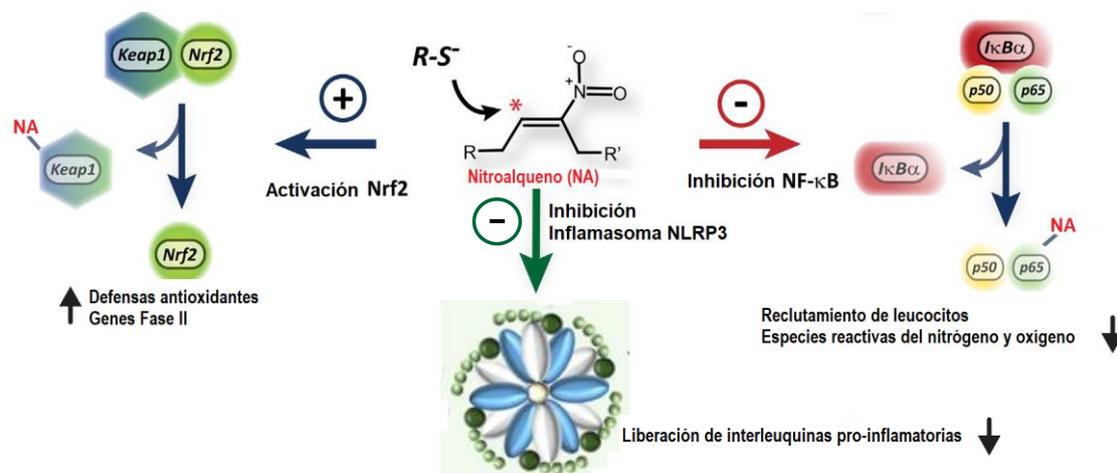


Figura 1.43. Vías de señalización intracelular de los nitroalquenos. Adaptado de Villacorta y colaboradores.¹⁸⁸

Recientemente se desarrollaron homólogos no naturales de nitroalquenos de ácidos grasos más eficaces, que se han descrito como candidatos a fármacos antiinflamatorios y antifibróticos (Figura 1.44).¹⁸⁹

¹⁸⁶ a) Kansanen, E.; Jyrkkänen, H.K.; Levenon, A.L. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, 52, 973-982; b) Woodcock, S.R.; Bonacci, G.; Gelhaus, S.L.; Schopfer, F.J. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, 59, 14-26; c) Cui, T.; Schopfer, F.J.; Zhang, J.; Chen, K.; Ichikawa, T.; Baker, P.R.; Batthyány, C.; Chacko, B.K.; Feng, X.; Patel, R.P.; Agarwal, A.; Freeman, B.A.; Chen, Y.E. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 35686-35698.

¹⁸⁷ a) Rubbo, H. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2013**, 46, 728-734; b) Batthyány, C.; Schopfer, F.J.; Baker, P.R.; Durán, R.; Baker, L.M.S.; Huang, Y.; Cerveñansky, C.; Branchaud, B.P.; Freeman, B.A. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 20450-20463; c) Schopfer, F.J.; Khoo, N.K.H. *Trends Endocrinol. Metab.* **2019**, 30, 505-519.

¹⁸⁸ Villacorta, L.; Minarrieta, L.; Salvatore, S.R.; Khoo, N.K.H.; Rom, O.; Gao, Z.; Berman, R.C.; Jobbagy, S.; Li, L.; Woodcock, S.R.; Chen, Y.E.; Freeman, B.A.; Ferreira, A.M.; Schopfer, F.J.; Vitturi, D.A. *Redox Biol.* **2018**, 15, 522-531.

¹⁸⁹ Khoo, N.K.H.; Lihua Li, Sonia R. Salvatore, Francisco J. Schopfer & Bruce A. Freeman. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 2295.

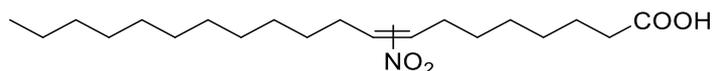


Figura 1.44. Ácido 8/9-nitro-eicos-8-enoico, derivado nitroalqueno de ácido graso con mejor perfil antiinflamatorio y antifibrótico.

En el mismo año, Freeman y col. describen la actividad inhibitoria del nitroalqueno derivado del ácido oleico, 10-NO₂-OA (Figura 1.45), en el subtipo de cáncer mamario más agresivo. El 10-NO₂-OA inhibe la viabilidad, migración, invasión y crecimiento tumoral de células de cáncer de mama triple negativo, inhibiendo la reparación de lesiones de ADN doble hebra lo que los convierte en una terapia muy prometedora en asociación con quimioterapias convencionales.¹⁹⁰

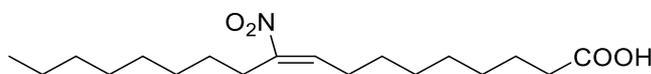


Figura 1.45. Nitroalqueno derivado del ácido oleico, 10-NO₂-OA.

La familia del β-nitroestireno (derivado nitroalqueno de compuestos aromáticos) y sus análogos ejercen diversos efectos biológicos, incluidas actividades antiinflamatorias y anticancerígenas. En la figura 1.45 se muestran las estructuras de algunas de estas moléculas que resultan relevantes para el trabajo que aquí se presenta. Recientemente fue descrito en la literatura que el 3,4-metilendioxi-β-nitroestireno (Figura 1.46) inhibe la integrina β1 y la proteína disulfuro-isomerasa, dando como resultado la supresión de la adhesión y migración de células cancerígenas de mama¹⁹¹.

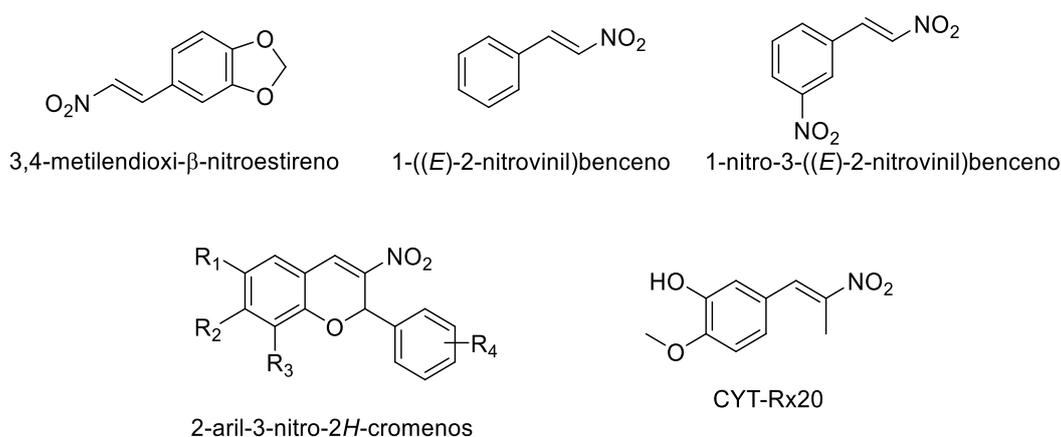


Figura 1.46. Nitroalquenos derivados de compuestos aromáticos.

¹⁹⁰ Woodcock, C.-S.C.; Huang, Y.; Woodcock, S.R.; Salvatore, S.R.; Singh, B.; Golin-Bisello, F.; Davidson, N.E.; Neumann, C.A.; Freeman, B.A.; Wendell, S.G. *J. Biol. Chem.* **2018**, 293, 1120–1137.

¹⁹¹ Chen, I.H.; Chang, F.R.; Wu, Y.C.; Kung, P.H.; Wu, C.C. *Biochimie* **2015**, 110, 81-92.

Además, 1-((*E*)-2-nitrovinil)benceno y 1-nitro-3-((*E*)-2-nitrovinil)benceno (Figura 1.46), indujeron la liberación de citocromo c de las mitocondrias y promovieron la apoptosis de las células tumorales ascíticas de Ehrlich.¹⁹²

También, una serie de 2-aril-3-nitro-2*H*-cromenos (Figura 1.46) sintetizados como análogos híbridos de β -nitroestireno y flavanona mostraron citotoxicidad en células de cáncer de mama por inducción de daño en el ADN y actividad de caspasa-3.¹⁹³

Asimismo, Yuan y col. han estudiado un derivado sintético de β -nitroestireno, CYT-Rx20 (Figura 1.46), mostrando que posee un efecto citotóxico contra las células de cáncer de mama y en el cáncer colorrectal.¹⁹⁴

1.5.1.3. Antitumorales derivados del sistema α -Tocoferol

Otra familia de moléculas que han presentado una actividad relevante en la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales está estrechamente relacionada con la vitamina E, una familia de 8 moléculas de estructuras relacionadas, cuatro tocoferoles (alfa, beta, gama, delta) y cuatro tocotrienoles (alfa, beta, gama, delta) (Figura 1.47).

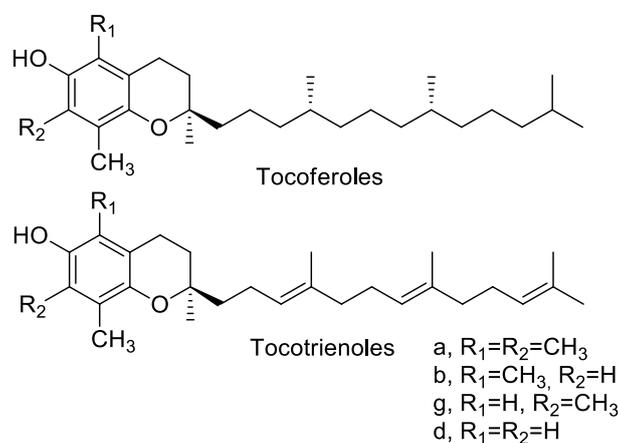


Figura 1.47. Componentes naturales de la Vitamina E

¹⁹² Calgarotto, A.K.; da Silva Pereira, G.J.; Bechara, A.; Paredes-Gamero, E.J.; Barbosa, C.M.V.; Hirata, H.; de Souza Queiroz, M.L.; Smaili, S.S.; Bincoletto, C. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**; 678,6-14.

¹⁹³ Rahmani-Nezhad, S.; Safavi, M.; Pordeli, M.; Kabudanian Ardestani, S.; Khosravani, L.; Pourshojaei, Y.; Mahdavi, M.; Emami, S.; Foroumadi, A.; Shafiee, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**; 86,562-569.

¹⁹⁴ Hung, A.C.; Tsai, C.H.; Hou, M.F.; Chang, W.L.; Wang, C.H.; Lee, Y.C.; Ko, A.; Hu, S.C.; Chang, F.R.; Hsieh, P.W.; Yuan, S.S. *Cancer letters* **2016**, 371,251-261.

Este grupo de moléculas y derivados de las mismas han sido estudiados en la prevención y tratamiento del cáncer.¹⁹⁵ Los tocotrienoles se encuentran en granos y se ha descubierto que inhiben la proliferación de una variedad de cánceres humanos, como el de mama, colon, pulmón y carcinomas hepatocelulares, y páncreas entre otros.¹⁹⁶ Recientemente se estudió la utilización de una combinación de γ -tocotrienol, el derivado éter acetato del α -tocoferol y docetaxel (conocido quimioterápico) como terapia combinada en células tumorales de próstata, se observó que utilizar esta combinación es más efectiva que el docetaxel solo y además la cantidad requerida de dicho compuesto para reducir la viabilidad celular es menor.

197

Un análogo de α -tocoferol, el succinato derivado de la vitamina E (VES, Figura 1.48, también ha demostrado actividad contra el cáncer en mama, próstata, pulmón y colorrectal, así como melanoma y páncreas.¹⁹⁸

Los metabolitos de tocoferol, 2- (20-carboxietil) -6- hidroxicromanos (α y γ -CEHC, Figura 1.47) y Trolox® (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Figura 1.48), un análogo hidrosoluble de la vitamina E, han demostrado ser tan efectivos como sus precursores para inhibir el crecimiento de células tumorales de próstata PC-3 mediante la regulación negativa específica de la expresión de ciclina, siendo las formas gamma las más efectivas.¹⁹⁹ Con respecto a análogos de tocoferol, se ha demostrado que varios compuestos híbridos de tocoferol-tiazolidindiona poseen propiedades anticancerígenas *in vitro* e *in vivo*. En particular, la troglitazona (Figura 1.48) presentó actividad antiproliferativa en varias líneas celulares de cáncer.²⁰⁰

¹⁹⁵ a) Constantinou, C; Papas, A; Constantinou, A.I. *Int. J. Cancer*. **2008**, 123, 739–752; b) Kanchi, M. M; Shanmugam, M.K.; Rane, G.; Sethi, G.; Kumar, A.P. *Drug Discov. Today* **2017**, 22, 1765–1781.

¹⁹⁶ a) Sylvester, P.W.; Shah, S.J. *Front Biosci* **2005**, 10, 699–709; b) Wada, S.; Satomi, Y.; Murakoshi, M.; Noguchi, N.; Yoshikawa, T.; Nishino, H. *Cancer Lett* **2005**, 229, 181–191; c) Xu, W.L.; Liu, J.-R.; Liu, H.-K.; Qi, G.-Y.; Sun, X.-R.; Sun, W.-G.; Chen, B.-Q. *Nutrition* **2009**, 25, 555–566; d) Shin-Kang, S.; Ramsauer, V.P.; Lightner, J.; Chakraborty, K.; Stone, W.; Campbell, S.; Reddy, S.A.; Krishnan, K. *Free Rad. Biol. Med.* **2011**, 51, 1164–1174; e) Laldusaki Sailo, B.; Banik, K.; Padmavathi, G.; Javadi, M.; Bordoloi, D.; Kunnumakkara, A.B. *Pharmacological Research*. **2018**, 130, 259–272.

¹⁹⁷ Asay, S; Graham, A.; Hollingsworth, S.; Barnes, B.; Oblad, R.V.; Michaelis, D.J.; Kenealey, J.D.. *Molecules*. **2020**, 25, 398.

¹⁹⁸ a) Barnett, K.T.; Fokum, F.D.; Malafa, M.P. *J. Surg. Res.* **2002**, 106,292–298; b) Malafa, M.P.; Fokum, F.D.; Andoh, J. *Int. J. Cancer* **2006**, 118, 2441–2447.; c) Malafa, M.P.; Fokum, F.D.; Mowlavi, A.; Abusief, M.; King, M. *Surgery* **2002**, 131, 85–91; d) Malafa, M.P.; Neitzel, L.T. *J. Surg. Res.* **2000**; 93, 163–170; e) Neuzil J. *Br. J. Cancer* **2003**, 89, 1822–1826; f) Patacsil, D.; Osayi, S.; Tran, A.T.; Saenz, F.; Yimer, L.; Shajahan, A.N.; Gokhale, P.C.; Verma, M.; Clarke, R.; Chauhan, S.C.; Kumar, D. *Genes & Nutrition* **2012**, 7, 83–9.

¹⁹⁹ Galli, F.; Stabile, A.M.; Betti, M.; Conte, C.; Pistilli, A.; Rende, M.; Floridi, A.; Azzi, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 423, 97-102.

²⁰⁰ a) Salamone, S.; Colin, C.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Flament, S.; Martin, H.; Richert, L.; Chapleur, Y.; Boisbrun, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 51, 206-215; b) Bordessa, B.; Colin-Cassin, C.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Husson, G.; Voa, M.; Flament, S.; Martin, H.; Chapleur, Y.; Boisbrun, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 83, 129-140.

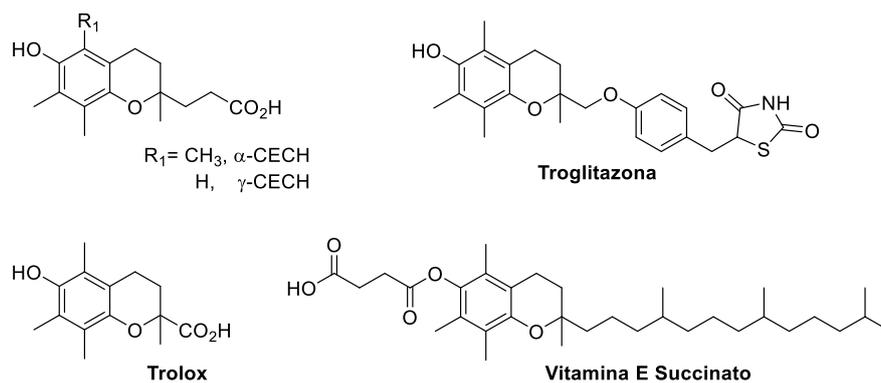


Figura 1.48. Análogos del tocoferol con actividad antiproliferativa.

En este contexto, la propuesta de este trabajo involucra la generación de moléculas híbridas tocoferol-miméticas liberadoras de óxido nítrico y/o conteniendo un grupo nitroalqueno, con potencial actividad antiproliferativa (sobre líneas celulares tumorales), mediante metodologías no convencionales siguiendo principios de la química verde.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

Durante los últimos años, el grupo de investigación al cual pertenece la autora de esta tesis viene trabajando en el desarrollo de potenciales fármacos para el tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), con énfasis en enfermedades cardiovasculares (ECV), del metabolismo, y en cáncer. Como se mencionó anteriormente los farmacóforos: moléculas liberadoras de NO, el tocoferol y el grupo nitroalquenilo; fueron seleccionados como potenciales agentes antitumorales para su hibridación molecular en base a la experiencia química y biológica con que cuenta el grupo.

En este sentido, se han desarrollado compuestos capaces de liberar óxido nítrico. Uno de los sistemas heterocíclicos más estudiados es el furoxano (*N*-óxido de 1,2,5-oxadiazol) así como también se ha trabajado en la preparación de derivados de otros farmacóforos liberadores de óxido nítrico; nitratos orgánicos (R-ONO₂) y nitrosotioles (R-S-N=O) con potencial actividad en diferentes patologías. Estos farmacóforos fueron acoplados a estructuras análogas a la vitamina E (Figura 2.1A), como potenciales agentes antiaterogénicos.^{201, 202} Una vez sintetizados, se realizó la caracterización biológica NO-dependiente: liberación de ·NO, capacidad vasoactiva, inhibición de la agregación plaquetaria, capacidad antioxidante, estudios de afinidad y la caracterización fisicoquímica. Para aquellos compuestos con adecuado perfil de actividad se realizaron estudios preclínicos: citotoxicidad, genotoxicidad, mutagenicidad, estudio en modelo animal, etc.²⁰³

Por otro lado, también se ha estudiado estos compuestos como posibles anticancerígenos. La actividad antiproliferativa de dichas moléculas sobre cuatro líneas celulares tumorales (HeLa, 253J, T24, HepG2) y los estudios de su relación con la liberación de ·NO fueron publicados recientemente.²⁰⁴ El tocoferol-mimético derivado de furoxano FNO5 (Figura 2.1B) surgió como potencial agente anticancerígeno para el tratamiento del cáncer de vejiga. La capacidad de este compuesto de liberar ·NO parece ser necesaria para obtener el efecto

²⁰¹ a) López, G.V.; Batthyány, C.; Blanco, F.; Botti, H.; Trostchansky, A.; Migliaro, E.; Radi, R.; González, M.; Cerecetto, H.; Rubbo, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5787; b) López, G.V., Blanco, F., Hernández, P.; Ferreira, A.; Piro, O.E.; Batthyány, C.; González, M.; Rubbo, H.; Cerecetto, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6262.

²⁰² López, G.V. Tesis Doctoral. Diseño, síntesis y caracterización biológica de tocoferol-miméticos liberadores de óxido nítrico. Facultad de Química, Universidad de la República., Agosto de 2006.

²⁰³ A) López, G. V., Gómez, L. E., Campillo, N.; Páez, J.A.; Giles, K.; Atkinson, J.; González, M.; Rubbo, H.; Cerecetto, H. *Bioorg Med Chem.* **2009**, *17*:8143–8148. b) Cabrera M, López G.V; Gómez, L.E; Breijo, M; Pintos, C; Botti, H; Raymondo, S; Vettorazzi, A; López de Ceráin, A; Monge, A; Rubbo, H; González, M; Cerecetto, H. *Drug and Chemical Toxicology*, **2011**, *34*, 285-293.

²⁰⁴ Pérez, F; Varela, M; Canclini, L.; Acosta, S.; Martínez-López, W.; López, G.V.; Hernández, P. *Anti-Cancer Drugs*, **2019**, *30*, 330-338.

antiproliferativo y sumado a los bajos niveles de toxicidad contra la línea celular normal HaCaT, lo señala como un compuesto líder para el diseño de nuevos agentes anticancerígenos.

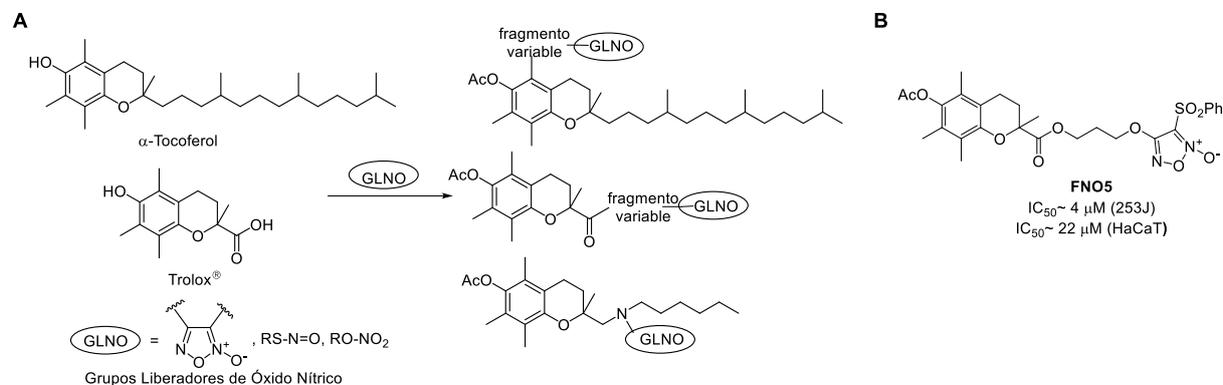


Figura 2.1. A. Esquema general de las moléculas híbridas estudiadas. B. Estructura del tocoferol-mimético derivado del furoxano con destaca actividad antiproliferativa en células tumorales, FNO5.

Con relación al desarrollo de derivados conteniendo el grupo nitroalqueno, el grupo del cual formo parte ha estado trabajando en la investigación y desarrollo de nitroalquenos análogos del α -tocoferol (Figura 2.2) como nuevos compuestos antiinflamatorios y antiaterogénicos.^{205,206,207} La inflamación crónica, estéril, de bajo grado juega un rol central en la patogenia de las enfermedades cardiovasculares y metabólicas. En este contexto, por una parte, se desarrollaron compuestos híbridos (NATOH, Figura 2.2) de modo de encontrar en una misma molécula la acción antiinflamatoria/antiaterogénica de nitroalquenos sumado al transporte selectivo del α -tocoferol en el organismo a través de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El α -tocoferol es el principal compuesto antioxidante presente en las LDL y éstas constituyen la principal fuente de lípidos y colesterol que forman y contribuyen al desarrollo de la placa de ateroma. De esta forma, la estrategia consiste en cargar a las lipoproteínas con nuestro potencial fármaco y que la LDL actúe como un transportador del mismo a la lesión aterosclerótica.

²⁰⁵ Batthyány, C. y López, G.V, inventores. WO2015073527 (A1). 21 de mayo de 2015.

²⁰⁶ Rodríguez-Duarte J, Galliussi, G; Dapuetto, R; Rossello, J; Malacrida, L; Kamaid, A; Schopfer, F.J; Escande, C; López, G.V; Batthyány, C. *Br J Pharmacol.* **2019**, 176, 757-772.

²⁰⁷ Rodríguez-Duarte J, Dapuetto, R; Galliussi, G; Turell, L; Kamaid, A; Khoo, N.K:H; Schopfer, F.J; Freeman, B.A; Escande, C; Batthyány, C; Ferrer-Sueta, G; López, G.V. *Sci Rep* **2018**, 8, 12784

Paralelamente, se desarrollaron nitroalquenos derivados de Trolox™ (NATx0, Figura 2.2), análogo hidrosoluble del α -tocoferol, con propiedades fisicoquímicas diferentes y propiedades biológicas más potentes, que podrían considerarse como una mejor opción terapéutica para otras enfermedades metabólicas.

Los resultados de los estudios fisicoquímicos e *in vitro* demuestran que son compuestos con actividad antiinflamatoria. NATOH se incorporó *in vivo* en las partículas de VLDL/LDL para alcanzar las lesiones de ateroma, disminuyó la expresión de marcadores proinflamatorios y mejoró la aterosclerosis en ratones Apo E^{-/-} alimentados con dieta rica en grasas.¹⁹⁴ Por su parte, NATx0 logró reducir la resistencia a la insulina en un modelo de ratón con obesidad inducida por dieta acompañado de la disminución de marcadores inflamatorios en el tejido adiposo de dichos animales.²⁰⁸

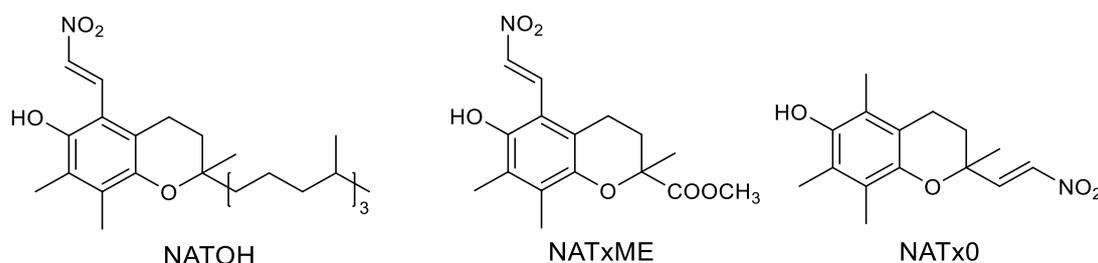


Figura 2.2. Moléculas híbridas tocoferol-nitroalqueno.

Más recientemente, considerando el potencial terapéutico de los nitroalquenos derivados de compuestos aromáticos antes descrito, se han diseñado y sintetizado derivados nitroalqueno de otras moléculas de relevancia biológica de origen aromático para el tratamiento de ECNT (Figura 2.3).^{209,210}

²⁰⁸ Dapuetto, R. Tesis Doctoral. Inhibidores de CD38 y nitroalquenos derivados de la vitamina E para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. ProInBio, Facultad de Medicina, Universidad de la República. En marcha.

²⁰⁹ Batthyány, C; López, G.V; Escande, C; Rodriguez-Duarte, J; Porcal, W; Dapuetto, R; Galliussi, G; Garat, M.P; Hill, M; Segovia, M. WO2018069907(A1). 4 de Abril de 2018.

²¹⁰ Batthyány, C; López, G.V; Escande, C; Rodriguez-Duarte, J; Porcal, W; Dapuetto, R; Galliussi, G; Garat, M.P; Invernizzi, P; Collela, L; Ingold, M. US20190194121(A1). 27 de Junio 27 de 2019.

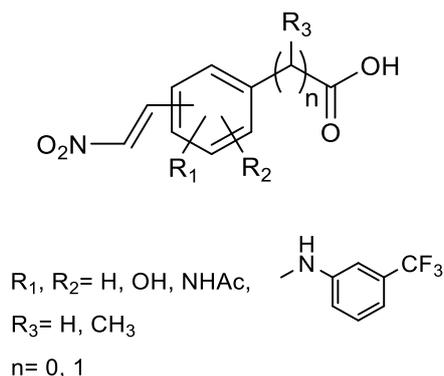


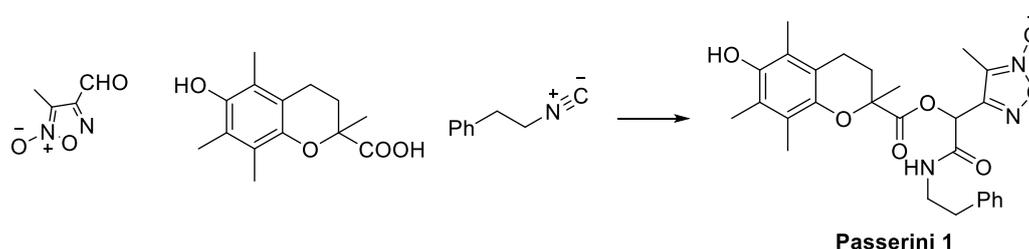
Figura 2.3. Estructura general de los nitroalquenos antiinflamatorios desarrollados.

Dada la evidencia ya mostrada sobre el posible uso de moléculas que presentan el grupo nitroalqueno como agentes anticancerígenos y a la experiencia en su síntesis en el grupo, también nos planteamos la síntesis verde mediante RMC de Passerini y Ugi de compuestos híbridos conteniendo este grupo funcional y su evaluación en distintas líneas cancerígenas, como se detallará más adelante.

Desde 2011, el grupo de investigación al cual pertenezco ha enfocado su trabajo en el desarrollo de moléculas bioactivas bajo condiciones amigables con el medio ambiente. En este contexto, tres aspectos claves que aplicamos en nuestra metodología de investigación e innovación en consonancia con principios de la química verde son : 1) el uso de disolventes verdes o evitar la utilización de disolventes orgánicos volátiles tradicionales en la reacciones a estudiar; 2) llevar a cabo reacciones a temperatura ambiente o mediante la utilización de fuentes de energía eficientes y 3) diseñar y generar diversidad molecular con alta economía atómica mediante la aplicación de reacciones multicomponente.

En el trabajo de tesina de grado de la autora de esta tesis, se comenzó a trabajar en la síntesis de nuevos compuestos tocoferol-miméticos con actividad liberadora de óxido nítrico siguiendo estos lineamientos. En este marco, con base en la literatura disponible, se estudió la reacción de Passerini (Esquema 2.1), utilizando Trolox como el componente ácido carboxílico, un aldehído derivado de furoxano, capaz de liberar NO y fenetil isocianuro, para rendir el producto híbrido deseado Passerini 1, en diferentes condiciones que involucran el

uso de soluciones bifásicas o acuosas, el no uso de disolventes, la influencia de la presencia de ciertos aditivos, irradiación por microondas, entre otros.^{211, 212}



Esquema 2.1 Síntesis de un tocoferol-mimético liberador de $\cdot\text{NO}$ vía reacción de Passerini.

Tabla 2.1 Condiciones ensayadas para la síntesis de un análogo de tocoferol liberador de $\cdot\text{NO}$ vía reacción de Passerini (**Passerini 1**, Esquema 2.1).

Entrada	Disolvente	Tiempo (h)	Temperatura	Rendimiento (%)
1	CH_2Cl_2	4	TA	50
2	H_2O	4	TA	31
3	H_2O	2	TA	33
4	H_2O	72	TA	33
5	2.5 M ac. LiBr	4	TA	45
6	1M ac. Glucosa	4	TA	43
7	H_2O (ITBA cat.)	24	TA	19
8	H_2O :Acetonitrilo (3:1)	72	TA	23
9	H_2O :Acetonitrilo (1:3)	72	TA	30
10	Acetonitrilo	72	TA	62
11	H_2O	5 min	60 °C (MW)	62
12	Acetonitrilo	10 min	60 °C (MW)	64
13	Sin disolvente	10 min	No determinada (MW, 100W)	70

Como se observa en la Tabla 2.1, la reacción inicialmente se ensayó en condiciones clásicas, utilizando diclorometano como disolvente, obteniéndose el compuesto deseado con 50 % de rendimiento (Tabla 2.1, entrada 1). En paralelo, se ensayó la reacción utilizando agua como disolvente a temperatura ambiente pero a distintos tiempos de reacción (Tabla 2.1, Entradas 2, 3 y 4), donde se observa que luego de 4 horas la reacción no avanza con rendimientos entre

²¹¹ Ingold, M. Tesina de graduación: UNA REACCIÓN MULTICOMPONENTE EN QUÍMICA VERDE APLICADA A LA SÍNTESIS DE ANÁLOGOS BIOACTIVOS DE TOCOFEROL. Facultad de Ciencias, Udelar, mayo 2013.

²¹² Ingold, M; López, G.V; Porcal, W. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. **2014**, 2, 1093.

31 % y 33 %. Además, teniendo en cuenta reportes en la literatura ⁵⁴ que describen que llevar a cabo la reacción acuosa con determinados solutos como LiBr (iónico) o glucosa (no iónico), aumentan los rendimientos y disminuyen los tiempos de reacción con respecto al uso de agua pura, se ensayaron condiciones similares (Entradas 5 y 6), observándose que dichos solutos aumentan los rendimientos a un 43-45 %. La solvatación de moléculas hidrofílicas o iónicas conducen a la organización de moléculas de agua alrededor del soluto, aumentando así la estructura del agua en el medio de reacción. Si bien existe un incremento del rendimiento el mismo no fue de gran importancia. También se ensayó la reacción utilizando ioduro de tetrabutilamonio (ITBA) como catalizador de transferencia de fase. En este caso no hubo aumento del rendimiento con respecto al agua pura, sino por el contrario una disminución al 19 %.

Por otro lado, la reacción se realizó utilizando otro disolvente orgánico, acetonitrilo (Entrada 10), y mezclas de agua - acetonitrilo en diferentes proporciones (Entradas 8 y 9). Bajo estas condiciones se observó que el rendimiento de la reacción aumenta a 62 % en acetonitrilo. Las mezclas de acetonitrilo/agua no muestran una mejora en los rendimientos.

Como ya ha sido mencionado en la introducción, en los últimos años, el uso de la radiación de microondas (MW) ha resultado muy versátil cuando se desea simplificar o mejorar reacciones orgánicas clásicas. Esta metodología no convencional a menudo conduce a rendimientos de reacción más altos, tiempos de reacción más cortos y reacciones más limpias. Además, las reacciones sin disolventes combinadas con el uso de MW dan como resultado una tecnología eficiente y segura, que es una condición necesaria en la química verde. En este contexto, se ensayó la reacción de Passerini utilizando un reactor de Microondas comercial multimodo (WX-4000, EU Chemicals Instruments) a 60 °C, obteniéndose rendimientos más altos en tiempos drásticamente más cortos. Las condiciones utilizadas involucraron el uso de agua o acetonitrilo como disolventes o libre de disolventes (Entradas 11 a 13). En los tres casos se aprecia un aumento en el rendimiento de la reacción, siendo el mejor sin disolvente (70 %) y habiendo además un dramático descenso del tiempo de reacción (10 minutos).

Estas condiciones, en donde se obtuvieron los mejores resultados sintéticos están en el marco de la química verde, ya que no se utilizan disolventes, ni catalizadores y optimizándose las cantidades de energía para llevar a cabo dicha reacción. De este modo, mediante la aplicación

de irradiación de microondas se obtiene un producto complejo en un único paso, en donde la reacción elegida integra en el producto todos los átomos de los reactivos (eficiencia atómica del 100 %).

El producto híbrido de **Passerini 1** (Esquema 2.1), fue evaluado en su capacidad antiproliferativa en 6 líneas celulares tumorales humanas, junto con el reactivo de partida Trolox y dos fármacos conocidos como antitumorales, Cisplatino y Etopósido.²¹³ Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Actividad antiproliferativa (IC₅₀) contra células tumorales sólidas humanas.*

Compuesto	A549 (pulmón)	HBL-100 (mama)	HeLa (cervix)	SW1573 (pulmón)	T-47D (mama)	WiDr (colon)
Passerini 1	25 (±1.4)	26 (±6.4)	23 (±4.2)	29 (±4.4)	28 (±5.5)	44 (±12)
Trolox	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Cisplatino	2.1 (±0.6)	1.9 (±0.3)	2.0 (±0.3)	3.0 (±0.4)	15 (±2.3)	26 (±5.3)
Etopósido	1.5 (±0.2)	2.3 (±0.9)	3.0 (±0.9)	15 (±1.5)	22 (±5.5)	23 (±3.1)

*Los valores se dan en μM y son medias de dos a tres experimentos; La desviación estándar se da entre paréntesis.

De los mismos se puede concluir que el compuesto obtenido presenta cierta actividad antiproliferativa, para las líneas celulares A549, HBL-100, HeLa y SW1573 no es mejor que los fármacos de referencia, pero para las líneas resistentes T-47D y WiDr está en el mismo orden. Lo que demuestra que esta molécula puede ser un punto de partida para posteriores optimizaciones y así encontrar nuevos híbridos con mejorada actividad biológica. Además, es destacable que el reactivo Trolox por sí solo, no tiene actividad antiproliferativa en dichas líneas celulares, lo que demuestra la validez de la estrategia del desarrollo de moléculas híbridas donadores de $\cdot\text{NO}$ tocoferol-miméticas a través de reacciones multicomponente.

²¹³ Ingold, M; Dapuetto, R; Victoria, S; Galliusi, G; Batthyany, C; Bollati-Fogolín, M; Tejedor, D; García-Tellado, F; Padrón, J.M; Porcal, W; López, G.V. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 1888.

De esta manera esta investigación ha marcado el punto de partida de esta tesis de doctorado, la cual tiene el objetivo de ampliar el espacio químico estudiado, encontrando nuevas estructuras híbridas con actividades biológicas mejoradas, las cuales serán sintetizadas siguiendo principios de la química verde.

Capítulo 3

OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

3.1 Objetivo General

A partir de lo documentado anteriormente, el objetivo principal de este trabajo es la generación de una quimioteca de moléculas bioactivas por hibridación molecular entre el sistema α -tocoferol y grupos liberadores de óxido nítrico y/o conteniendo un grupo nitroalqueno y el estudio de su actividad anticancerígena. Para la generación de esta colección de moléculas se utilizará como aproximación metodológica la síntesis orientada a la diversidad enfocada. Para ello, estudiaremos reacciones multicomponente, como son la reacción de Passerini y Ugi, en condiciones de reacción amigables con el medioambiente, siguiendo principios de la química verde.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Diseño y síntesis de híbridos tocoferol-miméticos liberadores de $\cdot\text{NO}$ en condiciones verdes a través de RMC.
- 2- Diseño y síntesis de nitroalquenos incluyendo en su estructura tocoferol-miméticos, en condiciones verdes a través de RMC.
- 3- Evaluación biológica de los compuestos obtenidos. Estudio de la capacidad antiproliferativa *in vitro* en líneas celulares tumorales. Estudios de mecanismos de acción para compuestos seleccionados.

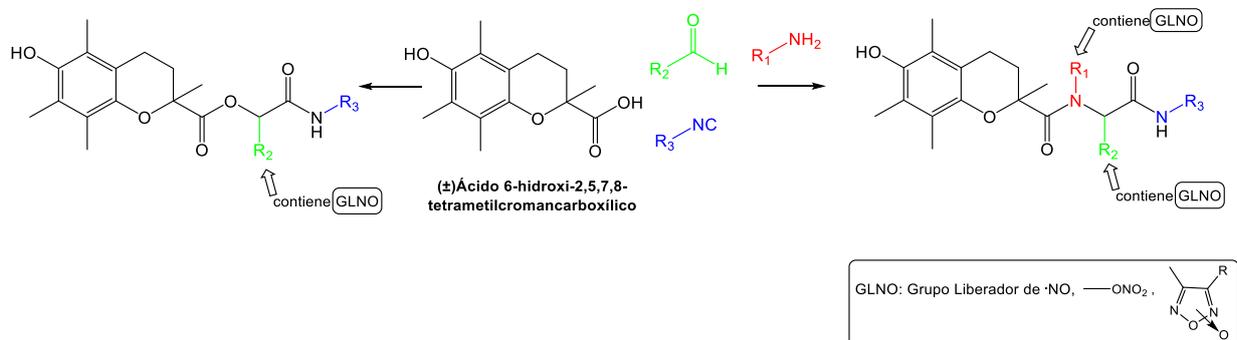
3.3 Estrategia de trabajo

Objetivo específico 1

En la primera etapa se plantea obtener estructuras híbridas *tocoferol-miméticas liberadoras de óxido nítrico* utilizando como estrategia sintética las RMC de Passerini y de Ugi, la primera involucra un ácido carboxílico, un aldehído y un isonitrilo, para la Ugi además una amina. Por lo que se incorporará el sistema cromano en alguno de dichos componentes. Asimismo, el farmacóforo liberador de óxido nítrico (nitrooxilo o furoxano) también será incorporado como alguno de los componentes antes mencionados. Por lo que, se han diseñado dos series de compuestos donde se introduce el sistema cromano como ácido carboxílico o como aldehído.

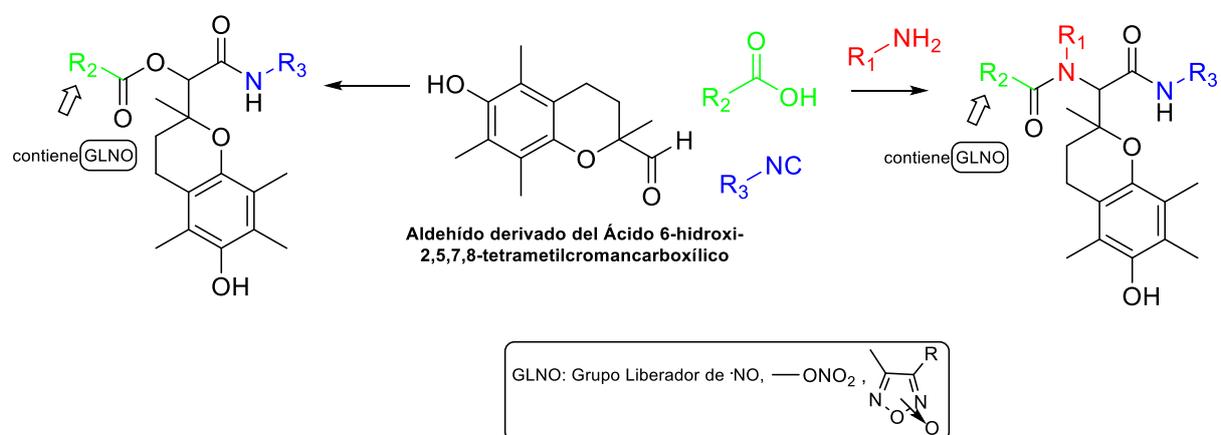
SERIE I: En esta serie el sistema cromano se introduce a nivel del componente ácido carboxílico (Esquema 3.1). El grupo liberador de $\cdot\text{NO}$ estará en el componente aldehído o

amina y el resto de los reactivos utilizados serán comerciales. Se ensayarán condiciones de reacción amigables con el medioambiente, como son la síntesis en medio acuoso, libre de disolvente o en el caso de utilizar disolventes orgánicos, que los mismos sean considerados verdes. También se tendrán en cuenta las condiciones energéticas y en el caso que no sea óptimo que las reacciones sean llevadas a cabo a temperatura ambiente, se utilizarán métodos de calentamiento alternativos, como los ya mencionados microondas o ultrasonido. Para las distintas condiciones a ensayar se tendrá en cuenta la bibliografía descrita en la introducción que involucra mayormente derivados comerciales simples, pero ahora utilizados en sistemas complejos en cuanto a reactividad química.



Esquema 3.1. Estructura general de los compuestos de la serie I.

SERIE II: En esta serie el sistema cromano se introduce a nivel del componente aldehído (Esquema 3.2). El grupo liberador de $\cdot\text{NO}$ estará en el componente ácido carboxílico y el resto de los reactivos utilizados serán comerciales. Se ensayarán condiciones de reacción amigables con el medioambiente, similares a las mencionadas en el punto anterior.



Esquema 3.2. Estructura general de los compuestos de la serie II.

Objetivo específico 2

En la segunda etapa se plantea obtener estructuras híbridas *tocoferol-miméticas con un grupo nitroalqueno* utilizando como estrategia sintética la RMC de Ugi. Para cumplir con dicho objetivo se diseñó una tercera serie de compuestos donde se incorporará el sistema cromano en el componente aldehído. A diferencia de las anteriores series no se utiliza la reacción de Passerini, ya que esta estrategia forma parte de otra tesis que se lleva adelante en el grupo.

214

SERIE III: Confidencial.

Objetivo específico 3

Se realizará la evaluación *in vitro* de los compuestos obtenidos previamente, como potenciales agentes antitumorales. El objetivo de este ensayo es identificar la actividad antiproliferativa de los compuestos, la cual se estudiará en un panel de 6 líneas celulares humanas procedentes de tumores sólidos de origen diverso: HBL100 (células de cáncer de mama), HeLa (células de cáncer de cérvix), SW1573 (células de cáncer de pulmón), T-47D (células de cáncer de mama), WiDr (células de cáncer de colon) y A549 (células de cáncer de pulmón).

Para los compuestos que resulten con la mejor actividad biológica se estudiará su citotoxicidad en células humanas no tumorales, para así poder establecer un índice de selectividad. También se harán ensayos de ciclo celular y muerte celular. Además se realizarán ensayos para tener una primera aproximación al mecanismo de acción de los mismos (para las moléculas líder de la Serie I y II la capacidad de liberación de $\cdot\text{NO}$ y se estudiará el efecto de los compuestos de la Serie III sobre la activación del inflammasoma NLRP3).

²¹⁴ Collela, L. Tesis Doctoral. Desarrollo de nitroalquenos bioactivos siguiendo principios de química verde. Facultad de Química, Universidad de la República. En marcha

Capítulo 4

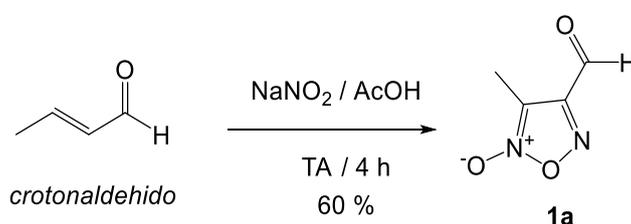
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Serie I. Estructuras híbridas tocoferol-miméticas liberadoras de óxido nítrico obtenidas mediante RMC.

4.1.1. Química.

En esta primera serie de compuestos se plantea obtener estructuras híbridas *tocoferol-miméticas liberadoras de óxido nítrico* utilizando como estrategia sintética las RMC de Passerini y de Ugi, la primera involucra un ácido carboxílico, un aldehído y un isonitrilo, para la Ugi además una amina. En esta serie el sistema cromano se introduce a nivel del componente ácido carboxílico y el grupo liberador de $\cdot\text{NO}$ estará en el componente aldehído o amina.

En primer lugar se continuó el trabajo iniciado durante la tesina de grado de la autora de esta tesis, en donde, como ya se mencionó, se optimizó la síntesis del compuesto **Passerini1**. Para sintetizar análogos del mismo, se utilizó como componente aldehído el derivado de furoxano (farmacóforo liberador de NO) (**1a**).²¹⁵ Para su obtención se trató crotonaldehído con una solución acuosa de nitrito de sodio durante 4 horas a temperatura ambiente, obteniendo el producto deseado con un rendimiento moderado (esquema 4.1). Este método proporciona una síntesis limpia de este compuesto.

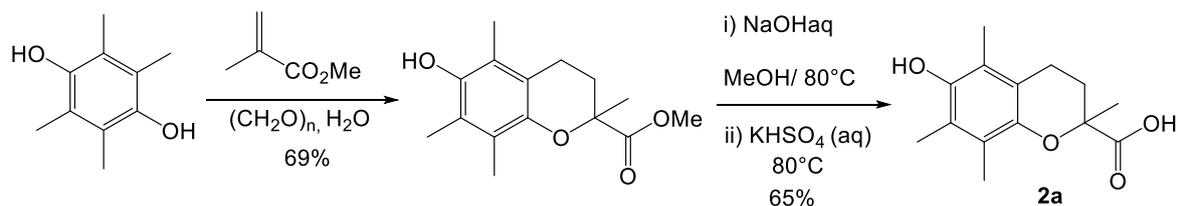


Esquema 4.1. Síntesis del aldehído **1a**.

Por otro lado, se sintetizó el ácido carboxílico análogo de tocoferol (Trolox, Vitamina E hidrosoluble) (**2a**).²¹² En primer lugar, se preparó el metil éster de Trolox y luego se hidrolizó al ácido carboxílico deseado, como se muestra en esquema 4.2. Es destacable que el primer paso de esta ruta sintética, es decir la formación del anillo de cromano; un fenol, una olefina y formaldehído reaccionan en una sola etapa de reacción. Se utilizan condiciones suaves en ausencia de catalizador y en presencia de agua (sin el uso de co-disolventes), en un reactor a

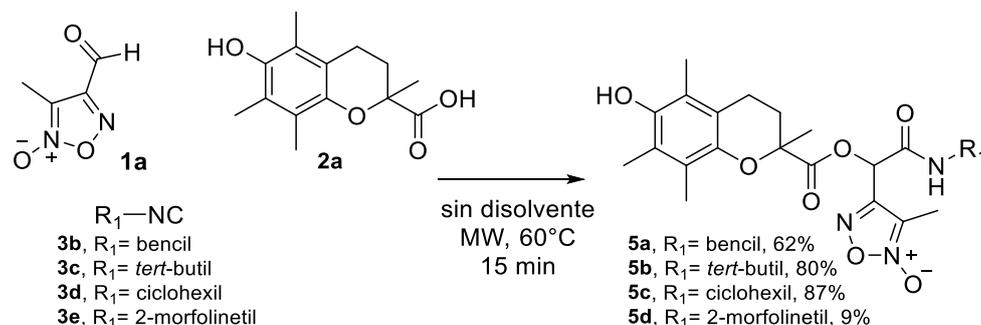
²¹⁵ Serafim, R. A.M; Gonçalves, J. E; de Souza, F. P; de Melo Loureiro, A. P; Storpirtis, S; Krogh, R; Andricopulo, A.D; Dias, L.C; Ferreira, E. I. *Eu. J. Med. Chem.* **2014**, 82, 418–425.

presión, obteniéndose el producto con buenos rendimientos. Estas condiciones están de acuerdo con los principios de la química verde.



Esquema 4.2. Síntesis del ácido carboxílico **2a**.

Es así que con los componentes obtenidos, se sintetizaron los análogos al compuesto **Passerini1**, en las condiciones optimizadas durante la tesina de grado, variando el componente isonitrilo con reactivos comerciales, como se muestra en el esquema 4.3, donde además se muestran los resultados encontrados.



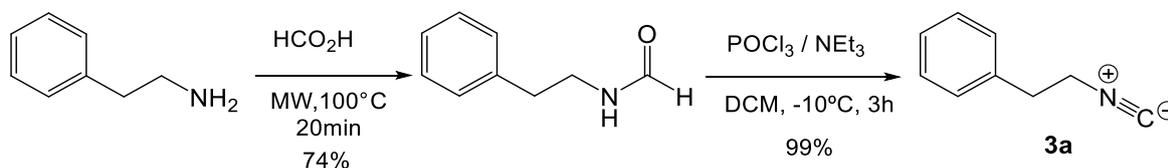
Esquema 4.3. Híbridos tocoferol-miméticos liberadoras de óxido nítrico obtenidos mediante reacción de Passerini.

Los productos se obtuvieron en tiempos de reacción cortos (15 min) a 60 °C, bajo irradiación de microondas sin la utilización de disolventes, con muy buenos rendimientos para los derivados **5a-c** (62-87 %). excepto cuando se utilizó el 2-morfolinetil isocianuro (9 %, derivado **5d**). Este resultado puede deberse a la posibilidad de reacciones competitivas mediante la función amina presente en el anillo de morfolina, actuando tanto como base y/o como nucleófilo, y por lo tanto le cueste reaccionar mediante la reacción de Passerini.²¹⁶ Los buenos resultados obtenidos bajo estas condiciones se ven resaltados si tenemos en cuenta que utilizamos, tanto el componente ácido como aldehído, con sustituyentes que aumentan el impedimento estérico, un efecto que disminuye drásticamente los rendimientos en esta clase de RMC.

²¹⁶ Giustiniano, M; Basso, A; Mercalli, V; Massarotti, A; Novellino, E; Tron, G. C; Zhu, J. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 5, 1295–1357.

Por otro lado, para ampliar el espacio químico estudiado, se trabajó en la síntesis de análogos al compuesto **Passerini1** a través de la reacción de Ugi, utilizando el aldehído derivado de furoxano (farmacóforo liberador de NO) (**1a**), el ácido carboxílico análogo de tocoferol (Trolox, Vitamina E hidrosoluble) (**2a**) y feniletisocianuro (**3a**), además la amina comercial **4a**, bajo su forma de clorhidrato. También se ensayó la reacción con benzaldehído (**1b**) como modelo químico de reactividad (Tabla 4.1).

Es de destacar que el feniletisocianuro fue sintetizado usando una ruta sintética en dos etapas como se muestra en el esquema 4.4.²¹² Primero, se llevó a cabo la formación de *N*-(2-feniletil)formamida usando feniletilamina y ácido fórmico como reactivos. Generalmente, la síntesis de carboxamidas a partir de aminas y ácidos carboxílicos implica la activación del grupo carboxílico. En este caso se realizó bajo condiciones libres de disolventes y activadores usando irradiación de microondas a 100 ° C durante 20 minutos, obteniendo la amida deseada con un rendimiento del 74 %. En el siguiente paso, se obtuvo el isonitrilo (**3a**), con un rendimiento excelente siguiendo un procedimiento estándar que implica la deshidratación de la formamida usando cloruro de fosforilo y trietilamina.

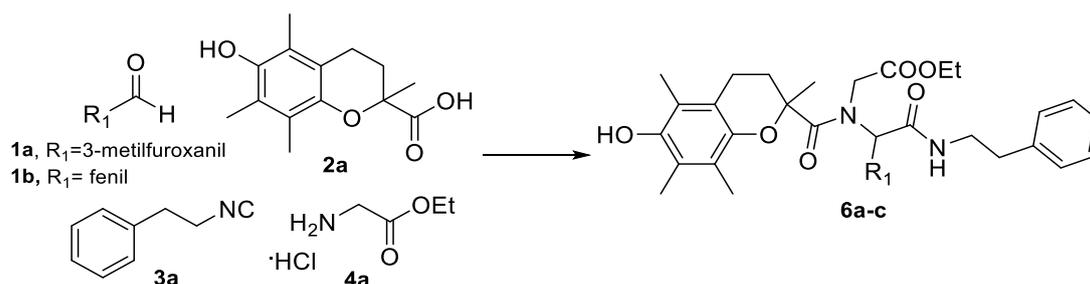


Esquema 4.4. Síntesis del isonitrilo **3a**.

Luego, la reacción de Ugi se llevó a cabo bajo distintas condiciones experimentales, en la Tabla 4.1 se resumen los principales resultados encontrados.

Los resultados obtenidos indican que la reacción de Ugi no se ve favorecida al utilizar el aldehído de furoxano (Tabla 4.1, entradas 1 a 5). Esto podría deberse a que es conocido que los sistemas furoxano pueden dar reacciones de apertura de anillo o formación de nuevos sistemas heterocíclicos con variados nucleófilos, entre ellos aminas,²¹⁷ como en este caso que se utilizó una amina primaria nucleofílica.

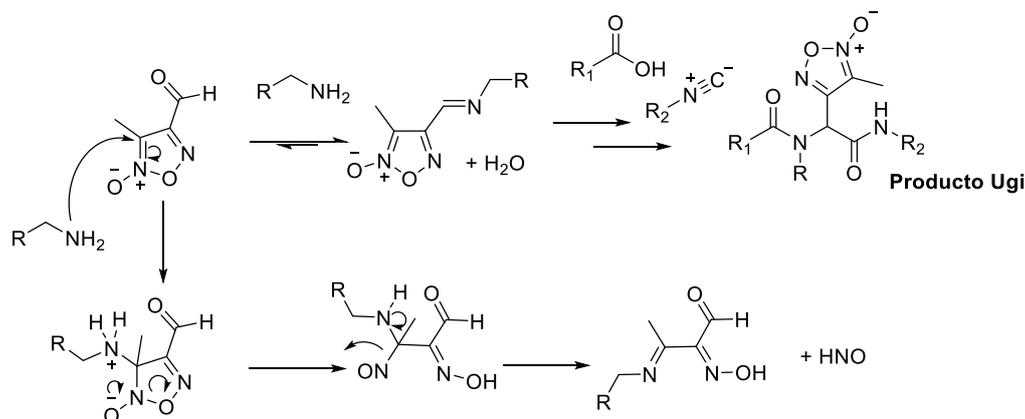
²¹⁷ A) Tannant, G; Wallace, G. M. *J Chem. Soc. Chem. Comm.* **1982**, 4, 267. B) Butler, A.R.; Lightfoot, P; Short, D.M. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 8748-8749.

Tabla 4.1. Esquema, condiciones ensayadas y resultados obtenidos para la reacción de Ugi estudiada

Entrada	R ₁	Condiciones	Producto (Rendimiento)	Observaciones
1	3-metilfuroxanil	H ₂ O, NaOH, TA, 24 h	6a (0)	Se obtiene producto de Passerini (Passerini1 , 30%)
2	3-metilfuroxanil	H ₂ O, NaOH, MW (60 °C), 15 min.	6a (0)	Se obtiene producto de Passerini (Passerini1 , 25%)
3	3-metilfuroxanil	CH ₃ CN, Et ₃ N, TA, 24 h	6a (0)	Mezcla compleja de reacción
4	3-metilfuroxanil	MeOH, NaOH, TA, 24 h	6a (0)	Mezcla compleja de reacción
5	3-metilfuroxanil	MeOH, NaOH, MW (60 °C), 15 min.	6a (0)	Mezcla compleja de reacción
6	Fenil	MeOH, NaOH, TA, 48h.	6b (53%)	Producto de Passerini (5e , 5%). El producto se obtuvo transesterificado
7	Fenil	MeOH, NaOH, MW (60 °C), 15 min.	6c (67%)	
8	Fenil	H ₂ O, NaOH, TA, 48 h	6c (16%)	Se obtiene producto de Passerini (5e , 18%)
9	Fenil	H ₂ O, NaOH, MW (60 °C), 15 min.	6c (14%)	Se obtiene producto de Passerini (5e , 14%)
10	Fenil	EtOH, NaOH, MW (60 °C), 45 min.	6c (61%)	
11	Fenil	EtOH, NaOH, MW(100 °C), 45 min	6c (54%)	
12	Fenil	sin disolvente, MW (100W), 45 min.	6c (18%)	Se obtiene producto de Passerini (5e , 41%)

En el esquema 4.5 se muestra como la amina en vez de formar la imina, primer paso de la reacción de Ugi, podría atacar al anillo y de esta manera promover su apertura. Este

mecanismo es una posibilidad, podrían darse otras reacciones, lo cual sería coherente dado que se obtiene una mezcla compleja en la reacción.



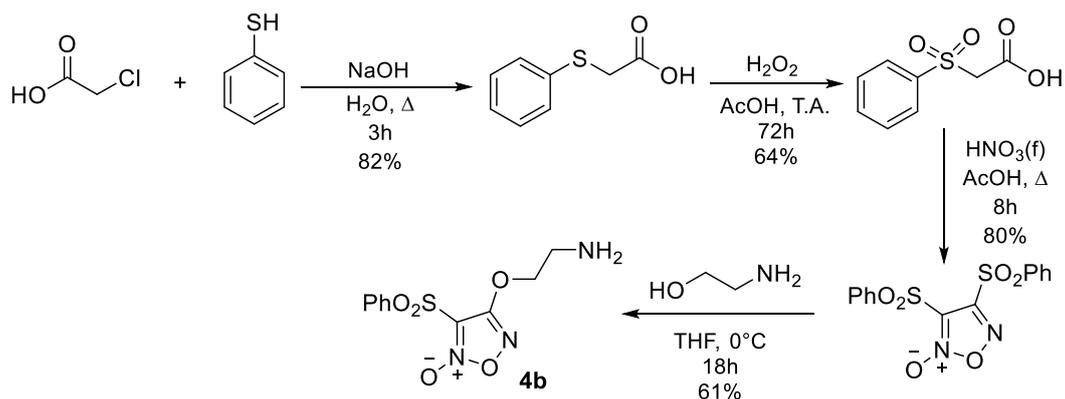
Esquema 4.5. Apertura del anillo de furoxano vs reacción de Ugi.

En los casos en que se utilizó agua como disolvente (Tabla 4.1, entradas 1 y 2) se logró aislar el producto de Passerini en bajos rendimientos. Esto puede deberse a que el primer paso clave de la reacción de Ugi es la formación de una imina (ver Figura 1.30). Dicha formación en este caso puntual puede verse afectada por la presencia del agua, desplazando el equilibrio a la forma ceto y por lo tanto favoreciendo la reacción de Passerini. Dicho efecto también se visualiza cuando se utiliza benzaldehído como componente (Tabla 4.1, entradas 8 y 9).

Al utilizar el benzaldehído se obtuvo el producto de Ugi bajo ciertas condiciones. Mientras que en la mayoría de las condiciones estudiadas se obtuvo una mezcla del producto de Ugi y de Passerini, cuando se utilizó MeOH o EtOH como disolvente, combinado con el uso de irradiación de microondas, se logró aumentar el rendimiento de la reacción multicomponente deseada y no se dieron reacciones secundarias (Tabla 4.1, entradas 7, 10 y 11). Al comparar ambos disolventes el resultado fue similar, por lo que este proceso puede ser llevado a cabo eficientemente en un disolvente como el EtOH, el cual se considera “verde”, como se vió en la introducción (Figura 1.5).

A partir de los resultados obtenidos se decidió seguir utilizando el benzaldehído e incorporar el liberador de óxido nítrico a nivel del componente amina. Para esto se utilizó el *N*-óxido de 3-aminoetilo-4-fenilsulfonil-1,2,5-oxadiazol (**4b**) preparado a partir de *bis*(fenilsulfonil)furoxano sintetizado según bibliografía,²¹⁸ como se muestra en el Esquema 4.6.

²¹⁸ Sorba, G; Medana, C; Fruttero, R; Cena, C; Di Stilo, A; Galli, U; Gasco, A. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 4, 463–469.

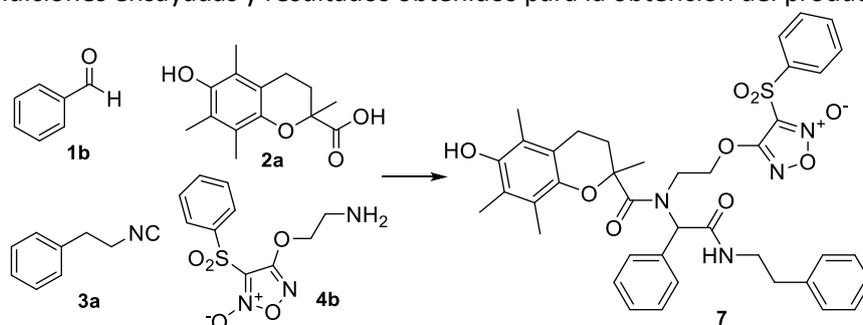


Esquema 4.6. Síntesis de *N*-óxido de 3-aminoetiloxi-4-fenilsulfonil-1,2,5-oxadiazol (**4b**)

Así, mediante un primer paso de *S*-alquilación entre ácido cloroacético y tiofenol, se obtiene un tioéter, el cual se oxida en presencia de peróxido de hidrógeno para generar la correspondiente sulfona. Seguidamente por tratamiento con ácido nítrico fumante se genera el sistema furoxano, el cual finalmente por sustitución nucleofílica en presencia de 2-aminoetanol rindió la amina deseada **4b**.

Una vez obtenida la amina, se llevó a cabo la reacción de Ugi correspondiente (Tabla 4.2) bajo distintas condiciones experimentales.

Tabla 4.2. Condiciones ensayadas y resultados obtenidos para la obtención del producto de Ugi **7**.



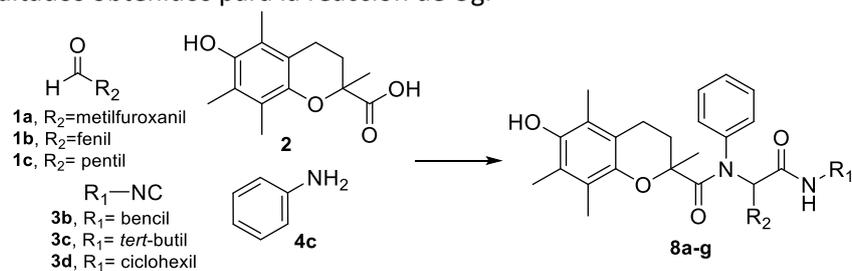
Entrada	Condiciones	Rendimiento	Observaciones
1	H ₂ O, TA, 50 h	–	Se obtuvo producto de Passerini (5e , 22%)
2	EtOH, TA, 50h	6%	–
3	EtOH, MW (60 °C, 100 W), 60 min.	–	–
4	sin disolvente, MW (60 °C, 100 W), 60 min.	–	Se obtuvo producto de Passerini (5e , 13%)
5	sin disolvente, Alumina, MW (60 °C, 100 W), 60 min.	4%	Se obtuvo producto de Passerini (5e , 9%)
6	CH ₂ Cl ₂ , TA, 50 h	11%	–
7	CH ₂ Cl ₂ seco, Tamices moleculares, TA, 50 h	4%	Se obtuvo producto de Passerini (5e , 8%)

A partir de los resultados obtenidos, podemos destacar que no fue posible obtener el producto deseado con buenos rendimientos en ninguna de las condiciones ensayadas. Además en todas ellas se obtuvieron mezclas complejas, de algunas fue posible separar el producto deseado en bajos rendimientos y en algunos casos el subproducto de la reacción de Passerini. Esto puede deberse a como ya se comentó, la posibilidad de los furoxanos de reaccionar con nucleófilos, pudiendo reaccionar con la amina de otras moléculas o con nucleófilos que se forman en el mecanismo de Ugi. Se observa que la condición en la que el producto de Ugi se consigue con mayor rendimiento y sin la formación concomitante del producto de Passerini es cuando se utiliza diclorometano como disolvente de reacción (Tabla 4.2, entrada 6), sin embargo, esta condición no está dentro de los parámetros de la química verde. Otro de los problemas que surgió durante la síntesis de este derivado de Ugi es que el mismo no es estable, se descompone rápidamente, lo cual podría también ser causa de los bajos rendimientos.

Dados los resultados obtenidos anteriormente, se decidió estudiar la reacción de Ugi utilizando distintos reactivos comerciales, entre ellos anilina como amina menos nucleofílica, y Trolox[®] como componente ácido. La reacción se realizó bajo distintas condiciones experimentales en consonancia con principios de la química verde. En la Tabla 4.3 se resumen los principales resultados encontrados.

Así, en primer lugar se optimizó la reacción utilizando, Trolox, anilina, benzaldehído y bencilisocianuro como componentes en la reacción de Ugi (Tabla 4.3, entradas 1-7). Dicha reacción se llevó a cabo en varias condiciones verdes y la mejor fue en Buffer pH 5.5 AcONa/AcOH a temperatura ambiente por 24 horas, ya que se obtuvo un muy buen rendimiento y además no se obtuvo producto de Passerini (Tabla 4.3, entrada 1). La literatura describe que trabajar a un pH controlado favorece la formación y estabilidad del grupo imina, lo cual seguramente permitió mejorar el rendimiento en esta clase de RMC, controlada en su primer paso por la formación de una imina como intermedio de reacción.²¹⁹

²¹⁹ a) Cruz-Acosta, F; de Armas, P; Garcia-Tellado, F. *Chem. Eur. J.* **2013**,19, 16550 – 16554. b) Dirksen, A., Hackeng, T.M., Dawson. P.E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7581–7584.

Tabla 4.3. Resultados obtenidos para la reacción de Ugi

Entrada	R ₁	R ₂	Condiciones	Producto (Rendimiento)	Observaciones
1	bencil	fenil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	8a (77)	-
2	bencil	fenil	Sin disolvente, MW (60 °C), 15 min.	8a (52)	Se obtuvo producto de Passerini (5f , 13%)
3	bencil	fenil	Sin disolvente, MW (60°C), 30 min.	8a (55)	Se obtuvo producto de Passerini (5f , 30%)
4	bencil	fenil	Buffer pH 5.5, MW (60 °C), 15 min.	8a (73)	Se obtuvo producto de Passerini (5f , 16%)
5	bencil	fenil	Buffer pH 5,5, MW (100 °C), 15 min.	8a (51)	Se obtuvo producto de Passerini (5f , 28%)
6	bencil	fenil	Agua destilada, 60 °C (MW), 15 min.	8a (56)	Se obtuvo producto de Passerini (5f , 24%)
7	bencil	fenil	Agua destilada, TA, 24 h	8a (68)	Se obtuvo producto de Passerini (5f , 3%)
8	<i>tert</i> -butil	fenil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	8b (75)	-
9	ciclohexil	fenil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	8c (60)	-
10	bencil	pentil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	8d (41)	-
11	<i>tert</i> -butil	pentil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	8e (47)	-
12	ciclohexil	Pentil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	8f (39)	-
13	bencil	3-metilfuroxanil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	8g (0)	Mezcla compleja
14	bencil	3-metilfuroxanil	Buffer pH 5,5, MW (60 °C), 15 min.	8g (0)	Mezcla compleja

Por otro lado, también se llevó a cabo dicha reacción en el mismo buffer pero bajo irradiación de microondas durante 15 minutos a 60 °C (entrada 4), obteniéndose un rendimiento similar (pero acortando el tiempo en casi 100 veces), con la concomitante formación del producto de Passerini. A 100 °C (entrada 5) el rendimiento de Ugi disminuye y el de Passerini aumenta a casi el doble, lo cual podría deberse a un efecto térmico en el desplazamiento de equilibrio de la forma imina a la forma ceto en medio acuoso. Si bien bajo calentamiento de microondas en medio acuoso ácido se obtiene una disminución del producto de Ugi, la concomitante formación del producto de Passerini provocaría una mayor diversidad química de productos a través de una única reacción, acompañada de una mejor eficiencia de masa de reacción como métrica de cuán verde resulta la misma.

También la reacción se llevó a cabo en agua destilada a temperatura ambiente (entrada 7), en ese caso se obtuvo el producto de Ugi con 68 % de rendimiento, lo cual en virtud de la

solubilidad de los reactivos utilizados se podría aproximar a una condición *on-water* (S_A benzaldehído: 0.003g/ml, S_A anilina: 0.36g/ml, S_A Trolox: 0.003 g/ml), es decir, el agua podría promover la reacción por alguno de los efectos mencionados en el capítulo introducción (efecto hidrofóbico, alta energía de densidad cohesiva del agua). Además, se ensayó la reacción bajo condiciones previamente encontradas óptimas para la reacción de Passerini, sin disolvente bajo irradiación de microondas por 15 minutos a 60 °C (entrada 2), obteniéndose el compuesto buscado en menor rendimiento, junto al producto de Passerini. Al aumentar el tiempo a 30 minutos (entrada 3), el rendimiento de Ugi crece muy poco y el de Passerini aumenta a más del doble.

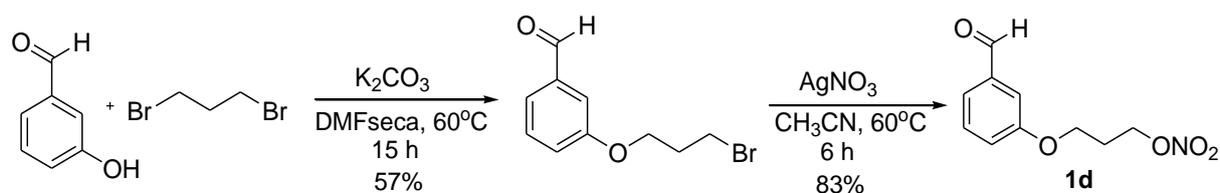
Luego se variaron el isonitrilo y el aldehído en las condiciones óptimas para obtener otros 5 nuevos derivados tocoferol-miméticos (compuestos **8b-f**), todos con rendimientos buenos y muy buenos. Se puede destacar que con el aldehído aromático se obtuvieron mejores rendimientos que con el alifático (Tabla 4.3, entrada 1 vs. 10).

También se ensayó la RMC de Ugi con el aldehído de furoxano **1a** (liberador de $\cdot\text{NO}$), con el que se ha trabajado anteriormente. En este caso, bajo nuevas condiciones ensayadas no se obtuvo el producto deseado (**8g**, Tabla 4.3, entradas 13 y 14), ya que en ambas condiciones se obtuvieron mezclas complejas de resolver. Como anteriormente se mencionó, esto puede deberse a la capacidad de dicho heterociclo de reaccionar con nucleófilos presentes en el medio.

Es de destacar que todos los compuestos obtenidos son tocoferol-miméticos como nuestro objetivo lo plantea, pero no tienen componentes liberadores de óxido nítrico (Tabla 4.3).

Es así que nos planteamos trabajar con otro aldehído que contiene un nitrato orgánico como grupo liberador de óxido nítrico (**1d**, Esquema 4.7). Dicho aldehído fue sintetizado según bibliografía como se muestra en el esquema 4.5.²²⁰

²²⁰ Luis E. Gómez. Tesina Licenciatura en Bioquímica. Nuevos análogos sintéticos de la vitamina E liberadores de $\cdot\text{NO}$: síntesis y determinación de citotoxicidad, liberación de $\cdot\text{NO}$ y capacidad vasodilatadora in vitro. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 2009.

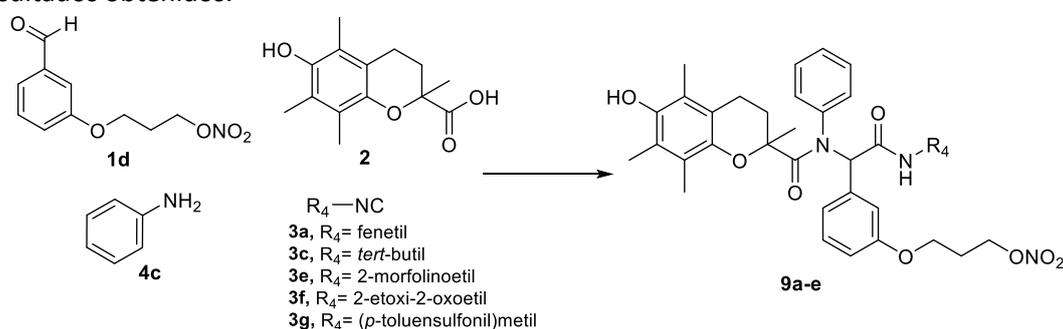


Esquema 4.7. Síntesis de 3-(3-nitrooxipropoxi)benzaldehído (**1d**).

Su obtención implica una ruta de dos pasos, el primero es la sustitución nucleofílica de 1,3-dibromopropano con 3-hidroxi-benzaldehído en medio básico, obteniéndose el intermedio deseado con un rendimiento moderado. Luego el bromo restante se sustituye por el grupo nitroxilo, utilizando nitrato de plata, resultando el compuesto deseado con un buen rendimiento.

Una vez obtenido el aldehído **1d**, se llevó a cabo la reacción de Ugi con el mismo, anilina, Trolox y diferentes isonitrilos. El esquema y los resultados que se obtuvieron se describen en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Reacción de Ugi para la formación de derivados híbridos de tocoferol-nitratos orgánicos y los resultados obtenidos.



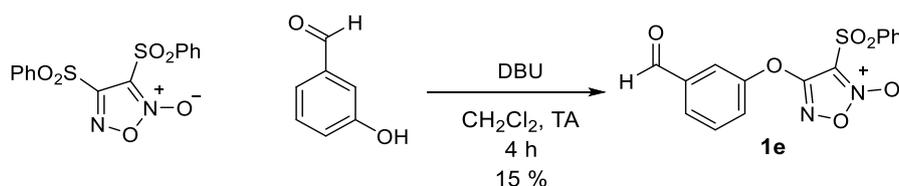
Entrada	R_4	Condiciones	Producto (Rendimiento)
1	<i>tert</i> -butil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	9a (25%)
2	Feniletal	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	9b (29%)
3	2-morfolinoetil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	9c (0%)
4	2-etoxi-2-oxoetil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	9d (0%)
5	2-etoxi-2-oxoetil	EtOH, TA, 48 h	9d (35%)
6	(<i>p</i> -toluensulfonil)metil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	9e (0%)
7	(<i>p</i> -toluensulfonil) metil	EtOH, TA, 48 h	9e (0%)

Dichos resultados muestran que fue posible obtener las moléculas deseadas con el *t*-butilisocianuro (**9a**, Tabla 4.4, entrada 1) y con fenetilisocianuro (**9b**, Tabla 4.4, entrada 2) en buffer pH 5.5 a temperatura ambiente en 24 h, con rendimientos moderados. Para el 2-morfolinoetilisocianuro (Tabla 4.4, entrada 3), 2-isocianoacetato de etilo (Tabla 4.4, entrada 4) y el (*p*-toluensulfonil)metilisocianuro (Tabla 4.4, entrada 6) no fue posible obtener los

compuestos Ugi en las mismas condiciones. Como ya se mencionó el 2-morfolinoetilisocianuro es poco reactivo, esto puede explicar la no obtención del producto deseado. En el caso del 2-isocianoacetato de etilo, se probó también una condición clásica de Ugi, en etanol a temperatura ambiente en 48 h, donde si fue posible obtener el derivado **9d**, con rendimiento moderado (Tabla 4.4, entrada 5). Para el (*p*-toluensulfonyl)metilisocianuro también se probaron dichas condiciones pero tampoco fue posible obtener el producto deseado. En los dos intentos de síntesis, se observaron varios productos por TLC, los cuales no se pudieron identificar, pero no correspondían al producto de Ugi, ni al producto de Passerini. Está reportado que este particular isonitrilo al participar en reacciones de Ugi y Passerini no siempre da las estructuras esperadas.²²¹

Al observar los rendimientos de los compuestos que se lograron sintetizar (25-35 %), se puede concluir que los mismos son bajos. Sobre todo si se comparan con su análogo **8b** (Tabla 4.3), que no tiene el nitrato orgánico, esto puede deberse a que dicho grupo funcional es inestable en medio ácido.²²² A futuro sería bueno probar otras condiciones para optimizar estas reacciones y obtener los compuestos con mejores rendimientos.

Por otra parte se utilizó como componente en la reacción de Ugi un benzaldehído derivado de furoxano (**1e**), el cual también fue sintetizado durante este trabajo según bibliografía, como se muestra en el Esquema 4.8.²²³



Esquema 4.8. Síntesis del aldehído **1e**

Dicho compuesto se sintetizó a partir de *bis*(fenilsulfonyl)furoxano (sintetizado como ya se mostró en el esquema 4.6) y 3-hidroxi-benzaldehído a través de una sustitución nucleofílica, obteniéndose el compuesto deseado con un bajo rendimiento.

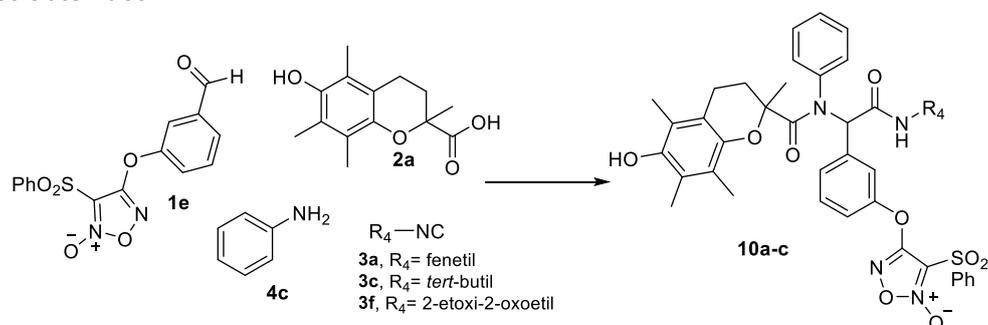
²²¹ Neochoritis, C. G; Livadiotou, D; Tsiaras, V; Zarganes-Tzitzikas, T; Samatidou, E. *Tetrahedron*. **2016**, 72, 33, 5149–5156.

²²² Wang, P. G; Xian, M; Tang, X; Wu, X; Wen, Z; Cai, T; Janczuk, A. J. *Chemical Reviews*. **2002**, 102, 4, 1091–1134.

²²³ Dutra, L. A; de Almeida, L; Passalacqua, T.G; Santana Reis, J; Torres, F. A. E; Martinez, I; Gonçalves Peccinini, R; Man Chin, C; Chegaev, K; Guglielmo, S; Fruttero, R; Graminha, M. A. S; dos Santos, J.L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 4837-4847.

La reacción de Ugi se llevó a cabo bajo distintas condiciones experimentales en sintonía con principios de química verde, utilizando distintos isonitrilos para así obtener diferentes compuestos híbridos. En la Tabla 4.5 se resumen los resultados encontrados.

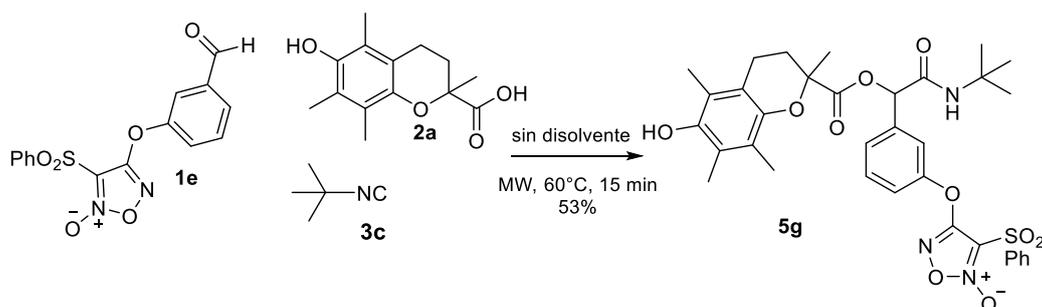
Tabla 4.5. Reacción de Ugi de formación de derivados híbridos tocoferol miméticos-furoxano y resultados obtenidos.



Entrada	R_4	Condiciones	Producto (Rendimiento)
1	<i>tert</i> -butil	Buffer pH 5,5, TA, 24 h	10a (9 %)
2	Fenilil	Buffer pH 5,5, TA, 24 h	10b (8 %)
3	2-etoxi-2-oxoetil	EtOH, TA, 48 h	10c (9 %)

Dichos resultados muestran que si bien fue posible obtener los productos de Ugi deseados, con *t*-butilisocianuro y fenililisocianuro (Tabla 4.5, entradas 1 y 2, respectivamente) en buffer pH 5.5 a temperatura ambiente en 24 h y con 2-isocainoacetato de etilo (Tabla 4.5, entrada 3) en etanol a temperatura ambiente en 48 h, los mismos se generaron con rendimientos bajos. El bajo rendimiento de estas reacciones podría deberse a que el furoxano podría descomponerse en presencia de la amina, tal como se comentó anteriormente. Esto es posible ya que en los tres casos se obtuvieron mezclas complejas de las que fueron posibles identificar los productos deseados, pero en rendimientos bajos.

En efecto, al ensayar la reacción de Passerini (Esquema 4.9) en la cual participan 3 componentes: aldehído, ácido carboxílico e isonitrilo, no participa la amina, se obtuvo el producto Passerini, **5g** con un rendimiento de 53 %.



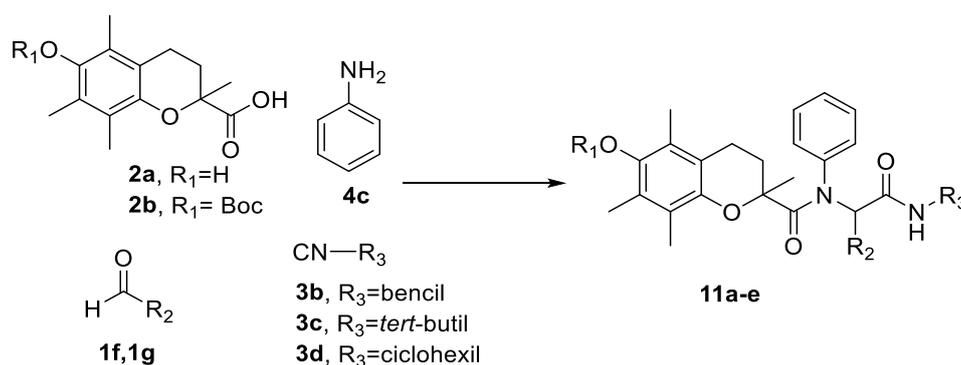
Esquema 4.9. Reacción de Passerini de formación de un derivado híbrido tocoferol-furoxano.

Esta reacción fue llevada a cabo en las condiciones previamente optimizadas para la RMC de Passerini, sin la utilización de disolvente, bajo irradiación de microondas a 60 °C por 15 minutos.

En resumen, de los resultados obtenidos en la serie I, se evidenció que al llevar a cabo la reacción de Ugi con los componentes ya conteniendo el grupo liberador de NO correspondiente se obtuvieron rendimientos bajos, mientras que cuando se realizó la reacción sin dicho farmacóforo, se alcanzan muy buenos rendimientos. Como proyección a futuro se puede plantear obtener los productos deseados con liberadores de NO, de tal forma que el mismo se incorpore al final sobre el producto de Ugi previamente ensamblado.

Por otra parte, durante una pasantía realizada en el año 2015 en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC), La Laguna-España. Bajo la guía de los Dres. David Tejedor y Fernando García-Tellado, se estudiaron nuevas condiciones para la reacción de Ugi, utilizando ultrasonido. Es así como se llevó a cabo esta RMC, utilizando Trolox como ácido carboxílico. Según la disponibilidad del laboratorio y para ampliar el espacio químico explorado con la reacción, se seleccionaron dos aldehídos conteniendo el grupo alqueno, uno aromático y otro alifático. En la Tabla 4.6 se muestran las condiciones utilizadas y los resultados obtenidos.

En primer lugar se estudió esta RMC utilizando 3-(aliloxi)benzaldehído (Tabla 4.6, entradas 1-6), la misma se llevó a cabo variando el isonitrilo utilizado y comparando la metodología optimizada anteriormente, es decir utilizando buffer pH 5.5 a TA por 24 h (entrada 1), con nuevas condiciones. Aumentando el tiempo a 48 h (entrada 2), llevándola a cabo en US durante 6 h (entrada 3) y en US, sin la utilización de disolventes (entrada 4), para así probar una condición más verde. Los resultados muestran que al utilizar el US, el rendimiento aumenta, disminuyendo el tiempo de reacción. Tanto con buffer, como sin la utilización de disolvente, se obtiene el mismo rendimiento. Se concluye entonces que las mejores condiciones para obtener el derivado de Ugi **11a** fue sin disolvente usando ultrasonido como fuente de energía alternativa (Tabla 4.6, entrada 4), ya que está en consonancia con los principios de la química verde.

Tabla 4.6. Esquema de la reacción de Ugi estudiada, condiciones ensayadas y resultados obtenidos.

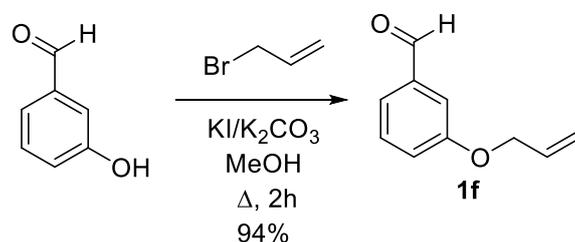
Entrada	R ₁	R ₂	R ₃	Condiciones	Producto (Rendimiento)
1	H		tert-butil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	11a (37%)
2	H		tert-butil	Buffer pH 5.5, TA, 48 h	11a (37%)
3	H		tert-butil	Buffer pH 5.5, US, 6 h	11a (55%)
4	H		tert-butil	sin disolvente, US, 6 h	11a (55%)
5	H		bencil	Buffer pH 5.5, TA, 24 h	11b (40%)
6	H		ciclohexil	Buffer pH 5.5, US, 3 h	11c (32%)
7	H		tert-butil	sin disolvente, US, 6 h	11d (49%)
8	Boc		tert-butil	sin disolvente, US, 6 h	11e (99%)

Con dicha condición se sintetizaron dos compuestos derivados del 4-pental (entradas 7 y 8), para la síntesis del compuesto **11e** se decidió utilizar el Trolox con el fenol protegido con el grupo Boc, aumentando así el espacio químico explorado y además para poder estudiar el efecto de no tener el fenol libre en la actividad biológica y un más completo estudio de la relación estructura-actividad. Inesperadamente al realizar la reacción con el fenol protegido con el grupo Boc el rendimiento aumentó al doble y fue cuantitativo.

Es destacable que el aldehído **1f** y el ácido carboxílico **2b** fueron sintetizados previamente a realizar la RMC. El aldehído **1f** se sintetizó según bibliografía,²²⁴ como se muestra en el esquema 4.10. Se obtiene a través de una sustitución nucleofílica a partir de 3-hidroxi-

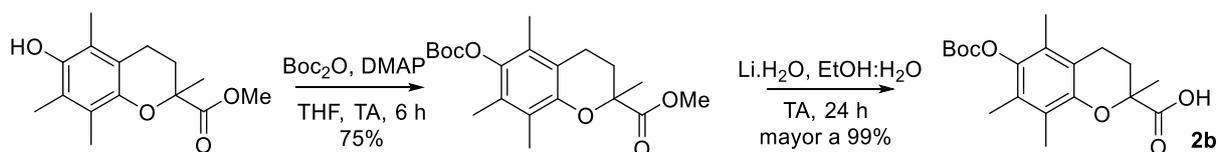
²²⁴ Mmutlane, E. M; Michael, J. P; Green, I. R; de Koning, C. B. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2004**, 2, 17, 2461.

benzaldehído y bromuro de alilo, utilizando K_2CO_3 como base y KI como catalizador, en excelente rendimiento.



Esquema 4.10. Síntesis del aldehído **1f**.

Por otra parte el compuesto **2b**, se preparó como se muestra en el esquema 4.11, en dos pasos de reacción. A partir del éster metílico de Trolox (sintetizado como se muestra en el esquema 4.2) se protege el fenol con un grupo Boc, y luego se hidroliza el éster al ácido correspondiente.



Esquema 4.11. Síntesis del ácido carboxílico **2b**.

4.1.2 Elucidación estructural

La estructura de todos los compuestos sintetizados se confirmó mediante experimentos de 1H -RMN y ^{13}C -RMN, donde se observaron claramente las señales correspondientes a los distintos tipos de protones y carbonos presentes en cada molécula. La correcta asignación de las señales de los mencionados espectros fue realizada mediante la ayuda de experimentos COSY, HMBC, y HSQC. También se confirmó la estructura mediante espectrometría de masas y masas de alta resolución. Debido a que, por un lado el Trolox (ácido **2a**) presenta un carbono quiral y se usa como mezcla racémica y por el otro, las reacciones de Passerini y de Ugi se realizaron sin la utilización de un auxiliar quiral, los compuestos fueron obtenidos como mezcla de diastereómeros. Es así que en general los espectros de 1H -RMN se observan las

señales duplicadas, que corresponden a dicha mezcla. En el caso de esta serie de compuestos los pares de diastereómeros se observan en cantidades equivalentes. A continuación (Figura 4.1) se muestran como ejemplo el espectro de ^1H -RMN del compuesto de Passerini **5g**. Se observan todos los protones correspondientes a su estructura duplicados, con la misma integración. La integración de las señales en la zona de aromáticos (δ entre 8.14-6.99 ppm) es de 18 protones, 9 correspondientes a cada par diastereomérico. Así como en $\delta=6.11$ y 5.55 se observa la señal correspondiente al N-H de la amida; en $\delta= 5.99$ y 5.94 son señales correspondientes al protón unido al carbono quiral que se genera en la reacción de Passerini. En $\delta= 4.75$ y 4.42 se corresponden con las señales del OH del anillo cromanol, entre $\delta= 2.74$ y 1.61 se pueden ver las señales correspondientes a los distintos metilos y metilenos del resto cromano y en $\delta=1.35$ y 1.13 las señales correspondientes al grupo *tert*-butilo.

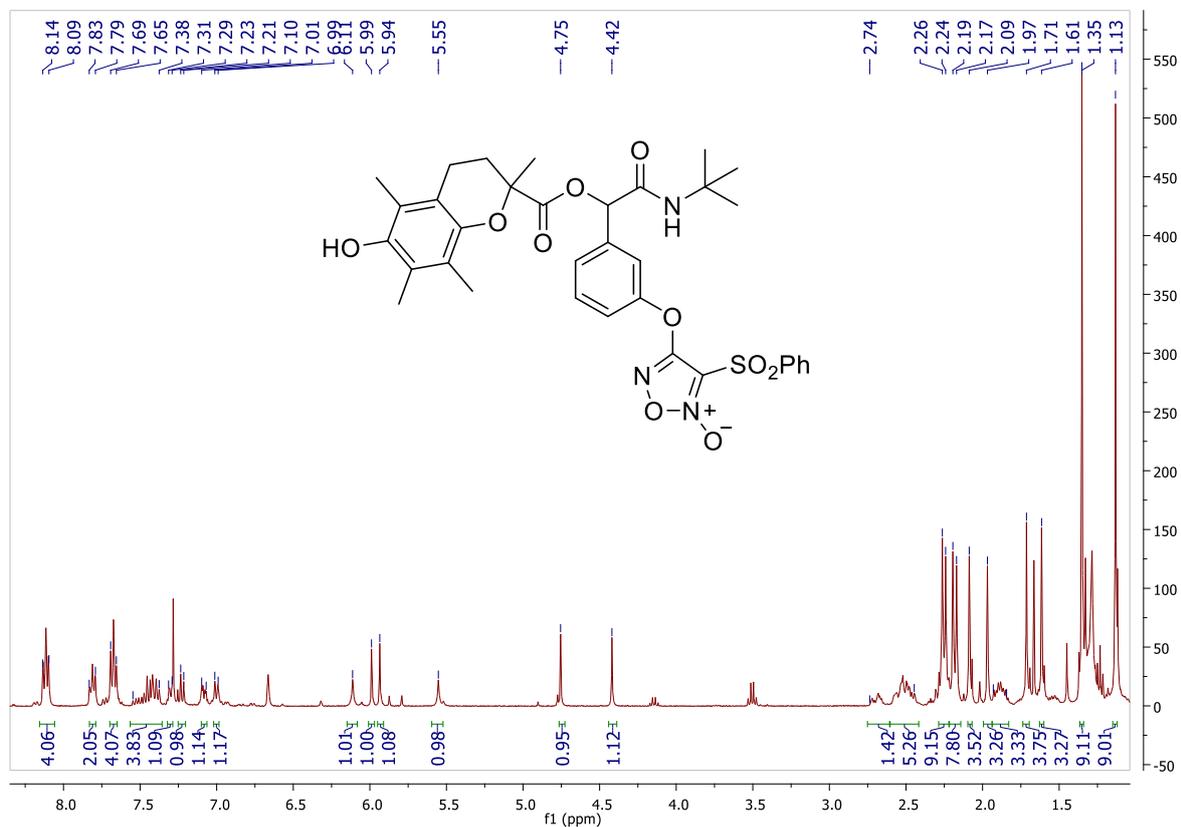


Figura 4.1. Espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 del compuesto **5g**

En la figura 4.2 se muestra el espectro de ^1H -RMN del compuesto **10a**, obtenido mediante una reacción de Ugi a partir de los mismos componentes que el compuesto **5g** y anilina, en donde también están todas las señales por duplicado, en igual proporción. En el se observan, señales similares al análogo Passerini, en este caso las señales correspondientes al N-H de la

amida están corridas a δ mayores, junto a las señales aromáticas. Además hay un aumento de señales aromáticas provenientes del componente amina.

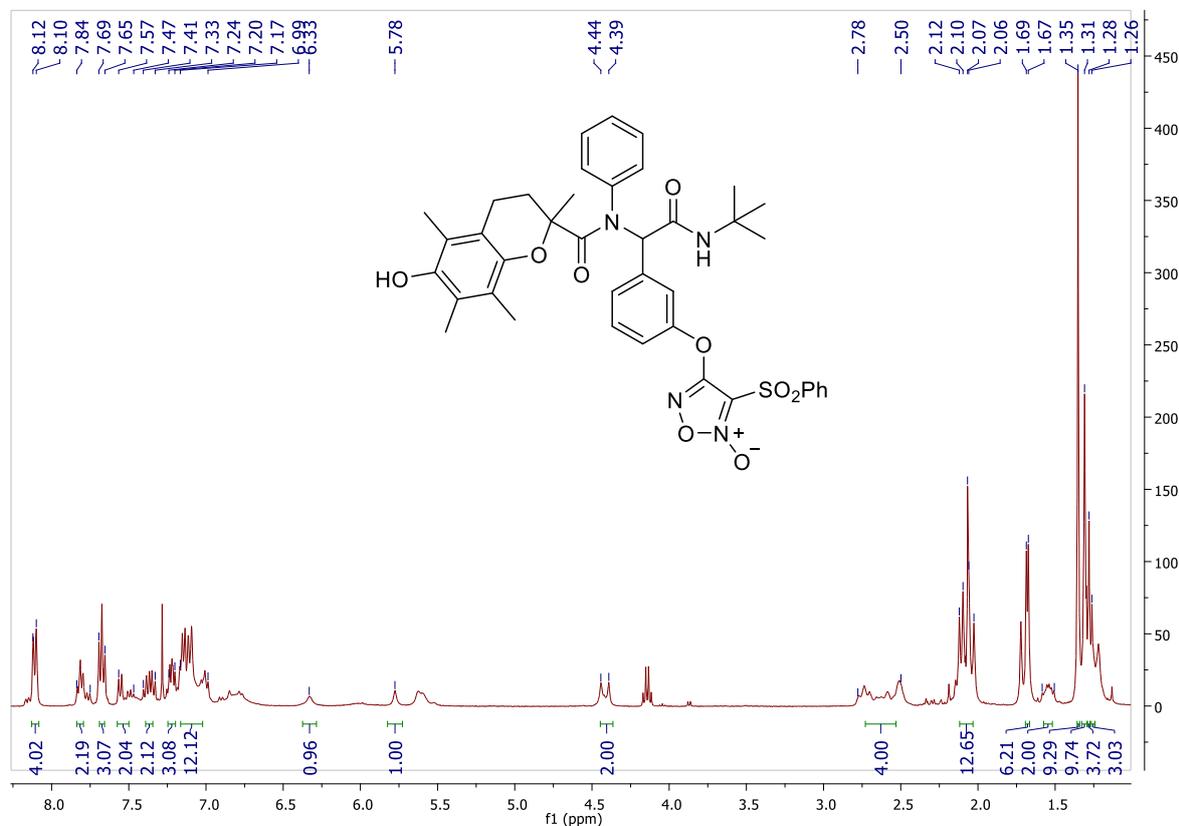


Figura 4.2. Espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 del compuesto 10a

4.1.3 Biología.

4.1.3.1 Actividad Antiproliferativa

Teniendo en cuenta los fundamentos mencionados en la introducción sobre la actividad antitumoral de los farmacóforos seleccionados y en base a los antecedentes recientes de nuestro grupo en este aspecto, se realizó la evaluación *in vitro* de los compuestos, como potenciales agentes anticancerígenos. Dicho *screening* se realizó en colaboración con el grupo del Dr. José Manuel Padrón Carrillo, BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González”, Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

El objetivo de este ensayo fue identificar la actividad antiproliferativa de los compuestos, la cual se estudió en un panel de 6 líneas celulares humanas procedentes de tumores sólidos de

origen diverso: HBL100 (células de cáncer de mama), HeLa (células de cáncer de cérvix), SW1573 (células de cáncer de pulmón), T-47D (células de cáncer de mama), WiDr (células de cáncer de colon) y A549 (células de cáncer de pulmón).

Tabla 4.7. Actividad antiproliferativa (IC₅₀) contra líneas celulares procedentes de tumores sólidos de los compuestos de la serie I

Compuesto	IC ₅₀ (μ M) ^a					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
Material de partida						
Trolox (2a)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Productos Passerini						
5a	28 (\pm 1.6)	24 (\pm 0.6)	18 (\pm 3.9)	20 (\pm 8.4)	32 (\pm 3.1)	31 (\pm 7.0)
5b	37 (\pm 4.9)	44 (\pm 7.5)	50 (\pm 5.6)	53 (\pm 3.5)	70 (\pm 4.2)	58 (\pm 4.4)
5c	25 (\pm 3.4)	21 (\pm 5.0)	15 (\pm 5.3)	26 (\pm 5.5)	24 (\pm 0.1)	26 (\pm 3.5)
5d	>100	>100	>100	>100	>100	>100
5e	7.5 (\pm 1.7)	17 (\pm 4.9)	19 (\pm 4.9)	16 (\pm 4.4)	25 (\pm 1.9)	26 (\pm 6.1)
5g	3.5 (\pm 0.3)	2.0 (\pm 0.4)	2.5 (\pm 0.7)	1.4 (\pm 0.1)	4.2 (\pm 1.1)	4.4 (\pm 1.1)
Productos Ugi						
6b	15 (\pm 5.3)	24 (\pm 2.9)	19 (\pm 3.8)	18 (\pm 5.1)	36 (\pm 5.6)	50 (\pm 6.5)
8a	5.3 (\pm 1.3)	4.6 (\pm 1.2)	3.2 (\pm 1.1)	4.8 (\pm 0.8)	4.5 (\pm 0.1)	14 (\pm 8.0)
8b	7.0 (\pm 1.1)	9.2 (\pm 6.1)	7.5 (\pm 3.7)	7.4 (\pm 1.6)	27 (\pm 2.2)	19 (\pm 1.2)
8c	7.5 (\pm 2.7)	7.3 (\pm 1.3)	8.2 (\pm 4.6)	8.1 (\pm 0.7)	19 (\pm 8.9)	51 (\pm 4.6)
8d	4.7 (\pm 0.9)	5.6 (\pm 1.3)	4.1 (\pm 1.0)	3.7 (\pm 1.6)	5.6 (\pm 0.5)	11 (\pm 6.8)
8e	7.1 (\pm 4.9)	5.0 (\pm 0.8)	4.7 (\pm 2.7)	5.1 (\pm 0.4)	12 (\pm 8.8)	11 (\pm 5.8)
8f	7.0 (\pm 5.1)	5.0 (\pm 0.9)	3.0 (\pm 0.8)	5.2 (\pm 0.7)	5.4 (\pm 0.7)	6.2(\pm 2.8)
9a	3.8 (\pm 1.6)	6.0 (\pm 1.2)	4.1 (\pm 0.7)	8.4 (\pm 2.2)	4.6 (\pm 0.4)	6.7 (\pm 5.3)
9b	4.9 (\pm 2.9)	10.0 (\pm 0.8)	75 (\pm 35)	78 (\pm 31)	>100	>100
9d	3.4 (\pm 0.8)	1.4 (\pm 0.1)	4.2 (\pm 1.8)	3.4 (\pm 0.6)	5.2 (\pm 1.9)	7.1 (\pm 3.4)
10a	5.4 (\pm 2.3)	1.9 (\pm 0.5)	1.9 (\pm 0.7)	1.6 (\pm 0.4)	5.3 (\pm 2.6)	18.0 (\pm 4.0)
10b	21.0 (\pm 5.6)	2.4 (\pm 0.5)	14.0 (\pm 4.9)	4.1 (\pm 1.2)	22.0 (\pm 7.3)	77 (\pm 16)
10c	14.0 (\pm 5.5)	2.2 (\pm 0.6)	3.6 (\pm 0.5)	2.0 (\pm 0.3)	14.0 (\pm 2.4)	18.0 (\pm 5.8)
11a	1.4 (\pm 0.5)	4.2 (\pm 0.1)	2.8 (\pm 0.6)	3.3 (\pm 0.5)	3.5 (\pm 0.9)	3.8 (\pm 1.3)
11b	2.9 (\pm 1.1)	5.1 (\pm 1.1)	5.2 (\pm 0.5)	3.0 (\pm 0.3)	6.9 (\pm 1.5)	15.0 (\pm 6.8)
11c	2.0 (\pm 0.6)	2.5 (\pm 1.3)	2.3 (\pm 0.7)	7.8 (\pm 1.5)	6.4 (\pm 0.5)	8.7 (\pm 0.1)
11d	3.6 (\pm 1.6)	4.5 (\pm 1.5)	4.7 (\pm 1.0)	4.0 (\pm 0.2)	12.0 (\pm 0.8)	31 (\pm 1)
11e	4.9 (\pm 0.9)	6.4 (\pm 0.1)	6.4 (\pm 1.7)	2.9 (\pm 0.7)	20.0 (\pm 8.5)	40 (\pm 17)
Controles positivos						
cisplatino	2,1 (\pm 0,6)	1,9 (\pm 0,3)	2,0 (\pm 0,3)	3,0 (\pm 0,4)	15 (\pm 2,3)	26 (\pm 5,3)
etoposido	0,7 (\pm 0,2)	2,3 (\pm 0,9)	3,0 (\pm 0,9)	15 (\pm 1,5)	22 (\pm 5,5)	23 (\pm 3,1)

^aLos valores son medias de al menos tres experimentos

Los resultados se expresan como 50% de inhibición del crecimiento (IC_{50}) tras 48 h de exposición aplicando el protocolo del National Cancer Institute (NCI)²²⁵ de los EE.UU. y el ensayo SRB²²⁶. El método utiliza placas multipocillo y permite evaluar de 54 a 108 productos por semana. Se utilizan hojas de cálculo de creación propia (MS Excel) para semiautomatizar el cálculo de los valores de IC_{50} .

Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 4.7, se evaluaron 24 compuestos sintetizados, el reactivo de partida Trolox y dos compuestos antitumorales conocidos de referencia, el cisplatino y el etopósido.

Estos resultados muestran que todos los compuestos evaluados fueron activos, mientras que el reactivo de partida Trolox no lo fue. El derivado de Passerini **5e**, que incorpora dicha subestructura, pero no contiene liberador de NO, tiene una actividad moderada. Por otra parte, mientras que los compuestos de Passerini **5a-c**, que poseen el metil-furoxano, presentan una actividad moderada, el compuesto **5g**, que incorpora un sulfonilfuroxano como donador de $\cdot NO$, fue uno de los más activos. Mostró valores de IC_{50} similares a los fármacos cisplatino y etopósido. Particularmente, en las líneas celulares resistentes T-47D (mama) y WiDr (colon), este derivado fue de tres a seis veces más activo que los fármacos de referencia. Los compuestos de Ugi más activos fueron **9a**, **9d**, **10a**, **11a** y **11c** exhibiendo valores de IC_{50} en el rango de 1.4 - 8.7 μM . En comparación con el cisplatino y el etopósido, estos compuestos mostraron una actividad biológica mejorada en las líneas celulares más resistentes T-47D y WiDr. De esta serie, inesperadamente dado que no contiene grupos liberadores de NO, el compuesto **11a** fue el más activo contra el panel de células tumorales estudiado ($IC_{50} \sim 1.4-4.2 \mu M$), con valores de IC_{50} de cuatro a siete veces más activos que los fármacos de referencia en las líneas celulares resistentes T-47D y WiDr. Al compararlo con su análogo **8b**, se podría decir que la incorporación de un sustituyente aliloxilo, mejoró la actividad antiproliferativa en todas las líneas celulares tumorales si bien se mantiene en el mismo orden. También es mejor que su análogo alqueno alifático **11d**. Además, se observa que la incorporación de liberadores de $\cdot NO$, tanto furoxano como nitratos orgánicos, no llevó a que las actividades antiproliferativas fueran más destacadas (**8a-f** vs. **9a,b,d**, **10a-c**). Por otro lado si se comparan los análogos Passerini **5g** y Ugi **10a**, ambos conteniendo el grupo sulfonilfuroxano (liberador

²²⁵ Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M, *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757-766..

²²⁶ Miranda PO, Padrón JM, Padrón JI, Villar J, Martín VS, *ChemMedChem* **2006**, 1, 323-329.

de ·NO), se podría decir que su actividad es similar, siendo el **5g** levemente superior en la línea WiDr.

4.1.3.2 Índice de Selectividad

Para determinar la especificidad de la actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer, fue necesario obtener información sobre la citotoxicidad contra células normales. Por lo tanto, se evaluó la citotoxicidad inespecífica *in vitro* entre 1-100 μM de compuestos seleccionados (**5g**, **9a**, **9d**, **10a**, **11a**) en células humanas no tumorales, del tipo macrófagos humanos (células THP-1 diferenciadas con éster forbol).²²⁷ La citotoxicidad para los macrófagos y la actividad antiproliferativa para cada línea celular tumoral se comparó utilizando el índice de selectividad (IS), que se determinó como la relación entre la concentración efectiva (CE_{50}) para macrófagos y IC_{50} para cada línea celular tumoral. Los valores de IS se resumen en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Citotoxicidad de los compuestos seleccionados contra macrófagos humanos THP-1 e índice de selectividad.

Compuesto	THP-1 $\text{CE}_{50}(\mu\text{M})^a$	IS ^b					
		A-549	HBL100	HeLa	SW1173	T-47D	WiDr
5g	10	2.9	5.0	4.0	7.1	2.4	2.4
9a	67	17.6	11.2	16.3	8.0	14.6	10.0
9d	37	10.9	26.4	8.8	10.9	7.1	7.3
10a	59	10.9	31.0	31.0	36.9	11.1	3.3
11a	>100	>71.4	>23.8	>35.7	>30.3	>28.6	>26.3

^a Los resultados son la media de cuatro experimentos independientes con una SD menor del 10% en todos los casos. ^b IS: índice de selectividad: CE_{50} , macrófagos / IC_{50} , células tumorales (línea).

Todos los compuestos presentan valores de IS de al menos dos veces los valores de GI_{50} correspondientes. Al comparar los análogos que contienen nitratos orgánicos **9a** y **9d**, se observa que el que contiene un *tert*-butilo en el componente isonitrilo (**9a**) es menos citotóxico que el que contiene un resto 2-etoxi-2-oxoetilo en esa posición (**9d**). También es

²²⁷ G.V. Lopez, F. Blanco, P. Hernandez, A. Ferreira, O.E. Piro, C. Batthyany, M. Gonzalez, H. Rubbo, H. Cerecetto, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 6262-6272.

levemente menos citotóxico que su análogo que tiene como liberador de ·NO un grupo furoxano (**10a**). El derivado Passerini **5g** resulto ser el más citotóxico del grupo estudiado, teniendo una gran diferencia con su análogo Ugi **10a**. Teniendo en cuenta que se busca la actividad máxima con una toxicidad celular mínima, los resultados muestran que **11a** es el compuesto con mejor perfil y puede considerarse como un futuro candidato para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos potentes.

Como aproximación al estudio del mecanismo de acción de esta familia de compuestos, se seleccionaron algunos de los más prometedores en cuanto a su relación actividad antiproliferativa /citotoxicidad. En este contexto, dos puntos clave a estudiar en relación a la muerte celular inducida por sustancias químicas son el análisis del ciclo celular y las vías de señalización que controlan la detención del ciclo celular y la apoptosis.²²⁸ Es así que se realizaron dichos estudios en colaboración con el grupo de la Dra. Mariela Bollati-Fogolín, Unidad de Biología Celular, Instituto Pasteur de Montevideo.

4.1.3.3 Apoptosis

La muerte celular programada se caracteriza por modificaciones de la membrana plasmática y la translocación de la fosfatidil-serina (PS) al prospecto de la membrana plasmática externa es uno de los primeros eventos observados en la apoptosis. Annexin V-FITC es una sonda fluorescente con alta afinidad por PS que permite su determinación mediante ensayos de fluorescencia. La Figura 4.1 muestra la capacidad de los compuestos Passerini **5g** y Ugi **11a**, **9a** y **10a** para inducir apoptosis en las células THP-1 y T-47D después de 24 h de tratamiento evaluado por citometría de flujo.

En las células THP-1, solo los compuestos **5g** y **10a** (ambos compuestos contienen el grupo liberador de ·NO furoxano) pudieron aumentar las células apoptóticas evaluadas por tinción con anexina V (cambio de 2 y 6 veces en comparación con el control, respectivamente, Figura 4.3A). Por otro lado, cuando las células T-47D se expusieron a los compuestos **5g**, **11a**, **9a** y **10a**, el porcentaje de células positivas para anexina V aumentó de 2 a 5 veces con respecto al

²²⁸ Yang, X; Zhao, L; Zhang, T; Xi, J; Liu, S; Ren, L; Zheng, Y; Zhang, H. *Scientific Reports*. **2019**, 9, 1048.

control (Figura 4.3B). Teniendo en cuenta estos resultados y el IS, se seleccionó el compuesto **11a** para una caracterización adicional.

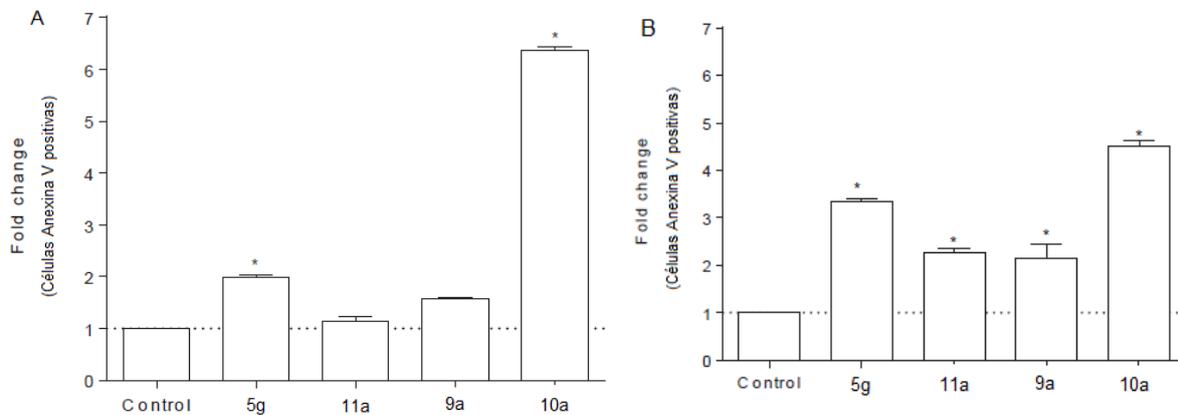


Figura 4.3. Evaluación de la apoptosis mediante tinción de anexina V. Las células THP-1 (A) y T-47D (B) se trataron con los compuestos **5g**, **11a**, **9a** y **10a** (4.2 - 3.5 - 4.6 - 5.3 μ M, respectivamente). El porcentaje de células positivas para anexina V se determinó por citometría de flujo. Los resultados se normalizaron contra el control del vehículo (DMSO). Las gráficas son representante de tres experimentos independientes. * Diferencias significativas versus el control de DMSO ($p < 0.01$).

4.1.3.4 Análisis del Ciclo Celular.

La proliferación incontrolada de células causada por la desregulación del ciclo celular es una de las características de las células tumorales. Por lo tanto, la inducción de la detención del ciclo celular es un mecanismo de acción importante para muchos fármacos contra el cáncer. Cuando son estimuladas por señales proliferativas, las células entran en el ciclo celular (fases G1 a S a G2 a M) desde un estado estacionario (fase G0). El ciclo celular se regula en dos puntos de transición, G1 / S (entre el final de la fase G1 y la fase S) y G2 / M (en la fase M). El punto de control G1 / S es un paso limitante en el ciclo celular; si el ciclo se detiene en este punto, la proliferación de células puede limitarse de manera efectiva.

Dado que el compuesto **11a** mostró toxicidad selectiva y fue capaz de inducir apoptosis en células tumorales pero no en células normales, se investigó más a fondo su efecto sobre la distribución de fases del ciclo celular. Después del tratamiento de células T-47D con el compuesto **11a** (3.5 μ M, valor del IC₅₀ en la línea tumoral) se observaron varios cambios.

Después de 48 h de incubación, se observó una detención del ciclo celular en la fase G₀ / G₁ (Figura 4.4). Además, también es notable una disminución en las fases S y G₂ / M. Cabe señalar que en estas condiciones experimentales no se detectó un pico subG₁.

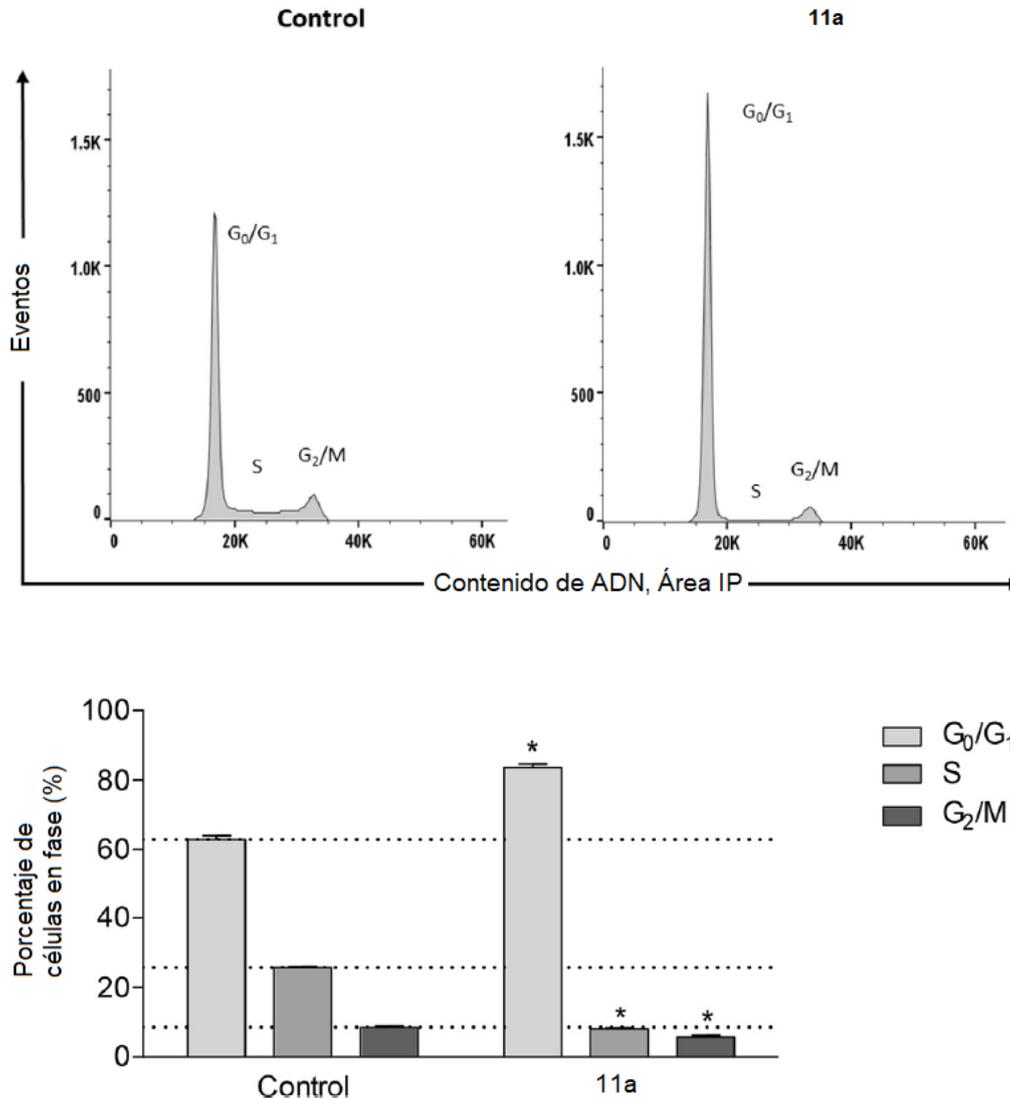


Figura 4.4. Efecto del compuesto **11a** sobre la detención del ciclo celular evaluado por citometría de flujo y tinción con Ioduro de Propidio. Las células T-47D se trataron con compuesto **11a** (3,5 μ M) durante 48 h. DMSO se utilizó como control del vehículo. Figura superior: ejemplo representativo de histogramas de frecuencia de contenido de ADN correspondientes a las células control y tratadas. Figura inferior: las barras muestran el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Los resultados se expresan como la media \pm SEM, n = 3. * Diferencias significativas versus control ($p < 0.01$).

Entonces el derivado de Ugi **11a** provocó una reducción a la concentración estudiada en la proporción de células T-47D en la fase S y un aumento en la proporción de células en la fase

G1. Por lo tanto, el compuesto **11a** detuvo las células en la fase G1, disminuyendo el índice de proliferación. Es probable que este compuesto detenga la progresión de la fase G1 a la S.

4.1.4 Conclusiones

Como conclusiones parciales de esta serie se puede decir que se utilizaron reacciones de acoplamiento multicomponente de Passerini y de Ugi para la síntesis de moléculas híbridas donadoras de $\cdot\text{NO}$ y tocoferol-miméticos, a partir de materiales de partida en algunos componentes con cierta complejidad estructural, en un solo paso sintético bajo condiciones verdes. La síntesis de estos análogos de tocoferol se logró en algunos casos mediante irradiación de microondas o ultrasonido como fuente de energía. Estas metodologías tienen como ventajas: i) reacciones más limpias con mejores rendimientos, ii) condiciones más suaves, iii) tiempos de reacción más cortos y iv) sencillez experimental. Se observó que cuando la RMC de Ugi se lleva a cabo con componentes que contienen el grupo furoxano, los productos se obtienen en rendimientos bajos, lo cual puede deberse a la inestabilidad de dicho grupo en presencia de nucleófilos.

Por otro lado se probó la quimioteca obtenida contra seis líneas de células tumorales humanas, donde la mayoría de los compuestos presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento celular, con valores de IC_{50} en el rango 1 a 78 μM . El derivado de Passerini **5g** y los derivados de Ugi **8f**, **11a**, **11c**, **9a** y **9d**, mostraron altos niveles de actividad antiproliferativa, exhibiendo valores de IC_{50} en el rango 1.4 a 8.7 μM .

En particular, en las líneas celulares resistentes a T-47D (mama) y WiDr (colon), los análogos de tocoferol **5g** y **11a** fueron de tres a siete veces más activos que el cisplatino y el etopósido, los dos fármacos de referencia utilizados. Además, el compuesto **5g** fue capaz de inducir apoptosis en células T-47D y THP-1, mientras que **11a** fue más selectivo ya que solo afectaba a T-47D y no a células normales (THP-1). Además, el análogo **11a** produjo una detención del ciclo celular en las células T-47D.

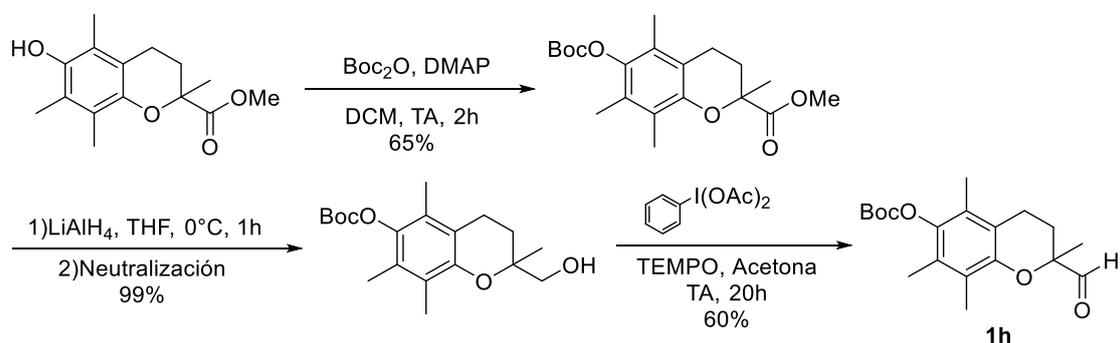
En resumen, considerando que es de interés la máxima actividad con mínima toxicidad celular, el **11a** es el compuesto con mejor desempeño (índice de selectividad mayor a 26 en todas las líneas tumorales) y puede ser considerado como un futuro candidato para el desarrollo de potentes agentes terapéuticos tocoferol miméticos para el cáncer. Estudios

futuros deberían profundizar en su mecanismo antiproliferativo, así como en experimentos *in vivo*. Si bien este derivado **11a** no es un compuesto híbrido, por no presentar un grupo liberador de NO, presenta ventajas desde el punto de vista sintético, utilizando el componente aldehído de mejor accesibilidad como material de partida, sumado a un superior rendimiento en la propia reacción multicomponente.

4.2 Serie II. Estructuras híbridas tocoferol-miméticas liberadoras de óxido nítrico obtenidas mediante RMC.

4.2.1 Química

En esta serie de compuestos, el derivado de tocoferol se introduce a nivel del componente aldehído, utilizando así el derivado **1h**, sintetizado durante este trabajo como se muestra en el Esquema 4.12.²⁰⁷ El mismo se usa con el fenol protegido con el grupo Boc, ya que si se quita el mismo, el aldehído resultante se descompone rápidamente.



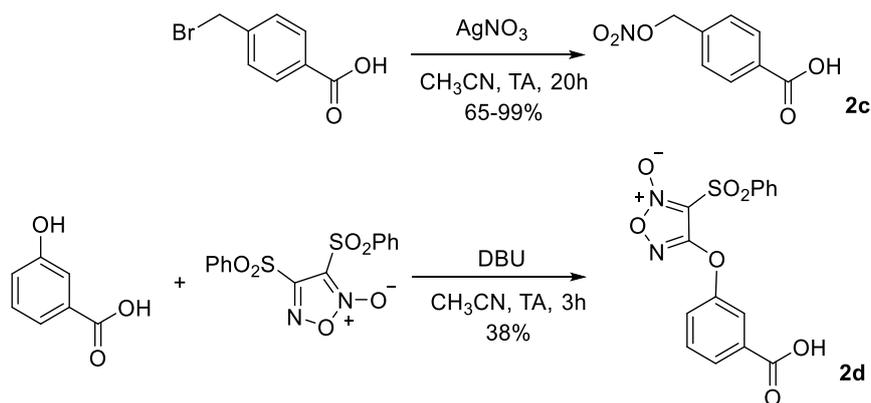
Esquema 4.12. Síntesis del aldehído derivado de tocoferol **1h**.

Este aldehído se obtiene en una secuencia sintética de 3 pasos a partir del éster metílico de Trolox, que se sintetiza como se mostró previamente en el esquema 4.2. El primer paso implica la protección del grupo fenol con un grupo Boc, para luego reducir el éster al alcohol correspondiente utilizando hidruro de litio aluminio, para finalmente oxidar el alcohol obtenido al aldehído deseado en presencia de diacetato de iodobenceno y TEMPO.

Los ácidos carboxílicos **2c** y **2d** (Esquema 4.13) son los componentes que aportan la capacidad de liberar óxido nítrico. Los mismos también fueron sintetizados previamente en el laboratorio según bibliografía.^{223, 229}

El ácido **2c** se sintetizó a partir del ácido 4-bromometilbenzoico y nitrato de plata, a través de una sustitución nucleofílica del halógeno por el nitroxilo. Por otro lado, la obtención del ácido **2d** se llevó a cabo a partir de una sustitución nucleofílica entre el ácido 3-hidroxibenzoico y el *bis*(fenilsulfonyl)furoxano sintetizado previamente.

²²⁹ Endres, S; Hacker, A; Noack, E; Kojda, G; Lehmann, J. *Eur.J.Med.Chem.* **1999**, 34, 895-901

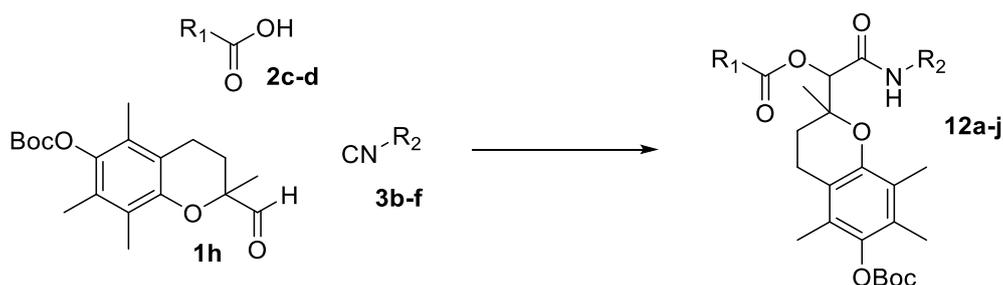


Esquema 4.13. Síntesis de ácidos carboxílicos **2c** y **2d** con los farmacóforos liberadores de $\cdot\text{NO}$ deseados utilizados en la Serie II.

Para comenzar se seleccionó la reacción de Passerini, ya que al involucrar tres componentes es más sencilla que la de Ugi, por lo que no solo resulta en un buen modelo de reactividad, sino que también de esta manera aumentamos la diversidad de compuestos obtenidos. En este caso se genera una estructura básica de α -aciloxiamida que puede tener una interesante actividad biológica²³⁰. La reacción de Passerini se llevó a cabo con el aldehído **1h**, los ácidos carboxílicos **2c** y **2d**, e isonitrilos comerciales. En la Tabla 4.9 se muestran los resultados obtenidos para dicha reacción.

En primer lugar, se optimizó la reacción de Passerini mencionada (Entradas 1 a 11) utilizando el aldehído derivado de Trolox (**1h**), el ácido carboxílico que contiene un nitrato orgánico **2c** y *tert*-butilisocianuro en distintas condiciones de reacción. Se utilizaron disolventes verdes como son el agua y el etanol, tanto a temperatura ambiente como bajo irradiación por microondas a diferentes tiempos (Entradas 1-4), así como también se llevó a cabo la reacción libre de disolvente, utilizando irradiación de microondas, ultrasonido y calentamiento convencional con una plancha calefactora (Entradas 5-10). También se estudió la reacción en condiciones clásicas con un disolvente no verde, comúnmente utilizado en el laboratorio, el diclorometano (Entrada 11).

²³⁰ Hulme, C; Gore, V. *Current Medicinal Chemistry*, **2003**, 10, 51-80.

Tabla 4.9. Esquema de la reacción de Passerini estudiada y los resultados obtenidos.

Entrada	R ₁	R ₂	Condiciones	Producto (Rendimiento)
1			EtOH, TA, 6 h	12a (81%)
2			MW, EtOH, 30 min., 60 °C	12a (76%)
3			H ₂ O, TA, 6 h	12a (84%)
4			H ₂ O, TA, 24 h	12a (91%)
5			MW, sin disolvente (sd), 15 min., 60 °C	12a (87 %)
6			MW, sd, 30 min, 60 °C	12a (93%)
7			MW, sd, 60 min., 60 °C	12a (93%)
8			US, sd, 6 h	12a (93%)
9			US, sd, 30 min.	12a (46%)
10			Calentamiento convencional, 30 min., 60 °C	12a (92%)
11			CH ₂ Cl ₂ , TA, 6 h	12a (93%)
12			MW, sd, 30 min., 60 °C	12b (88%)
13			MW, sd, 30 min., 60 °C	12c (82%)
14			MW, sd, 30 min., 60 °C	12d (85%)
15			MW, sd, 30 min., 60 °C	12e (<30%)
16			MW, EtOH, 30 min., 60 °C	12e (67%)
17				MW, sd, 30 min., 60 °C
18			MW, sd, 30 min., 60 °C	12g (73%)
19			MW, sd, 30 min., 60 °C	12h (89%)
20			MW, sd, 30 min., 60 °C	12i (83%)
21			MW, EtOH, 30 min., 60 °C	12j (47%)

El mejor rendimiento (93%) se obtuvo en cuatro condiciones, en diclorometano a temperatura ambiente por 6 h (entrada 11), sin disolvente bajo ultrasonido por 6 h (entrada 8), sin disolvente bajo irradiación de MW a 60 °C por 30 minutos y 60 minutos (entradas 6 y 7). De todas ellas la más eficiente es en ausencia de disolvente, bajo irradiación de microondas durante 30 minutos, ya que el producto se obtiene en un tiempo corto, a través de un calentamiento eficiente y sin la utilización de sustancias adicionales, por lo tanto sin la generación de residuos adicionales. En este sentido, cabe la pena recordar que la reacción de Passerini tiene una eficiencia atómica del 100 %, es decir todos los átomos presentes en los reactivos forman parte del producto deseado. Por lo tanto, la formación de dicho producto en esas condiciones cumpliría con los principios de la Química Verde.

Por otro lado, cuando la reacción se lleva a cabo sin disolvente, pero con calentamiento convencional por 30 minutos (entrada 10), se obtiene un rendimiento muy similar a cuando es llevada a cabo en MW (entrada 6). Este hecho estaría de acuerdo con la teoría comentada en la introducción de que el calentamiento por microondas se debe únicamente al efecto térmico, sin mediar el llamado efecto microondas. Por más que la reacción fue llevada a cabo por el mismo tiempo, el MW es un calentamiento más eficiente, ya que consumió energía solamente en los 30 minutos de reacción, mientras que para el calentamiento convencional se precalentó el baño previamente a una mayor temperatura de trabajo. Sin embargo, no se lograron tan buenos resultados cuando la reacción se llevó a cabo en el mismo tiempo de reacción bajo irradiación de ultrasonido (entrada 9), necesitando bajo este método de calentamiento tiempos muy superiores para alcanzar excelentes rendimientos.

Por otra parte, se utilizó etanol como disolvente verde, llevándose a cabo la reacción a T.A. por 6h (entrada 1) y bajo irradiación de MW por 30 minutos (entrada 2), en ambos casos se obtuvieron muy buenos rendimientos, similares entre sí, pero con la aplicación de microondas se logra disminuir el tiempo de reacción en más de 10 veces.

Cuando se llevó a cabo la reacción utilizando agua como disolvente, a TA: por 24 h (entrada 4), también se obtuvieron muy buenos rendimientos, mientras que al disminuir el tiempo a 6 h (entrada 3), el rendimiento disminuyó levemente. En estas condiciones, la mezcla de reacción es heterogénea como se observa en la figura 4.5, lo cual sugeriría condiciones de tipo *on-water*.

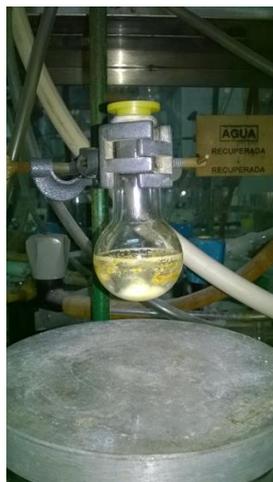


Figura 4.5. Foto de la reacción de Passerini para la obtención del compuesto **12a**, utilizando agua como disolvente.

En suma, es posible llegar a excelentes rendimientos en condiciones amigables con el medio ambiente, como es la no utilización de disolventes o la utilización de excelentes disolventes verdes, en conjunto con la utilización de un calentamiento eficiente de microondas, lo cual conlleva la disminución notoria de tiempos de reacción.

Luego, para estudiar el alcance de la reacción, se ensayó la reacción de Passerini bajo la condición optimizada más verde encontrada (sd, MW 60 °C, 0.5 h), variando el isonitrilo y el ácido carboxílico (Entradas 12 a 21). En todos los casos se obtuvieron rendimientos de buenos a excelentes, y en general, con el ácido **2c** el rendimiento es levemente superior que con el **2d**. Para el caso de los compuestos **12e** y **12j**, se tuvieron que cambiar las condiciones de reacción, ya que cuando se sintetizó el compuesto **12e** sin disolvente, se obtuvo un crudo de reacción con la presencia de diversos compuestos además del deseado. Al ser purificado no fue posible separarlo correctamente y se obtuvo una masa de compuesto impura, correspondiente al 30 % de rendimiento. Por esto se decidió probar otra condición, incorporando un disolvente verde como el EtOH, en donde se pudo obtener el producto deseado con un buen rendimiento.

Por otra parte, también se estudió la reacción de Ugi utilizando el aldehído derivado de Trolox **1h**, los ácidos **2c** y **2d**, *p*-toluidina como componente amina y *tert*-butilisocianuro. Las condiciones utilizadas y los resultados obtenidos se muestran la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Esquema de la reacción de Ugi estudiada y los resultados obtenidos.

Entrada	R ₁	Condiciones ensayadas	Producto (Rendimiento)	EMR
1		MW, sd, 30 min., 60 °C.	13a (38%) y 12a (62%)	91%
2		MW, EtOH, 30 min., 60 °C.	13a (59%) y 12a (32%)	83%
3		US, sd, 6 h	13a (46%) y 12a (33%)	72%
4		US, Buffer pH 5.5, 6 h	13a (51%) y 12a (49%)	94%
5		TA, Buffer pH 5.5, 24 h	13a (46%) y 12a (33%)	70%
6		MW, EtOH, 30 min., 60 °C	13b (48%) y 12f (15%)	60%

En primer lugar se llevó a cabo dicha reacción en las mismas condiciones optimizadas para la reacción de Passerini, utilizando el ácido 4-nitrooximetilbenzoico **2c** (Entrada 1), se realizó la reacción libre de disolvente bajo irradiación de microondas durante 30 minutos. Como se obtuvo el producto de Passerini **12a** en mayor proporción que el de Ugi **13a**, se decidió buscar nuevas condiciones de reacción en donde se obtenga éste último como producto único o principal. Se ensayó la reacción sin disolventes, en etanol ó en buffer pH 5.5, tanto bajo irradiación de microondas, ultrasonido ó temperatura ambiente, a distintos tiempos (Entradas 2-5). Se encontró que la condición más eficiente fue EtOH como disolvente bajo irradiación de microondas, a 60 °C durante 30 min.

Luego se utilizó dicha condición para la obtención del derivado de Ugi **13b**, cuando se utilizó como componente el ácido **2d**. Es destacable que en este caso si fue posible obtener este derivado Ugi conteniendo el grupo furoxano con un rendimiento moderado. Si se compara su síntesis con la de su análogo **13a** en las mismas condiciones (entrada 6 vs. 2) el EMR es menor, se obtiene en menor rendimiento tanto el producto de Ugi como el producto de Passerini, pero los rendimientos son mucho mejores que para la Serie I. Esto podría deberse a que la

amina **4d** y el aldehído **1h** reaccionan efectivamente para formar la imina, y queda menos amina disponible para reaccionar con la subestructura furoxano del componente ácido carboxílico y disminuyen los productos secundarios, de hecho, en la TLC del crudo de la reacción se observaron varias manchas de productos secundarios menores.

En todas las condiciones ensayadas no solo se obtiene el producto de Ugi sino también el producto de Passerini como se describe en la Tabla 4.10. Así, en un único paso de reacción, es destacable que se obtuvieron ambas series de compuestos de interés, por lo que consideramos que estos resultados son muy interesantes. Además, si analizamos el parámetro o métrica llamado eficiencia de masa de la reacción, $EMR = [(masa\ de\ los\ productos\ de\ interés\ aislado / masa\ total\ de\ reactivos) \times 100]$, que muestra una eficiencia práctica de la utilización de los reactivos²³¹ para cada condición descrita en la tabla 4.10, los porcentajes calculados son de muy buenos a excelentes, es decir que en las condiciones ensayadas casi todos los reactivos se transforman en un producto o el otro.

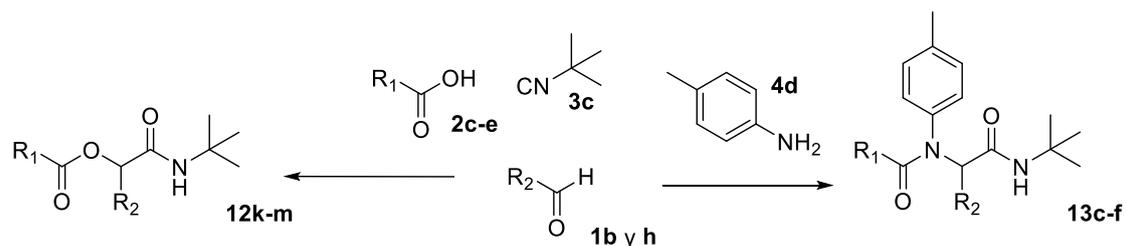
Es altamente destacable que a través de las metodologías desarrolladas se lograron optimizar dos reacciones multicomponente con reactivos complejos, como son el aldehído derivado de trolox o los ácidos carboxílicos derivados de furoxano o nitratos orgánicos, obteniéndose los productos híbridos deseados con rendimientos de muy buenos a excelentes, en condiciones amigables con el medio ambiente.

Por otra parte, se sintetizaron una serie de compuestos con uno u otro de los farmacóforos de interés o con ninguno, a efectos de completar el estudio de relación estructura-actividad de la quimioteca. En la Tabla 4.11 se muestran los resultados obtenidos.

La síntesis del compuesto de Passerini **12k** (entrada 1) fue estudiada en paralelo a este trabajo y fue publicada en un artículo de la revista Educación Química con su posible aplicación a un laboratorio de enseñanza en química orgánica.²³¹ Por otro lado la síntesis de los compuestos **12l** y **12m** (entradas 2 y 3), se llevó a cabo en las condiciones optimizadas anteriormente (sd, bajo irradiación de MW a 60 °C durante 30 minutos), obteniéndose ambos con excelentes rendimientos.

²³¹ Ingold, M; Dapuzeto, R; López, G.V; Porcal, W. *Educación Química*. **2016**, 27, 15.

Tabla 4.11. Esquema de las reacciones de Passerini y Ugi estudiadas y resultados obtenidos en la síntesis de compuestos para completar el estudio de la relación estructura-actividad.



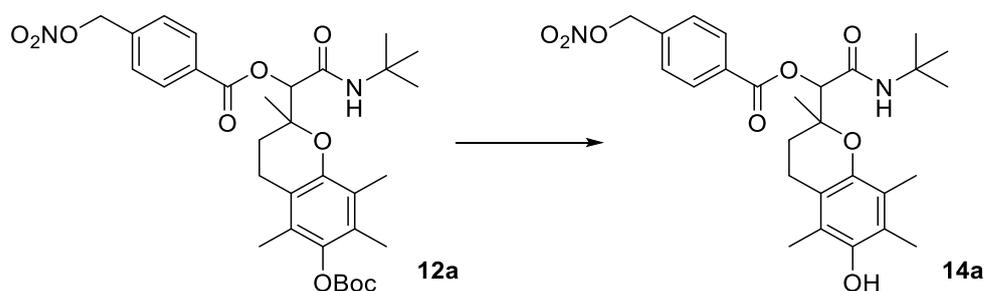
Entrada	R ₁	R ₂	Condiciones ensayadas	Producto (Rendimiento)
1			sd, 1 h, TA	12k (93%) ²³¹
2			MW, sd, 30 min., 60 °C.	12l (87%)
3			MW, sd, 30 min., 60 °C.	12m (97%)
4			MW, EtOH, 30 min., 60 °C	13c (57%) y 12k (26%)
5			MW, EtOH, 30 min., 60 °C	13d (45%) y 12n (21%)
6			MW, EtOH, 30 min., 60 °C	13e (63%) y 12l (15%)
7			MW, EtOH, 30 min., 60 °C	13f (32%) y 12m (33%)
8			MW, EtOH, 30 min., 60 °C	13g (0%) y 12o (54%)

La obtención de los derivados de la reacción de Ugi **13c-g** (entradas 4 a 8) se llevó a cabo mediante las condiciones optimizadas anteriormente (EtOH, bajo irradiación de MW a 60 °C durante 30 minutos). En todos los casos se obtuvo el compuesto deseado en rendimiento moderado y el de Passerini correspondiente como subproducto. Cuando se utilizó pentanal (entrada 8), no fue posible obtener el producto de Ugi, si no que se obtuvo el derivado de Passerini con un rendimiento moderado.

Asimismo, con objeto de completar la serie de interés y futuros estudios de relación estructura-actividad, se ensayó la desprotección del grupo hidroxilo fenólico del cromanol, eliminando el grupo protector Boc. Para esto se realizaron varios intentos, teniendo en cuenta que dicha reacción requiere condiciones especiales y no las clásicas con TFA debido a la presencia del grupo liberador de óxido nítrico, que resultaría lábil bajo estas condiciones. Además, con el objetivo de no alterar el enlace éster que se forma en la reacción de Passerini, se buscaron algunas condiciones de reacción suaves, que además sean amigables con el medio ambiente. Se ensayó inicialmente la desprotección del compuesto **12a**, en las condiciones descritas en la Tabla 4.12.

De todas las condiciones en que se llevó a cabo la reacción solo fue posible obtener el producto deseado con una novedosa técnica descrita en literatura. Esta consiste en calentar la molécula a desproteger durante 12 h a reflujo o bajo calentamiento por irradiación de microondas en trifluoroetanol, un disolvente que es considerado verde.²³² Las condiciones de reacción son neutras, no se requiere reactivos adicionales al propio disolvente. Por tanto, el proceso de aislamiento del producto es simple, implicando solo evaporación del disolvente y posterior purificación. En ambas condiciones el compuesto se obtuvo con rendimientos moderados.

²³² Dandia, A; Singh, R; Joshi, J; Kumari, S. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. **2014**, 11, 462-476.

Tabla 4.12. Condiciones de reacción ensayadas para la desprotección del grupo fenol.

Entrada	Condiciones ensayadas	Resultados
1	Na ₂ CO ₃ , Acetonitrilo-Agua (2:1), 24 h, reflujo. ²³³	Se obtiene el producto de hidrólisis del grupo éster, con el grupo Boc.
2	NaOH, MeOH-Agua, 3 h, TA ²³⁴	Se obtiene el producto de hidrólisis del grupo éster, con el grupo Boc.
3	Agua, MW, 3 min., 80 °C. ²³⁵	Se recupera el producto de partida incambiado.
4	Agua, MW, 10 min., 80 °C. ²³⁵	Se recupera el producto de partida incambiado.
5	Agua, MW, 30 min., 80 °C. ²³⁵	Se recupera el producto de partida incambiado.
6	Piperidina, CH ₂ Cl ₂ , 48 h, TA ²³⁴	Se recupera producto de partida incambiado y producto de hidrólisis del grupo éster con el grupo Boc.
7	TFE, reflujo, 12 h ²³⁶	14a (58%)
8	TFE, MW, 100 °C, 30 min.	14a (65%)

Luego se llevó a cabo la desprotección de moléculas seleccionadas (**12f**, **12g**, **12h**, **12m**, **13a**, **13b**, **13f**), utilizando TFE, bajo reflujo o irradiación de microondas según la disponibilidad del equipo (Esquema 4.14). En general cuando se realizó la reacción a reflujo por 12 h, se obtuvieron rendimientos de moderados a buenos. En los dos casos que se llevó a cabo la reacción bajo irradiación de MW, se irradiaron solo por 15 minutos, ya que en ese tiempo se

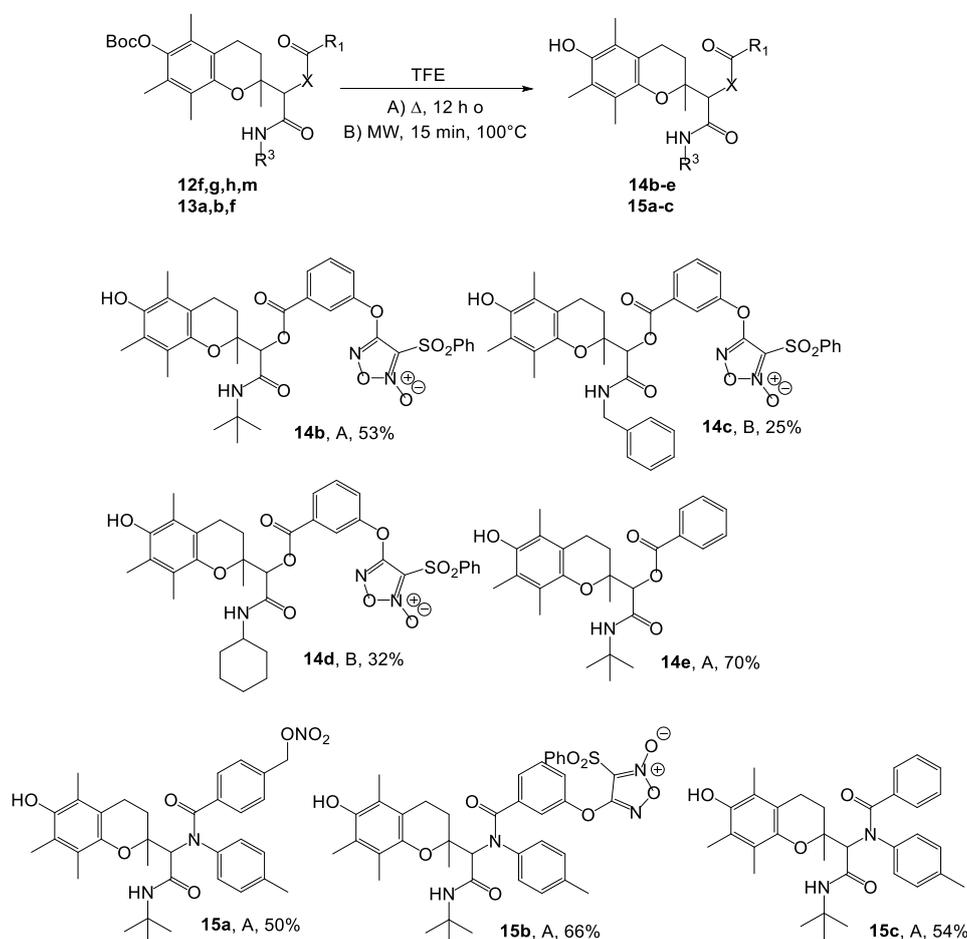
²³³ El Kazzouli, S; Koubachi, J; Berteina-Raboin, S; Mouaddib, A; Guillaumet, G. *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 8575–8577.

²³⁴ Nakamura, K; Nakajima, T; Kayahara, H; Nomura, E; Taniguchi, H. *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45,495–499.

²³⁵ Cheraiet, Z; Hessainia, S; Ouarna, S; Berredjem, M; Aouf, N.-E. *Green Chemistry Letters and Reviews*, **2013**, 6, 3, 211-216.

²³⁶ Choy, J; Jaime-Figueroa, S; Lara-Jaime, T. *Tetrahedron Letters*. **2010**, 51, 2244-2246.

observó consumo total del reactivo de partida y otros productos secundarios en el origen de la TLC. Los compuestos deseados se obtuvieron con rendimientos bajos.



Esquema 4.14. Síntesis de compuestos híbridos y derivados de tocoferol mediante estrategia de desprotección del grupo fenol.

4.2.2 Elucidación estructural

Al igual que en la serie anterior la estructura de todos los compuestos sintetizados se confirmó mediante experimentos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, donde se observaron claramente las señales correspondientes a los distintos tipos de protones y carbonos presentes en cada molécula. Además la correcta asignación de las señales de los mencionados espectros fue realizada mediante la ayuda de los experimentos COSY, HMBC, y HSQC. También se confirmó la estructura mediante espectrometría de masas y masas de alta resolución. Los compuestos de esta serie que provienen del aldehído de Trolox **1h** (mezcla racémica) fueron obtenidos

también como mezcla de diasterómeros. Es así que en general los espectros de ^1H -RMN se observan las señales duplicadas, que corresponden a dicha mezcla. En el caso de esta serie de compuestos los pares diastereoméricos se observan en una proporción 1:0.5. A continuación (Figura 4.6) se muestran como ejemplo el espectro de ^1H -RMN del compuesto **14e**. Se observan todos los protones correspondientes a su estructura duplicados, con la presencia de un par diastereomérico mayoritario (integración 1) y otro par minoritario (integración 0.5). La integración de las señales en la zona de aromáticos (δ entre 8.13-7.46 ppm) es de 7.5 protones, 5 correspondientes al par mayoritario y 2.5 al minoritario. Así como en $\delta=6.16$ y 5.96 se observa la señal correspondiente al N-H de la amida; en $\delta= 5.40$ y 5.21 son señales correspondientes al protón unido al carbono quiral que se genera en la reacción de Passerini. En este caso las señales del OH del anillo cromano no se observan. Las señales entre $\delta= 2.82$ y 1.43 corresponden a los distintos metilos y metilenos del resto cromano y en $\delta=1.40$ y 1.36 al grupo *tert*- butilo.

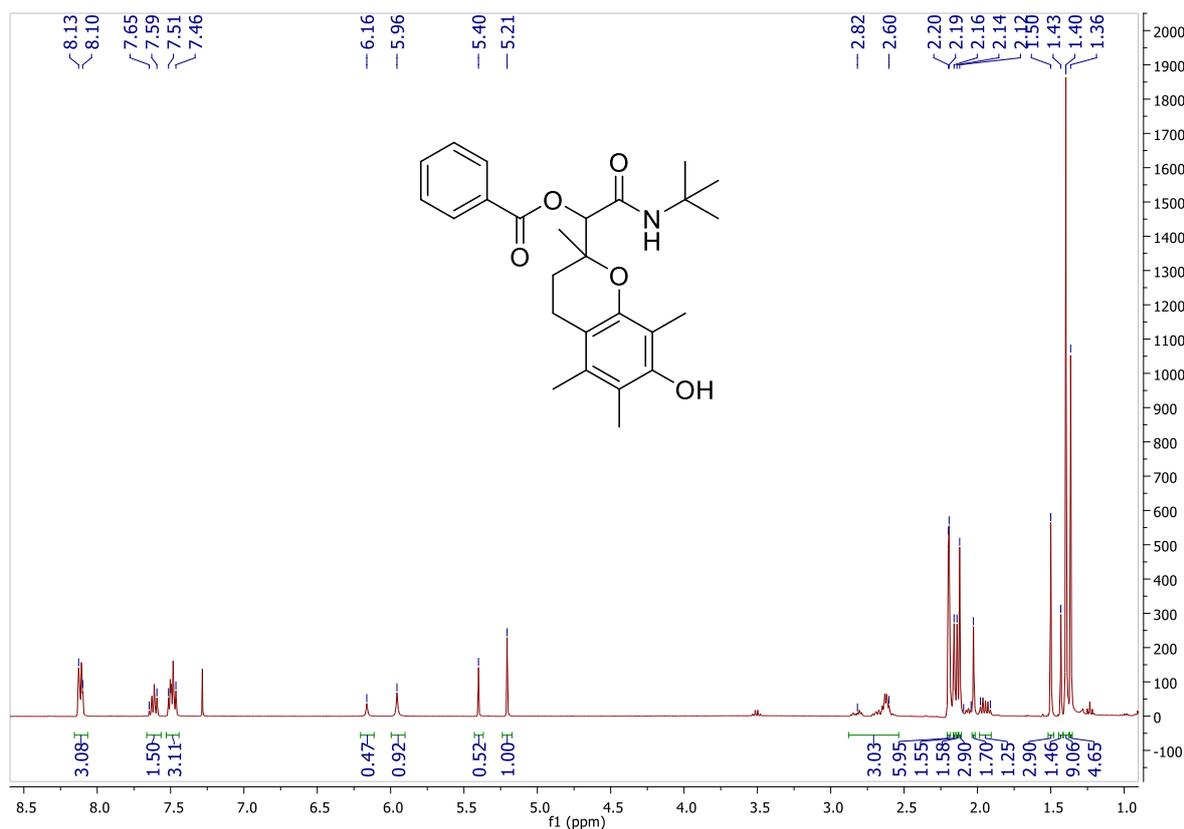


Figura 4.6. Espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 del compuesto **14e**

En la figura 4.7 se muestra el espectro de ^1H -RMN del compuesto **15c**, obtenido mediante una reacción de Ugi a partir de los mismos componentes que el compuesto **14e** y *p*-toluidina, en

donde también están todas las señales por duplicado, en la misma proporción 1: 0.5 que el espectro anterior. En él se observan, señales similares al análogo Passerini, en este caso también las señales correspondientes al N-H de la amida están corridas a δ mayores, junto a las señales aromáticas. Además hay un aumento de señales aromáticas y de un metilo, correspondientes al componente amina.

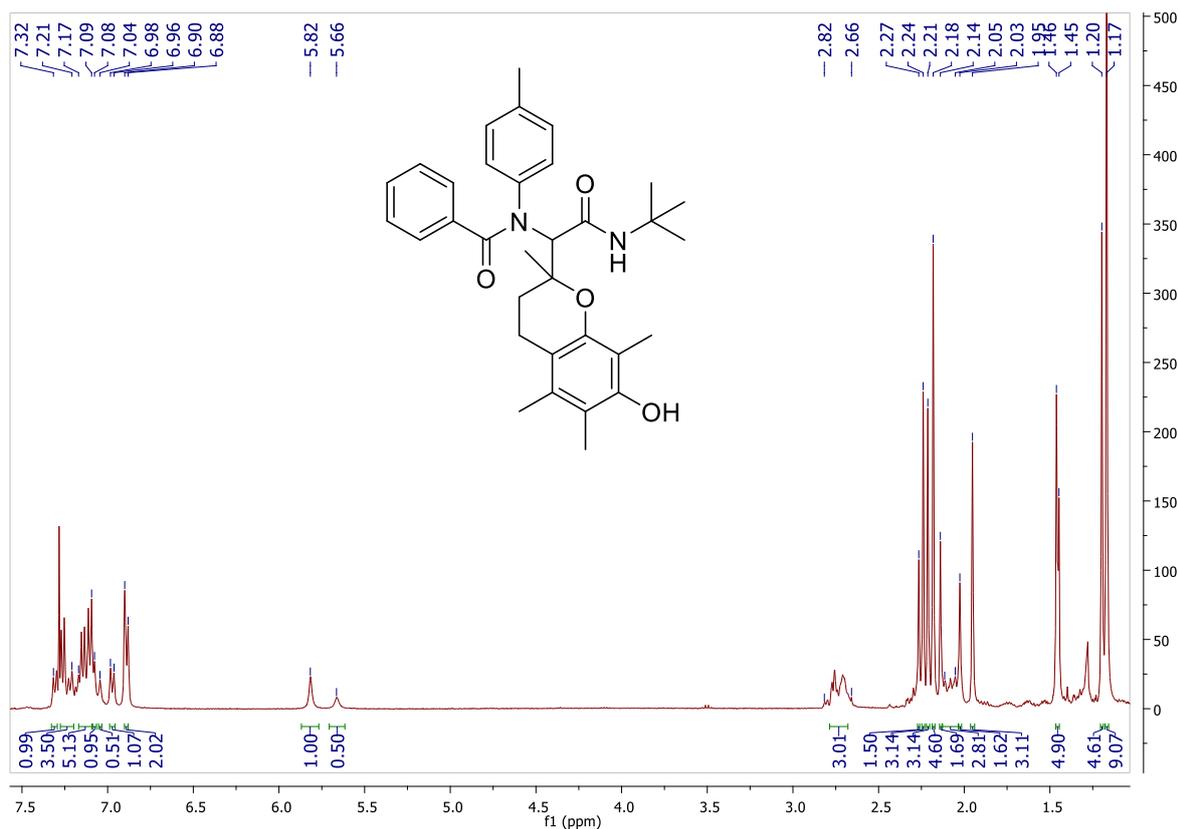


Figura 4.7. Espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 del compuesto **15c**

Por otro lado, en la Figura 4.8 se muestra el ^1H -RMN del compuesto **13c**, análogo al compuesto anterior, pero que no contiene el grupo tocoferol-mimético. En este caso no se observa la duplicación de señales, ya que solamente se obtiene el compuesto como mezcla racémica. En δ entre 7.35 y 6.81 corresponden las señales aromáticas provenientes de la *p*-toluidina, ácido benzoico y benzaldehído, que integran 14, $\delta=6.07$ la señal del protón unido al carbono quiral, en $\delta=5.86$ el protón N-H de la amida, en $\delta=2.18$ corresponde el metilo de la *p*-toluidina y en $\delta=1.39$ la señal proveniente del grupo *tert*-butilo.

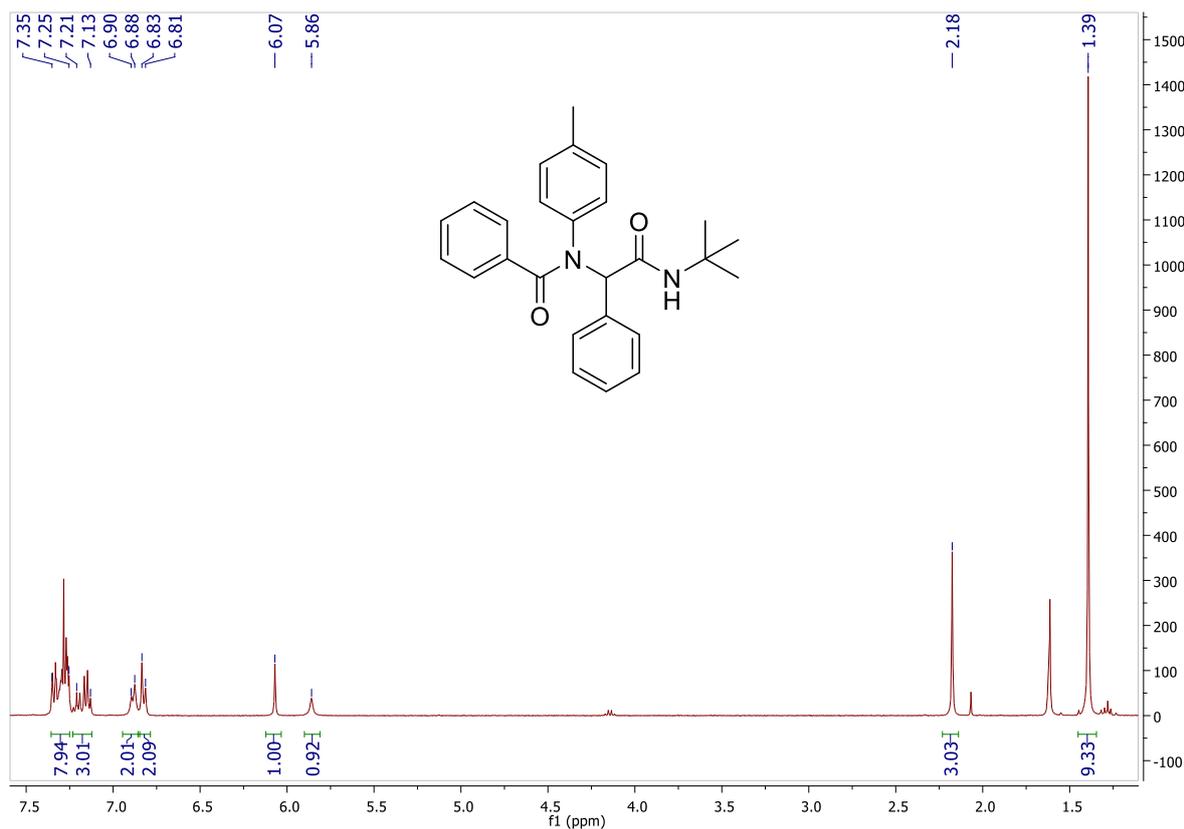


Figura 4.8. Espectro de ¹H-RMN en CDCl₃ del compuesto **13c**

4.2.3 Biología

4.2.3.1 Actividad Antiproliferativa

Inicialmente se estudió la estabilidad de los fenoles protegidos con el grupo Boc en el medio de cultivo celular, para asegurar que la actividad biológica que luego se estudió no se debía a una mezcla de compuestos protegidos y desprotegidos, lo cual podría afectar la posterior discusión. Dicha estabilidad se estudió mediante HPLC. Se realizaron estudios de estabilidad en condiciones de cultivo celular para el compuesto **13a**, donde no se observó desprotección, como se muestra en la Figura 4.9.

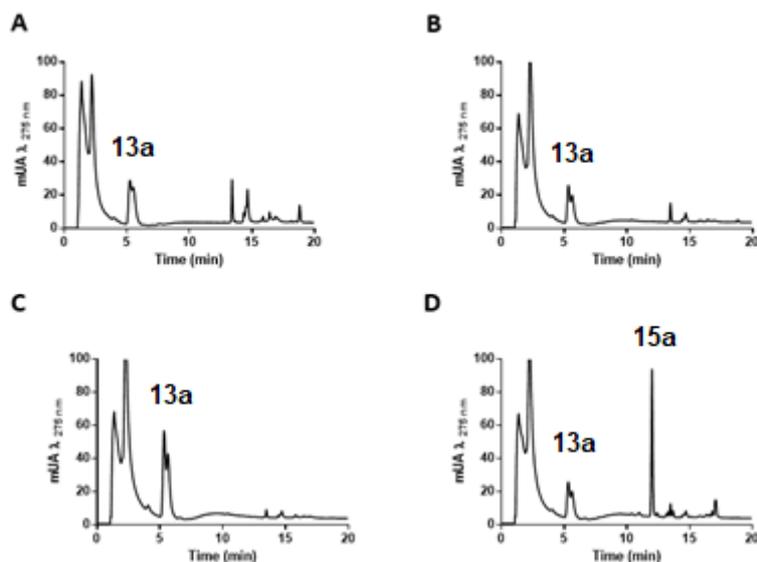


Figura 4.9 Estabilidad de **13a** en cultivo celular. RPMI 1640 suplementado con SFB inactivado por calor al 5% y L-glutamina 2 mM se trató con **13a** (50 μ M) durante 48 h a 37 ° C. Se extrajo una muestra (100 μ L) de medio con metanol (9: 1, v: v), a tiempo = 0 (A) y 48 h (B) y se analizaron por RP-HPLC (Abs. 275 nm). A la muestra mostrada en B, se agregó una cantidad adicional de **13a** (C) u **15a** (D).

Como en la Serie I, con esta nueva serie de compuestos también se realizó la evaluación *in vitro* de los compuestos como potenciales agentes antitumorales, en colaboración con el grupo del Dr. José Manuel Padrón Carrillo, BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González”, Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

Como se comentó anteriormente el objetivo de este ensayo es estudiar la actividad antiproliferativa de los compuestos, en un panel de 6 líneas celulares humanas procedentes de tumores sólidos de origen diverso: HBL100 (células de cáncer de mama), HeLa (células de cáncer de cérvix), SW1573 (células de cáncer de pulmón), T-47D (células de cáncer de mama), WiDr (células de cáncer de colon) y A549 (células de cáncer de pulmón).

Los resultados mostrados en la Tabla 4.13 se expresan como 50% de inhibición del crecimiento (IC_{50}) tras 48 h de exposición aplicando el protocolo del National Cancer Institute (NCI)²²⁵ de los EE.UU. y el ensayo SRB.²²⁶

Tabla 4.13. Actividad antiproliferativa (IC₅₀) contra células humanas procedentes de tumores sólidos de los compuestos sintetizados en la serie II mediante reacciones de Passerini y de Ugi y componentes de partida.

Compuesto	Linea Celular (tipo)					
	A549 (pulmón)	HBL-100 (mama)	HeLa (cervix)	SW1573 (pulmón)	T-47D (mama)	WiDr (colon)
Materiales de partida						
1h	71 (±16)	18 (±8.4)	17 (±5.5)	16 (±8.3)	79 (±17)	64 (±33)
2c	>100	>100	96 (±5.0)	>100	>100	>100
2d	9.7 (±3.7)	2.9 (±0.9)	4.6 (±2.0)	2.0 (±0.7)	16 (±2.5)	20 (±1.1)
Productos Passerini						
12a	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12b	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12c	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12d	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12e	95(±7.2)	>100	>100	>100	>100	>100
12f	15 (±5.2)	>100	4.8 (±1.1)	0.17 (±0.01)	49 (±10)	82 (±25)
12g	89 (±14)	19 (±0.01)	25 (±3.6)	0.26 (±0.01)	>100	>100
12h	87 (±23)	12 (±6.3)	32 (±7.4)	0.28 (±0.01)	>100	>100
12i	39(±11)	3.1(±0.2)	10(±2.5)	0.097(±0.02)	>100	>100
12j	93 (±12)	93(±9.4)	71 (±18)	0.32 (±0.05)	>100	>100
12k	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12l	2.5 (±0.6)	0.3 (±0.04)	1.7 (±0.07)	0.11 (±0.01)	2.1 (±0.06)	3.5 (±0.4)
12m	18 (±4.4)	24 (±19)	14 (±2.7)	32 (±3.1)	75 (±26)	66 (±15)
12n	30 (±2.6)	21 (±4.9)	17 (±0.9)	7.4 (±0.7)	3.6 (±0.5)	12 (±0.01)
12o	2.5(±0.3)	1.9(±0.5)	3.1(±0.2)	0.14(±0.05)	2.1(±0.4)	2.2(±0.3)
14a	5.1 (±1.2)	22 (±2.9)	4.7(±1.0)	6.0 (±1.0)	17 (±2.6)	42(±9.8)
14b	2.3 (±0.06)	2.4 (±0.1)	2.2 (±0.2)	0.4(±0.03)	3.0(±0.5)	3.5(±1.0)
14c	4.5 (±0.4)	13 (±1.6)	8.3 (±0.9)	3.9 (±0.5)	12 (±1.1)	17 (±4.5)
14d	13(±1.0)	9.6(±2.6)	13(±3.0)	3.4(±0.5)	30(±4.1)	42(±1.5)
14e	4.5(±0.4)	13(±1.6)	8.3(±0.9)	3.9(±0.5)	12(±1.1)	17(±4.5)
Productos Ugi						
13a	6.3 (±1.9)	66 (±18)	14 (±0.1)	14 (±8.3)	15(±4.4)	84(±23)
13b	89(±14)	2.6 (±0.7)	15 (±2.3)	0.16 (±0.02)	>100	>100
13c	24 (±7.8)	33 (±3.7)	19 (±6.9)	21 (±8.5)	32 (±8.0)	33 (±6.2)
13d	9.3 (±0.5)	10 (±2.5)	5.9 (0.9)	1.7 (±0.1)	17 (±1.5)	15 (±4.2)
13e	2.3 (±0.5)	0.23 (±0.02)	1.8 (±0.3)	0.021 ± (0.013)	1.9 (±0.3)	3.0 (±0.6)
13f	3.2 (±0.9)	3.5 (±0.6)	3.0 (±0.5)	3.9 (±0.9)	4.1 (±0.9)	6.0 (±1.3)
15a	2.5 (±0.8)	8.1(±1.9)	3.7 (±0.9)	5.5 (±0.6)	8.1 (±1.0)	29(±4.3)
15b	2.3 (±0.5)	0.31 (±0.03)	1.3 (±0.1)	0.24 (±0.003)	3.0 (±0.2)	5.8 (±1.2)
15c	2.4 (±0.1)	3.7 (±0.4)	2.0 (±0.3)	1.8 (±0.06)	2.9 (±0.5)	3.8 (±0.3)
Controles positivos						
Cisplatino	2.1 (±0.6)	1.9 (±0.3)	2.0 (±0.3)	3.0 (±0.4)	15 (±2.3)	26 (±5.3)
Etoposido	0.7 (±0.2)	2.3 (±0.9)	3.0 (±0.9)	15 (±1.5)	22 (±5.5)	23 (±3.1)

Se evaluaron los 29 compuestos sintetizados, así como también los componentes de partida **1h** (aldehído), **2c** (ácido) y **2d** (ácido) y dos compuestos antitumorales conocidos de referencia, el cisplatino y el etopósido. En líneas generales, los resultados obtenidos muestran que los derivados Passerini **12l**, **12o** (ambos incorporan únicamente el farmacóforo liberador

de $\cdot\text{NO}$) y **14b** (híbrido tocoferol-liberador de $\cdot\text{NO}$), junto a los derivados Ugi **13e** (incorpora únicamente el farmacóforo liberador de $\cdot\text{NO}$) y **15b** (híbrido tocoferol-liberador de $\cdot\text{NO}$) fueron los de mejor actividad, todos conteniendo un fragmento molecular sulfonilfuroxanilo como liberador de $\cdot\text{NO}$. En este contexto, el compuesto **12l** exhibió una notable actividad anticancerígena con valores de IC_{50} entre 0.11 a 3.5 μM contra las líneas celulares analizadas, especialmente contra las células de cáncer de mama HBL-100 y las células de cáncer epitelial pulmonar SW1573 (300 nM y 110 nM, respectivamente). Por lo tanto, **12l** fue 6-8 veces más potente que cisplatino y etopósido para las células HBL-100, casi 30 veces más potente que cisplatino y cerca de 140 veces más potente que etopósido para las células SW1573. Su análogo **12o**, que proviene del pentanal, en lugar de benzaldehído como componente aldehído en la reacción de Passerini correspondiente, mostró una notable inhibición de la proliferación celular con alta sensibilidad hacia las células SW1573 (140 nM de IC_{50}). El compuesto **14b**, análogo del **12l**, pero híbrido de tocoferol, presentó una actividad similar, algo menor en algunas líneas tumorales. Entre los derivados de Ugi, el compuesto **13e** mostró una notable actividad anticancerígena con excelente sensibilidad hacia las células SW1573 (21 nM de IC_{50}), bastante más potente que los controles positivos, cisplatino y etopósido (140 y 700 veces más potente, respectivamente). Mientras tanto, el compuesto **15b** reveló una notable actividad anticancerígena en el mismo orden que el compuesto **12l** con valores de IC_{50} entre 0.24 y 5.8 μM contra todas las líneas celulares probadas y sensibilidad contra las líneas celulares HBL-100 y SW1573. Por otro lado, los compuestos **2c**, **12k**, **12a-e** no muestran actividad antiproliferativa contra el panel de células cancerosas analizadas. Estos resultados iniciales sugieren que la presencia del fragmento molecular sulfonilfuroxanilo, pero no de nitratos orgánicos incorporados en la molécula, como resto donador de $\cdot\text{NO}$ podría desempeñar un papel crucial en la actividad antiproliferativa. Los resultados obtenidos también mostraron que los componentes aldehído **1h**, ácido **2d**, los Passerini **12m**, **12n**, **14a**, **14c**, **14d**, **14e** y los Ugi **13a**, **13c**, **13d**, **13f**, **15a** y **15c** mostraron una actividad moderada similar contra todas las líneas celulares con IC_{50} que varía de 2.0 a 84 μM . Sin embargo, los derivados de Passerini **12f-j** y Ugi **13b**, no muestran actividad contra las líneas celulares más resistentes a los fármacos utilizados como referencia, T-47D y WiDr, pero mostraron actividad moderada contra las otras líneas celulares. Curiosamente, presentan una excelente actividad contra la línea SW1573, siendo entonces altamente selectivos contra la misma. Por ejemplo el compuesto **12f** presentó un valor de IC_{50} de 170 nM contra dicha línea celular. Esto hace a

estos compuestos muy interesantes ya que el cáncer de pulmón es la causa más común de muerte relacionada con el cáncer (1.76 millones de muertes al año mundialmente).¹⁶²

Comparando los valores de IC_{50} obtenidos, se observaron los siguientes puntos con respecto a la REA de los compuestos sintetizados: a) La incorporación de un grupo nitrooxilo como farmacóforo dio como resultado un aumento moderado de la actividad anticancerígena, como se puede ver comparando los derivados de Passerini **12k** vs. **12n** y los derivados de Ugi **13c** vs. **13d**; b) El reemplazo del sustituyente fenilo a través del componente aldehído en los derivados de Passerini **12k**, **12n**, **12l** y de Ugi **13c**, **13d**, **13e** por el anillo de cromanol (resto tocoferol-mimético) dio como resultado una actividad anticancerígena similar o un aumento moderado del mismo (comparando GI_{50} de **12k** con **14e**, **12n** con **14a**, **12l** con **14b**, **13c** con **15c**, **13d** con **15a**, **13e** con **15b**); c) La sustitución del grupo *tert*-butilo (proveniente del componente isonitrilo) en el compuesto **12a** con otro grupo alquilo, arilo o cicloalquilo no modificó la baja actividad resultante (véase GI_{50} de **12a** vs. **12b-e**); d) La incorporación de un grupo furoxanilo como farmacóforo dio como resultado una mejora notable de la actividad anticancerígena como se puede ver al comparar **12k** vs. **12l** y **13c** vs. **13e**; e) La sustitución del grupo *tert*-butilo en el compuesto **12f** con otro grupo alquilo, arilo o cicloalquilo tampoco resultó en un cambio relevante en la actividad anticancerígena (véase IC_{50} de **12g-j**); e) La desprotección del grupo fenólico del anillo de cromano (**12m** vs. **14e**, **12h** vs. **14d**, **13f** vs. **15c**, **12f** vs. **14b**, **12g** vs. **14c**) dio como resultado un leve aumento de la actividad antiproliferativa, excepto en el caso de **12a** vs. **14a**. En general, los derivados de Passerini y de Ugi que contienen la subestructura de fenilsulfonilfuroxano como grupo liberador de $\cdot NO$ mostraron la mejor actividad antitumoral en el panel de seis células. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron los mejores compuestos para profundizar los estudios del mecanismo de acción de los mismos.

4.2.3.3 Índice de Selectividad

Para evaluar de manera preliminar el perfil de toxicidad de los compuestos seleccionados, se realizó un estudio de proliferación celular en células HaCaT, queratinocitos humanos, utilizando concentraciones entre 1–100 μM de los compuestos usando el ensayo de SRB. El índice de selectividad (IS) se calculó para estos compuestos dividiendo el CE_{50} para HaCaT por el IC_{50} para cada línea celular tumoral, dichos resultados se presentan en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Citotoxicidad de los compuestos seleccionados contra queratinocitos humanos HaCaT e índice de selectividad.

Compuesto	HaCat CE ₅₀ (μ M) ^a	IS ^b					
		A-549	HBL100	HeLa	SW1173	T47-D	WiDr
12l	7.7	3.1	25.7	4.5	70	3.7	2.2
13d	34.1	3.7	3.4	5.8	20	2.0	2.3
13e	9.9	4.3	43	5.5	471.4	5.2	3.3
14a	>100	>19.6	>4.5	>16.7	>5.9	>5.9	>2.4
14b	10.4	4.5	4.3	4.7	26	3.5	2.9
15a	>100	>40	>12.3	>27	>18.2	>12.3	>3.4
15b	7.9	3.4	25.5	6.1	32.9	2.6	1.36
15c	14.4	6.0	3.9	7.2	8.0	4.9	3.8

^a. Los resultados son la media de cuatro experimentos independientes con una DS menor del 10% en todos los casos. ^b IS: índice de selectividad, CE₅₀, HaCat / IC₅₀, célula tumoral (línea).

Los datos obtenidos revelaron que todos los compuestos seleccionados fueron selectivos hacia las células cancerosas, mostrando un rango de índice de selectividad de 2.2-471.4. Además, la mayoría de estos compuestos exhibieron una notable selectividad hacia las células cancerosas SW1573. En particular, los compuestos Passerini **12l** y Ugi **13e**, que contienen únicamente el farmacóforo furoxanilo como donador de \cdot NO, mostraron un IS de 70 y 471.4 para las células SW1573 y un IS de 25.7 y 43 para las células HBL-100, respectivamente. También es notable la actividad antiproliferativa significativamente más baja de los derivados de híbridos de tocoferol-nitrooxilo **14a** y **15a** en células normales HaCaT.

4.2.3.4 Medida de la liberación de \cdot NO

Entre los grupos capaces de liberar \cdot NO, el furoxano ha atraído una atención considerable debido a su estabilidad en condiciones ambientales y su capacidad para producir grandes cantidades de \cdot NO mediante un mecanismo dependiente de tiol, provocando así los efectos citotóxicos asociados al mismo. A diferencia de los nitratos orgánicos, los furoxanos no promueven la tolerancia bajo terapia continua.^{184,237} Los nitratos orgánicos son los liberadores de \cdot NO más antiguos y estructuralmente más simples con un papel importante en

²³⁷ O. N. Burov, M. E. Kletsii, N. S. Fedik, A. V. Lisovin, S. V. Kurbatov, *Chem. Heterocycl. Compd.* **2015**, 51, 951–960.

la terapia cardiovascular, pero también han demostrado propiedades anticancerígenas *in vitro* e *in vivo*.²³⁸ Se han hecho muchos esfuerzos para dilucidar completamente el mecanismo de generación de $\cdot\text{NO}$ por nitratos orgánicos. En este contexto, se han propuesto biotransformaciones enzimáticas de nitratos orgánicos para dar $\cdot\text{NO}$, incluidas glutatión-S-transferasas (GST), citocromo P450 reductasa, xantina oxidorreductasa y aldehído deshidrogenasa-2 (ALDH2).^{180, 183a, 239} Los compuestos seleccionados **12l**, **14a**, **14b**, **13d**, **13e**, **15a** y **15b**, que contienen un grupo liberador de $\cdot\text{NO}$ y tuvieron una excelente actividad anticancerígena, fueron evaluados por su capacidad para liberar NO en presencia de células cancerosas, como una primera aproximación a su mecanismo de acción. Como se muestra en la Figura 4.10A, se determinó la capacidad de producción de NO intracelular de estos compuestos y se presenta como la producción de nitrito en los lisados de células HeLa (expuestos a 100 μM de cada compuesto) usando el ensayo de Griess.

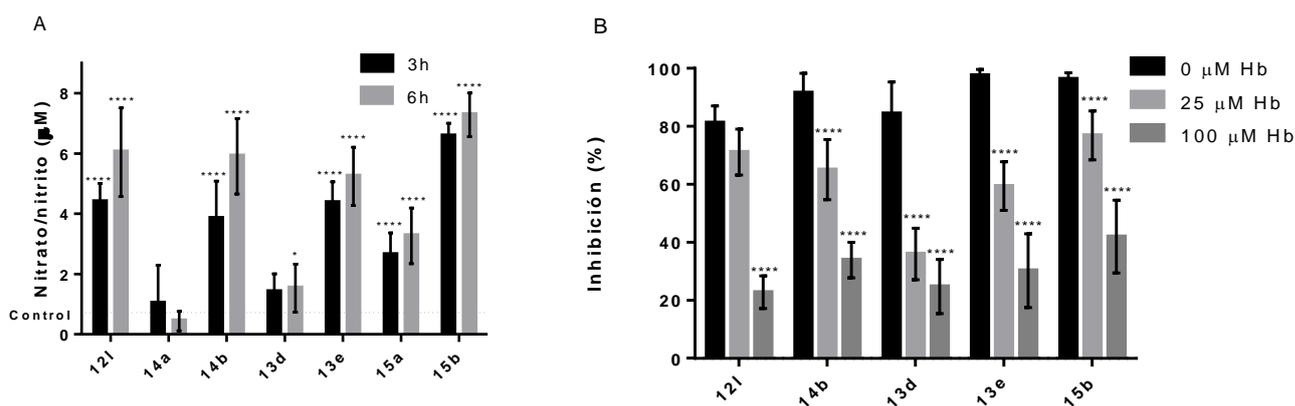


Figura 4.10 A) Niveles de $\cdot\text{NO}$ producidos por los compuestos seleccionados en células HeLa. Los resultados se indican como la media \pm DS (desviación estándar) de tres experimentos independientes. B) Efectos de la hemoglobina sobre la actividad antiproliferativa de los compuestos liberadores de $\cdot\text{NO}$ seleccionados. Las células HeLa se pre-trataron con las concentraciones indicadas de hemoglobina (0, 25 o 50 μM) durante 1 h y se trataron con 25 μM de los compuestos durante 48 h. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular en relación con las células de control. Los datos son el valor medio \pm DS, obtenido de tres determinaciones. Análisis estadístico: ANOVA bidireccional seguido de prueba de comparación múltiple Bonferroni. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Los resultados obtenidos muestran que los compuestos pueden producir varios niveles de nitrito a las 3 o 6 h en presencia de células de cáncer de cuello uterino humano HeLa, entre

²³⁸ B. J. McDonald, B. M. Bennett, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1990**, 68, 1552–1557.

²³⁹ a) H. Li, X. Liu, H. Cui, Y.-R. Chen, A. J. Cardounel, J. L. Zweier, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 12546–12554. b) H. Li, H. Cui, X. Liu, J. L. Zweier, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 16594–16600. c) Z. Chen, J. Zhang, J. S. Stamler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, 99, 8306–8311.

los cuales, los compuestos más activos **12l**, **14b**, **13e** y **15b** liberaron la concentración más alta de nitrito. Se observó que los derivados de nitratos orgánicos (**14a**, **13d** y **15a**) liberaron menos nitrito que sus análogos de furoxano. Además, para los mismos compuestos, se examinó el efecto del $\cdot\text{NO}$ sobre su actividad antiproliferativa contra las células HeLa. Después de la incubación con un atrapador de $\cdot\text{NO}$ (Hb, hemoglobina), las células HeLa se trataron con 25 μM de los compuestos liberadores de $\cdot\text{NO}$ seleccionados durante 48 h. Los compuestos **14a** y **15a** no mostraron cambios en su actividad antiproliferativa en presencia de Hb (datos no mostrados). Sin embargo, como se ve en la Figura 4.10B, los otros compuestos en ausencia de Hb inhiben notablemente el crecimiento de las células HeLa, pero este efecto antiproliferativo disminuyó por el pretratamiento con Hb de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados indican que la potente actividad antiproliferativa contra las células cancerosas de estos compuestos puede atribuirse parcialmente a la liberación de $\cdot\text{NO}$.

Vale la pena mencionar que los ensayos en células HaCaT, el ensayo de Griess para medir la liberación de óxido nítrico y el ensayo con hemoglobina, fueron realizados por la autora de esta tesis en el marco de una pasantía en el Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica, del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, bajo la dirección de la Dra. Paola Hernández.

4.2.4 Conclusiones

Con respecto a los resultados obtenidos en esta serie podemos concluir que se sintetizó una pequeña biblioteca de compuestos liberadores de $\cdot\text{NO}$ utilizando reacciones multicomponente de Passerini y de Ugi. Se ensamblaron materiales de partida con algunos componentes presentando cierta complejidad estructural en una sola etapa sintética, para producir los productos deseados con rendimientos de buenos a excelentes. Las RMC se optimizaron para realizarse en condiciones amigables con el medio ambiente, ya sea mediante el uso de irradiación de MW en condiciones sin disolventes o con disolventes verdes. Las principales ventajas de este protocolo son: i) simplicidad experimental, ii) condiciones suaves, iii) tiempos de reacción cortos, iv) reacciones limpias y v) rendimientos buenos a excelentes.

Todas las moléculas sintetizadas se evaluaron frente a seis líneas celulares de tumores sólidos humanos. La mayoría de ellos eran capaces de inhibir el crecimiento celular, los derivados furoxanos resultaron ser prometedores, en contraste con sus análogos nitratos orgánicos. Los derivados de Passerini **12l**, **12o** y **14b**, y los derivados de Ugi **13e** y **15b**, que contienen el sistema furoxano como liberador de $\cdot\text{NO}$, son potentes agentes anticancerígenos, que exhiben valores de IC_{50} contra todas las células en el rango de 0.021 a 5.8 μM , siendo el compuesto **13e** el más potente. Casi 8 veces más potente que el cisplatino y el etopósido contra las líneas celulares resistentes T-47D y WiDr, pero además, fue extremadamente potente contra células de carcinoma alveolar SW1573, siendo 140 veces más activo que el cisplatino y 700 veces más potente que el etopósido. Respecto a los derivados de Passerini, el compuesto **12l** fue casi 7 veces más activo que el cisplatino y el etopósido contra las células de cáncer de mama HBL-100, y casi 30 veces más potente que el cisplatino y casi 140 veces más potente que el etopósido contra las células cancerosas SW1573. Por otro lado, estas dos moléculas (**12l** y **13e**) exhibieron menor potencia contra los queratinocitos humanos no cancerosos (HaCaT), lo que indica una selectividad contra las células tumorales.

Otros estudios demostraron que **12l** y **13e** pudieron liberar $\cdot\text{NO}$ en presencia de células HeLa, y las actividades antiproliferativas de ambos compuestos disminuyeron al aumentar la concentración de hemoglobina, que atrapa NO liberado. Estos resultados sugieren un papel clave del NO en su mecanismo antitumoral. Cabe mencionar que aunque **14b** y **15b** presentan actividades biológicas similares a las de **12l** y **13e**, estos últimos se puede sintetizar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles y en mejores rendimientos.

En resumen, la estrategia propuesta ha permitido identificar dos pequeñas moléculas como futuras candidatas para el desarrollo de potentes compuestos antitumorales. Se deberían llevar a cabo estudios futuros para conocer más profundamente su mecanismo antiproliferativo, además de evaluar la actividad antiproliferativa de los estereoisómeros aislados y determinar su actividad *in vivo*, en particular, en un modelo animal de carcinoma alveolar de pulmón.

4.3 Serie III. Síntesis de nitroalquenos obtenidos mediante RMC de Ugi



Fecha de emisión 02/10/2020

EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA EN SESIÓN ORDINARIA DE FECHA 1 DE OCTUBRE DE 2020, ADOPTO LA SIGUIENTE RESOLUCIÓN:

65.

(Exp. N° 101400-003199-20) - Aprobar el informe de la Comisión de Posgrado y en consecuencia:

- 1.- Designar a los Dres. David González, Viviana Huguaburu y Mauricio Cabrera como integrantes del Tribunal que deberá entender en la Defensa de Tesis del Doctorado en Química, de la Lic. **Mariana Ingold**.
- 2.- Autorizar una moratoria de un año para la entrega y publicación en línea de la tesis completa, de modo de avanzar en el proceso de registro de patente.
- 3.- Remitir copia de la presente resolución a Pedeciba Química. (10 en 10)

Comuníquese a Pedeciba Química. Cumplido pase al DAE Secc. Posgrado.

5/10/20

- se comunicó a Pedeciba.


DIEGO MECOL
ADMINISTRATIVO
SECCION CONSEJO



Ana Morquio
Directora de División – Secretaria
Facultad de Química

Capítulo 5

CONCLUSIONES GENERALES, PERSPECTIVAS Y ALCANCE DE LA TESIS

5.1 Conclusiones Generales

Uno de los mayores desafíos de la química orgánica y de la química médica actual, es la obtención de nuevos compuestos orgánicos estructuralmente diversos, de manera rápida y eficiente, para estudiar sistemas biológicos y acelerar el proceso de descubrimiento de fármacos. En este sentido la química también enfrenta retos como la reducción del impacto ambiental de los residuos industriales y al manejo adecuado de recursos ambientales. El desarrollo sustentable se ha convertido en un ideal fundamental del siglo XXI, la conservación y gestión de los recursos para el desarrollo es el aspecto más importante. La química tiene un papel significativo que desempeñar para lograr la sustentabilidad y los químicos deben ser conscientes de la necesidad de lograr este reto y tomar la iniciativa a la hora de desarrollar nuevas metodologías y tecnologías.

En el desarrollo del trabajo de tesis doctoral presentado no solo se estudiaron rutas sintéticas basadas en reacciones multicomponente con alta eficiencia atómica, sino también se utilizaron condiciones de reacción alternativas amigables con el medio ambiente, minimizando el consumo energético. Así se plantearon reacciones en medio acuoso, libre de disolventes, o utilizando disolventes verdes, tanto a temperatura ambiente como bajo irradiación con microondas o ultrasonido. Se estudiaron y optimizaron reacciones que generan complejidad y un rápido ensamble del esqueleto molecular utilizando materiales de partida simples y de fácil acceso a más complejos, con buenos rendimientos y mediante el uso de reactivos y condiciones ambientalmente amigables, siguiendo los principios de la química verde.

Se estudiaron la reacción de Passerini y la reacción de Ugi, que son RMC que permiten generar una estructura compleja, α -aciloxiamida y bis-amida, respectivamente, a partir de: aldehído o cetona, un isonitrilo y un ácido carboxílico, y en la reacción de Ugi, además una amina.

En el transcurso de la presente tesis doctoral bajo esta metodología se sintetizaron 3 series de compuestos, en las cuales fue posible hibridizar de diferentes maneras tres grupos farmacóforos seleccionados: liberadores de óxido nítrico, nitroalquenos y análogos de tocoferol. Los cuales fueron elegidos por su conocida actividad antiproliferativa.

La quimioteca así generada fue sometida a una evaluación biológica primaria *in vitro* como potenciales agentes antitumorales.

Como principales conclusiones de esta tesis doctoral se destacan los siguientes puntos:

- Se sintetizaron 76 compuestos derivados de RMC de Passerini o de Ugi, además de compuestos que se utilizaron como componentes de partida, bajo condiciones amigables con el medio ambiente, siguiendo los principios de la química verde. Se obtuvieron en general con rendimientos de moderados a buenos y en algunos casos, excelentes.
- Los compuestos obtenidos fueron evaluados en su actividad antiproliferativa frente a un panel de 6 líneas celulares tumorales humanas y de esos estudios surgen varios *hits*. De la serie I resaltaron los compuestos **10a**, **5g** y **11a** (Figura 5.1), en particular el **11a**, resultó selectivo para células cancerígenas, con respecto a células no tumorales humanas y además fue capaz de inducir apoptosis en células tumorales, pero no en normales.
- Los compuestos que destacaron de la serie II, fueron el **12l** y el **13e**, ambos conteniendo el grupo furoxano como liberador de NO y sin la presencia del grupo tocoferol-mimético. Dichos derivados resultaron especialmente potentes contra carcinoma de células alveolares SW1573. Se vió que estos compuestos presentaban selectividad frente a las células tumorales con respecto a células normales y además se demostró que son capaces de liberar NO en células HeLa, y que esto podría tener un rol importante en su mecanismo de acción antiproliferativo.

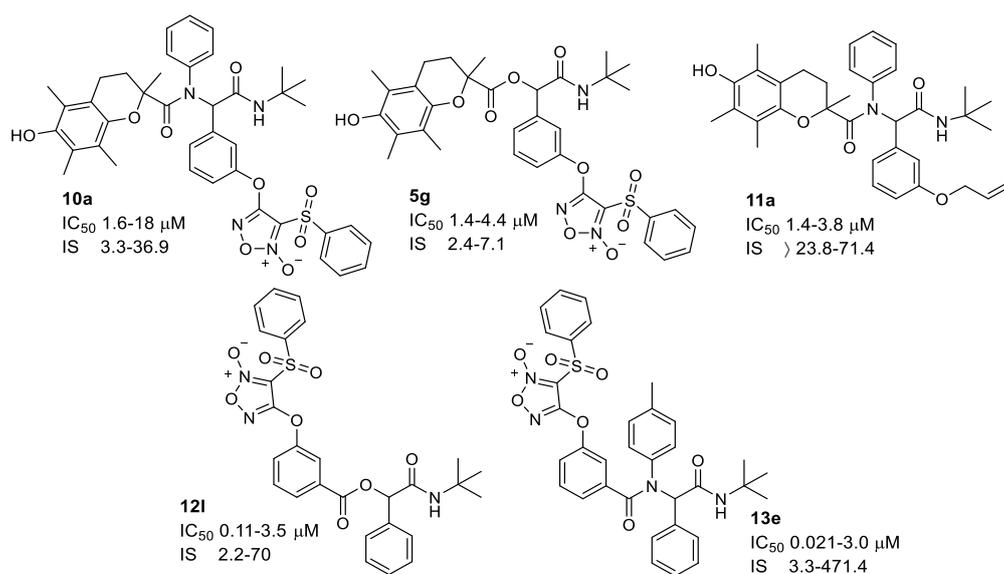


Figura 5.1. Estructura de los compuestos más relevantes de la serie I (**10a**, **5g** y **11a**) y de la serie II (**12l** y **13e**).

5.2 Perspectivas

Los hallazgos encontrados en el desarrollo de esta tesis demuestran un camino para el desarrollo de nuevos potenciales fármacos de manera novedosa, con metodologías no convencionales en la química orgánica, amigables con el medio ambiente, siguiendo la filosofía de la química verde. Algunos de los compuestos obtenidos demostraron ser prometedores candidatos para el desarrollo de potentes agentes terapéuticos para el cáncer.

A futuro, a partir de ellos se podrían sintetizar nuevos derivados que mejoren la actividad antiproliferativa buscada, sus perfiles de seguridad y propiedades ADME. En este sentido, se podrían explorar nuevas RMC o hacer modificaciones a las utilizadas, de manera de ampliar el espacio químico explorado.

También optimizar y estudiar el escalado de la síntesis de los productos con mejor perfil antitumoral para así tener cantidad suficiente de compuesto para estudios posteriores.

Un aspecto que sería de gran relevancia desarrollar, en una próxima etapa, es la obtención de los estereoisómeros por separado de los compuestos con actividad biológica destacada. Lo cual resulta de interés para poder estudiar su actividad antiproliferativa y citotóxica por separado.

Por otro lado, de los compuestos seleccionados como más relevantes, se podría profundizar el estudio de su mecanismo de acción, así como llevar a cabo estudios *in vivo* en modelos tumorales seleccionados.

5.3 Alcance de la tesis

Por último vale la pena resaltar los frutos obtenidos a partir de la realización de esta Tesis.

En primer lugar destacar las publicaciones en revistas internacionales nivel Q1 de los resultados obtenidos en las Series I y II:

- **Mariana Ingold**, Rosina Dapuetto, Sabina Victoria, Germán Galliusi, Carlos Batthyany, Mariela Bollati-Fogolín, David Tejedor, Fernando García-Tellado, José M. Padrón, Williams Porcal, Gloria. V. López. A green multicomponent synthesis of Tocopherol analogues with

antiproliferative activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2018**, 143, 1888. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.11.003. 2017. Q1. Impact Factor: 4.816.

- **Mariana Ingold**, Lucía Colella, David Tejedor, Fernando García-Tellado, José M. Padrón, Paola Hernandez, Williams Porcal, Gloria. V. López. A focused library of NO-donors compounds with potent antiproliferative activity based on green multicomponent reactions. *Chemmedchem*. **2019**, 14, 1669 DOI: 10.1002/cmdc.201900385. Q1. Impact Factor: 3.016

Es destacable que los resultados obtenidos en la Serie III no han sido publicados aún, ya que son plausibles de patentamiento, en línea con previas patentes del grupo en esta línea de trabajo.

Por otro lado, en paralelo a la realización de este trabajo, se generaron dos publicaciones en el área de enseñanza con las temáticas reacciones multicomponente y química verde:

- **Mariana Ingold**, Rosina Dapuetto, Gloria V. López, Williams Porcal. Una reacción multicomponente verde en el laboratorio de química orgánica. *Educación Química*. **2016**, 27, 15. DOI: 10.1016/j.eq.2015.09.00.
- **Mariana Ingold**, Lucia Colella, Rosina Dapuetto, Gloria. V. López, Williams Porcal. Ugi Four-component Reaction (U-4CR) Under Green Conditions Designed for Undergraduate Organic Chemistry Laboratories. *World Journal of Chemical Education*. **2017**, 5, 153. DOI: 10.12691/wjce-5-5-2.

Además entre los años 2014 y 2016 la autora de esta tesis, realizó 3 estancias en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC, La Laguna, España, bajo la guía de los Dr. David Tejedor y Dr. Fernando García-Tellado. Allí, además de incorporar nuevos conocimientos sintéticos que fueron aplicados en su trabajo experimental, colaboró con las líneas de investigación propias del laboratorio, a partir de lo cual se generaron dos publicaciones:

- David Tejedor, Mary Cruz Prieto-Ramírez, **Mariana Ingold**, Margot Chicón, Fernando Garcia-Tellado. Synthesis of Polysubstituted Benzoic Esters from 1,2-Dihydropyridines. Application to the Synthesis of Fluorenones. *Organic Letters*. **2016**, 18, 2770. DOI: 10.1021/acs.orglett.6b01260. 2017. Q1. Impact Factor: 6.492.
- David Tejedor, Samuel Delgado-Hernández, **Mariana Ingold**, and Fernando García-Tellado. Synthesis of α -Quaternized 2,4-Cyclohexadienones from Propargyl Vinyl Ethers. *Journal of Organic Chemistry*. **2016**, 81, 10099. DOI: 10.1021/acs.joc.6b02137. 2017. Q1. Impact Factor: 4.805.

Cabe señalar que los resultados obtenidos a lo largo de la realización de esta tesis también fueron presentados en diversos congresos nacionales e internacionales.

Capítulo 6

PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Química

6.1.1 Generalidades

* Los disolventes se purificaron y secaron, previo a su utilización, por métodos convencionales. Otros reactivos fueron adquiridos en empresas comerciales y usados sin purificación.

* El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinaron por cromatografía en capa fina (TLC). Para esto se utiliza sílica gel o alúmina con indicador fluorescente en placas de poliéster o de aluminio. Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

- exposición a la luz ultravioleta a 254 nm
- asperjado con: a) mezcla de etanol: ácido sulfúrico: anisaldehído (95:4:1) (v:v:v) y posterior quemado, o b) reactivo de Brady (solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina en ácido sulfúrico y EtOH).
- exposición a vapores de yodo.

* Para las cromatografías en columna (CC), se utilizó sílica gel (Kieselgel, tamaño 0.063-0.2 mm, J. T. Baker)

* Los espectros de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN se realizaron en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz) utilizando los disolventes indicados en cada caso y TMS como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de δ (ppm) y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, sa: señal ancha. La completa caracterización se realiza con la combinación de experimentos HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), COSY (CORrelated SpectroscopY) y DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer).

* Los espectros de masa se obtuvieron por impacto electrónico (IE) utilizando un equipo Shimadzu GCMS QP 2010 ULTRA a un potencial de ionización de 70 eV por inyección directa.

* Los espectros de masas de alta resolución se registraron en un espectrómetro modelo LCT Premier XE de MICROMASS, empleando como técnica de ionización el electrospray (ESI), o en espectrómetro modelo Micromass AutoSpec, mediante impacto por electrones acelerados (EI).

* Los puntos de fusión se determinaron experimentalmente utilizando un equipo ELECTROTHERMAL IA-9100.

6.1.2 Síntesis de la Serie I

N-óxido de 4-metil-1,2,5-oxadiazol-3-carbaldehído (1a) Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²¹⁵

3-(3-nitrooxipropiloxi)benzaldehído (1d) Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²²⁰

3-([5-óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-3-il]oxi)benzaldehído (1e) Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²²³

3-(aliloxi)benzaldehído (1f) Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²²⁴

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (2a) Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²¹²

Ácido 6-((*tert*-butoxicarbonil)oxi)-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (2b) A una solución de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxilato de metilo (2,30 g, 8,5 mmol) en THF (20 mL) se agrega dicarbonato de di-*tert*-butilo (2,00 g, 8,5 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0,10 g, 0,9 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La solución se agita a temperatura ambiente durante 6 h, luego se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en AcOEt (50 mL), se lava con una solución acuosa 0,5 N de HCl (30 mL) y brine (20 mL). La capa orgánica se seca (Na_2SO_4) y el disolvente se evapora. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna (Hexano / AcOEt, 90:10) para dar el compuesto intermedio deseado (2,40 g, R: 75%) como un aceite incoloro que solidifica en heladera. Luego se disuelve el producto obtenido (1,4 mmol, 0,50 g) en etanol / agua 2,5: 1 y se agrega LiOH.H₂O (5,2 mmol, 0,22 g). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h, luego

se añade una solución acuosa saturada de NH_4Cl (30 mL). La solución acuosa se extrae con AcOEt (4 x 10 mL). Las capas orgánicas resultantes se secan con Na_2SO_4 , se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida, para dar el compuesto deseado **2b**, como un sólido blanco (0,48 g, 100%) sin purificación adicional. ^1H NMR (CDCl_3): δ = 2.64 (m, 2H), 2.36 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.73 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.57 (s, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ = 173.6, 152.2, 149.2, 141.5, 127.1, 125.1, 122.9, 117.1, 82.7, 77.2, 34.7, 30.2, 27.6, 20.8, 12.7, 12.5, 11.8. MS (EI, 70 eV): m/z (%) 350 (M^+ , 5), 291 (10), 250 (100), 205 (24), 164 (38), 57 (76). HRMS m/z calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 350.1729, encontrado 350.1735.

2-feniletilisocianuro (3a). Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²¹²

***N*²-Óxido de 3-fenilsulfonil-4-(3-aminoetiloxi)-1,2,5-oxadiazol (4b)**. Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²¹⁸

Productos de la reacción de Passerini

Procedimiento general para los productos de Passerini (5a-d,g) Se coloca secuencialmente en un tubo de vidrio apto para microondas, el aldehído correspondiente (0.2 mmol), el ácido derivado de tocoferol (**2a**, 0.2 mmol) y el isonitrilo correspondiente (0.2 mmol), bajo condiciones libre de disolvente. El tubo sellado se calienta 15 minutos a 60°C bajo irradiación de microondas. Se deja enfriar al tubo y se trata la mezcla de reacción con NaHCO_3 saturado y se extrae con AcOEt. La capa orgánica se lava con brine, se seca con Na_2SO_4 y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica flash (SiO_2 , Hexane/ AcOEt) para dar el producto deseado.

6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de 1-(5-óxido-3-metil-1,2,5-oxadiazol-4-il)-1-(bencilaminocarbonil)metilo (5a). Este compuesto se obtuvo mediante el procedimiento general. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**5a**) como un aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diastereómeros (62 %). ^1H -NMR (CDCl_3): δ = 7.39-7.25 (m, 6H), 7.19-7.17 (m, 2H), 7.05-7.03 (m, 2H), 6.49 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.08 (t, J=4.0 Hz, 1H), 4.50-4.46 (m, 1H), 4.45 (s, 1H), 4.43 (s, 1H), 4.33-4.29 (m, 1H), 4.20-4.14 (m, 1H), 4.08-4.04 (m, 1H), 2.74-2.40 (m, 6H), 2.17 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.06 (s, 6H), 2.03 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.96 (s,

3H), 1.95-1.92 (m, 2H), 1.71 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 172.6, 172.3, 164.6, 164.2, 153.7, 153.4, 145.9, 147.7, 145.4, 145.3, 137.0, 136.8, 128.8, 128.6, 127.8, 127.5, 127.3, 126.6, 122.3, 122.1, 121.6, 119.6, 117.1, 117.0, 112.3, 112.1, 77.7, 77.2, 67.4, 66.7, 43.4, 43.1, 31.1, 30.6, 25.8, 25.4, 20.9, 20.7, 12.2, 12.1, 11.7, 11.6, 11.1. MS (EI, 70 eV): m/z (%) 495 (M^+ , 39), 438 (14), 250 (11), 205 (100), 189(16), 164 (19), 91 (48). HRMS m/z calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 495.2369, encontrado 495.2353.

6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de 1-(5-óxido-3-metil-1,2,5-oxadiazol-4-il)-1-(tert-butilaminocarbonil)metilo (5b). Este compuesto se obtuvo mediante el procedimiento general. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano:AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**5b**) como un aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (80 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 6.07 (bs, 1H), 6.02 (s, 2H), 5.78 (bs, 1H), 2.75-2.47 (m, 6H), 2.23 (s, 3H), 2.19 (s, 9H), 2.12 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.96-1.92 (m, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.23 (s, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ =172.5, 163.1, 163.0, 154.0, 153.7, 145.8, 145.7, 145.3, 144.9, 122.1, 121.7, 116.6, 112.1, 77.2, 67.7, 67.4, 52.2, 52.1, 31.1, 30.4, 28.7, 28.3, 25.7, 25.4, 20.7, 20.6, 12.3, 12.0, 11.9, 11.3, 11.2. MS (EI, 70 eV): m/z (%) 461 (M^+ , 55), 404 (27), 250 (20), 205 (100), 189(16), 164 (20), 57 (40). HRMS m/z calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 461.2162, encontrado 461.2155.

6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcroman- 2-carboxilato de 1-(5-óxido-3-metil-1,2,5-oxadiazol-4-il)-1-(ciclohexilaminocarbonil)metilo (5c). Este compuesto se obtuvo mediante el procedimiento general. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**5c**) como un sólido amarillo en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (87 %). P.F. 92-94°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 6.16 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.99 (d, J = 4 Hz, 1H), 5.50 (d, J =4 Hz, 1H), 3.79-3.71 (m, 1H), 3.66-6.58 (m, 1H), 2.77-2.43 (m, 6H), 2.25 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.21 (s, 6H), 2.20 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.98-1.89 (m, 2H), 1.82-1.78 (m, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.71-1.65 (m, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.42-1.20 (m, 7H), 1.16-0.99 (m, 4H), 0.94-0.88 (m, 1H), 0.83-0.74 (m, 1H), 0.68-0.60 (m, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 172.6, 172.4, 162.9, 153.7, 153.7, 153.6, 146.1, 145.7, 145.3, 145.0, 122.1, 121.9, 121.8, 121.7, 119.2, 118.9, 116.8, 116.7, 112.2, 77.4, 67.3, 66.9, 48.6, 48.4, 32.7, 32.6, 32.3, 32.1, 31.1, 30.5, 26.1, 25.5, 25.3, 25.1, 25.0, 24.8, 24.7, 20.9, 20.7, 12.4, 12.3, 12.0, 11.9, 11.4, 11.2,

8.0, 7.6. MS (EI, 70 eV): m/z (%) 487 (M+, 73), 430 (39), 250 (32), 205 (100), 189(22), 164 (34), 83 (20). HRMS m/z calculado para C₂₅H₃₃N₃O₇ [M+H]⁺ 487.2319, encontrado 487.2326.

6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcroman-2-carboxilato de 1-(5-óxido-3-metil-1,2,5-oxadiazol-4-il)-1-((2-morfolinoetil)aminocarbonil)metilo (5d) Este compuesto se obtuvo mediante el procedimiento general. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**5d**) como un aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (9%). ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 6.82 (t, J= 4.0 Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 3.74-3.71 (m, 4H), 3.47-3.39 (m, 1H), 3.33-3.26 (m, 1H), 2.69-2.55 (m, 2H), 2.52-2.48 (m, 7H), 2.18 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.00-1.97 (m, 1H), 1.95 (s, 3H), 1.74 (s, 3H). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ= 172.6, 153.6, 145.9, 122.0, 120.0, 116.8, 111.7, 77.4, 67.5, 66.5, 56.5, 53.0, 35.6, 30.1, 23.9, 19.9, 11.3, 9.8, 6.4. MS (EI, 70 eV): m/z (%) 518 (Mp, 10), 355 (20), 250 (2), 205 (5), 100 (100). HRMS m/z calculado para C₂₅H₃₄N₄O₈[M+H]⁺ 518.2377, encontrado 518.2389.

6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de 1-(fenil)-1-(fenetilaminocarbonil)metilo (5e). Este compuesto se obtuvo como subproducto en la reacción para la obtención del producto de Ugi **6c**. Dicho producto (**5e**) se obtuvo como un aceite amarillo. ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 7.54 (t, J =4.0 Hz, 1H), 7.46-7.37 (m, 10H), 7.28-7.19 (m, 5H), 7.16-7.11 (m, 5H), 6.34 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.03 (s, 1H), 3.70-3.53 (m, 4H), 2.91-2.83 (m, 4H), 2.59-2.51 (m, 2H), 2.33-2.26 (m, 1H), 2.18-2.10 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.74-1.67 (m, 2H), 1.42 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.28 (s, 3H). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ= 187.6, 187.5, 187.4, 187.2, 175.6, 175.0, 167.9, 167.7, 143.0, 142.6, 141.2, 141.1, 140.8, 140.6, 140.3, 140.1, 139.0, 138.4, 135.3, 134.8, 129.3, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 127.5, 127.3, 126.6, 126.3, 77.1, 74.5, 74.4, 41.0, 40.5, 38.0, 37.7, 35.4, 35.3, 27.3, 26.3, 21.9, 21.1, 12.5, 12.4, 12.3, 12.2, 12.0, 11.9. MS (EI, 70 eV): m/z (%) 487 (M+, 100), 249 (49), 205 (69), 164 (5), 105 (25), 77 (4). HRMS m/ z calculado para C₃₀H₃₃NO₅ [M+H]⁺ 487.2359, encontrado 487.2375.

6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de 1-(fenil)-1-(bencilaminocarbonil)metilo (5f). Este compuesto se obtuvo como subproducto en la reacción para la obtención del producto de Ugi **8a**. Dicho producto (**5f**) se obtuvo como un aceite amarillo, en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros. ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 7.46-7.34 (m, 8H), 7.31-7.19 (m, 8H), 6.96-6.93 (m, 4H), 6.46 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.54 (s, 1H),

4.53-4.48 (m, 1H), 4.38-4.34 (m, 1H), 4.32 (s, 1H), 4.20-4.16 (m, 1H), 4.02 (s, 1H), 3.96-3.92 (m, 1H), 2.71-2.39 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 2.21-2.14 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.93-1.90 (m, 2H), 1.88 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.64 (s, 3H).

6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de 1-(3-(5-óxido-(3-(fenilsulfonyl)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxi)fenil)-1-(tert-butylaminocarbonyl)metilo. (5g) Este compuesto se obtuvo mediante el procedimiento general. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**5g**) como un sólido amarillo en una mezcla 1:1 de dos diastereómeros (53%). P.F. 52.0-54.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.14 – 8.09 (m, 4H), 7.83 – 7.79 (m, 2H), 7.69 – 7.65 (m, 4H), 7.55 – 7.38 (m, 4H), 7.31 – 7.29 (m, 1H), 7.23 – 7.21 (m, 1H), 7.10 – 7.07 (m, 1H), 7.01 – 6.99 (m, 1H), 6.11 (bs, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 5.55 (bs, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.42 (s, 1H), 2.74 – 2.45 (m, 6H), 2.26 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.93 – 1.84 (m, 2H), 1.71 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.13 (s, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 172.7, 172.6, 166.4, 166.3, 152.6, 152.2, 145.6, 145.5, 145.1, 145.0, 138.4, 138.1, 137.9, 137.7, 135.9, 135.8, 129.9, 129.8, 128.7, 128.6, 125.7, 125.1, 122.2, 122.0, 121.7, 119.9, 119.7, 118.8, 118.2, 117.9, 99.9, 99.8, 75.1, 51.6, 51.4, 30.3, 28.7, 28.3, 25.8, 20.8, 20.7, 12.0, 11.3, 11.1. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 679 (M^+ , 3), 538 (3), 524 (6), 250 (12), 205 (26), 164 (7), 57 (100). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$: 679.2210, encontrado: 679.2197.

Productos de la reacción de Ugi

Procedimiento general para los productos de Ugi. (6b-c, 7, 8a-g, 9a-e, 10a-c, 11a-e) Método A (Síntesis de derivados Tocoferol-mimético con 2-aminoacetato de etilo) (6b y 6c): Se disuelven 0,6 mmol de NaOH en el disolvente elegido, se agrega 0,6 mmol de Clorhidrato de 2-aminoacetato de etilo y se deja reaccionar por 15 minutos. Se agrega el aldehído (0.6 mmol), y el Trolox (0.6 mmol, 0.150 g), se deja reaccionar por 30 minutos. Por último se agrega el isonitrilo correspondiente (0.6 mmol). La mezcla de reacción se deja con agitación magnética a temperatura ambiente por el tiempo correspondiente, o se lleva al horno microondas. Posteriormente la mezcla de reacción se diluye en agua (5 mL) y se extrae con Acetato de Etilo (2 x 20 mL), luego dicha capa orgánica se lava con solución saturada de NaHCO_3 y con HCl 10% , por último se lava con solución saturada de NaCl. Se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra el agente desecante y evapora el disolvente a presión reducida. El

crudo obtenido se purifica por CC (SiO₂ flash, Hexanos: Acetato de etilo (7:3)). **Metodo B (microondas)**. Se coloca en un tubo de vidrio apropiado: aldehído (0.6 mmol), anilina (0.6 mmol), Trolox (0.6 mmol, 0.150 g), e isonitrilo (0.6 mmol). Si fuera el caso se agrega 2 mL del disolvente elegido. Se lleva al horno microondas y es irradiado a 100 W por el tiempo y temperatura correspondiente. Posteriormente la mezcla de reacción se diluye en agua (5mL) y se extrae con Acetato de Etilo (2 x 20 mL), luego dicha capa orgánica se lava con solución saturada de NaHCO₃, por último se lava con solución saturada de NaCl. Se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra el agente desecante y evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CC (SiO₂ flash, Hexanos: Acetato de etilo). **Metodo C (temperatura ambiente)**. (7, 8a-f, 9a, 9b, 9d, 10a-c): Aldehído (0.6 mmol), Anilina (0.6 mmol), Trolox (0.6 mmol, 0.150 g) , e Isonitrilo (0.6 mmol) se colocan en un balón conteniendo 10 mL de disolvente (Buffer NaOAc/HOAc pH 5.5, agua destilada, o EtOH) en dicho orden. La mezcla de reacción se deja con agitación magnética a temperatura ambiente por el tiempo correspondiente. Posteriormente la mezcla de reacción se diluye en agua (5 mL) y se extrae con acetato de etilo (2 x 20 mL) (si tiene etanol se destila a presión reducida previamente), luego dicha capa orgánica se lava con solución saturada de NaHCO₃, por último se lava con solución saturada de NaCl. Se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra el agente desecante y evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CC (SiO₂ flash, Hexanos: Acetato de etilo). **Metodo D (ultrasonido)**. Aldehído (0.6 mmol), Anilina (0.6 mmol), Trolox (0.6 mmol, 0.150 g), e Isonitrilo (0.6 mmol) se colocan en un balón (conteniendo 10 mL de disolvente, si corresponde) en dicho orden. El cual se coloca en una baño de ultrasonido (Ultrasons-H, J.P. Selecta.) precalentado a 60°C, por 6 hs a 720W y 50/60 Hz. Posteriormente la mezcla de reacción se diluye en agua (5 mL) y se extrae con acetato de etilo (2 x 20 mL) (si tiene etanol se destila a presión reducida previamente), luego dicha capa orgánica se lava con solución saturada de NaHCO₃, por último se lava con solución saturada de NaCl. Se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra el agente desecante y evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CC (SiO₂ flash, Hexanos: Acetato de etilo).

***N*-(1-(fenil)-1(fenetilaminocarbonil)metil)-*N*-(metiloxicarbonilmetil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (6b)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (6b) como un aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diastéromeros

(53 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.34 – 7.08 (m, 10H), 6.76 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.62 (d, $J=16$, 1H), 3.55 – 3.48 (m, 2H), 3.03 (d, $J=16$, 1H), 2.72 – 2.43 (m, 5H), 2.18 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), 1.65 – 1.61 (m, 1H). MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 558(M^+ , 11), 327 (9), 205(100).

***N*-(1-(fenil)-1(fenetilaminocarbonil)metil)-*N*-(etiloxicarbonilmetil)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (6c).** Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (6c) como un aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (14-67 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.45 – 7.09 (m, 20H), 6.98 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.25 – 4.3.44 (m, 8H), 3.15 – 2.95 (m, 4H), 2.85– 2.45 (m,10H), 2.18 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.68 – 1.66 (m, 2H), 1.65 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.24 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.9, 174.3, 171.6, 171.2, 170.6, 168.9, 167.6, 135.4, 130.0, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 126.4, 126.2, 122.7, 121.6, 121.3, 119.0, 118.7, 118.4, 118.0, 80.5, 79.9, 64.6, 64.2, 61.8, 61.7, 60.4, 49.1, 48.9, 40.6, 40.4, 35.4, 34.7, 32.8, 31.7, 27.3, 25.2, 21.1, 20.9, 14.2, 13.9, 12.3, 12.2, 12.1, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 572(M^+ , 11), 526 (14), 451 (3), 341 (8), 205(100), 105 (8), 77 (2). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$: 572.2886, encontrado: 572.2869.

(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-*N*-(2-oxo-2-(fenetilamino)-1-feniletíl)-*N*-(2-(4-fenilsulfonil)furoxan-3-iloxi)etil)croman-2-carboxamida (7) Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (7) como un aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (4-11 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.05 – 7.99 (m, 4H), 7.76 – 7.72 (m, 2H), 7.62– 7.57 (m, 4H), 7.27 – 7.00 (m, 20H), 5.97 (sa, 1H), 5.73 (sa, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.36 – 4.23(m, 4H), 4.09 – 4.03 (m, 2H), 3.69 – 3.64 (m, 2H), 3.61 – 3.42 (m, 4H), 2.78 – 2.60 (m, 10H), 2.17 – 2.10 (m, 18H), 1.85- 1.80 (m, 2H), 1.77 (s, 3H), 1.71 (s, 3H).

***N*-((1-fenil-1-bencilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (8a).** Este compuesto se obtuvo mediante el método B y C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (8a) como sólido blanco en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (51-77 %) P.F.

170.0-172.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.36 – 7.26 (m, 10H), 7.23 – 7.12 (m, 13H), 7.09 – 7.04 (m, 7H), 6.57 (sa, 1H), 5.97 (sa, 1H), 5.72 (s, 2H), 4.51 – 4.48 (m, 4H), 2.83 – 2.69 (m, 3H), 2.62 – 2.53 (m, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.61-1.54 (m, 2H), 1.29 (s, 3H), 1.26 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.1, 174.9, 169.5, 169.2, 144.8, 144.5, 138.3, 138.1, 134.7, 134.3, 130.3, 129.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.6, 127.5, 127.3, 127.2, 127.1, 122.7, 122.6, 118.3, 118.2, 80.4, 80.2, 69.0, 43.8, 43.7, 32.7, 32.4, 27.7, 27.6, 21.2, 21.1, 12.1, 12.0, 11.7, 11.6, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 548(M^+ , 17), 205(100). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4$: 548,2675, encontrado: 548.2686.

***N*-(1-fenil-1-(*tert*-butilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (8b).** Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (8b) como sólido blanco en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (75 %) P.F. 162.0-164.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.43 – 7.35 (m, 1H), 7.28 – 7.23 (m, 1H), 7.22 – 7.13 (m, 10H), 7.11 – 7.10 (m, 3H), 7.04 – 7.02 (m, 3H), 6.95 – 6.94 (m, 2H), 6.40 (sa, 1H), 5.63 (s, 1H), 5.57 (sa, 1H), 5.45 (s, 1H), 2.76 – 2.68 (m, 2H), 2.61 – 2.56 (m, 1H), 2.53 – 2.51 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.58- 1.51 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.32 (s, 9H), 1.28 (s, 3H), 1.25 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.5, 174.9, 168.7, 168.4, 145.0, 144.8, 144.5, 144.4, 142.0, 140.6, 135.0, 134.8, 130.0, 129.3, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.3, 127.1, 126.9, 126.8, 122.6, 122.5, 120.9, 120.7, 118.3, 118.2, 118.1, 117.9, 80.3, 80.1, 71.9, 69.3, 51.4, 51.3, 32.7, 32.5, 28.7, 28.6, 27.7, 27.6, 21.3, 21.2, 12.1, 12.0, 11.7, 11.6, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 514(M^+ , 29), 403(19), 232(3), 205(100). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4$: 514.2832, encontrado: 514.2822.

***N*-((1-fenil-1-ciclohexilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (8c).** Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (8c) como sólido blanco en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (60 %) P.F. 78.0-79.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.44 – 7.35 (m, 2H), 7.29 – 7.18 (m, 6H), 7.16 – 7.08 (m, 8H), 7.01 – 6.99 (m, 2H), 6.89 – 6.85 (m, 2H), 6.34 (sa, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 5.55 (sa, 1H), 3.90 – 3.78 (m, 2H), 2.83 – 2.79 (m, 1H), 2.77 – 2.68 (m, 2H), 2.61 – 2.58 (m, 1H), 2.53 -2.51 (m, 2H), 2.15 (s,

6H), 2.09 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.95 -1.84 (m, 4H), 1.73 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.67- 1.53 (m, 6H), 1.41 – 1.33 (m, 6H), 1.30 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.21 – 1.09 (m, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.6, 174.8, 168.5, 168.3, 144.4, 140.4, 134.9, 134.6, 130.2, 129.45, 128.2, 128.1, 127.9, 127.8, 127.3, 127.1, 122.6, 118.3, 118.1, 118.0, 80.4, 80.2, 68.6, 48.6, 48.3, 32.9, 32.8, 32.7, 32.6, 32.4, 27.7, 25.5, 24.9, 24.8, 24.7, 21.2, 12.1, 12.0, 11.7, 11.5, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 540(M^+ , 37), 205(100), 182(45). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$: 544.2988, encontrado: 540.2997.

***N*-(1-(3-butenil)-1-(bencilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (8d)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**8d**) como sólido blanco en una mezcla 1:1 de dos diastereómeros (41 %) P.F. 137.0-138.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.29 – 7.21 (m, 8H), 7.19 – 7.13 (m, 6H), 7.09 – 7.01 (m, 5H), 6.88 (sa, 2H), 4.93 (sa, 1H), 4.74 (sa, 1H), 4.30 – 4.25 (m, 4H), 2.63 – 2.56 (m, 2H), 2.47 – 2.39 (m, 4H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.60 (s, 2H), 1.55 (s, 3H), 1.46 – 1.39 (m, 5H), 1.20 (s, 3H), 1.18 – 1.09 (m, 9H), 0.75 – 0.70 (m, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 176.4, 170.9, 170.1, 145.1, 145.0, 144.4, 144.3, 140.1, 138.5, 138.4, 138.1, 128.7, 128.6, 128.4, 128.1, 127.9, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3, 122.7, 122.6, 121.4, 120.9, 118.1, 117.8, 117.4, 80.7, 80.2, 63.9, 60.7, 43.5, 43.4, 32.8, 32.7, 28.7, 28.2, 28.0, 27.8, 27.7, 27.6, 22.5, 22.4, 21.3, 21.2, 13.9, 13.8, 12.1, 12.0, 11.8, 11.7. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 528(M^+ , 13), 205(100). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$: 528,2988, encontrado: 528.2963.

***N*-(1-(3-butenil)-1-(*tert*-butilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (8e)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**8e**) como aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diastereómeros (47 %) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.22 – 7.05 (m, 6H), 6.69 – 6.50 (m, 4H), 4.84 (sa, 2H), 4.67 (sa, 1H), 2.70 – 2.60 (m, 2H), 2.51 – 2.43 (m, 4H), 2.01 (s, 3H), 1.99 (s, 6H), 1.93 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.47 – 1.39 (m, 3H), 1.35 – 1.30 (m, 2H), 1.25 (s, 9H), 1.22 (s, 9H), 1.15 (s, 3H), 1.13 – 1.05 (m, 10H), 0.74 – 0.70 (m, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 176.7, 176.6, 169.8, 169.3, 145.0, 144.3, 139.7, 138.3, 129.3, 128.5, 128.3, 127.9, 127.7, 122.6, 120.9, 118.6, 118.2, 118.0, 117.9, 117.5, 115.1, 80.5, 80.2, 61.3, 50.9, 32.8, 32.7, 28.8, 28.7, 28.6, 28.2, 28.0, 27.9, 27.8, 27.6, 22.6, 22.5, 21.4, 14.0, 13.9, 12.1, 12.0, 11.7, 11.6, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 494(M^+ ,

21), 205(100), 162(27). HRMS-FAB: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{30}H_{42}N_2O_4$: 494,3145, encontrado: 494.3156.

***N*-(1-(butenil)-1-(ciclohexilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-**

tetrametilcroman-2-carboxamida (8f). Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (8f) como sólido blanco en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (39 %) P.F. 58.0-60.0°C. 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 7.33 – 6.94 (m, 10H), 6.75 (sa, 1H), 6.61 (sa, 1H), 4.99 (sa, 1H), 4.81 (sa, 1H), 3.79 – 3.69 (m, 2H), 2.81 – 2.72 (m, 2H), 2.62 – 2.55 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 2.11 (s, 6H), 2.06 (s, 3H), 1.96 – 1.81 (m, 4H), 1.77 – 1.73 (m, 4H), 1.71 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.57 – 1.44 (m, 6H), 1.39 – 1.32 (m, 9H), 1.29 (s, 3H), 1.25 – 1.17 (m, 10H), 0.94 – 0.89 (m, 4H), 0.87 – 0.82 (m, 6H). ^{13}C -NMR: δ = 175.9, 169.8, 169.3, 145.1, 144.4, 144.3, 128.4, 128.3, 127.9, 127.7, 122.6, 121.0, 118.3, 118.2, 117.8, 117.4, 80.6, 80.1, 61.1, 47.9, 47.7, 33.2, 33.1, 33.0, 32.8, 32.7, 29.4, 28.7, 28.2, 28.0, 27.9, 27.8, 27.6, 25.6, 25.5, 24.9, 24.8, 24.7, 24.6, 22.6, 22.5, 21.4, 14.0, 13.9, 12.2, 12.1, 11.8, 11.7, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): m/z (%)= 520(M^+ , 27), 421 (4), 289(10), 205(100). HRMS-FAB: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{32}H_{44}N_2O_4$: 520.3301, encontrado: 520.3284.

***N*-(1-(*tert*-butilaminocarbonil)-1-(3-(3-nitrooxipropoxi)fenil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-**

2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (9a). Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (9a) como aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (25%). 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 7.19 – 7.01 (m, 8H), 6.96 – 6.86 (m, 2H), 6.74 – 6.64 (m, 6H), 6.59 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 5.58 (s, 1H), 4.65 – 4.60 (m, 4H), 3.96 – 3.76 (m, 4H), 2.80 – 2.52 (m, 6H), 2.27 – 2.14 (m, 4H), 2.12 (s, 6H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.58 – 1.50 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 1.31 (s, 9H), 1.26 (s, 3H), 1.22 (s, 3H). ^{13}C -NMR: δ = 175.3, 168.5, 168.4, 158.0, 144.4, 136.4, 129.1, 127.9, 127.4, 127.1, 123.0, 122.6, 122.4, 120.8, 115.7, 115.4, 114.8, 114.3, 80.3, 80.2, 69.2, 63.3, 51.4, 51.3, 28.6, 27.7, 27.6, 26.9, 26.8, 21.2, 12.1, 12.0, 11.6, 11.5, 11.4, 11.5. MS(IE, 70eV): m/z (%)= 633(M^+ , 16), 588(8), 486(5), 324(3), 256(20), 205(100). HRMS-FAB: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{35}H_{43}N_3O_8$: 633.3134, encontrado: 633.3122.

***N*-(1-(3-(3-nitrooxipropoxi)fenil)-1-(fenetilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (9b)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**9b**) como aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (29%) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.28 – 7.14 (m, 12H), 7.07 – 7.03 (m, 6H), 6.74 – 6.70 (m, 4H), 6.61 – 6.59 (m, 2H), 6.48 (s, 2H), 6.12 (sa, 1H), 5.65 (sa, 1H), 5.61 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 4.64 – 4.60 (m, 4H), 3.90 – 3.74 (m, 4H), 3.60 – 3.40 (m, 4H), 2.85 – 2.71 (m, 6H), 2.70 – 2.52 (m, 4H), 2.14 – 2.11 (m, 4H), 2.13 (s, 6H), 2.07 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.58 – 1.51 (m, 2H), 1.27 (s, 3H), 1.23 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.5, 174.8, 169.2, 169.0, 158.2, 158.1, 144.4, 141.6, 138.8, 136.2, 135.9, 129.34, 129.2, 128.8, 128.5, 128.4, 128.0, 127.3, 127.2, 126.4, 126.3, 123.1, 122.7, 115.8, 115.7, 115.0, 114.4, 80.3, 80.2, 69.9, 69.8, 41.0, 40.8, 35.5, 35.4, 27.7, 27.6, 26.8, 21.2, 21.1, 12.1, 12.0, 11.7, 11.6, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 681(M^+ , 4), 636(23), 578(4), 324(5), 256(34), 205(100). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8$: 681.3050, encontrado: 681.3018.

***N*-(1-(3-(3-nitrooxipropoxi)fenil)-1-(*N*-(etiloxicarbonilmetil)aminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (9d)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**9d**) como sólido rosado en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (35 %) P.F. 56.0-58.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.19 – 7.07 (m, 8H), 6.95 – 6.84 (m, 2H), 6.75 – 6.68 (m, 4H), 6.62 (sa, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.20 (sa, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.71 (s, 1H), 4.64 – 4.60 (m, 4H), 4.23 – 4.11 (m, 6H), 4.09 – 4.03 (m, 2H), 3.98 – 3.76 (m, 4H), 2.78 – 2.50 (m, 6H), 2.15 – 2.10 (m, 10H), 2.07 (s, 6H), 2.02 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.69 (s, 1H), 1.60- 1.52 (m, 2H), 1.31 – 1.23 (m, 12H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.9, 174.9, 169.6, 169.2, 158.2, 135.8, 135.4, 129.3, 129.2, 128.0, 127.4, 123.4, 122.7, 116.0, 115.6, 115.3, 114.7, 80.4, 80.2, 70.0, 69.9, 63.3, 61.4, 41.6, 41.5, 32.8, 32.4, 27.7, 26.9, 21.2, 21.1, 14.1, 12.1, 12.0, 11.7, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 663(M^+ , 7), 618(12), 324(5), 256(16), 205(100). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{10}$: 663.2792, encontrado: 663.2828.

***N*-(1-(3-(3-fenilsulfonil-1,2,5-oxadiazol N^2 -oxido-4-il)fenoxi)-1-(*tert*-butilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (10a)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**10a**) como sólido amarillo en una

mezcla 1:1 de dos diasterómeros (9 %) P.F. 68.0-70.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.12 – 8.10 (m, 4H), 7.84 – 7.75 (m, 2H), 7.69– 7.65 (m, 3H), 7.57 – 7.47 (m, 2H), 7.41- 7.33 (m, 2H), 7.24 – 7.20 (m, 3H), 7.17 – 6.99 (m, 12H), 6.33 (sa, 1H), 5.78 (sa, 1H), 5.64 – 5.58 (m, 2H), 2.79 – 2.50 (m, 6H), 2.12 – 2.03 (m, 12H), 1.69 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.58- 1.51 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 1.30 (s, 9H), 1.28 (s, 3H), 1.26 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.7, 175.6, 172.11, 167.8, 167.6, 162.3, 159.0, 158.2, 152.14, 144.9, 144.4, 141.2, 137.8, 137.3, 135.9, 129.8, 129.6, 129.5, 129.1, 128.7, 128.5, 128.4, 128.1, 127.6, 127.5, 125.3, 124.8, 122.6, 121.7, 121.5, 119.9, 119.4, 118.9, 80.3, 80.1, 68.4, 32.6, 32.5, 28.6, 28.5, 27.7, 27.6, 21.2, 21.1, 12.1, 12.0, 11.7, 11.6, 11.4. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 754 (M^+ , 2), 739(1), 529(24), 456(20), 428(19), 231(24), 205(63). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$: 754.2726 encontrado: 754.2713.

***N*-(1-(3-(3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol *N*²-oxido-4-il)fenoxi)-1-(fenetilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxamida (10b)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 6:4) para obtener el producto deseado (**10b**) como sólido blanco en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (8%) P.F. 73.0-75.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.13 – 8.10 (m, 4H), 7.84 – 7.80 (m, 2H), 7.70– 7.66 (m, 4H), 7.31 – 7.13 (m, 20H), 7.07- 6.97 (m, 8H), 6.19 (sa, 1H), 5.76 – 5.74 (m, 2H), 5.53 (s, 1H), 3.63 – 3.44 (m, 4H), 2.82 – 2.49 (m, 10H), 2.12 – 2.03 (m, 12H), 1.67 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.58- 1.51 (m, 2H), 1.30 (s, 3H), 1.26 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 176.1, 175.2, 168.7, 168.3, 153.2, 152.1, 145.1, 144.9, 144.5, 144.4, 141.0, 140.5, 138.7, 138.6, 137.8, 137.2, 137.0, 135.9, 134.3, 134.1, 129.8, 129.7, 129.5, 129.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 127.5, 126.5, 126.4, 122.6, 121.8, 121.7, 121.2, 120.8, 119.8, 119.4, 80.3, 80.2, 68.6, 41.4, 41.0, 35.4, 35.3, 32.8, 32.4, 27.7, 27.6, 21.2, 21.1, 21.0, 20.7, 12.1, 12.0, 11.7, 11.6, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 802(M^+ , 2), 577(6), 487(4), 428 (6), 373(5), 338(18), 205 (97), 141 (16), 105 (38), 77 (100).HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$: 802.2731 encontrado: 802.2720.

***N*-(1-(3-(3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol *N*²-oxido-4-il)fenoxi)-1-((*N*-etiloxi carbonilmetil)aminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (10c)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 6:4) para obtener el producto deseado (**10c**) como aceite amarillo que solidifica en la heladera, en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (9%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.10 – 8.08 (m, 4H), 7.83 – 7.77 (m, 2H), 7.69– 7.65 (m, 4H), 7.24 – 7.09 (m, 10H),

7.03- 6.89 (m, 6H), 6.88 – 6.86 (m, 2H), 6.67 (sa, 1H), 6.36 (sa, 1H), 5.88 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 4.24 – 4.01 (m, 8H), 2.76 – 2.49 (m, 6H), 2.15 – 2.02 (m, 12H), 1.69 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.59-1.53 (m, 2H), 1.31 – 1.21 (m, 12H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 176.5, 175.4, 169.1, 168.6, 158.3, 152.4, 144.5, 144.3, 137.8, 136.9, 136.5, 135.8, 129.7, 129.5, 129.1, 129.0, 128.7, 128.6, 128.5, 128.2, 127.6, 122.6, 121.9, 121.3, 120.7, 119.9, 119.4, 80.3, 80.2, 68.0, 41.6, 41.4, 32.9, 32.4, 27.8, 27.7, 21.2, 21.1, 12.2, 12.0, 11.8, 11.6, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 784 (M^+ , 1), 768 (1), 560 (16), 225 (3), 205(100), 77 (63). HRMS-FAB: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{S}$: 784.2415 encontrado: 784.2403.

***N*-(1-(3-(aliloxi)fenil)-1-(*tert*-butilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-carboxamida (11a)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**11a**) como sólido blanco en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (37-55 %) P.F. 66.0-68.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.08 – 6.93 (m, 8H), 6.82-6.74 (m, 2H), 6.72-6.63 (m, 2H), 6.60-6.58 (m, 2H), 6.54-6.52(m, 2H), 6.45 (sa, 2H), 6.14 (sa, 1H), 5.93-5.83 (m, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.33 (sa, 1H), 5.29-5.22 (m, 2H), 5.19-5.14 (m, 2H), 4.29-4.22 (m, 4H), 2.70 – 2.42 (m, 6H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.48 – 1.41 (m, 2H), 1.26 (s, 9H), 1.21 (s, 9H), 1.17 (s, 3H), 1.13 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.2, 174.7, 168.5, 168.3, 158.3, 144.9, 144.8, 144.5, 144.4, 141.8, 140.5, 136.4, 136.1, 133.2, 133.1, 129.1, 129.0, 127.9, 127.9, 127.3, 127.1, 122.7, 122.6, 122.5, 122.0, 120.8, 120.6, 118.1, 117.9, 117.6, 115.9, 115.6, 115.1, 114.6, 80.3, 80.2, 68.6, 51.4, 51.3, 32.5, 32.4, 28.6, 28.5, 27.7, 27.5, 21.9, 12.0, 11.6, 11.5, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 570(M^+ , 32), 497 (2), 238 (43), 205(100), 57 (5). HRMS-FAB: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5$: 570.3094, encontrado: 570.3093.

***N*-(1-(3-(aliloxi)fenil)-1-(bencilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-carboxamida (11b)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método C. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**11b**) como aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diasterómeros (40 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.40 – 7.30 (m, 6H), 7.26-7.19 (m, 8H), 7.16-7.03 (m, 8H), 6.76-6.73 (m, 2H), 6.70-6.62 (m, 2H), 6.59 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.48 (as, 1H), 6.54-6.52(m, 2H), 6.45 (sa, 2H), 6.14 (sa, 1H), 5.93-5.83 (m, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.33 (bs, 1H), 6.01-5.92 (m, 3H), 5.66 (s, 2H), 5.37-5.23 (m, 4H), 4.53-4.41 (m, 4H), 4.35-4.24 (m, 4H), 2.80 – 2.50 (m, 6H), 2.12 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.60 – 1.51 (m, 2H), 1.27 (s, 3H), 1.23 (s,

3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.5, 174.8, 169.3, 169.1, 158.9, 158.3, 144.5, 144.4, 141.7, 140.5, 138.3, 138.1, 135.9, 135.6, 133.1, 132.9, 129.8, 129.3, 129.2, 129.1, 128.6, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.2, 125.3, 124.8, 122.9, 122.7, 122.6, 122.3, 119.9, 118.9, 117.7, 116.1, 115.8, 115.3, 114.8, 80.4, 80.2, 68.6, 43.7, 32.6, 32.4, 27.7, 27.6, 21.2, 21.1, 12.1, 12.0, 11.6, 11.5, 11.4. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 604(M^+ , 35), 373 (11), 281 (10), 205(100), 189 (9), 91 (15). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5$: 604.2937, encontrado: 604.2919.

***N*-(1-(3-(aliloxi)fenil)-1-(ciclohexilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-carboxamida (11c)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método D. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**11c**) como sólido blanco en una mezcla 1:1 de dos diastereómeros (32 %) P.F. 171.0-173.0°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.20 – 7.04 (m, 10H), 6.95-6.83 (m, 2H), 6.80-6.75 (m, 2H), 6.70-6.68 (m, 1H), 6.64-6.61(m, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.20 (bs, 1H), 6.05-5.95 (m, 2H), 5.70 (s, 2H), 5.60 (s, 1H), 5.54 (bs, 1H), 5.40-5.34 (m, 2H), 5.30-5.26 (m, 2H), 4.40-4.30 (m, 4H), 3.87-3.78 (m, 2H), 2.83 – 2.53 (m, 6H), 2.14 (s, 6H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.95-1.85 (m, 4H), 1.73 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.64 – 1.52 (m, 6H), 1.42-1.33 (m, 5H), 1.33 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.17-1.08 (m, 5H), 1.00-0.88 (s, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 175.4, 174.8, 168.3, 168.2, 158.3, 145.0, 144.8, 144.5, 141.8, 140.4, 136.3, 136.0, 133.2, 133.1, 129.1, 127.3, 127.1, 122.9, 122.6, 122.2, 120.8, 120.6, 118.1, 118.0, 117.9, 117.6, 116.1, 115.7, 115.3, 114.8, 80.4, 80.2, 68.8, 48.6, 48.4, 32.9, 32.8, 32.6, 32.4, 27.7, 27.6, 25.5, 24.8, 24.7, 21.2, 12.1, 12.0, 11.7, 11.6, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 596(M^+ , 38), 497 (2), 392 (1), 273 (18), 205(100), 83 (5). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_5$: 596.3250, encontrado: 596.3221.

***N*-(1-(3-butenil)-1-(*tert*-butilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-carboxamida (11d)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método D. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 85:15) para obtener el producto deseado (**11d**) como aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diastereómeros (49 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.30 – 6.97 (m, 10H), 6.66 (bs, 1H), 6.55 (bs, 1H), 5.57-5.62 (m, 2H), 5.08-4.85 (m, 6H), 2.78 – 2.53 (m, 6H), 2.11 (s, 3H), 2.09 (s, 6H), 2.04 (s, 3H), 1.97-1.84 (m, 4H), 1.69 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.58 – 1.41 (m, 6H), 1.35 (s, 9H), 1.31 (s, 9H), 1.28 (s, 3H), 1.24 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 176.5, 176.6, 169.5, 169.0, 145.0, 144.4, 144.3, 139.4, 138.1, 137.5, 135.1, 130.6, 129.0, 128.5, 128.3, 127.9, 127.7, 127.2, 122.7, 120.9, 120.8, 119.6, 118.2, 117.9, 117.7, 117.4, 115.4, 115.2, 80.5, 80.1, 60.3, 53.4, 51.1, 50.9, 34.7, 34.0, 32.7, 32.6, 30.5,

30.1, 28.7, 28.6, 28.5, 27.1, 21.4, 12.1, 12.0, 11.7, 11.6, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%) = 492$ (M^+ , 20), 325 (10), 287 (4), 205 (100), 160 (21), 77 (8), 57 (53). HRMS-FAB: $m/z [M+H]^+$ calculado para $C_{30}H_{40}N_2O_4$: 492.2988, encontrado: 492.2981.

***N*-(1-(3-butenil)-1-(*tert*-butilaminocarbonil)metil)-*N*-fenil-6-*tert*-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxamida (11e).** Este compuesto se obtuvo mediante el método D. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**11e**) como aceite amarillo en una mezcla 1:1 de dos diastéromeros (99%). 1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 7.17 - 6.76$ (m, 10H), 6.52 (bs, 1H), 6.40 (bs, 1H), 5.65-5.55 (m, 2H), 4.88-4.82 (m, 6H), 2.70 - 2.44 (m, 6H), 1.95 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.83-1.73 (m, 4H), 1.61 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 1.45 - 1.34 (m, 6H), 1.26 (s, 9H), 1.23 (s, 3H), 1.22 (s, 9H), 1.16 (s, 3H). ^{13}C -NMR: $\delta = 175.3, 169.4, 169.0, 148.2, 148.0, 141.4, 139.2, 138.0, 137.5, 129.3, 129.2, 128.7, 128.4, 128.0, 127.7, 127.0, 124.7, 123.1, 117.9, 117.6, 115.4, 113.7, 82.6, 80.9, 80.6, 60.4, 50.9, 32.5, 32.3, 30.5, 30.2, 29.4, 28.7, 28.6, 27.9, 27.7, 27.5, 22.8, 21.3, 12.6, 12.5, 11.9, 11.8, 11.7, 11.6$. MS(IE, 70eV): $m/z(\%) = 592$ (M^+ , 9), 492 (36), 305(3), 205(96), 160 (100), 77(10), 57 (49). HRMS-FAB: $m/z [M+H]^+$ calculado para $C_{35}H_{48}N_2O_6$: 592.3512, encontrado: 592.3491.

6.1.3 Síntesis de la Serie II

6-((*tert*-butoxicarbonil)oxi)-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbaldehído (1h). Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²⁰⁷

Ácido 4-(nitrooximetil)benzoico (2c) Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²²⁹

Ácido 3-([5-óxido-4-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-3-il]oxi)benzoico (2d) Se sintetiza de acuerdo a los métodos descritos en bibliografía.²²³

Productos de la reacción de Passerini

Procedimiento general para los productos de Passerini (12a-12m). Método A (microondas). Se coloca secuencialmente en un tubo de vidrio apto para microondas, el aldehído (0.2 mmol),

el ácido (0.2 mmol) y el isonitrilo (0.2 mmol), bajo condiciones libre de disolvente o en EtOH. El tubo sellado se calienta entre 15-60 minutos a 60°C bajo irradiación de microondas. Se deja enfriar al tubo y se trata la mezcla de reacción con NaHCO₃ saturado y se extrae con AcOEt. La capa orgánica se lava con brine, se seca con Na₂SO₄ y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica flash (SiO₂, Hexano/ AcOEt).

Método B (ultrasonido). El aldehído (0.2 mmol), el ácido (0.2 mmol) y el isonitrilo (0.2 mmol) se colocan secuencialmente en un balón; luego se coloca el mismo en un baño de ultrasonido (Ultrasons-H, J.P. Selecta.) precalentado a 60 °C. Se expone por 30 min o 6 h a 720W y 50/60 Hz. Se deja enfriar la mezcla de reacción y se trata con una solución saturada de NaHCO₃ y es extraída con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se lavan con brine se secan con Na₂SO₄

y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica flash (SiO₂, Hexano/ AcOEt). **Método C (calentamiento convencional).** El aldehído (0.2 mmol), el ácido (0.2 mmol) y el isonitrilo (0.2 mmol) se colocan secuencialmente en un balón; luego se coloca el mismo en una plancha calefactora precalentada a 60 °C en agitación por 30 min. Se deja enfriar la mezcla de reacción y se trata con una solución saturada de NaHCO₃ y es extraída con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se lavan con brine se secan con Na₂SO₄ y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica flash (SiO₂, Hexano/ AcOEt).

Método D (temperatura ambiente). El aldehído derivado de tocoferol (0.2 mmol), el ácido (0.2 mmol) y el isonitrilo (0.2 mmol) se colocan secuencialmente en un balón con H₂O, EtOH o CH₂Cl₂ o sin disolvente; se lleva a agitación por 1, 6 o 24 hs. La mezcla de reacción se trata con una solución saturada de NaHCO₃ y es extraída con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se lavan con brine se secan con Na₂SO₄ y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica flash (SiO₂, Hexano/ AcOEt).

4-((nitrooxi)metil)benzoato de 1-(6-*tert*-butoxicarbonilo-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(*tert*butilaminocarbonil)metilo (12a). Este compuesto se obtuvo a través del método A, B, C o D. El crudo se purificó a través de una columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para dar el producto deseado (**12a**) como un sólido blanco en una mezcla diastereomérica 1:0.5 (46-93%) P.F. 80-82 °C. Diastereómero mayoritario: ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 8.03 (d, J=5Hz, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 5.86 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.11 (s, 1H), 2.72-2.52 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.04-2.02 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.89-1.82 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.40 (s, 3H), 1.30 (s, 3H).

Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.03 (d, J =5Hz, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 5.98 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.26 (s, 1H), 2.72-2.52 (m, 2H), 2.04-2.02 (m, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.89-1.82 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.33 (s, 3H), 1.26 (s, 3H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 165.9, 165.7, 164.8, 164.5, 152.2, 125.1, 148.0, 147.9, 141.8, 141.7, 137.9, 137.8, 130.4, 130.3, 128.7, 128.6, 127.8, 127.5, 125.9, 125.8, 122.7, 122.5, 117.6, 117.5, 83.0, 82.9, 76.5, 76.1, 73.6, 73.5, 51.7, 51.5, 28.7, 28.6, 27.7, 20.9, 20.5, 20.1, 19.9, 12.8, 12.7, 12.4, 12.1, 11.9. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ =614(M^+ , 5), 514(51), 316(18), 205(41), 135(92), 57(100). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{10}$: 614.2839, encontrado: 614.2827.

4-((nitrooxi)metil)benzoato de 1-(6-*tert*-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(bencilaminocarbonil)metilo (12b). Este compuesto fue obtenido mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**12b**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (88%). P.F. 72-74 °C. Diasterómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.03-7.99(m, 2H), 7.41-7.39 (m, 2H), 7.21-7.11 (m,5H), 6.39 (bs, 1H), 5.39 (s, 2H), 5.28 (s, 1H), 4.41 (s, 2H), 2.70-2.53 (m, 2H), 2.06-2.02 (m, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.91-1.87 (m, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.40 (s, 3H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.03-7.99(m, 2H), 7.41-7.39 (m, 2H), 7.21-7.11 (m,5H), 6.44 (bs, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.39 (s, 2H), 4.40 (s, 2H), 2.70-2.53 (m, 2H), 2.06-2.02 (m, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.91-1.87 (m, 1H), 1.73 (s, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.36 (s, 3H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 167.0, 166.7, 164.9, 164.6, 152.2, 152.1, 147.9, 147.7, 141.8, 141.7, 138.0, 137.9, 137.7, 130.4, 130.2, 130.1, 128.8, 128.7, 128.6, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 125.9, 125.7, 122.9, 122.6, 117.5, 117.4, 83.0, 82.9, 78.5, 76.6, 76.0, 76.1, 73.6, 73.5, 43.7, 43.5, 28.6, 27.9, 27.7, 20.9, 20.7, 20.0, 19.9, 12.7, 11.9, 11.8. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ =548(M^+ -Boc, 7), 503(76), 351(14), 205(90), 135(88), 91(63).). HRMS: m/z [M^+Na] $^+$ calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}$: 671.2581, encontrado: 671.2590.

4-((nitrooxi)metil)benzoato de 1-(6-*tert*-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(ciclohexilaminocarbonil)metilo (12c). Este compuesto fue obtenido mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**12c**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (82%). P.F. 143-145 °C. Diasterómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.03 (d, J =5Hz, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 5.98 (d, 8Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.22 (s, 1H), 3.77-3.70 (m, 1H), 2.60-2.53 (m, 2H), 2.09-2.07 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.90-1.85 (m, 1H), 1.65-1.61 (m, 2H),

1.54-1.52 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.40 (s, 3H), 1.31-1.19 (m, 4H), 1.10-1.05 (m, 2H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.03 (d, J =5Hz, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 6.00 (d, 8Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.34 (s, 1H), 3.77-3.70 (m, 1H), 2.72-2.56 (m, 2H), 2.09-2.07 (m, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.90-1.85 (m, 1H), 1.65-1.61 (m, 2H), 1.54-1.52 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.35 (s, 3H), 1.31-1.19 (m, 4H), 1.10-1.05 (m, 2H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 165.9, 165.7, 164.9, 164.5, 152.2, 152.1, 148.0, 147.9, 141.8, 141.7, 137.9, 137.8, 130.4, 130.3, 128.7, 128.6, 127.8, 127.5, 126.0, 125.7, 122.8, 122.5, 117.6, 117.5, 83.0, 82.9, 76.0, 75.9, 73.6, 73.5, 48.7, 48.3, 33.2, 33.1, 33.0, 32.9, 29.4, 29.1, 28.6, 28.0, 27.7, 25.5, 25.4, 25.0, 24.9, 24.8, 24.7, 20.9, 20.4, 20.0, 19.9, 12.8, 12.7, 12.3, 12.1, 11.9, 11.4. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ =640(M^+ , 1), 595(2), 540(18), 493(100), 205(78), 135(81), 83(15), 57(37). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}$: 640.2996, encontrado: 640.2969.

4-((nitrooxi)metil)bezoato de 1-(6-*tert*-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(pentilaminocarbonil)metilo (12d). Este compuesto fue obtenido mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**12d**) como un aceite incoloro que solidifica en la heladera en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (85%). Diasterómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.03-8.01 (m, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 6.06 (bs, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.24 (s, 1H), 3.24-3.20 (m, 2H), 2.72-2.54 (m, 2H), 2.09-2.04 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.90-1.86 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.46-1.43 (m, 2H), 1.41 (s, 3H), 1.23-1.13 (m, 4H), 0.80-0.73 (m, 3H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.03-8.01 (m, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 6.14 (bs, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.38 (s, 1H), 3.24-3.20 (m, 2H), 2.72-2.54 (m, 2H), 2.09-2.04 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.90-1.86 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.46-1.43 (m, 2H), 1.36 (s, 3H), 1.23-1.13 (m, 4H), 0.80-0.73 (m, 3H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 166.8, 166.7, 164.9, 164.5, 152.2, 152.1, 148.0, 147.9, 141.8, 141.7, 138.0, 137.9, 130.4, 130.3, 128.7, 128.6, 127.6, 127.8, 127.6, 126.0, 125.8, 122.8, 122.5, 117.5, 117.4, 83.0, 82.9, 76.0, 75.9, 73.6, 73.5, 39.6, 39.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.5, 28.0, 27.7, 22.3, 22.2, 20.9, 20.5, 20.0, 19.9, 13.9, 13.8, 12.7, 12.6, 12.0, 11.9, 11.8. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ =628(M^+ , 1), 583(1), 528(10), 481(100), 205(76), 135(40), 71(5), 57(27). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}$: 628.2996, encontrado: 628.2980.

4-((nitrooxi)metil)benzoato de 1-(6-*tert*-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-((4-metoxifenil)aminocarbonil)metilo (12e). Este compuesto fue obtenido mediante el

método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**12e**) como un sólido marrón claro en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (67%) P.F. 70-72°C. Diasterómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.06-8.04 (m, 2H), 7.71 (bs, 1H), 7.44-7.42 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 2H), 6.77-6.75 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.34 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.72-2.57 (m, 2H), 2.13-2.07 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.95-1.90 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.47 (s, 3H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.06-8.04 (m, 2H), 7.81 (bs, 1H), 7.44-7.42 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 2H), 6.77-6.75 (m, 2H), 5.49 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 6.69 (s, 3H), 2.72-2.57 (m, 2H), 2.13-2.07 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.95-1.90 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.41 (s, 3H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 164.9, 164.8, 164.7, 164.6, 156.7, 156.6, 152.2, 152.1, 147.9, 147.7, 142.0, 141.9, 138.2, 138.0, 130.5, 130.4, 130.2, 130.1, 129.9, 128.7, 128.6, 128.0, 127.7, 126.1, 125.9, 122.8, 122.7, 121.8, 121.7, 117.6, 117.5, 114.2, 114.1, 83.1, 83.0, 76.4, 76.3, 76.2, 73.6, 73.5, 55.5, 28.9, 27.7, 20.9, 20.6, 20.0, 19.9, 12.8, 12.3, 12.1, 11.9. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ =619(M^+-NO_2 , 1), 564(M^+-Boc , 3), 556(22), 519(40), 385(6), 205(100), 135(72), 105(24), 57(19). HRMS: m/z [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{Na}$: 687.2530, encontrado: 687.2526.

3-((5-óxido-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxi)benzoato de 1-(6-tert-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(tertbutilaminocarbonil)metilo (12f**).**

Este compuesto fue obtenido mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**12f**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (90%). P.F. 90-92 °C. Diasterómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.15 (d, $J=5\text{Hz}$, 2H), 8.08-8.04 (m, 2H), 7.83 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.22-7.68 (m, 2H), 7.62-7.60 (m, 2H), 5.98 (bs, 1H), 5.22 (s, 1H), 2.83-2.61 (m, 2H), 2.27-2.21 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.01-1.93 (m, 1H), 1.60 (s, 9H), 1.52 (s, 3H), 1.42 (s, 3H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.15 (d, $J=5\text{Hz}$, 2H), 8.08-8.04 (m, 2H), 7.83 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.22-7.68 (m, 2H), 7.62-7.60 (m, 2H), 6.12 (bs, 1H), 5.38 (s, 1H), 2.83-2.61 (m, 2H), 2.27-2.21 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01-1.93 (m, 1H), 1.60 (s, 9H), 1.44 (s, 3H), 1.38 (s, 3H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 165.7, 165.5, 164.1, 163.8, 158.1, 152.6, 152.2, 147.8, 147.7, 141.8, 141.7, 137.9, 135.9, 131.7, 130.4, 130.3, 129.9, 128.7, 128.1, 127.9, 127.6, 126.0, 125.8, 125.0, 124.9, 122.7, 122.4, 121.3, 121.2, 117.6, 117.5, 83.0, 82.9, 78.6, 76.1, 76.0, 51.8, 51.6, 29.1, 28.9, 28.8, 28.7, 27.7, 21.1, 20.9,

20.0, 19.9, 14.2, 14.1, 12.8, 12.7, 12.4, 12.1, 11.9. MS(IE, 70eV): $m/z(\%) = 679(M^+ - \text{Boc}, 3), 455(39), 316(19), 260(11), 205(27), 120(100), 57(37)$. HRMS: $m/z [M + \text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{SNa}$: 802.2622, encontrado: 802.2628.

3-((5-óxido-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxi)benzoato de 1-(6-tert-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(bencilaminocarbonil)metilo (12g). Este compuesto fue obtenido mediante el Método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**12g**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (73%) P.F. 68-70 °C. Diasterómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 8.03-8.01$ (m, 2H), 7.96-7.92 (m, 2H), 7.71 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.59-7.55 (m, 2H), 7.49-7.47 (m, 2H), 7.23-7.11 (m, 5H), 6.40 (bs, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.44-4.41 (m, 2H), 2.71-2.54 (m, 2H), 2.09-2.00 (m, 1H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.92-1.87 (m, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.41 (s, 3H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 8.03-8.01$ (m, 2H), 7.96-7.92 (m, 2H), 7.71 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.59-7.55 (m, 2H), 7.49-7.47 (m, 2H), 7.23-7.11 (m, 5H), 6.45 (bs, 1H), 5.42 (s, 1H), 4.44-4.41 (m, 2H), 2.71-2.54 (m, 2H), 2.09-2.00 (m, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.92-1.87 (m, 1H), 1.74 (s, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.36 (s, 3H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 166.7, 166.5, 164.2, 164.0, 158.1, 152.6, 152.2, 147.8, 147.6, 141.9, 141.8, 137.8, 137.6, 136.0, 131.6, 131.5, 130.4, 130.3, 129.9, 128.8, 128.7, 128.2, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6, 126.0, 125.8, 125.1, 125.0, 122.9, 122.6, 121.3, 121.2, 117.4, 83.0, 82.9, 78.6, 76.7, 76.1, 75.9, 43.8, 43.6, 29.1, 28.7, 27.7, 20.9, 20.7, 19.9, 19.8, 12.7, 12.0, 11.9, 11.8$. MS(IE, 70eV): $m/z(\%) = 629(2), 489(23), 350(28), 205(15), 121(100), 91(56)$. HRMS: $m/z [M + \text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{SNa}$: 836.2465, encontrado: 836.2438.

3-((5-óxido-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxi)benzoato de 1-(6-tert-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(ciclohexilaminocarbonil)metilo (12h). Este compuesto fue obtenido mediante el Método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**12h**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (89%). P.F. 72-74 °C Diasterómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 8.04-8.02$ (m, 2H), 7.95-7.92 (m, 2H), 7.73-7.69 (m, 1H), 7.60-7.56 (m, 2H), 7.51-7.48 (m, 2H), 6.00 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 3.78-3.69 (m, 1H), 2.71-2.53 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.89-1.85 (m, 2H), 1.65-1.62 (m, 2H), 1.56-1.52 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.40 (s, 3H), 1.30-1.18 (m, 2H), 1.12-1.02 (m, 4H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 8.04-8.02$ (m, 2H), 7.95-7.92 (m, 2H), 7.73-7.69 (m, 1H), 7.60-

7.56 (m, 2H), 7.51-7.48 (m, 2H), 6.03 (d, $J = 8.5\text{Hz}$, 1H), 5.35 (s, 1H), 3.78-3.69 (m, 1H), 2.71-2.53 (m, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.89-1.85 (m, 2H), 1.65-1.62 (m, 2H), 1.56-1.52 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.34 (s, 3H), 1.30-1.18 (m, 2H), 1.12-1.02 (m, 4H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 165.7, 165.6, 164.2, 163.9, 158.1, 156.6, 156.5, 152.2, 152.1, 147.9, 147.8, 141.9, 141.7, 137.9, 137.8, 136.0, 135.9, 131.7, 131.6, 130.5, 130.3, 129.9, 128.7, 128.1, 128.0, 127.9, 127.6, 126.0, 125.8, 125.0, 124.9, 122.8, 122.4, 121.3, 121.2, 117.5, 117.4, 83.0, 82.9, 78.5, 76.6, 76.0, 48.8, 48.4, 33.2, 33.1, 33.0, 32.9, 29.1, 28.7, 27.7, 25.5, 25.4, 25.0, 24.8, 24.7, 22.7, 22.6, 20.9, 20.4, 20.0, 19.9, 12.8, 12.7, 12.4, 12.1, 11.9, 11.4$. MS(IE, 70eV): $m/z(\%) = 621(\text{M}^+\text{-BOC-Ciclohexil}, 2), 481(\text{M}^+\text{-BOC-Fx}, 15), 360(15), 342(26), 205(36), 121(100), 83(33), 77(70), 56(20)$. HRMS: m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{SNa}$: 828.2778, encontrado: 828.2784.

3-((5-óxido-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxi)benzoato de 1-(6-tert-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(pentilaminocarbonil)metilo (12i). Este compuesto fue obtenido mediante el Método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**12i**) como un aceite incoloro que solidifica en la heladera, en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (88%). Diasterómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 8.04\text{-}8.02$ (m, 2H), 7.97-7.92 (m, 2H), 7.73-7.69 (m, 1H), 7.59-7.56 (m, 2H), 7.51-7.48 (m, 2H), 6.08 (bs, 1H), 5.24 (s, 1H), 3.27-3.19 (m, 2H), 2.76-2.55 (m, 2H), 2.09-2.04 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.89-1.86 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.45-1.42 (m, 2H), 1.41 (s, 3H), 1.23-1.18 (m, 4H), 0.80-0.76 (m, 3H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 8.04\text{-}8.02$ (m, 2H), 7.97-7.92 (m, 2H), 7.73-7.69 (m, 1H), 7.59-7.56 (m, 2H), 7.51-7.48 (m, 2H), 6.17 (bs, 1H), 5.39 (s, 1H), 3.27-3.19 (m, 2H), 2.76-2.55 (m, 2H), 2.09-2.04 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.89-1.86 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.45-1.42 (m, 2H), 1.35 (s, 3H), 1.23-1.18 (m, 4H), 0.80-0.76 (m, 3H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 166.6, 166.5, 164.2, 163.8, 158.1, 152.6, 152.5, 152.2, 152.1, 147.9, 147.8, 141.9, 141.8, 137.9, 137.8, 136.0, 135.9, 131.6, 130.5, 130.4, 129.9, 128.7, 128.1, 127.9, 127.6, 126.1, 125.8, 125.1, 125.0, 122.8, 122.5, 121.3, 121.2, 117.5, 83.0, 82.9, 78.5, 76.7, 76.0, 75.9, 39.7, 39.5, 29.2, 29.1, 29.0, 28.0, 27.7, 22.3, 20.9, 20.5, 20.0, 19.9, 13.9, 13.8, 12.8, 12.7, 12.1, 11.9, 11.8$. MS(IE, 70eV): $m/z(\%) = 693(\text{M}^+\text{-Boc}, 1), 609(2), 469(32), 330(44), 205(22), 121(100), 77(78), 71(3)$. HRMS: m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{SNa}$: 816.2778, encontrado: 816.2777.

3-((3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il N²-oxido)oxi)benzoato de 1-(6-*tert*-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-((4-metoxifenil) aminocarbonil)metilo (12j). Este compuesto fue obtenido mediante el Método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (12j) como un sólido marrón claro en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (47%). P.F. 79-81 °C. Diasterómero mayoritario: ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 8.04-8.02 (m, 2H), 8.00-7.95 (m, 2H), 7.72 (bs, 1H), 7.71-7.69 (m, 1H), 7.59-7.55 (m, 2H), 7.52-7.50 (m, 2H), 7.36-7.31 (m, 2H), 6.78-6.75 (m, 2H), 5.34 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.74-2.55 (m, 2H), 2.13-2.09 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.97-1.92 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.48 (s, 3H). Diasterómero minoritario: ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 8.04-8.02 (m, 2H), 8.00-7.95 (m, 2H), 7.83 (bs, 1H), 7.71-7.69 (m, 1H), 7.59-7.55 (m, 2H), 7.52-7.50 (m, 2H), 7.36-7.31 (m, 2H), 6.78-6.75 (m, 2H), 5.51 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.74-2.55 (m, 2H), 2.13-2.09 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.97-1.92 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.41 (s, 3H). Mezcla diasteromérica: ¹³C-NMR: δ= 164.6, 164.2, 163.9, 158.0, 156.7, 152.2, 147.6, 142.0, 141.9, 137.8, 136.0, 131.5, 131.4, 130.5, 130.4, 130.1, 129.9, 128.2, 128.1, 126.2, 125.9, 125.2, 125.1, 122.8, 122.6, 121.7, 121.6, 121.4, 121.3, 117.5, 114.2, 83.1, 83.0, 76.5, 76.4, 76.1, 55.5, 29.0, 27.7, 20.9, 20.0, 19.9, 12.8, 12.3, 12.1, 11.9. MS(IE, 70eV): *m/z*(%)= 505(2), 468(2), 469(32), 330(44), 205(15), 121(41), 108(15), 77(100). HRMS: *m/z* [M+Na]⁺ calculado para C₄₂H₄₃N₃O₁₃SNa: 852.2414, encontrado: 852.2407.

benzoato de 1-(fenil)-1-(*tert*-butilaminocarbonil) metilo (12k) Ácido benzoico (2 mmol, 0.25 g), benzaldehído (2 mmol, 0.21 g) y *tert*-butilisocianuro (2 mmol, 0.17 g) se colocan en un matraz de fondo redondo. La mezcla de reacción se deja con agitación magnética por 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente se filtra el sólido blanco formado, se disuelve en una mínima cantidad de EtOH caliente y se agrega agua hasta que precipita un sólido blanco, el cual se filtra y guarda en desecador por 48 h. (93%) P.F. 150-152°C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 8.12 (d, *J* = 8 Hz, 2H, a), 7.63 (t, *J* = 8 Hz, 1H, c), 7.56-7.49 (m, 4H, b y e), 7.44-7.38 (m, 3H, d y f), 6.25 (s, 1H, h), 6.03 (s, 1H, g), 1.39 (s, 9H, i). ¹³C-NMR: δ= 167.4 (C7), 164.9 (C5), 135.9 (C10), 133.6 (C4), 129.8 (C1), 129.4 (C2), 128.9 (C11), 128.8 (C12), 128.7 (C3), 127.5 (C13), 76.0 (C6), 51.6 (C8), 28.7 (C9) MS(IE, 70eV): *m/z*(%)= 311 (M+, 0.14), 239 (0.39), 212 (30), 194 (7), 167(3), 105 (100), 91 (3), 77 (19), 57 (9).

3-((5-óxido-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxi) benzoato de 1-fenil-1-(tert-butilaminocarbonil)metilo (12l). Este compuesto fue obtenido mediante el Método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**12l**) como un sólido blanco (87%). P.F. 172-174 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.13-8.10 (m, 2H), 8.08-8.06 (m, 1H), 8.03-8.02 (m, 1H), 7.83-7.79 (m, 1H), 7.69-7.65 (m, 2H), 7.60-7.59 (m, 2H), 7.55-7.53 (m, 2H), 7.46-7.41 (m, 3H), 6.20 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 1.38 (s, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 166.9, 163.8, 158.0, 152.5, 137.7, 136.0, 135.5, 131.6, 130.4, 129.9, 129.2, 128.9, 128.7, 128.1, 127.6, 125.0, 121.2, 110.7, 76.5, 51.8, 28.7. HRMS: m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8\text{SNa}$: 574.1260, encontrado: 574.1261.

benzoato de 1-(6-tert-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(tert-butilaminocarbonil)metilo (12m). Este compuesto fue obtenido mediante el Método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 85:15) para obtener el producto deseado (**12m**) como un aceite incoloro que solidifica en la heladera, en una mezcla diastereomérica 1:0.5 (97%). Diastereómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.11-8.09 (m, 2H), 7.65-7.59 (m, 1H), 7.52-7.47 (m, 2H), 5.96 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 2.82-2.62 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.49 (s, 3H), 1.39 (s, 9H). Diastereómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.11-8.09 (m, 2H), 7.65-7.59 (m, 1H), 7.52-7.47 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 5.36 (s, 1H), 2.82-2.62 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.45 (s, 3H), 1.36 (s, 9H). Mezcla diastereomérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 166.2, 165.9, 165.4, 165.1, 152.3, 152.2, 148.0, 147.9, 141.7, 141.6, 133.5, 133.4, 129.9, 129.8, 129.5, 129.4, 128.6, 125.5, 127.7, 127.4, 125.9, 125.7, 122.8, 122.5, 117.6, 117.5, 83.0, 82.9, 76.4, 76.1, 51.7, 51.4, 28.7, 28.6, 27.7, 20.8, 20.4, 20.1, 19.9, 12.8, 12.7, 12.4, 12.1, 11.9. HRMS: m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{NO}_7\text{Na}$: 562.2781, encontrado: 562.2781.

4-((nitrooxi)metil)benzoato de 1-(fenil)-1-(tert-butilaminocarbonil)metilo (12n). Este compuesto se obtuvo como subproducto en la reacción para la obtención del producto de Ugi **13d**. Dicho producto (**12n**) se obtuvo como un sólido blanco (21%), P.F. 106-108 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.14 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 7.54-7.51 (m, 5H), 7.43-7.39 (m, 2H), 6.22 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 1.38 (s, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ =167.1, 164.4, 138.0, 135.7, 130.3, 129.6, 129.1, 129.0,

128.9, 128.7, 127.6, 127.5, 76.3, 73.5, 51.7, 28.7. HRMS: m/z $[M+Na]^+$ calculado para $C_{20}H_{22}N_2O_6Na$: 409.1376, encontrado: 409.1379.

3-((5-óxido-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxi)benzoato de 1-pentil-1-((tert-butilamino)carbonil)metilo (12o). Este compuesto se obtuvo como subproducto en la reacción para la obtención del producto de Ugi **13g**. Dicho producto (**12o**) se obtuvo como un sólido blanco (54%), P.F. 95-97 °C. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.06-8.03 (m, 1H), 7.99-7.93 (m, 2H), 7.76-7.70 (m, 1H), 7.62-7.55 (m, 2H), 7.53-7.51 (m, 1H), 7.17-7.06 (m, 1H), 6.91-6.88 (m, 1H), 5.73 (bs, 1H), 5.21-5.17 (m, 1H), 1.93-1.87 (m, 2H), 1.29 (s, 9H), 1.28-1.17 (m, 4H), 0.84 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 168.6, 164.1, 158.1, 152.6, 137.8, 136.0, 130.4, 129.9, 129.8, 129.6, 128.6, 127.9, 124.9, 121.1, 110.7, 75.5, 60.6, 28.8, 28.7, 27.0, 22.4, 13.9. HRMS: m/z $[M+Na]^+$ calculado para $C_{25}H_{29}N_3O_8SNa$: 554.1573, encontrado: 554.1573

Productos de la reacción de Ugi

Procedimiento general para los productos de Ugi (13a-13f). Método A (microondas). Se coloca en un tubo apto para microondas, el aldehído (0.2 mmol), la *p*-toluidina (0.2 mmol), el ácido (0.2 mmol) y el tert-butilisocianuro (0.2 mmol), sin disolvente o con etanol como disolvente. Dicho tubo sellado se calienta por 30 minutos a 60°C bajo irradiación de microondas. Se deja enfriar la mezcla de reacción y se trata con una solución saturada de $NaHCO_3$ y es extraída con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se lavan con brine se secan con Na_2SO_4 y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica flash (SiO_2 , Hexano/ AcOEt). **Método B (ultrasonido).** El aldehído derivado de tocoferol (0.2 mmol), la *p*-toluidina (0.2 mmol), el ácido (0.2 mmol) y el isonitrilo (0.2 mmol) se colocan secuencialmente en un balón; luego se coloca el mismo en un baño de ultrasonido (Ultrasons-H, J.P. Selecta.) precalentado a 60 °C. Se expone por 6 h a 720W y 50/60 Hz. Se deja enfriar la mezcla de reacción y se trata con una solución saturada de $NaHCO_3$ y es extraída con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se lavan con brine se secan con Na_2SO_4 y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica flash (SiO_2 , Hexanos/ AcOEt).

***N*-(1-(tert-butilaminocarbonil)-1-(6-tert-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metil)-*N*-(4-metilfenil)-4-((nitrooxi)metil)fenilcarboxamida (13a).** Este compuesto se obtuvo mediante el método A o B. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica

(hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**13a**) como un sólido blanco en una mezcla diastereomérica 1:0.5 (38-59%) P.F. 78-80 °C. Diastereómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.21-7.19 (m, 2H), 7.10-7.04 (m, 4H), 6.81-6.80 (m, 2H), 6.73 (bs, 1H), 5.69 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 2.70-2.53 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.14-2.12 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.96-1.94 (m, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.37 (s, 3H), 1.08 (s, 9H). Diastereómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.25-7.24 (m, 2H), 7.10-7.04 (m, 4H), 6.94-6.89 (m, 2H), 6.83 (bs, 1H), 5.51 (s, 1H), 5.23 (s, 2H), 2.70-2.53 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.14-2.12 (m, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.96-1.94 (m, 1H), 1.91 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.35 (s, 3H), 1.14 (s, 9H). Mezcla diastereomérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 170.7, 170.3, 165.4, 165.1, 151.2, 151.1, 146.6, 146.3, 140.9, 140.8, 138.8, 138.6, 137.5, 135.4, 136.6, 136.4, 131.9, 130.1, 130.0, 129.0, 128.3, 127.9, 127.8, 127.7, 127.0, 126.7, 125.2, 124.9, 121.5, 121.3, 116.9, 116.6, 82.1, 81.9, 77.8, 77.5, 73.1, 73.0, 67.2, 67.1, 50.3, 50.1, 28.7, 28.4, 28.0, 27.7, 27.6, 27.5, 27.4, 26.7, 19.9, 19.2, 19.0, 11.9, 11.8, 11.7, 11.5, 10.9, 10.8. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ =703(M^+ , 5), 658(11), 603(4), 558(32), 295(14), 205(50), 135(100), 91(21), 57(77). HRMS-FAB: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_9$: 703.3469, encontrado: 703.3518.

***N*-(1-(*tert*-butilaminocarbonil)-1-(6-*tert*-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2il)metil)-*N*-(4-metilfenil)-3-(5-óxido-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxifenil carboxamida (**13b**)**. Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**13b**) como un sólido blanco en una mezcla diastereomérica 1:0.5 (48%), P.F. 77-79 °C. Diastereómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.08-8.05 (m, 2H), 7.83-7.76 (m, 1H), 7.69-7.63 (m, 2H), 7.25-7.03 (m, 6H), 6.90 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 6.83 (s, 1H), 5.77 (s, 1H), 2.81-2.65 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.08-2.03 (m, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.59 (s, 9H), 1.47 (s, 3H), 1.17 (s, 9H). Diastereómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.08-8.05 (m, 2H), 7.83-7.76 (m, 1H), 7.69-7.63 (m, 2H), 7.25-7.03 (m, 6H), 6.98 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 6.94 (s, 1H), 5.58 (s, 1H), 2.81-2.65 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08-2.03 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.57 (s, 9H), 1.44 (s, 3H), 1.24 (s, 9H). Mezcla diastereomérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 170.7, 166.1, 157.9, 152.2, 151.7, 147.6, 141.9, 138.5, 137.9, 135.8, 129.8, 129.4, 129.3, 129.0, 128.6, 127.7, 126.6, 126.3, 122.3, 120.5, 120.0, 117.9, 110.6, 83.1, 78.5, 68.4, 51.4, 51.2, 29.3, 28.6, 28.5, 27.7, 26.9, 22.7, 21.0, 20.9, 14.1, 12.9, 12.8, 11.9. HRMS: m/z [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{SNa}$: 891.3251, encontrado: 891.3255

***N*-(1-(*tert*-butilaminocarbonil)-1-fenilmetil)-*N*-(4-metilfenil)-fenilcarboxamida (13c).** Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (13c) como un sólido blanco (57%), P.F. 157-159 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 7.35-7.25 (m, 7H), 7.21-7.13 (m, 3H), 6.90-6.88 (m, 2H), 6.83-6.81 (m, 2H), 6.07 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 2.18 (s, 3H), 1.39 (s, 9H). ¹³C-NMR: δ= 171.2, 168.7, 138.8, 136.8, 136.2, 135.1, 130.0, 129.8, 129.3, 129.0, 128.6, 128.4, 128.2, 127.6, 67.4, 51.6, 28.7, 21.0. HRMS: *m/z* [M+Na]⁺ calculado para C₂₆H₂₈N₂O₂Na: 423.2048, encontrado: 423.2051.

***N*-(1-(*tert*-butilaminocarbonil)-1-(fenilmetil)-*N*-(4-metilfenil)-4-((nitrooxi)metil)fenil carboxamida (13d).** Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (13d) como un sólido blanco (45%), P.F. 128-130 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 7.37 (d, J=8Hz, 2H), 7.28-7.23 (m, 5H), 7.17 (d, J=8Hz, 2H), 6.89-6.81 (m, 4H), 6.07 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.38 (s, 9H). ¹³C-NMR: δ= 170.4, 168.5, 138.3, 137.4, 137.1, 134.9, 133.1, 130.1, 129.9, 129.1, 129.0, 128.5, 128.4, 128.1, 74.1, 67.3, 51.7, 28.7, 21.0. HRMS: *m/z* [M+Na]⁺ calculado para C₂₇H₂₉N₃O₅Na: 498.2005, encontrado: 498.2003.

***N*-(1-(*tert*-butilaminocarbonil)-1-(fenilmetil)-*N*-(4-metilfenil)-3-(5-óxido-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxifenilcarboxamida (13e).** Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (13e) como un sólido blanco (63%), P.F. 170-171 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 8.06-8.04 (m, 2H), 7.82-7.78 (m, 1H), 7.68-7.64 (m, 2H), 7.29-7.13 (m, 9H), 6.88-6.79 (m, 3H), 6.06 (s, 1H), 5.67 (s, 1H), 2.14 (s, 3H), 1.38 (s, 9H). ¹³C-NMR: δ= 169.3, 168.4, 157.9, 151.8, 138.3, 138.0, 137.9, 137.3, 135.9, 134.8, 130.2, 129.9, 129.8, 129.3, 129.2, 128.6, 128.5, 128.4, 126.9, 120.7, 120.2, 110.6, 67.2, 51.7, 28.7, 21.0 HRMS: *m/z* [M+Na]⁺ calculado para C₃₄H₃₂N₄O₇SNa: 663.1889, encontrado: 663.1891.

***N*-(1-(*tert*-butilaminocarbonil)-1-(6-*tert*-butoxicarboniloxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metil)-*N*-(4-metilfenil)-fenilcarboxamida (13f).** Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (13f) como un sólido amorfo blanco en una mezcla diastereomérica 1:0.5 (32%). Diastereómero mayoritario: ¹H-NMR (CDCl₃): δ= 7.31-7.25 (m, 1H), 7.20-7.08 (m, 6H), 6.89-6.87 (m, 2H), 6.82 (s, 1H), 5.81 (s, 1H), 2.79-2.66 (m, 2H), 2.23 (s, 3H),

2.13-2.08 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.58 (s, 9H), 1.46 (s, 3H), 1.16(s, 9H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.31-7.25 (m, 1H), 7.20-7.08 (m, 6H), 6.97-6.95 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 2.79-2.66 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.13-2.08 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.57 (s, 9H), 1.45 (s, 3H), 1.21 (s, 9H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 172.6, 172.2, 166.6, 166.3, 152.3, 152.2, 147.7, 147.4, 141.8, 137.3, 137.1, 136.5, 136.4, 130.1, 129.1, 128.8, 128.3, 127.6, 127.5, 126.2, 125.9, 122.6, 122.4, 118.0, 117.7, 83.1, 83.0, 78.9, 78.6, 51.3, 51.1, 28.6, 28.5, 27.7, 27.6, 21.0, 20.3, 20.0, 12.9, 12.8, 12.5, 11.9, 11.8. . HRMS: m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$: 651.3410, encontrado: 651.3409

Procedimiento general para la desprotección del grupo fenol (14a-e, 15a-c). Método A (calentamiento convencional). El compuesto con grupo fenol protegido (**12a**, **12f**, **12m**, **13a**, **13b** ó **13f**) (0.07 mmol) se disuelven en un balón con 2,2,2-trifluoroetanol (TFE, 0.5 mL), se agita la solución a reflujo por 12 hs. Se deja enfriar el crudo y se remueve el disolvente a presión reducida y se purifica el producto deseado por columna cromatográfica flash (SiO_2 , Hexano/ AcOEt). **Método B (microondas).** El compuesto **12g** o **12h** se coloca en un tubo de vidrio adecuado para usar en el microondas y se disuelve en TFE (0.5 mL). El tubo sellado se calienta por 15 minutos a 100°C bajo irradiación de microondas. Se deja enfriar el crudo y se remueve el disolvente a presión reducida y se purifica el producto deseado por columna cromatográfica flash (SiO_2 , Hexano/ AcOEt).

4-(nitrooximetil)benzoato de 1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(tert-butilaminocarbonil)metilo (14a). Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**14a**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (58%). P.F. $69-71^\circ\text{C}$. Diasterómero mayoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.15 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 7.53-7.50 (m, 2H), 5.95 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.20 (s, 1H), 4.46 (s, 1H), 2.85-2.56 (m, 2H), 2.19 (s, 6H), 2.12 (s, 3H), 1.98-1.89 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). Diasterómero minoritario: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.15 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 7.53-7.50 (m, 2H), 6.15 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.39 (s, 1H), 4.41 (s, 1H), 2.85-2.56 (m, 2H), 2.16 (s, 6H), 2.14 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.98-1.89 (m, 2H), 1.42 (s, 3H), 1.36 (s, 9H). Mezcla diasteromérica: $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 166.1, 165.8, 164.9, 164.5, 145.6, 145.4, 144.0, 143.9, 137.8, 137.7, 130.5, 130.4, 128.7, 128.6, 122.3, 121.9, 121.7, 121.4, 119.0, 118.8, 117.5, 117.4, 77.9, 75.9, 75.7, 75.5, 73.7, 73.6, 51.7, 51.4, 29.3, 28.7, 28.6, 28.0, 20.8, 20.6, 20.2, 20.1, 12.5, 12.3, 12.0, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)=514(\text{M}^+, 6)$, 467(100),

317(13), 205(82), 133(90), 57(41). HRMS-FAB: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{27}H_{34}N_2O_8$: 514.2315, encontrado: 514.2329.

3-(5-óxido-(3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxi)benzoato de 1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(tertbutilaminocarbonil)metilo (14b). Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**14b**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (53%), P.F. 91-93 °C. Diasterómero mayoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 8.14-8.12 (m, 2H), 8.08-8.05 (m, 1H), 8.01-7.99 (m, 1H), 7.84-7.80 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 2H), 7.60-7.57 (m, 2H), 5.96 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 4.46 (s, 1H), 2.85-2.57 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). Diasterómero minoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 8.14-8.12 (m, 2H), 8.08-8.05 (m, 1H), 8.01-7.99 (m, 1H), 7.84-7.80 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 2H), 7.60-7.57 (m, 2H), 6.15 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.41 (s, 1H), 2.85-2.57 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.42 (s, 3H), 1.36 (s, 9H). Mezcla diasteromérica: ^{13}C -NMR: δ = 165.9, 165.7, 164.2, 163.8, 158.1, 152.4, 145.6, 145.5, 144.0, 143.9, 137.8, 136.0, 131.7, 130.4, 130.3, 129.9, 128.7, 128.2, 128.1, 125.0, 124.9, 122.3, 121.9, 121.7, 121.3, 119.0, 118.8, 117.5, 117.4, 110.7, 78.3, 76.1, 75.6, 75.5, 51.8, 51.5, 29.4, 28.7, 28.6, 28.0, 21.1, 21.0, 20.2, 20.1, 12.5, 12.3, 12.1, 11.3. MS(IE, 70eV): m/z (%)= 595(5), 454(20), 316(17), 205(9), 121(100), 77 (48), 57(24). HRMS: m/z $[M+Na]^+$ calculado para $C_{34}H_{37}N_3O_{10}SNa$: 702.2097, encontrado: 702.2093.

3-((3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il N^2 -óxido)oxi)benzoato de 1-((bencilamino)carbonil)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metilo (14c). Este compuesto se obtuvo mediante el método B, a partir de **12g**. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**14c**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (25%) P.F. 67-69 °C. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.14-8.12 (m, 4H), 8.08-8.03 (m, 2H), 7.99-7.98 (m, 2H), 7.84-7.79 (m, 2H), 7.71-7.65 (m, 4H), 7.60-7.58 (m, 4H), 7.32-7.22 (m, 10H), 6.57 (t, J 5.9 Hz, 1H), 6.49 (t, J 5.9 Hz, 1H), 5.55 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.56-4.50 (m, 4H), 4.37 (s, 1H), 4.34 (s, 1H), 2.81-2.60 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.09-1.95 (m, 2H), 1.87 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.46 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 172.3, 172.2, 166.9, 166.7, 158.1, 158.0, 152.6, 152.5, 143.9, 143.7, 141.8, 141.6, 137.8, 137.6, 136.0, 135.0, 133.5, 133.3, 130.5, 130.0, 129.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 125.1,

125.0, 122.4, 122.0, 121.3, 121.2, 119.0, 118.9, 117.4, 117.3, 110.7, 110.6, 78.3, 77.2, 75.6, 75.5, 43.9, 43.6, 29.3, 28.2, 21.1, 21.0, 20.9, 20.1, 20.0, 14.2, 14.1, 12.2, 11.8, 11.4, 11.3. HRMS: m/z $[M+Na]^+$ calculado para $C_{37}H_{35}N_3O_{10}SNa$: 736.1941, encontrado: 736.1953

3-(5-óxido-(3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxi)benzoato de 1-((ciclohexilamino)carbonil)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metilo (14d). Este compuesto se obtuvo mediante el método B, a partir de **12h**. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**14d**) como un sólido blanco en una mezcla diastereomérica 1:0.5. (32%), P.F. 69-71 °C. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.15-8.12 (m, 4H), 8.02-7.95 (m, 2H), 7.84-7.80 (m, 2H), 7.72-7.67 (m, 4H), 7.62-7.57 (m, 6H), 6.15 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 6.10 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 5.46 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.35 (s, 1H), 3.88-3.80 (m, 2H), 2.84-2.59 (m, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.07-2.04 (m, 2H), 1.99-1.95 (m, 2H), 1.77-1.71 (m, 4H), 1.66-1.60 (m, 8H), 1.50 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.39-1.33 (m, 4H), 1.20-1.14 (m, 4H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 171.2, 171.1, 165.9, 165.7, 158.2, 158.1, 152.5, 152.4, 145.6, 144.1, 143.9, 137.8, 137.7, 136.0, 135.9, 131.1, 131.7, 130.4, 130.3, 129.9, 129.2, 129.1, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 125.0, 124.9, 121.3, 121.2, 119.0, 118.8, 117.5, 117.4, 110.8, 110.7, 78.2, 76.8, 76.2, 76.1, 48.8, 48.3, 33.2, 33.1, 32.9, 32.8, 28.2, 28.1, 25.5, 25.4, 25.0, 24.7, 21.0, 20.7, 20.2, 20.1, 14.2, 14.1, 12.4, 12.3, 12.2, 12.0, 11.3. HRMS: m/z $[M+Na]^+$ calculado para $C_{36}H_{39}N_3O_{10}SNa$: 728.2254, encontrado: 728.2249.

benzoato de 1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-1-(tert-butilaminocarbonil)metilo (14e). Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 8:2) para obtener el producto deseado (**14e**) como un sólido amarillo en una mezcla diastereomérica 1:0.5 (70 %), P.F. 152-154 °C. Diastereómero mayoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 8.13-8.10 (m, 2H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.51-7.46 (m, 2H), 5.96 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 2.86-2.58 (m, 2H), 2.19 (s, 6H), 2.12 (s, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). Diastereómero minoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 8.13-8.10 (m, 2H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.51-7.46 (m, 2H), 6.16 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 2.86-2.58 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.43 (s, 3H), 1.36 (s, 9H). Mezcla diastereomérica: ^{13}C -NMR: δ = 166.4, 166.1, 165.5, 165.1, 145.6, 145.4, 144.1, 144.0, 133.5, 133.4, 129.9, 129.8, 129.5, 129.4, 128.6, 128.5, 122.4, 121.9, 121.7, 121.4, 119.1, 118.8, 117.4, 117.3, 77.7, 75.9, 75.7,

75.6, 51.6, 51.4, 29.2, 28.7, 28.6, 28.1, 20.8, 20.5, 20.3, 20.1, 12.5, 12.3, 12.0, 11.3. HRMS: m/z $[M+Na]^+$ calculado para $C_{26}H_{33}N_2O_5Na$: 462.2256, encontrado: 462.2258.

***N*-(1-(*tert*-butilaminocarbonil)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metil)-*N*-(4-metilfenil)-4-((nitrooxi)metil)fenilcarboxamida (15a).** Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**15a**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (50%), P.F. 76-78 °C. Diasterómero mayoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 7.36-7.28 (m, 2H), 7.22-7.12 (m, 4H), 7.05 (s, 1H), 6.91-6.89 (m, 2H), 5.79 (s, 1H), 5.29 (s, 2H), 4.53 (s, 1H), 2.83-2.67 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.11-2.04 (m, 2H), 1.94 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.17 (s, 9H). Diasterómero minoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 7.36-7.28 (m, 2H), 7.22-7.12 (m, 4H), 7.20 (s, 1H), 6.99-6.97 (m, 2H), 5.63 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 4.47 (s, 1H), 2.83-2.67 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.11-2.04 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.21 (s, 9H). Mezcla diasteromérica: ^{13}C -NMR: δ = 166.5, 166.3, 162.3, 162.1, 152.3, 152.1, 145.7, 143.8, 143.4, 137.6, 132.8, 130.1, 129.2, 128.8, 128.1, 122.0, 121.6, 119.2, 118.9, 117.7, 117.4, 78.3, 78.1, 74.1, 51.3, 28.8, 28.5, 21.0, 20.8, 20.5, 20.4, 20.2, 13.0, 12.6, 12.4, 12.3, 11.4, 11.3. MS(IE, 70eV): $m/z(\%)$ = 603 (M^+ , 6), 556(52), 514(19), 205(100), 133(81), 91(21), 57(26). HRMS-FAB: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{34}H_{41}N_3O_7$: 603.2945, encontrado: 603.2934.

***N*-(1-(*tert*-butilaminocarbonil)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metil)-*N*-(4-metilfenil)-3-(5-óxido-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-4-il)oxifenilcarboxamida (15b).** Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**15b**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (50%), P.F. 60-62 °C. Diasterómero mayoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 8.09-8.04 (m, 2H), 7.84-7.75 (m, 1H), 7.69-7.62 (m, 2H), 7.26-6.97 (m, 8H), 6.90 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 2.82-2.66 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.10-2.04 (m, 2H), 1.92 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.17 (s, 9H). Diasterómero minoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 8.09-8.04 (m, 2H), 7.84-7.75 (m, 1H), 7.69-7.62 (m, 2H), 7.26-6.97 (m, 8H), 6.88 (s, 1H), 5.60 (s, 1H), 4.43 (s, 1H), 2.82-2.66 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.10-2.04 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.22 (s, 9H). Mezcla diasteromérica: ^{13}C -NMR: δ = 170.7,

166.2, 158.0, 151.6, 145.7, 143.7, 138.5, 137.9, 137.8, 136.7, 165.9, 130.9, 129.8, 129.3, 129.0, 128.6, 126.7, 121.9, 121.7, 120.5, 120.1, 117.6, 110.6, 78.1, 77.2, 68.3, 30.1, 29.3, 28.8, 28.5, 20.9, 20.8, 20.1, 19.2, 12.9, 12.3, 11.4. HRMS: m/z $[M+Na]^+$ calculado para $C_{41}H_{44}N_4O_9SNa$: 791.2727, encontrado: 791.2722.

***N*-(1-(*tert*-butilaminocarbonil)-1-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)metil)-*N*-(4-metilfenil)-fenilcarboxamida (15c).** Este compuesto se obtuvo mediante el método A. El crudo fue purificado a través de columna cromatográfica (hexano: AcOEt, 7:3) para obtener el producto deseado (**15c**) como un sólido blanco en una mezcla diasteromérica 1:0.5 (54%), P.F. 80-82 °C. Diasterómero mayoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 7.32-7.21 (m, 3H), 7.17-7.09 (m, 4H), 7.08 (s, 1H), 6.90 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.82 (s, 1H), 2.82-2.66 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.11-2.05 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.17 (s, 9H). Diasterómero minoritario: 1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 7.32-7.21 (m, 3H), 7.17-7.09 (m, 4H), 7.04 (s, 1H), 6.98 (d, $J=8$ Hz, 2H), 5.66 (s, 1H), 2.82-2.66 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.11-2.05 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.20 (s, 9H). Mezcla diasteromérica: ^{13}C -NMR: δ = 172.5, 171.7, 166.7, 166.4, 145.6, 137.2, 136.4, 136.1, 134.0, 133.6, 131.2, 130.2, 129.1, 129.0, 128.8, 127.5, 122.0, 121.6, 119.2, 119.0, 117.7, 78.1, 68.2, 51.2, 51.0, 31.7, 28.5, 22.7, 21.0, 20.8, 20.2, 13.0, 12.3, 11.4, 11.3. HRMS: m/z $[M+Na]^+$ calculado para $C_{33}H_{40}N_2O_4Na$: 551.2886, encontrado: 551.2888.

6.2 Biología

6.2.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular humana de cáncer de mama T-47D (ATCC, HTB-133) se cultivó en RPMI 1640 complementado con FCS inactivado por calor al 10% (v / v). Las células similares a monocitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202, EE. UU.) Se mantuvieron en RPMI 1640, GlutaMAX suplementado con FBS al 10%, β -mercaptoetanol 0,05 mM, estreptomycin 100 mg / L y penicilina 100 UI / ml. Las líneas celulares de tumores sólidos humanos HBL-100, HeLa, SW1573 y WiDr fueron un amable obsequio del Prof. G. J. Peters (Centro Médico VU, Amsterdam, Países Bajos). Las células se cultivaron en RPMI 1640 complementado con FCS inactivado por calor al 5% y L-glutamina 2 mM. Todas las células se propagaron de forma rutinaria en botellas de cultivo de 25 cm² a 37 ° C, 5% de CO₂, 95% de humedad, hasta alcanzar aproximadamente un 70% de confluencia. Posteriormente, las células se tripsinizaron, se ajustó la concentración y se utilizaron para los diferentes experimentos. Para todos los ensayos descritos, las células se cultivaron durante menos de veinte pasajes.

6.2.2 Actividad Antiproliferativa

Todos los compuestos sintetizados se analizaron para determinar la actividad antiproliferativa contra las líneas celulares HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr utilizando el ensayo SRB.^{225,}
²²⁶ Las células en crecimiento exponencial se tripsinizaron y se resuspendieron en medio que contenía antibiótico (100 unidades de penicilina G y 0,1 mg de estreptomycin por ml). Posteriormente se contaron las suspensiones de células individuales que mostraban una viabilidad > 97% determinada por exclusión del colorante azul tripán. Después del recuento, se hicieron diluciones para dar las densidades celulares apropiadas para la inoculación en placas de 96 pocillos. Las células se inocularon en un volumen final de 100 μ l por pocillo a densidades de 10000 (HBL-100, HeLa y SW1573), 15000 (T-47D) y 20000 (WiDr) células por pocillo, según sus tiempos de duplicación. Los compuestos se disolvieron inicialmente en DMSO a 400 veces la concentración de prueba máxima final deseada. Las células de control se expusieron a una concentración equivalente de DMSO (0,25% v / v, control negativo). Cada agente se probó por triplicado a diferentes diluciones en el intervalo de 1 a 100 μ M. El

tratamiento farmacológico comenzó el día 1 después de la siembra. Los tiempos de incubación del fármaco fueron de 48 h, después de lo cual las células se precipitaron con 25 ml de TCA helado (50% p / v) y se fijaron durante 60 min a 4°C. Luego se realizó el ensayo SRB.^{225, 226} La densidad óptica (DO) de cada pocillo se midió a 492 nm, utilizando el lector de microplacas de absorbancia PowerWave XS de BioTek. Los valores se corrigieron para la DO de fondo de los pocillos que solo contenían medio. Se utilizaron como controles positivos los fármacos anticáncer estándar cis-platino y etopósido.

6.2.3 Estudios de citotoxicidad

Se sembraron células THP-1 (1×10^5 células / pocillo) en microplacas de 96 pocillos con 100 μ L de medio RPMI suplementado con suero fetal y se añadió éster de forbol al medio de cultivo (200 nM) para inducir la diferenciación de macrófagos. Se permitió que las células se unieran durante 48 hs en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂, 95% de aire a 37°C y, luego, se expusieron a compuestos (1-100 μ M) durante 48 hs. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular midiendo la reducción dependiente de mitocondrias de MTT a formazán. Para ello, se añadió MTT a las células hasta una concentración final de 0,5 mg / mL y las células se incubaron a 37°C durante 1 h. Después de retirar el medio, se disolvieron cristales de formazán en isopropanol y se leyó la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro de microplacas. Los resultados se expresan como CE₅₀ (concentración de compuesto que redujo 50% la absorbancia de control a 570 nm). Cada CE₅₀ es el promedio de al menos tres determinaciones.

Las células HaCaT se sembraron en una placa de 96 pocillos a densidades de 10×10^3 por pocillo con medio Eagle modificado de Dulbecco, complementado con FBS al 10% y penicilina-estreptomina al 1%, y se dejó adherir durante 24 h en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, a 37 °C. Las células HaCaT fueron amablemente proporcionadas por la Sección de Virología de la Facultad de Ciencias, UdelaR (Montevideo, Uruguay). Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se agregaron los compuestos solubilizados en DMSO a las concentraciones finales deseadas (0,78-100,0 μ M) diluidos en medio de cultivo fresco (volumen final de 200 μ L) por triplicado. En cada experimento se incluyeron controles con medio y DMSO al 0,25%. Las células se incubaron adicionalmente a 37 °C y CO₂ al 5% durante 48 h. Después de la incubación del compuesto, se desechó el medio de cultivo que quedaba

en la placa de pocillos múltiples, se lavó cada pocillo con 200 μ l de PBS a temperatura ambiente y se fijaron las células y se realizó el ensayo SRB. La CE_{50} se determinó como la concentración que reduce la absorbancia al 50% en comparación con el DMSO al 1% de control y se determinó mediante análisis de regresión lineal. Cada ensayo se reprodujo al menos tres veces.

6.2.4 Ensayo de apoptosis

Se utilizaron células T-47D y THP-1 para estudios de apoptosis. Las células en las etapas temprana y tardía de la apoptosis se detectaron mediante tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP). Las células se sembraron en placas de 12 pocillos (100000 células / pocillo) y se cultivaron durante 24 h. Los compuestos **9d**, **10a**, **8a** y **9a** se añadieron a una concentración final de 4.2; 3.5; 4.6; y 5.3 μ M, respectivamente, en medio sin suero y las células se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 24 h (DMSO al 0,1% (v / v) utilizó como control del vehículo). Se recogieron las células en el sobrenadante y las células tripsinizadas, se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en buffer de Anexina V (HEPES 25 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4, albúmina de suero bovino al 0,1% (v / v)). Para 100 mL de suspensión celular, se agregaron 2.5 mL de Anexina V-FITC y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 2 ml de IP (250 mg/mL) antes del análisis. Las muestras se adquirieron en un analizador Cyan ADP (Beckman Coulter, EE.UU.) equipado con láser de 488 nm. Las emisiones de fluorescencia se detectaron utilizando filtros de paso de banda 530/40 y 613/20. Para cada muestra, se registraron 10000 recuentos controlados en un diagrama de puntos de dispersión directa (FSC) versus dispersión lateral (SSC), excluyendo los dobletes. Se utilizó el software Summit v4.3 para la adquisición de datos y FlowJovX.0.7 para el análisis de datos. El cambio de veces se calculó como la relación entre el porcentaje de células positivas de Anexina V para la muestra tratada y el control no tratado.

6.2.5 Análisis del ciclo celular

Para el análisis del ciclo celular, las células se cultivaron en una botella de cultivo de 25 cm². El contenido de ADN en las fases G1 / G0, S, G2 / M del ciclo celular se analizó mediante

citometría de flujo. Las células se sembraron (400000 células / mL) en botellas de cultivo de 25 cm², se cultivaron durante 24 hs y luego se trataron con el compuesto **10a** a 3,5 µM durante 48 h. Luego, las células se recolectaron, se lavaron con PBS, se fijaron y se permeabilizaron con etanol helado al 70% durante más de 2 h. Posteriormente, las células se resuspendieron en un buffer de tinción reciente (concentración final de 50 µg/mL de IP y 50 µg/ml de ARNasa sin ADNasa preparada en PBS que contenía EDTA 2 mM) y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Distribución del ciclo celular: El análisis se realizó en un citómetro de flujo CyAn™ ADP utilizando el software Summit v4.3 para la adquisición de datos. Para cada muestra, los agregados celulares se separaron y se contaron y representaron al menos 10000 células en un histograma de un solo parámetro. A continuación, se calculó el porcentaje de células en las fases G0 / G1, S, G2 / M y el pico sub-G1 mediante el software FlowJo 7.6 (utilizando el modelo Watson).

6.2.6 Liberación de óxido nítrico

La línea celular HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino) se cultivó en MEM, complementado con FBS al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%. Los cultivos celulares se mantuvieron bajo una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37 °C. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a densidades de 10 x 10³ por pocillo y se dejaron adherir durante 24 hs en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37 °C. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron los compuestos solubilizados en DMSO a las concentraciones finales deseadas (100 µM) diluidos en medio de cultivo fresco (volumen final 200 µL) por triplicado, se incluyeron controles con medio y DMSO al 0.25% en cada experimento. Las células se incubaron adicionalmente a 37 °C y 5% de CO₂, la producción de NO se midió como el contenido de nitrito en el medio de cultivo a las 3 y 6 hs mediante la reacción de Griess. Para desarrollar este ensayo, se transfirieron 50 µL de medio de cultivo a una nueva placa multipocillo. Al mismo tiempo, se realizó una curva de referencia con NaNO₂ a diluciones seriadas entre 0 y 100 µM en 50 µL de medio de cultivo. Luego, se agregaron 50 µL de solución de sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5% a cada pocillo y se incubaron durante 10 min protegidos de la luz. Después de eso, se agregaron 50 µL de diclorhidrato de *N*-1-naftiletildiamina al 0.1% en agua y se incubaron durante otros 10 minutos en la oscuridad.

La absorbancia se midió a 540 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (espectrofotómetro de microplacas Flash Varioskan; Thermo Fisher, Vantaa, Finlandia). Los niveles de NO se determinaron en al menos tres experimentos independientes usando la curva estándar de nitrato. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA).

6.2.7 Actividad antiproliferativa en presencia de hemoglobina

Para investigar la contribución del NO a la actividad antiproliferativa de los compuestos estudiados, probamos su efecto sobre el crecimiento de la línea celular de cáncer HeLa en ausencia y presencia de Hb. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos y al día siguiente, se pretrataron con Hb (0, 25 o 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$) durante 1 h y luego se trataron con 25 μM de los compuestos seleccionados durante 48 hs. Posteriormente, se descartó el medio de cultivo y las células se fijaron con una solución de MeOH-AcOH, seguido del ensayo SRB. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza bidireccional (ANOVA).