

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“DISEÑO, SÍNTESIS, EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA Y
RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE COMPUESTOS
PIRIMIDOISOQUINOLINQUINÓNICOS COMO
ANTIBACTERIANOS FRENTE A BACTERIAS GRAM
POSITIVO”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctor en Farmacología por:**

JUAN ANDRÉS ANDRADES LAGOS

Directores de Tesis:

**Dr. Hernán Pessoa Mahana
Dr. David Vásquez Velásquez**

Santiago-CHILE

2019

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

JUAN ANDRÉS ANDRADES LAGOS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Hernán Pessoa Mahana

Dr. David Vásquez Velásquez

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Vargas M. (Presidente)

Dr. Luis Mercado V.

Dra. Carlos Santiviago C.

Dr. Gonzalo Recabarren G.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Celmira y Juan, por el apoyo incondicional, paciencia, apoyo y el confiar ciegamente en mí y mis proyectos. Los amo, les estaré eternamente agradecido de todos los esfuerzos y sacrificios que han hecho para que yo pudiera lograr mis diferentes metas y anhelos.

A mis hermanos, Alicia y Mauricio, por su apoyo, confianza y constante preocupación, los quiero montones y me alegro poder compartir a diario con ustedes.

A Camila, por acompañarme a lo largo de este camino, por ser paciente y entender lo difícil de esta vocación. Por comprender las horas de trabajo y entregarme el apoyo cuando el camino fue difícil. Por tu alegría y amor. Sin lugar a dudas, este logro y quien soy hoy en día son, en gran medida, resultado de mi trabajo y del tuyo.

A mis abuelitos, tíos, primos y amigos cercanos por estar pendientes de mí, por sus llamadas o mensajes, por brindarme alegrías, apoyo y cariño. Perdón que no los nombre a todos, pero son muchos y no quiero olvidar a ninguno.

Al profesor David Vásquez, por creer en mí y en este proyecto. Por atreverse a tomar una responsabilidad que en su momento no era necesaria. Por todo el tiempo invertido en mi formación, como profesional y persona. Por sus consejos, compañía y por haberme permitido volar cada vez que quise emprender con algún plan o propósito que iba más allá de la investigación realizada. Le agradezco, además, el haber comprendido que necesitaba tiempos distintos en esta etapa de mi vida. Sin lugar a dudas hoy no me voy de la universidad solo con un tutor, sino también con un amigo.

Al profesor Hernán Pessoa por su apoyo a lo largo de todos estos años en que he sido alumno de la facultad, por sus consejos y por entregarnos su ayuda en este proyecto de doctorado.

A los miembros de la comisión evaluadora de tesis, profesores Sergio Vargas, Luis Mercado, Gonzalo Recabarren y Carlos Santiviago, por su tiempo, consejos, críticas constructivas y retroalimentación al trabajo realizado. Sin lugar a dudas sus comentarios y sugerencias ayudaron a mejorar este trabajo y fortalecieron mi formación profesional.

A los profesores Fanny Guzmán y Jaime Mella, por haber invertido su tiempo y recursos en mi formación profesional.

A Javier, mi amigo y colega incondicional, por todos los buenos momentos, por estar en los malos, por hacer más llevadero este camino y compartir de buena manera esta pasión que ambos tenemos.

A Fernanda y Julia, por su cariño, preocupación y permitirme seguir siendo parte de sus vidas a lo largo de estos años en donde ya no nos vemos tan frecuentemente.

A mis compañeros de doctorado, por su buena onda, compañía y amistad.

A mis alumnos de unidad de investigación y América, y todos aquellos que han pasado por el laboratorio de Desarrollo de Fármacos, por su trabajo e inquietudes, las cuales sin dudas fueron entregándome experiencia en otro ámbito de mi formación.

A José Riquelme, y en su nombre a cada técnico, auxiliar y trabajador de esta universidad, que con su trabajo apoyaron a mi formación. Ayuda que es genuina y realizada sin esperar retribución.

A CONICYT por la beca de doctorado y financiamiento otorgado.

Y a todos aquellos, que de alguna u otra manera aportaron a este proyecto, estuvieron pendiente de mi o apoyaron a mi formación académica y profesional.

FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta tesis doctoral ha sido financiado gracias al Proyecto FONDECYT N°11110516 (dirigido por el Dr. David Vásquez V.), al Proyecto FONDECYT 1130185 (dirigido por el Dr. Hernán Pessoa M.) y a la Beca CONICYT N° 21130628 de Doctorado Nacional.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| TABLA DE CONTENIDOS..... | 6 |
| TABLA DE ABREVIATURAS..... | 9 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 11 |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 13 |
| RESUMEN..... | 16 |
| ABSTRACT..... | 18 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 20 |
| II. HIPÓTESIS..... | 31 |
| III. OBJETIVOS..... | 31 |
| i. OBJETIVO GENERAL..... | 31 |
| ii. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 31 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 33 |
| 1. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS QUINÓNICOS Y PEPTÍDICOS..... | 33 |
| 1.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y CARACTERIZACIÓN..... | 33 |
| 1.2 MÉTODOS..... | 34 |
| 1.2.1 ESTUDIO DE SÍNTESIS DE COMPUESTOS QUINÓNICOS..... | 34 |
| 1.2.2 ESTUDIO DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS..... | 35 |
| 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA..... | 37 |
| 2.1 MATERIALES Y EQUIPOS..... | 37 |
| 2.2 BACTERIAS..... | 37 |
| 2.3 MÉTODOS..... | 38 |
| 2.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA..... | 38 |
| 2.3.2 ENSAYO DE SINERGIA..... | 38 |
| 3. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD CELULAR DE COMPUESTOS QUINÓNICOS..... | 39 |
| 3.1 MATERIALES Y EQUIPOS..... | 39 |
| 3.2 MÉTODOS..... | 40 |
| 4. CÁLCULOS TEÓRICOS..... | 40 |
| 5. GENERACIÓN DE MÉTODOS 3D-QSAR..... | 40 |
| 5.1 SELECCIÓN Y ALINEAMIENTO DE LOS CONFÓRMEROS..... | 40 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5.2 | SELECCIÓN DEL CONJUNTO DE DATOS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA..... | 41 |
| 5.3 | CÁLCULOS DE CAMPO CoMFA Y CoMSIA..... | 45 |
| 5.4 | VALIDACIÓN INTERNA Y ANÁLISIS DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES..... | 46 |
| 5.5 | VALIDACIÓN EXTERNA..... | 46 |
| V. | RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 47 |
| 1. | DISEÑO..... | 47 |
| i. | Gráfica de Craig..... | 49 |
| ii. | Cambio bioisostérico..... | 50 |
| iii. | Free Wilson..... | 50 |
| iv. | Estudio por homología..... | 50 |
| 2. | FREE-WILSON – RESULTADOS..... | 52 |
| 3. | SÍNTESIS DE COMPUESTOS QUINÓNICOS..... | 53 |
| 4. | DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS COMPUESTOS QUINÓNICOS..... | 61 |
| 5. | RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD..... | 64 |
| 5.1. | ESTUDIO DE LA CARACTERÍSTICA DEL SUSTITUYENTE EN POSICIÓN 4' DEL ANILLO AROMÁTICO..... | 64 |
| 5.2. | ANÁLISIS DEL GRÁFICO DE CRAIG EN FUNCIÓN A LA CIM..... | 65 |
| 5.3. | ANÁLISIS DE LA REFRACTIVIDAD MOLAR EN FUNCIÓN A LA CIM..... | 67 |
| 5.4. | CAMBIO BIOISOSTÉRICO: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL HETEROÁTOMO CONECTOR EN LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA..... | 68 |
| 5.5. | FREE WILSON..... | 71 |
| 5.6. | ESTUDIO POR HOMOLOGÍA..... | 72 |
| 5.6.1 | INFLUENCIA DEL DISTANCIAMIENTO DEL ÁTOMO DE AZUFRE Y EL ANILLO AROMÁTICO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA..... | 73 |
| 5.6.2 | ADICIÓN DE TIOLES ALQUÍLICOS AL NÚCLEO QUINÓNICO.... | 74 |
| 5.6.3 | REDUCCIÓN DE LA CADENA ETILO EN POSICIÓN 6 DEL NÚCLEO QUINÓNICO..... | 75 |
| 5.7 | ADICIÓN DE SUSTITUYENTES EN POSICIÓN 9 DEL NÚCLEO QUINÓNICO..... | 77 |
| 5.8 | DESAFIO DEL MODELO..... | 78 |
| 6. | DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD CELULAR DE LOS COMPUESTOS QUINÓNICOS SINTETIZADOS..... | 81 |
| 7. | ESTUDIOS 3D-QSAR CoMFA Y CoMSIA..... | 86 |
| 8. | PÉPTIDOS CATIÓNICOS ANTIBACTERIANOS..... | 103 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 8.1 | ¿POR QUÉ PÉPTIDOS CATIÓNICOS ANTIBACTERIANOS?..... | 103 |
| 8.2 | DISEÑO..... | 104 |
| 8.3 | SÍNTESIS DE PÉPTIDOS..... | 105 |
| 8.4 | EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS PÉPTIDOS SÍNTETIZADOS..... | 106 |
| 9. | EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONJUNTA DE COMPUESTOS QUINÓNICOS Y Pep8..... | 108 |
| VI. | CONCLUSIONES..... | 111 |
| VII. | PROYECCIONES..... | 112 |
| VIII. | REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS..... | 113 |
| IX. | PARTE EXPERIMENTAL | 121 |

TABLA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|--|
| ¹H RMN | Resonancia Magnética Nuclear de Protones. |
| ¹³C RMN | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13. |
| 3D-QSAR | <i>Three - Dimensional Quantitative Structure Activity Relationship</i> (Relación Estructura – Actividad Cuantitativa Tridimensional). |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo). |
| CCF | Cromatografía en Capa Fina. |
| CDCl₃ | Cloroformo deuterado. |
| CFI | Concentración fraccionaria inhibitoria. |
| CH₂Cl₂ | Diclorometano. |
| cFW | Coefficiente de Free-Wilson. |
| CIM | Concentración Inhibitoria Mínima. |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio). |
| CoMFA | <i>Comparative Molecular Field Analysis</i> (Análisis comparativo de campos moleculares). |
| CoMSIA | <i>Comparative Molecular Similarity Index Analysis</i> (Análisis comparativo de índice de similitud). |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> . |
| DMF | <i>N,N</i> -dimetilformamida. |
| DMSO | Dimetilsulfóxido. |
| DMSO-d₆ | Dimetilsulfóxido deuterado. |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> . |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> . |
| <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus faecium</i> . |
| Eq. | Equivalente. |
| <i>et. al</i> | Del latín “y otros”. |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> (Administración de alimentos y medicamentos). |
| FW | Free-Wilson. |
| HCl | Ácido clorhídrico. |
| <i>K. pneumoniae</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> . |

| | |
|-----------------------------|---|
| LOO | <i>Leave-One-Out</i> (dejando uno fuera). |
| MMFF94 | <i>Merck Molecular Force Field 94</i> (Campos de fuerza molecular Merck 94). |
| MTT | 3-(4,5-dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. |
| OMS | Organización Mundial de la Salud. |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . |
| pCIM | -log (Concentración Inhibitoria Mínima). |
| P.f. | Punto de fusión. |
| PLS | <i>Partial Least Squares</i> (Mínimos cuadrados parciales). |
| ppm | Partes por millón. |
| QSAR | <i>Quantitative Structure Activity Relationship</i> (Relación Estructura-Actividad Cuantitativa). |
| RM | Refractividad Molar. |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> . |
| SARM | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina. |
| SASM | <i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina. |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio. |
| SPFS | Síntesis de Péptidos en Fase Sólida. |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias. |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cronología de fármacos antibacterianos aprobados en la última década..... | 27 |
| Tabla 2. Compuestos empleados en estudios QSAR y valores de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y pCIM (mol/L)..... | 43 |
| Tabla 3. Parámetros estadísticos y valores umbrales para validación de modelos QSAR. | 46 |
| Tabla 4. Estructura prototipo utilizada para el diseño de nuevos compuestos y discusión de resultados. | 48 |
| Tabla 5. Resultados obtenidos para el análisis de FW..... | 52 |
| Tabla 6. Compuestos escogidos a partir del análisis de Free-Wilson. | 53 |
| Tabla 7. Preparación one-pot de las quinonas 5 , 6 y 7 | 54 |
| Tabla 8. Resultados de actividad antibacteriana de los compuestos quinónicos. | 62 |
| Tabla 9. CIM de los compuestos analizados agrupados en función al carácter hidrofóbico del sustituyente. | 66 |
| Tabla 10. CIM de los compuestos analizados agrupados en función del volumen del sustituyente..... | 67 |
| Tabla 11. Resumen de resultados de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los derivados 8 , 9 , 10 y 11 | 68 |
| Tabla 12. Resultados de CIM de los derivados anilínicos y tiofenólicos. | 69 |
| Tabla 13. Análisis de distancias y ángulos de enlace de los compuestos anilínicos y tiofenólicos..... | 71 |
| Tabla 14. Valores de CIM de los compuestos diseñados a través del análisis de FW. | 72 |
| Tabla 15. Resultados del estudio por homología en bacterias Gram positivo..... | 73 |
| Tabla 16. Compuestos empleados para el segundo estudio por homología y resultados de CIM de ambas series..... | 75 |
| Tabla 17. Comparación de actividad antibacteriana de compuestos 6-etilo y 6-metilo..... | 76 |
| Tabla 18. Comparación de actividad antibacteriana de compuestos 6-sustituidos..... | 77 |
| Tabla 19. Resultados de actividad antibacteriana de compuestos mono-adicionados (P1 , P3 y 39) y di-adicionados (P18 , P19 y P20). | 77 |
| Tabla 20. Resultados de CIM de compuestos 4'-sustituidos ordenados en función al carácter hidrofóbico del sustituyente. | 78 |
| Tabla 21. Gráficas de viabilidad celular de células N2a post exposición aguda de los compuestos quinónicos y vancomicina. | 83 |
| Tabla 22. Gráficas de viabilidad celular de células SH-SY5Y post exposición aguda de los compuestos quinónicos y vancomicina. | 84 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 23. Porcentaje de viabilidad celular en SH-SY5Y (izquierda) y N2a (derecha) expuestas a diferentes compuestos a sus respectivos valores de CIM en $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h. X: CIM (concentración inhibitoria mínima)..... | 85 |
| Tabla 24. Resultados estadísticos para modelos QSAR generados..... | 89 |
| Tabla 25. Resultados validación externa modelos QSAR..... | 90 |
| Tabla 26. Valores de pCIM experimental y predichos, y valores residuales para compuestos analizados en estudios CoMFA y CoMSIA..... | 91 |
| Tabla 27. Péptidos propuestos para el estudio..... | 105 |
| Tabla 28. Resultados de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los péptidos sintetizados..... | 107 |
| Tabla 29. Resultados de la actividad antibacteriana combinada de 28 y Pep8 sobre distintas bacterias ATCC..... | 109 |
| Tabla 30. Resultados de la actividad antibacteriana combinada de 29 y Pep8 sobre distintas bacterias ATCC..... | 109 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cronología de la introducción de nuevas familias de antibacterianos..... | 21 |
| Figura 2. Factores que afectan la inversión y desarrollo de nuevos antibacterianos. | 22 |
| Figura 3. Cronología de la introducción de fármacos antibacterianos (arriba) y su primer reporte de resistencia (abajo). | 23 |
| Figura 4. Número de muertes atribuibles a la resistencia a agentes antibacterianos comparado con las principales causas de muerte..... | 24 |
| Figura 5. Listado de patógenos prioritarios según la OMS..... | 26 |
| Figura 6. Ejemplo de diferentes núcleos quinónicos. | 28 |
| Figura 7. Representación de la reacción de naftoquinona con un nucleófilo. | 28 |
| Figura 8. Compuestos quinónicos obtenidos desde fuentes naturales. A: langcoquinonas; B: shikoina; C: plumbagina; D: juglona..... | 29 |
| Figura 9. Estructura general de los compuestos previamente publicados. Negro: núcleo pirimidoisoquinolinquinona; azul: anillo tiofenólico. | 30 |
| Figura 10. Esquema de procedimientos generales empleados..... | 34 |
| Figura 11. Representación de la placa de ensayo. X: compuesto a evaluar 1; Y: compuesto a evaluar 2; AC: antibiótico control; CC: control de crecimiento; CE: control de esterilidad; c: concentración inicial..... | 38 |
| Figura 12. Resultado del alineamiento de confórmers en estudio QSAR. A: núcleo de alineación; B: Estructuras superpuestas de todos los compuestos empleados en los modelos CoMFA y CoMSIA..... | 41 |
| Figura 13. Distribución de valores de pCIM de los compuestos empleados para estudios QSAR..... | 42 |
| Figura 14. Gráfica de Craig. Extraído y modificado desde “An introduction to Medicinal Chemistry” | 49 |
| Figura 15. Resumen de modificaciones estructurales propuestas y las estrategias de diseño propuestas..... | 52 |
| Figura 16. Esquema general de síntesis del núcleo quinónico. | 53 |
| Figura 17. Probable curso de formación de la quinona 5 a partir de 1 y 4 | 54 |
| Figura 18. Esquema general de obtención de compuestos objetivo a través de los procedimientos generales empleados..... | 55 |
| Figura 19. Esquema general de obtención de compuestos tioariles (izquierda) y tioalquiles (derecha). | 56 |
| Figura 20. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 60 | 56 |
| Figura 21. Núcleo fenantridin-7,10-quinonas, 6-H y 6-Me estudiadas por Valderrama et al. | 57 |
| Figura 22. Regioselectividad en la reacción con quinonas 5 (6-Et), 6 (6-Me) o 7 (6-H)..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Figura 23. Obtención de los compuestos 26 y 26a . | 58 |
| Figura 24. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 26 . | 59 |
| Figura 25. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 26a . | 59 |
| Figura 26. Esquema de obtención de los compuestos 17 y 10 . | 60 |
| Figura 27. Espectro ¹ H-RMN del compuesto 9 . | 61 |
| Figura 28. Esquema resumen de las estrategias utilizadas. | 65 |
| Figura 29. Distribución de los sustituyentes en función de su carácter hidrofóbico (arriba - amarillo) o electrónico (azul – abajo). | 66 |
| Figura 30. Conformaciones de mínima energía de los compuestos 4'-H y 4'-Br de ambas series. P1 : 4'-H-tiofenol; P4 : 4'-Br-tiofenol; 24 : 4'-H-anilina y 28 : 4'-Br-anilina. El núcleo pirimidoisoquinolinquinona de todas las estructuras se encuentra en el mismo plano para facilitar la comparación entre las conformaciones de los grupos 4'-R-aril-X. El nivel de cálculo utilizado fue DFT(B3LYP)/6-311++G(d,p). | 70 |
| Figura 31. Conformaciones de mínima energía de los compuestos estudiados. P1 : Bz-S-Quinona; 34 : Bz-CH ₂ -S-Quinona; 35 : Bz-CH ₂ -CH ₂ -S-Quinona, 37 : BT-S-Quinona, P3 : 4'-Cl-S-Quinona y 36 : 4'-Cl-CH ₂ -S-Quinona. El núcleo pirimidoisoquinolinquinona de todas las estructuras se encuentra en el mismo plano para facilitar la comparación entre los distintos sustituyentes. El nivel de cálculo utilizado para optimizar todas las estructuras fue DFT(B3LYP)/6-311++G(d,p). | 74 |
| Figura 32. Estructura química del compuesto 30 . | 80 |
| Figura 33. Resumen de la relación estructura-actividad de compuestos de núcleo pirimidoisoquinolinquinona. | 81 |
| Figura 34. Representación del cambio químico y de coloración que sufre el MTT por acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial. | 82 |
| Figura 35. A: Estructura común empleada como núcleo de alineamiento para modelos CoMFA y CoMSIA; B: Resultado del alineamiento de los compuestos superpuestos. Se observa que los anillos y heteroátomos conectores orientan de manera común con pequeñas variaciones individuales asociadas al sustituyente en cada uno de ellos. | 87 |
| Figura 36. Comparación del alineamiento de compuestos tiofenólicos y anilínicos. A: Compuestos P3 vs 28 ; B: Compuestos P4 vs 29 ; C: compuestos P3 y P4 vs 28 y 29 . | 88 |
| Figura 37. Representación de los compuestos dentro de la grilla de análisis junto a un átomo de prueba. | 88 |
| Figura 38. Modelo CoMFA total. Mapa alrededor de la molécula 29 . | 93 |
| Figura 39. CoMFA estérico: verde, área favorecida para sustituyentes voluminosos, amarillos, área desfavorecida para sustituyentes voluminosos. A: compuesto 15 ; B: compuesto 20 ; C: compuesto 29 ; D: compuesto 58 . | 94 |
| Figura 40. CoMFA electroestático: rojo, área favorecida para sustituyentes electro-atradores, azul, área favorecida para sustituyentes electro-donores. A: compuesto 15 ; B: compuesto 20 ; C: compuesto 29 ; D: compuesto 58 . | 95 |
| Figura 41. Modelo CoMSIA total. Mapa alrededor de la molécula 29 . | 96 |

| | |
|--|-----|
| Figura 42. CoMSIA estérico: verde, área favorecida para sustituyentes voluminosos, amarillos, área desfavorecida para sustituyentes voluminosos. A: compuesto 15 ; B: compuesto 20 ; C: compuesto 29 ; D: compuesto 58 | 97 |
| Figura 43. CoMSIA estérico: verde, área favorecida para sustituyentes voluminosos, amarillos, área desfavorecida para sustituyentes voluminosos. Mapa alrededor del compuesto P16 | 98 |
| Figura 44. CoMSIA electroestático: rojo, área favorecida para sustituyentes electro-atradores, azul, área favorecida para sustituyentes electro-dadores. A: compuesto 15 ; B: compuesto 20 ; C: compuesto 29 ; D: compuesto 58 | 99 |
| Figura 45. CoMSIA electroestático: rojo, área favorecida para sustituyentes electro-atradores, azul, área favorecida para sustituyentes electro-dadores. Mapa alrededor del compuesto P16 | 99 |
| Figura 46. CoMSIA hidrofóbico: amarillo, área favorecida para sustituyentes hidrofóbicos; plomo, área desfavorecida para sustituyentes hidrofóbicos. A: compuesto 15 ; B: compuesto 20 ; C: compuesto 29 ; D: compuesto 58 | 100 |
| Figura 47. CoMSIA hidrofóbico: amarillo, área favorecida para sustituyentes hidrofóbicos; plomo, área desfavorecida para sustituyentes hidrofóbicos. Mapas alrededor del compuesto 16 | 101 |
| Figura 48. CoMSIA aceptor de puente de hidrógeno: morado, área favorecida para sustituyentes aceptores de puente de hidrógeno; rojo, área desfavorecida para sustituyentes aceptores de puentes de hidrógeno. A: compuesto 15 ; B: compuesto 20 ; C: compuesto 29 ; D: compuesto 58 | 102 |
| Figura 49. Mecanismo acción de péptidos antibacterianos: A) Péptido en solución. B) Interacción electroestática de los péptidos con la membrana bacteriana. C) Integración de los péptidos y pérdida de grosor de la membrana externa. D) Formación de poro, liberación componentes intracelulares y muerte bacteriana. | 104 |
| Figura 50. Esquema general de síntesis de péptidos..... | 106 |

RESUMEN

La resistencia a agentes antibacterianos es un problema creciente de salud pública mundial, que afecta al tratamiento de las enfermedades infecciosas, reduciendo la eficacia de los antibacterianos disponibles, provocando un aumento de la mortalidad y morbilidad de los pacientes. De no generarse iniciativas innovadoras que busquen resolver este problema, se proyecta que, a nivel mundial, en el año 2050 habrá alrededor de 10 millones de muertes causadas por microorganismos resistentes, con costos estimados en 100 trillones de dólares. Lamentablemente, la industria farmacéutica ha ido dejando de lado la investigación en esta área lo que se refleja en la aprobación de solo 10 fármacos por la FDA, durante los últimos 10 años, ninguno de ellos con nuevos mecanismos de acción. Es por esto que se debe promover e incentivar el desarrollo de una mayor cantidad de compuestos antibacterianos, distintos a los ya conocidos.

Dentro de las familias de compuestos interesantes a investigar se encuentran los compuestos que poseen núcleos quinónicos, los cuales han demostrado tener un efecto antimicrobiano de amplio espectro. En esta línea, nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente la síntesis y evaluación antibacteriana de una serie de compuestos arilmercapto-pirimidoisoquinolinquinónicos, que demostraron ser activos frente a bacterias prototipo Gram positivo y aislamientos clínicos multirresistentes, mostrando ser hasta 128 veces más potente que vancomicina frente a aislamientos de *Enterococcus faecium* y sin actividad sobre bacterias Gram negativas. Además, no redujeron la viabilidad celular en células humanas ni animales. Estos resultados hacían necesario abordar el diseño desde una perspectiva racional para optimizar su actividad. En este trabajo se utilizaron diversas estrategias de diseño de fármacos que permitieron orientar la síntesis de nuevos compuestos y obtener información precisa de la relación estructura-actividad de esta familia. Se diseñaron y sintetizaron 55 nuevos compuestos quinónicos que presentaron actividad antibacteriana con CIM entre 64 y 0,5 µg/mL, en bacterias Gram positivo, donde los compuestos **28** y **29** mostraron ser los más activos. Destacable fue el resultado de los compuestos **17** y **33**, que presentaron actividad sobre *Klebsiella pneumoniae* con CIM de 64 µg/mL, una bacteria Gram negativa. Además, los compuestos **28** y **29**, no mostraron reducción en la viabilidad celular de manera significativa a concentraciones CIM en las líneas celulares N2a y SH-SY5Y.

Los modelos 3D-QSAR desarrollados demostraron robustez estadística y fueron validados tanto interna como externamente. El modelo CoMFA indicó que los parámetros electrónicos y estéricos modulan en un 52,3% y 47,7% la actividad antibacteriana, respectivamente. Por su parte, los mapas de contorno mostraron que las sustituciones voluminosas en posiciones 3' y 4' del anillo tiofenólico favorecen la actividad antibacteriana. Por otra parte, el modelo CoMSIA señaló que los parámetros electrónicos e hidrofóbicos son los principales moduladores de la actividad con contribuciones de un 42,7% y 32,9%, respectivamente. Los mapas de contorno CoMSIA, muestran que la actividad se ve favorecida con sustituciones hidrofóbicas y electrodonoras en la posición 4' del anillo tiofenólico, en cambio, para la posición 2' deben utilizarse sustituyentes electroattractores e hidrofílicos.

Finalmente, se sintetizaron 13 péptidos catiónicos dentro de los cuales, el **PEP8** presentó valores de actividad antibacteriana entre 64 y 256 ug/mL en un *screening* con bacterias prototipo Gram positivo y negativo. Estableciéndose en los estudios de sinergia entre los complementos **Pep8/Compuesto 28** y **Pep8/Compuesto 29**, características de indiferencia.

Estos resultados mostraron que los compuestos **28** y **29** tienen una clara proyección como compuestos líderes de esta familia, y la relación estructura-actividad cuali y cuantitativa, permitirán el posterior desarrollo de nuevos compuestos con mayor actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Resistance to antibacterial agents is a growing problem of global public health, which affects the treatment of infectious diseases, reducing the effectiveness of available antibacterials, causing an increase in mortality and morbidity of patients. If innovative initiatives that seek to solve this problem are not generated, it is projected that, worldwide, in the year 2050 there will be around 10 million deaths caused by resistant microorganisms, with costs estimated at 100 trillion dollars. Unfortunately, the pharmaceutical industry has been leaving research in this area which is reflected in the approval of only ten drugs by the FDA, during the last ten years, none of them with new mechanisms of action. Due to this is why it is necessary to promote and encourage the development of a greater quantity of antibacterial compounds, different from those already known.

Among the families of interesting compounds to investigate are the compounds that possess quinonic core, which have been shown to have a broad spectrum antimicrobial effect. In this line, our research group has recently published the synthesis and antibacterial evaluation of a series of arylmercapto-pirimidoisoquinolinquinónicos compounds, which proved to be active against Gram-positive prototype bacteria and multiresistant clinical isolates, showing to be 128 times more potent than vancomycin versus isolates of *Enterococcus faecium* and without activity on Gram-negative bacteria. Besides, they did not reduce cell viability in human or animal cells. These results made it necessary to approach the design from a rational perspective to optimize its activity. In this work, various drug design strategies were used to guide the synthesis of new compounds and obtain accurate information on the structure-activity relationship of this family. We designed and synthesized 55 new quinonic compounds that showed antibacterial activity with MIC between 64 and 0.5 $\mu\text{g/mL}$, in Gram-positive bacteria, where compounds **28** and **29** were the most active. Remarkable was the result of compounds **17** and **33**, which showed activity on *Klebsiella pneumoniae* with MIC of 64 $\mu\text{g/mL}$, a Gram-negative bacterium. Besides, compounds **28** and **29** showed no reduction in cell viability significantly at MIC concentrations in the N2a and SH-SY5Y cell lines.

The developed 3D-QSAR models demonstrated statistical robustness and were validated both internally and externally. The CoMFA model indicated that the electronic and steric parameters modulate the antibacterial activity in 52.3% and 47.7%, respectively. On the other hand, the contour maps showed that voluminous substitutions in positions 3' and 4' of the thiophenolic ring are favoring the antibacterial activity. On the other hand, the

CoMSIA model indicated that the electronic and hydrophobic parameters are the main modular of the activity with contributions of 42.7% and 32.9%, respectively. The CoMSIA contour maps show that the activity is favored with hydrophobic and electrodonal substitutions in the 4' position of the thiophenolic ring, however, for the 2' position, electroattractable and hydrophilic substituents must be used.

Finally, 13 cationic peptides were synthesized within which, **Pep8** presented values of antibacterial activity between 64 and 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in a screening with prototype Gram-positive and Gram-negative bacteria. Establishing itself in the studies of synergy that between the complements (peptide/compound) **Pep8/28** and **Pep8/29**, characteristics of indifference.

These results showed that compounds **28** and **29** have a clear projection as leading compounds in this family, and the qualitative and quantitative structure-activity relationship will allow the subsequent development of new compounds with better antibacterial activity.

I. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son compuestos que revolucionaron la medicina a partir de los años 40, ya que permitieron tratar infecciones mortales hasta esa fecha, y favoreciendo otros procesos médicos como cirugías, quimioterapias y el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos, aumentando la esperanza de vida a nivel mundial. El término antibiótico utilizado en este trabajo, será empleado de manera indistinta para señalar compuestos tanto de origen natural como sintético, siendo sinónimo del término antibacteriano.

Estos fármacos han sido exitosos debido a su efectividad y rapidez en el tratamiento de enfermedades infecciosas, relativa seguridad, administración mayoritariamente por vía oral y costo económico relativamente bajo, lo que ha permitido su amplio uso [1].

El inicio de la terapia con agentes antimicrobianos comenzó de manera fortuita, con el hallazgo de la penicilina [2]. Su posterior desarrollo, se orientó hacia la obtención de moléculas pequeñas extraídas desde productos naturales útiles en la práctica clínica. El éxito de este proceso, generó el interés de la industria farmacéutica por el desarrollo e investigación de este tipo de agentes, llevando a la generación de una Gran cantidad de familias de antibacterianos entre las décadas del 40 y 60, la que es conocida como la “era de oro de los antibióticos”. Durante estos años se obtuvieron diferentes grupos de antibacterianos como penicilinas, macrólidos, glicopéptidos o aminoglicósidos, lo que permitió a través de la optimización de los farmacóforos, ya sea por procesos sintéticos o semisintéticos, disponer de un amplio arsenal terapéutico de antibióticos clínicamente intercambiables [3], [4].

Posterior a la década de los 60, se produce la denominada “brecha en la innovación” debido a la drástica caída en la aprobación de nuevos fármacos, sin aprobaciones de moléculas con nuevos mecanismos de acción hasta el año 2003 con la introducción de linezolid (oxazolidinona) y posteriormente la de daptomicina (lipopéptido) **Figura 1**[3].

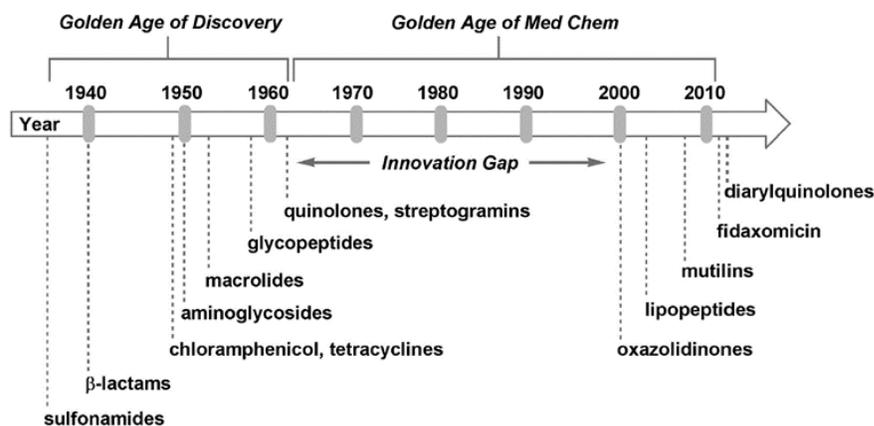


Figura 1. Cronología de la introducción de nuevas familias de antibacterianos.

Esta situación puede explicarse por el desinterés de la industria farmacéutica en investigar en esta área debido a que estos fármacos presentan una menor tasa de retorno económico a la investigación que otras drogas. Esto se debe a que, al ser terapias con intención curativa, generalmente económicas y de corta duración se tornan comercialmente menos atractivos para estas empresas que otros grupos farmacológicos como los empleados para tratar las enfermedades crónicas, los cuales controlan los síntomas de la enfermedad y son utilizados mayoritariamente de por vida [5]–[7].

Sumado a lo anterior, el menor retorno económico a la investigación que producen estos fármacos puede explicarse por otros motivos como:

- Estos fármacos presentan control en su dispensación y restricción del uso de nuevas moléculas limitando su empleo [8], [9].
- El término de patentes de propiedad intelectual y posterior aparición de formas genéricas promueve la competencia a nivel de mercado farmacéutico, disminuyendo los precios [6].
- El aumento de las exigencias por parte de la FDA para demostrar eficacia de nuevos agentes antibacterianos, hace necesario aumentar el tamaño de muestra y la duración de los estudios, lo que conlleva un aumento en los costos en investigación [10]. Asociado a esto, la aparición de efectos adversos graves ha provocado el retiro de fármacos del mercado, aumentando la incertidumbre en la investigación y los costos económicos para los laboratorios [11].

- Finalmente, la aparición de resistencia a estos fármacos de manera previa o poco tiempo después de que ellos salen al mercado provoca una disminución de su empleo y del retorno esperado [12].

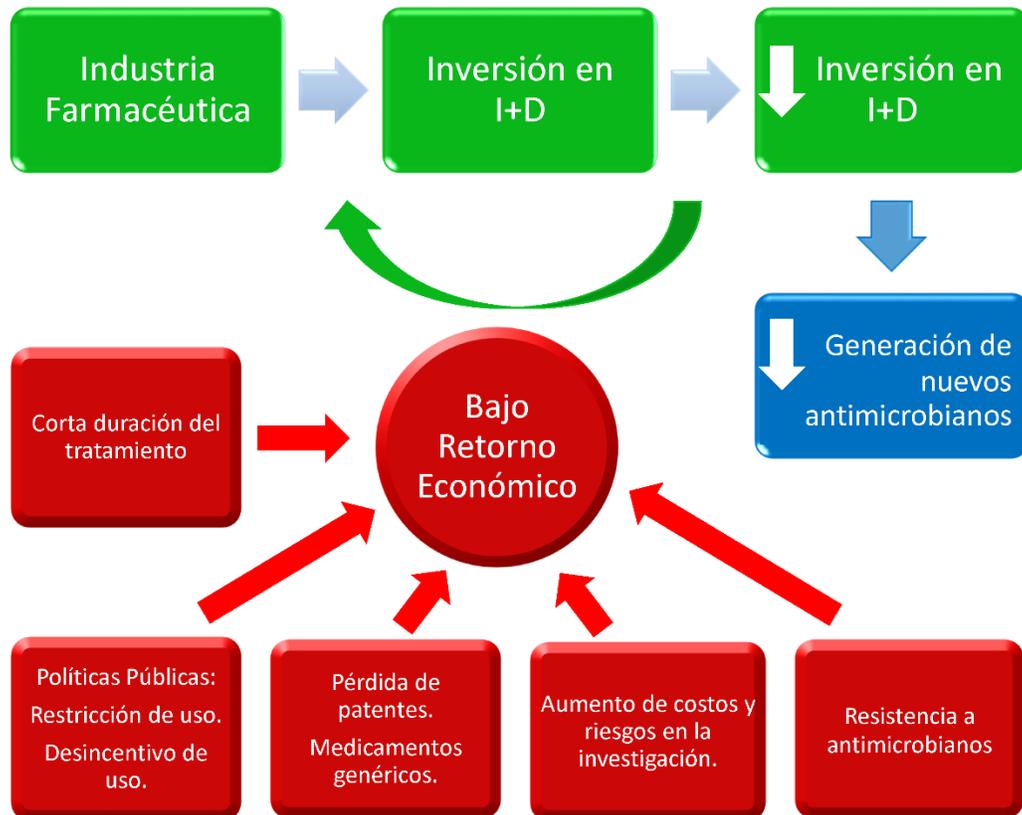


Figura 2. Factores que afectan la inversión y desarrollo de nuevos antibacterianos.

De esta forma, este grupo de fármacos, irónicamente, se vuelve víctima de su propio éxito, transformándose en nichos poco rentables para inversionistas y grandes compañías farmacéuticas [5].

Dada esta situación, la aparición de los llamados “nuevos antibacterianos” se ha basado en la modificación de compuestos ya existentes que tienen entre otros objetivos: ampliar el espectro antibacteriano, mejorar parámetros farmacocinéticos y/o mejorar la adherencia al tratamiento [13]. En la última década, solo 10 nuevos antibacterianos han sido aprobados ninguno de ellos con nuevos mecanismos de acción [12].

El proceso de optimización estructural es finito, lo que dificulta el descubrimiento de derivados estructurales activos frente a bacterias resistentes. Así, las nuevas versiones con modificaciones no farmacofóricas tendrán una alta probabilidad de presentar resistencia

análoga a la droga madre, con la consecuente pérdida de efectividad de estos compuestos [10], [14].

La carencia de nuevos antibacterianos se torna un problema, ya que, debido al uso y mal uso de los fármacos actualmente disponibles se promueve el fenómeno de la resistencia a agentes antibacterianos, el cual, históricamente ha venido de la mano del empleo de estos fármacos, **Figura 3** [15].

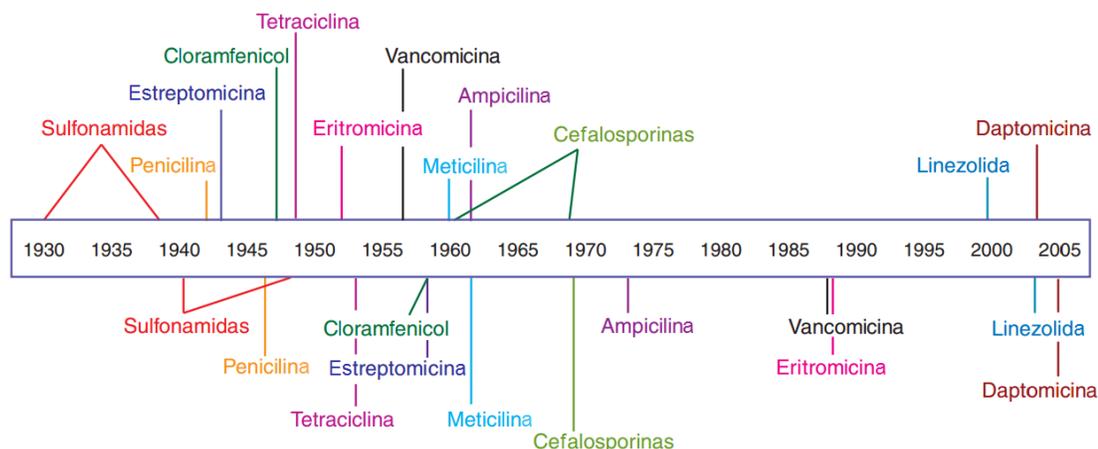


Figura 3. Cronología de la introducción de fármacos antibacterianos (arriba) y su primer reporte de resistencia (abajo).

Un ejemplo de esta situación fue la aparición de resistencia a la metilina, donde la identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM) fue realizada de forma casi inmediata a la introducción clínica de este fármaco [16].

Este problema creciente, afecta el tratamiento de enfermedades infecciosas, reduciendo la eficacia de los antibacterianos disponibles y provocando un aumento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes [17].

Hoy, la resistencia bacteriana es reconocida como un fenómeno multifactorial; en donde la prescripción inadecuada (uso en profilaxis e infecciones virales), uso inapropiado de antibióticos por pacientes (tratamientos incompletos o subdosificación), la automedicación y el aumento de viajes intercontinentales, que ha facilitado el intercambio y transmisión de genes de resistencia entre bacterias, agrava este problema. Sumado a lo anterior, el uso de antibióticos para promover el crecimiento de animales de cría para consumo, abre la posibilidad de seleccionar poblaciones de bacterias resistentes a estos agentes [18].

Esta situación es un problema de salud pública mundial, ya que al no haber iniciativas innovadoras que busquen resolver este problema, se proyecta que al año 2050 habrá alrededor de 10 millones de muertes causadas por microorganismos resistentes - superando el número de muertes causadas por cáncer - (**Figura 4**), con costos económicos estimados de 100 trillones de dólares debido al alto riesgo de contraer infecciones no tratables con los antibióticos actualmente disponibles, similar a lo que acontecía un siglo atrás [19].

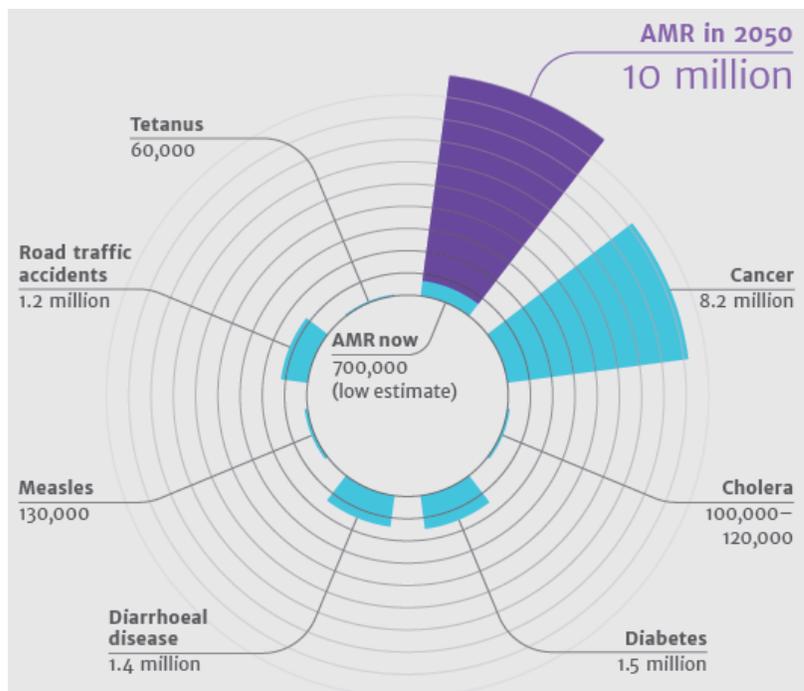


Figura 4. Número de muertes atribuibles a la resistencia a agentes antibacterianos comparado con las principales causas de muerte.

De esta forma, se establece un escenario desfavorable ya que cuando el aumento de la resistencia a agentes antibacterianos ha generado una necesidad crítica de desarrollo de nuevos fármacos, la industria farmacéutica ha ido abandonado la investigación en agentes anti-infecciosos, incluyendo agentes antibacterianos [20], [21].

Por estos motivos, se hace necesario establecer iniciativas que promuevan el uso eficiente de los fármacos actualmente disponibles e incentiven el desarrollo de nuevos compuestos, idealmente con mecanismos de acción novedosos, capaces de actuar, principalmente frente a bacterias resistentes.

Por esta razón el manejo de esta problemática ha buscado generar medidas en diferentes ámbitos de manera simultánea, como la reducción del uso de estos fármacos, evitar su empleo en animales e incentivar la investigación y desarrollo en esta área [22]. En

este último punto, la obtención y desarrollo de nuevos antibacterianos para uso humano, en los cuales no existan mecanismos de resistencia previos se torna esencial [1].

En el ámbito de la promoción del desarrollo de nuevas moléculas se han generado diferentes iniciativas. Una de ellas corresponde a la impulsada por la Sociedad Americana de enfermedades infecciosas, el año 2010, denominada iniciativa 10x20, la que busca alcanzar el desarrollo de 10 nuevos antibacterianos para el año 2020 [23].

Otras iniciativas son las que ha liderado la Organización Mundial de la Salud (OMS). Una de ellas, publicada en 2014, proporciona una revisión global sobre resistencia a agentes antibacterianos, entregando información de resistencia y sobrevida, con datos específicos por región, proyectando costos en salud y muertes asociadas a este problema. Además se clasificaron 7 bacterias de “interés internacional” dado su perfil de resistencia y extensión en diferentes regiones [17].

Como complemento a lo anterior, en el año 2017 se publicó un documento destinado a guiar el descubrimiento, investigación y desarrollo de nuevos antibacterianos, centrando su foco en un conjunto de patógenos denominados prioritarios. Esta lista estipula la necesidad urgente en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de tuberculosis, seguida de 3 categorías, denominadas de prioridad crítica, alta y media [24].

Dentro de la categoría de prioridad crítica se encuentran bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, enterobacterias (como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*) resistentes a carbapenémicos o cefalosporinas de tercera generación. Por otra parte, bacterias como *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y vancomicina son clasificados como patógenos de alta prioridad (**Figura 5**).

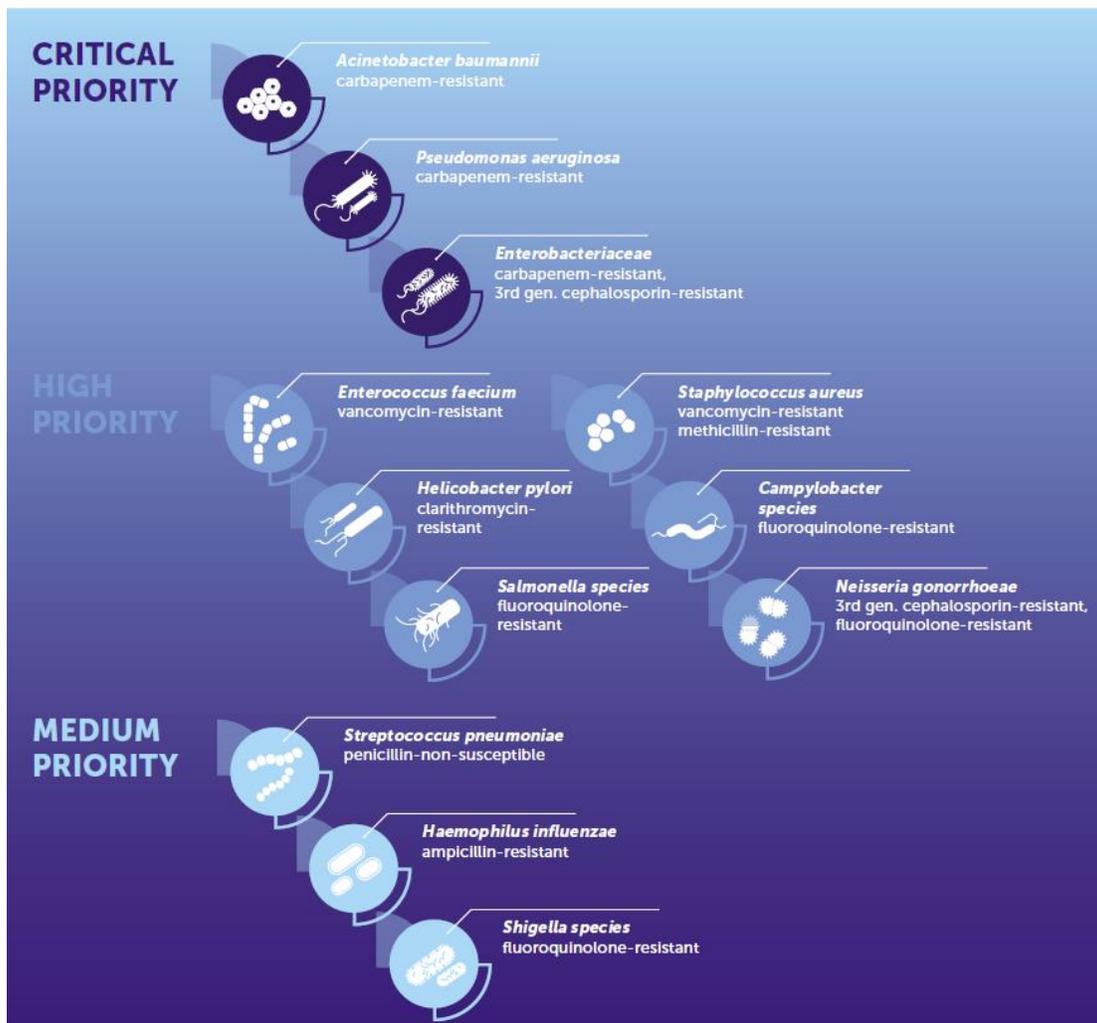


Figura 5. Listado de patógenos prioritarios según la OMS.

Si revisamos que fármacos han sido aprobados en los últimos años (Tabla 1), queda de manifiesto los limitados avances en el desarrollo de moléculas activas frente a estos patógenos prioritarios. Sumado a lo anterior es posible observar que el número de indicaciones terapéuticas para los cuales estos fármacos han sido aprobados está restringida principalmente a infecciones de la piel y del tracto urinario, salvo algunas excepciones [12].

Tabla 1. Cronología de fármacos antibacterianos aprobados en la última década.

| Año | Nombre Comercial | Principio activo | Indicación aprobada por la FDA |
|------|--|--------------------------|--|
| 2017 | Vabimere® | meropenem – vaborbactam | Infecciones complicadas del tracto urinario |
| | Baxdela® | delafloxacin | |
| 2016 | Sin aprobaciones de fármacos antibacterianos | | |
| 2015 | Avycaz® | ceftazidima – avibactam | Infecciones intra-abdominales complicadas en combinación con metronidazol, e infecciones complicadas del tracto urinario, incluyendo pielonefritis |
| | | | Infecciones intra-abdominales complicadas en combinación con metronidazol, e infecciones complicadas del tracto urinario, incluyendo pielonefritis |
| 2014 | Zerbaxa® | ceftolozana – tazobactam | Infecciones intra-abdominales complicadas en combinación con metronidazol, e infecciones complicadas del tracto urinario, incluyendo pielonefritis |
| | Orbactiv® | oritavancina | Infecciones de la piel |
| | Sirvextro® | tedizolid fosfato | Infecciones de la piel |
| | Dalvance® | dalbavancina | Infecciones de la piel |
| 2013 | Sin aprobaciones de fármacos antibacterianos | | |
| 2012 | Sin aprobaciones de fármacos antibacterianos | | |
| 2011 | Dificid® | fidaxomicina | Diarrea asociada a <i>Clostridium difficile</i> |
| 2010 | Zinforo® | ceftarolina fosamil | Infecciones complicadas de la piel y estructuras de la piel |
| 2009 | Vibativ® | telavancina | Infecciones intra-abdominales complicadas e infecciones complicadas del tracto urinario, incluyendo pielonefritis |
| 2008 | Sin aprobaciones de fármacos antibacterianos | | |

Es por esto, y considerando que estos fármacos no presentan nuevos mecanismos de acción, es relevante preguntarse, ¿qué está ocurriendo con el desarrollo de nuevos antibacterianos en etapas clínicas?

Desafortunadamente, la respuesta no es muy distinta a lo ya señalado, ya que número de antibacterianos, con nuevos mecanismos de acción, en fases clínicas II o III es acotado. Dentro de este grupo de moléculas se encuentran inhibidores de FaBI [25], análogos de defensinas [26], inhibidores de LptD [27], inhibidores de tRNA-LeuRS [28] e inhibidores de PDF [29].

Es por esto que se debe promover e incentivar el desarrollo de una mayor cantidad de compuestos antibacterianos, distintos a los ya conocidos.

En este sentido las quinonas se establecen como un grupo farmacológico interesante a investigar. Estas son compuestos que presentan una estructura diona cíclica completamente conjugada. Esta definición agrupa a un amplio grupo de moléculas, las que presentan diferentes núcleos como por ejemplo benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas (**Figura 6**) y aquellas donde un hidrógeno de la estructura ha sido sustituido por otro radical [30].



Figura 6. Ejemplo de diferentes núcleos quinónicos.

Compuestos quinónicos han sido identificados en diferentes fuentes de origen natural, como plantas [31], bacterias [32] u hongos [33] y obtenidas a través de distintos procesos sintéticos [34]–[36], siendo ampliamente estudiadas, desde un punto de vista de su reactividad química, la cual está condicionada por la presencia de los grupos carbonilo, lo que les permite participar de reacciones mediadas por radicales libres en etapas de iniciación y propagación, ya que la quinona puede ser reducida a semiquinona y esta a su vez, reducida nuevamente a hidroquinona. Por otra parte, estos compuestos pueden actuar como electrófilos uniéndose covalentemente con diferentes nucleófilos. Particularmente, presentan un sistema carbonil α,β -insaturado, lo cual les permite actuar como aceptor de Michael, según se describe en la **Figura 7** [37].

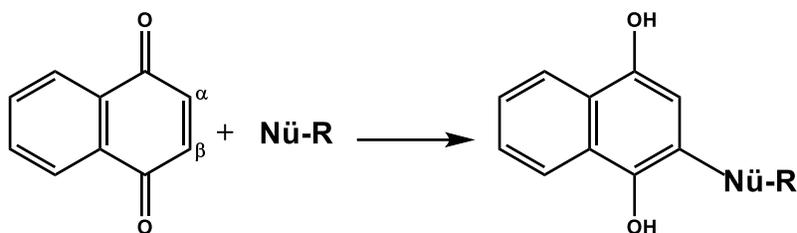


Figura 7. Representación de la reacción de naftoquinona con un nucleófilo.

El producto de adición que se obtiene depende de las características del núcleo quinónico y del nucleófilo, pudiendo existir mono o diadiciones a la quinona. Además, en algunos casos, la hidroquinona obtenida puede sufrir autoxidación u oxidación cruzada [38].

Por otra parte, desde un punto de vista farmacológico compuestos de núcleo quinónico han sido estudiados y asociados a una amplia variedad de actividades biológicas, entre las cuales destacan sus efectos antifúngicos [39], [40], antivirales [41], antitumorales [42], [43], antimaláricos [44] o antiinflamatorios [45], solo por señalar algunos ejemplos.

De igual forma se han identificado diferentes compuestos obtenidos desde fuentes naturales como langcoquinonas [46], shikoina [47], [48], plumbagina [49], y juglona y 7-metiljuglona [49], [50] con actividad antibacteriana frente a distintas bacterias patógenas.

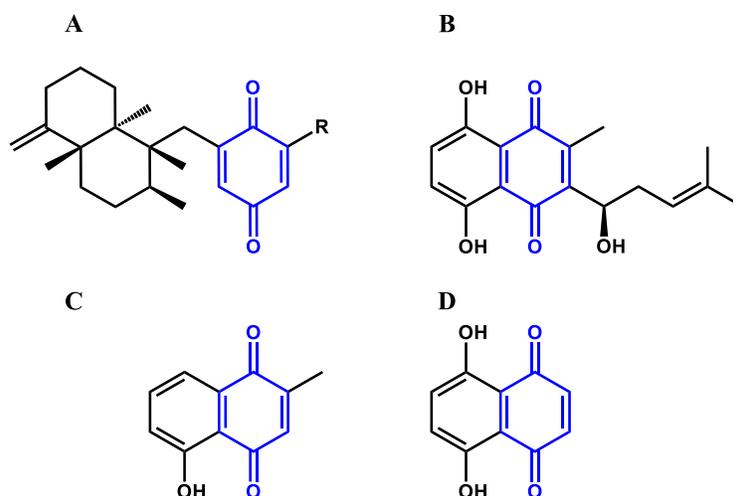
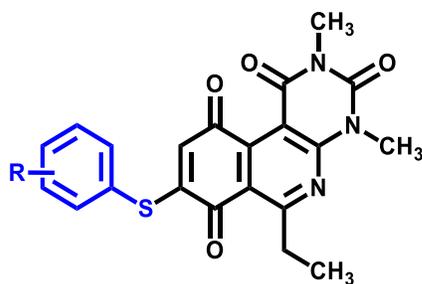


Figura 8. Compuestos quinónicos obtenidos desde fuentes naturales. A: langcoquinonas; B: shikoína; C: plumbagina; D: juglona.

Asimismo, diferentes autores han estudiado la obtención sintética de diversos compuestos quinónicos [51]–[53] y su evaluación antibacteriana. Entre ellos parece interesante mencionar los trabajos publicados por Tandon *et al.* quienes han estudiado la adición de compuestos tiólicos y anilínicos a 1,4-naftoquinonas generando compuestos con actividad antibacteriana frente a bacterias como *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, además de estudiar los efectos antifúngicos y antiproliferativos de estos compuestos [54]–[56]. Sin embargo, estas publicaciones se centran en el estudio de las condiciones de reacción óptimas para la obtención de estos compuestos, sin entregar información de relación estructura-actividad que permita guiar el diseño racional de nuevos derivados, limitándose a realizar una descripción de los resultados biológicos.

En este contexto, nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente la síntesis y evaluación antibacteriana de una serie de compuestos arilmercapto-pirimidoisoquinolinquinónicos (**Figura 9**), los cuales demostraron ser activos frente a bacterias prototipo Gram positivo (*S. aureus* sensible y resistente a metilicina y *E. faecalis*) sin presentar actividad en bacterias prototipo Gram negativo. Además, la evaluación de 2 compuestos frente a aislamientos clínicos de *E. faecium* resistente a vancomicina entregó como resultado que estos derivados presentaron entre 64 y 128 veces mayor actividad antibacteriana que vancomicina, sin afectar la viabilidad celular de celular eucariontes en ensayos de toxicidad celular [57].



R = H, Me, OMe, F, Cl, Br.

Figura 9. Estructura general de los compuestos previamente publicados. Negro: núcleo pirimidoisoquinolinquinona; azul: anillo tiofenólico.

Desde un punto de vista estructural, los resultados indican que la adición del anillo tiofenólico al núcleo tricíclico es esencial para obtener actividad antibacteriana, la cual sería modulada por la presencia de sustituyentes voluminosos en posición *orto* y lipofílicos en posición *para*, sin encontrarse un descriptor que explique el cambio de actividad cuando el sustituyente se encuentra en posición *meta*. Sin embargo, estos resultados son discutidos a partir de un número acotado de sustituyentes, restringido a la zona del anillo tiofenólico, lo cual no permite establecer de manera fehaciente qué parámetros condicionan la actividad antibacteriana de estos compuestos, lo cual no permite establecer una relación estructura-actividad de esta familia de compuestos, ya que no se han explorado modificaciones en otros sectores de la molécula, por lo cual se hace necesario extender este análisis.

Por estos motivos se propone realizar un estudio de relación estructura-actividad cualitativo para esta familia de compuestos, a través de diferentes estrategias de diseño de fármacos, que permita identificar qué parámetros modulan la actividad antibacteriana de estos compuestos y las zonas de la molécula que son susceptibles a ser modificadas y contrastarlos con estudios de relación estructura-actividad cuantitativa, particularmente estudios 3D-QSAR, los cuales permitirán diseñar nuevos derivados pirimidoisoquinolinquinónicos. Además, y con el objetivo de proyectar nuestra investigación hacia la obtención de un compuesto líder (compuesto con alta actividad y baja toxicidad) se evaluará la toxicidad celular, en células eucariontes, de los mejores compuestos obtenidos.

Finalmente se realizará el diseño, síntesis y evaluación antibacteriana de 2 series de péptidos catiónicos, los cuales serán utilizados para evaluar una potencial sinergia antibacteriana junto a los mejores compuestos quinónicos, con el objetivo principal de establecer una estrategia que permita obtener actividad frente a bacterias Gram negativo.

II. HIPÓTESIS.

i. La evaluación antibacteriana de compuestos de núcleo pirimidoisoquinolinquinónicos, diseñados racionalmente como antibacterianos permitirán para esta familia de compuestos:

- Establecer un farmacóforo.
- Establecer la relación estructura-actividad.
- Determinar los parámetros que modulan la actividad antibacteriana.
- La generación de modelos 3D-QSAR.

Esta información junto a los estudios de toxicidad celular, permitirán el diseño racional de nuevas moléculas y selección de compuestos líderes.

ii. La evaluación conjunta de compuestos de núcleo pirimidoisoquinolinquinona con péptidos catiónicos presentará actividad frente a bacterias prototipo Gram negativo.

III. OBJETIVOS.

i. OBJETIVO GENERAL.

Obtener compuestos de núcleo pirimidoisoquinolinquinona activos en bacterias Gram positivo diseñados a través de herramientas de la química medicinal, evaluar el perfil de seguridad de los compuestos más activos y desarrollar modelos 3D-QSAR.

Además, explorar el perfil de actividad antibacteriana de los mejores compuestos quinónicos en conjunto con péptidos catiónicos.

ii. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Diseñar 6 series de derivados de núcleo pirimidoisoquinolinquinona a través de diversas estrategias de química medicinal como la Gráfica de Craig, Free Wilson, cambios bioisostéricos y estudios por homología.

2. Estudiar la síntesis de los compuestos propuestos en la etapa de diseño.

3. Caracterizar químicamente los derivados sintetizados.

4. Determinar la concentración inhibitoria mínima de los compuestos quinónicos frente a bacterias prototipo Gram positivo y Gram negativo.

5. Realizar un estudio de relación estructura-actividad de los compuestos de núcleo pirimidoisoquinolinquinona.

6. Evaluar toxicológicamente los mejores compuestos sintetizados.
7. Generar modelos 3D-QSAR mediante la metodología CoMFA y CoMSIA
8. Sintetizar dos series de péptidos catiónicos, basados en los aminoácidos lisina, arginina y glicina, con un largo de 6 unidades aminoacídicas.
9. Determinar la concentración inhibitoria mínima de los péptidos frente a bacterias prototipo Gram positivo y Gram negativo.
10. Evaluar la actividad antibacteriana conjunta de compuestos quinónicos y péptidos catiónicos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS QUINÓNICOS Y PEPTÍDICOS.

1.1 REACTIVOS, SOLVENTES Y CARACTERIZACIÓN.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad comercial y se utilizaron sin purificación adicional, adquiridos desde AK-scientific, Enamine, Merck o Sigma-Aldrich. De igual manera todos los solventes utilizados fueron de grado “para análisis”, empleados sin purificación adicional y obtenidos desde Merck y Sigma-Aldrich. Los péptidos, activadores y resina 2-clorotritil fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

El seguimiento de las reacciones se realizó a través de placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ con soporte de aluminio para cromatografía en capa fina (CCF) obtenidos desde Merck.

La purificación de los compuestos obtenidos se realizó mediante cromatografía por gravedad utilizando sílica gel (70–230 o 230–400 mesh) obtenidos desde Merck. Las mezclas de solventes empleadas como eluyentes y sus proporciones se indican para cada producto y son expresadas en proporción volumen/volumen.

Para los compuestos quinónicos los puntos de fusión (p.f.) fueron medidos en un equipo Stuart Scientific SMP3, sin corrección e informados en grados Celsius (°C). Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (¹H-RMN) y de carbono (¹³C-RMN) fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker AM-400 a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente, en cloroformo deuterado (CDCl₃) o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆). Los desplazamientos químicos están expresados en ppm utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna (δ escala), y las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hercios (Hz). Los espectros de masas de alta resolución se registraron en un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo y sistema Triwave® WATERS modelo SYNAP G2 con ionización a presión atmosférica electro spray. Referencia utilizada: leucina encefalina.

La determinación de la masa molecular de los péptidos fue confirmada por espectroscopia de masa MALDI-TOF. Los polvos fueron almacenados como polvo liofilizado y disueltos previo a su uso.

1.2 MÉTODOS.

1.2.1 ESTUDIO DE SÍNTESIS DE COMPUESTOS QUINÓNICOS.

El estudio de síntesis de los compuestos quinónicos objetivos se llevó a cabo en 2 etapas. La primera etapa consistió en la obtención del núcleo tricíclico mediante el procedimiento general 1 (PG1) [58] y la segunda etapa corresponde a la adición de derivados tioaril (o tioalquil) y anilinas a través de los procedimientos generales 2 (PG2) [57] y 3 (PG3) [59], respectivamente. Un esquema general de obtención de los compuestos objetivos se muestra en la **Figura 10**.

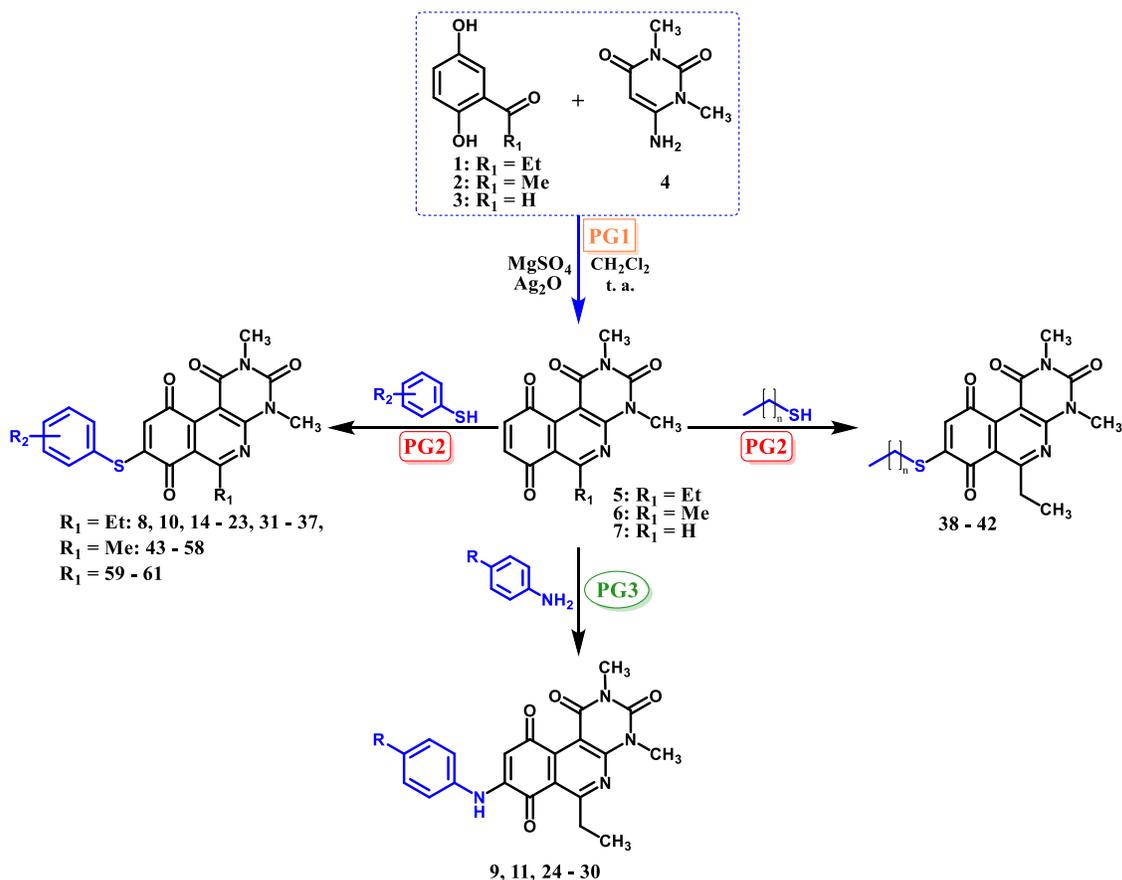


Figura 10. Esquema de procedimientos generales empleados.

Los procedimientos generales utilizados se describen a continuación:

Procedimiento general 1 (PG1) ensayo de obtención de los compuestos 5, 6 y 7: Una suspensión de: compuesto 2,5-dihidroxifenil derivado (1, 2 o 3. 1 eq.), 6-amino-1,3-dimetiluracilo 4 (1 eq.), óxido de plata I (3 eq.) y sulfato de magnesio (3 eq.), en 20 mL de diclorometano (20 mL) se agita vigorosamente a temperatura ambiente por 3 h. El crudo de reacción se filtra al vacío con papel filtro y celite® en embudo Büchner utilizando

diclorometano para arrastrar el producto. La solución obtenida de la filtración se evapora hasta sequedad. El sólido resultante se purifica con 60 g de sílica gel (70-230 mesh) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo = 9: 1.

Procedimiento general 2 (PG2) ensayo de obtención de los compuestos 14 - 23 y 31 - 61: A una solución de la quinona respectiva (2 eq.) y tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% de eq. de la quinona) en una mezcla de diclorometano: etanol = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución del aril(alquil)mercapto derivado correspondiente (1 eq.) disuelto en una mezcla de diclorometano: etanol = 1: 1 (35 mL) desde una bureta de llave lateral con un flujo de aproximadamente 1 mL/30 min. La reacción se deja en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. El crudo de reacción se lleva a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna utilizando 60 g de sílica gel (230-400 mesh) empleando una fase móvil adecuada.

Procedimiento general 3 (PG3) ensayo de obtención de los compuestos 24 - 25 y 27 - 30: A una solución de la quinona respectiva (2 eq.) y tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% de eq. de la quinona) en una mezcla de diclorometano: etanol = 1: 1 (20 mL), se le adiciona el derivado anilínico apropiado (2 eq.) y se deja en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. El crudo de reacción se lleva a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna utilizando 60 g de sílica gel (230-400 mesh) empleando una fase móvil adecuada.

El detalle de los compuestos sintetizados, su protocolo de síntesis y caracterización espectroscópica y física se encuentra en la sección "Parte Experimental" del documento de tesis.

1.2.2 ESTUDIO DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS.

La síntesis de los péptidos fue realizada mediante la técnica de Síntesis de Péptidos Fase Sólida (SPFS) aplicando el procedimiento desarrollado por Houghten *et al* [60], el cual se detalla en el procedimiento general 4.

Procedimiento general 4 (PG4) ensayo de obtención de los péptidos Pep1-Pep13: En una bolsa previamente preparada se agregan 40 mg de la resina, la cual se agita durante 12 horas en diclorometano. Transcurrido ese tiempo se procede a la desprotección de la resina utilizando piperidina al 20% en dimetilformamida realizando dos lavados de 10 minutos cada uno. Luego se realizan 3 lavados con dimetilformamida durante un minuto cada

uno. Finalizado este procedimiento se comprueba la desprotección de la resina a través del test de ninhidrina. Posteriormente se realizan:

- 2 lavados con isopropanol durante un minuto cada uno.
- 1 lavado con azul de bromofenol durante 2 minutos.
- 2 lavados con dimetilformamida durante un minuto cada uno, y
- 2 lavados con diclorometano durante un minuto cada uno.

Finalizado este proceso se masa el aminoácido protegido (F-moc) correspondiente al anclaje y se mezcla con el activador correspondiente y *N,N*-diisopropiletilamina, disolviéndose en dimetilformamida. La resina desprotegida en la etapa anterior se agita en la solución durante 1 hora.

Transcurrido el tiempo, se confirma el acoplamiento mediante una solución de azul de bromofenol, si:

- La bolsa está azul significa que hay un extremo amino desprotegido, por lo que el aminoácido correspondiente al acople no formó completamente el enlace con la resina. En este caso debe realizarse un doble acople.
- La bolsa posee una tonalidad café el enlace se ha formado de manera efectiva. Por lo tanto, se sigue el proceso de desprotección para continuar con el siguiente acople según la secuencia que se quiera realizar. Para esto se reinicia el proceso de lavado y posterior desprotección selectiva del aminoácido adicionado.

Una vez obtenida la secuencia deseada se debe realizar el clivaje del péptido desde la resina y la desprotección de los grupos protegidos. Para esto se agrega una solución al 95% de ácido trifluoroacético y se agita durante 4 horas. Luego la solución es filtrada y la resina lavada nuevamente con la solución al 95% de ácido trifluoroacético. Posteriormente al filtrado se le agrega éter frío y se procede a centrifugar el péptido obtenido. El proceso se repite 10 veces.

Luego los péptidos son purificados por medio de columnas G10 utilizando metanol y mezclas metanol agua. Finalmente, los péptidos obtenidos son liofilizados y caracterizados en base a sus tiempos de retención y determinación de su peso molecular.

2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

2.1 MATERIALES Y EQUIPOS.

Las placas de agar sangre de cordero y las placas de cultivo de 96 pocillos, estériles y fondo en U (Santa Cruz biotechnology, inc.) fueron adquiridas desde Fermelo Biotec®. Los antibióticos patrones, vancomicina y gentamicina, fueron adquiridos desde Abcam Biochemicals® y Sigma-Aldrich®, respectivamente. El medio de cultivo Mueller Hinton en polvo fue adquirido desde Lab-Diagnostic®, y reconstituido según las recomendaciones del fabricante. Dimetilsulfóxido (DMSO) fue adquirido desde Sigma-Aldrich® y el agua destilada fue obtenida mediante el equipo Elix®100 de osmosis inversa, Merck. Este equipo es parte de los servicios que presta la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. La medición de la concentración de bacterias fue realizada en un nefelómetro Den-1 (Grant bio®) y la incubación se realizó en una incubadora BJPX-Hilo (Biobase Biodustri Co. Ltda.), a 37 °C. Según requerimiento, la esterilización del material se realizó en un autoclave BK-30Z (Biobase Biodustri Co. Ltda.) automático, mediante un programa de 121 °C por 15 minutos.

2.2 BACTERIAS.

Las bacterias evaluadas, fueron *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) ATCC® 43300, *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM) ATCC® 29213, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC® 29212, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC® 27853 y *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ATCC® 700603. Estas fueron extraídas a partir de viales de criopreservación a -20 °C en leche descremada estéril (al 70%). La obtención de bacterias aisladas se realizó por medio de cultivos bacterianos en placas de agar sangre de cordero, incubados por 20 horas a 37 °C. Posteriormente, para cada bacteria, se preparó un inóculo bacteriano en H₂O estéril hasta alcanzar 0,5 McFarland (concentración bacteriana aproximada de 1,5 x 10⁸ UFC/mL) usando un nefelómetro. El inóculo se utilizó dentro de los primeros 15 minutos después de ajustada la concentración, para evitar el crecimiento bacteriano no estandarizado. Finalmente se realizó una dilución para obtener una concentración final aproximada de 5 x 10⁵ UFC/mL en cada pocillo de la placa.

2.3 MÉTODOS.

2.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA.

La determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se realizó acorde a las recomendaciones establecidas por *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) [61].

En placas de cultivo de 96 pocillos estériles (8 filas y 12 columnas) se agregaron 100 µL de caldo Mueller Hinton en los pocillos 2-11, con excepción de la columna 12 en la cual se agregaron 200 µL. Luego se cargaron los primeros tres pocillos de la columna 1 con 100 µL del compuesto "A", los siguientes tres pocillos con 100 µL del compuesto "B", y los dos últimos pocillos de la columna se cargaron con antibiótico control (vancomicina para bacterias Gram positivo y gentamicina para bacterias Gram negativo). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 0,5 entre las columnas 1 a 10 utilizando una pipeta multicanal. Los pocillos de las columnas 11 y 12 se utilizaron como control de crecimiento (caldo inoculado, sin antibiótico) y control de esterilidad (caldo sin inocular), respectivamente. En cada ensayo los valores de CIM para los antibióticos control estuvieron dentro de los rangos establecidos por la CLSI [62]. Un esquema representativo de la placa de ensayo se muestra en la **Figura 11**.

| | | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,006 | CC | CE |
|---|----|-----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | X | cX | c ^X _{/2} | c ^X _{/4} | c ^X _{/8} | c ^X _{/16} | c ^X _{/32} | c ^X _{/64} | c ^X _{/128} | c ^X _{/256} | c ^X _{/512} | CC | CE |
| B | X | cX | c ^X _{/2} | c ^X _{/4} | c ^X _{/8} | c ^X _{/16} | c ^X _{/32} | c ^X _{/64} | c ^X _{/128} | c ^X _{/256} | c ^X _{/512} | CC | CE |
| C | X | cX | c ^X _{/2} | c ^X _{/4} | c ^X _{/8} | c ^X _{/16} | c ^X _{/32} | c ^X _{/64} | c ^X _{/128} | c ^X _{/256} | c ^X _{/512} | CC | CE |
| D | Y | cY | c ^Y _{/2} | c ^Y _{/4} | c ^Y _{/8} | c ^Y _{/16} | c ^Y _{/32} | c ^Y _{/64} | c ^Y _{/128} | c ^Y _{/256} | c ^Y _{/512} | CC | CE |
| E | Y | cY | c ^Y _{/2} | c ^Y _{/4} | c ^Y _{/8} | c ^Y _{/16} | c ^Y _{/32} | c ^Y _{/64} | c ^Y _{/128} | c ^Y _{/256} | c ^Y _{/512} | CC | CE |
| F | Y | cY | c ^Y _{/2} | c ^Y _{/4} | c ^Y _{/8} | c ^Y _{/16} | c ^Y _{/32} | c ^Y _{/64} | c ^Y _{/128} | c ^Y _{/256} | c ^Y _{/512} | CC | CE |
| G | AC | cAC | c ^{AC} _{/2} | c ^{AC} _{/4} | c ^{AC} _{/8} | c ^{AC} _{/16} | c ^{AC} _{/32} | c ^{AC} _{/64} | c ^{AC} _{/128} | c ^{AC} _{/256} | c ^{AC} _{/512} | CC | CE |
| H | AC | cAC | c ^{AC} _{/2} | c ^{AC} _{/4} | c ^{AC} _{/8} | c ^{AC} _{/16} | c ^{AC} _{/32} | c ^{AC} _{/64} | c ^{AC} _{/128} | c ^{AC} _{/256} | c ^{AC} _{/512} | CC | CE |

Ej: c X = 32 µg/mL

Ej: c X = 128 µg/mL

Figura 11. Representación de la placa de ensayo. X: compuesto a evaluar 1; Y: compuesto a evaluar 2; AC: antibiótico control; CC: control de crecimiento; CE: control de esterilidad; c: concentración inicial.

2.3.2 ENSAYO DE SINERGIA.

Se evaluó la efectividad *in vitro* de la asociación de los derivados **32** y **33** con el péptido **Pep8**. Esto se estudió a través del método del "tablero de ajedrez" [63]. Se determinó la CIM, por la técnica de microdilución en caldo, según las recomendaciones del CLSI [61] sobre *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM) ATCC® 43300,

Staphylococcus aureus sensible a meticilina (SASM) ATCC® 29213, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC® 29212, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC® 27853 y *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ATCC® 700603. Se probaron distintas combinaciones de los compuestos **28** y **29** con **Pep8**. Para la configuración del panel de diluciones, en bacterias Gram positivo, se comenzó con una concentración CIM x 4 para los compuestos a evaluar y se diluyó en potencias de 2 hasta una concentración mínima de CIM/16. En bacterias Gram negativo, para los compuestos **28** y **29** se diluyeron desde una concentración de 16 µg/mL, realizando posteriormente, 6 diluciones en potencias de 2. En ambos casos, se busca de evaluar todas las posibilidades de sinergia en un amplio rango de combinaciones. Para lograr esto, el primer compuesto fue diluido a lo largo del eje de las abscisas, mientras el segundo se diluyó a lo largo del eje de las ordenadas y posteriormente, se agregó un inóculo de bacteria, a una concentración de 5×10^5 UFC/mL preparado desde una suspensión de bacteria de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Las placas fueron incubadas por 18 - 24 h a 37 °C.

Para establecer el efecto de la asociación se calculó el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (CFI). De acuerdo a *Gracia et al.* un índice de CFI $\leq 0,5$ se considerará sinergia, $0,5 < \text{CFI} \leq 4$, indiferencia y valores CFI > 4 , antagonismo [64].

3 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD CELULAR DE COMPUESTOS QUINÓNICOS.

3.1 MATERIALES Y EQUIPOS.

Las líneas celulares empleadas en este trabajo se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC®). Ellas incluyen N2a (CCL-131, ATCC® Rockville, MD, USA), células de neuroblastoma de cerebro de ratón, HEK293T (CRL-3216, ATCC® Rockville, MD, USA) células de riñón embrionario humano y SH-SY5Y (CRL-2266, Manassas, VA, USA) células de médula ósea humana. Como medio de crecimiento para N2a y HEK293T se empleó DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco®) con y sin rojo fenol adquirido de Thermo Fisher, y para SH-SY5Y se empleó DMEM/F-12, ambos suplementados con suero fetal bovino 10% (SFB, Gibco), penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL (ambos Thermo Fisher). El bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Calbiochem), dodecilsulfato de sodio (SDS) y ácido clorhídrico (HCl) fueron obtenidos desde Merck.

Finalmente, el ensayo fue realizado en placas de 96 pocillos estériles y fondo plano (Truline) adquiridas desde Tecnología y ciencia Ltda. y la absorbancia obtenida se midió en un lector de placas TECAN infinitive® 200 Pro a 550 nm.

3.2 MÉTODOS.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a confluencia de 10.000 células/pocillo (100.000 células/mL). Luego de 24 horas las células fueron tratadas con concentraciones variables de compuestos (CIM*4 – CIM/4) durante 24 horas, a 37 °C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, el medio fue reemplazado por DMEN sin rojo fenol y se le agregó 10 µl de MTT [12 µM], incubándose nuevamente por 4 horas a 37 °C y 5% CO₂. Tras este tiempo la solución resultante fue extraída y se agregaron 100 µl de una solución al 5% SDS - HCl 0,01 M con el objetivo de disolver los cristales formados, leyéndose a 550 nm. Como controles internos se utiliza células sin tratamiento (control de vida), y con peróxido de hidrógeno 10% (H₂O₂, control de muerte). Cada ensayo se realizó en triplicado, en 3 mediciones independientes (n = 3). Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular (%VC) según el promedio de la absorbancia (A) de las réplicas respecto al promedio de la absorbancia del grupo sin tratamiento (100%) [65].

El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.) [66] utilizando test ANOVA de 1 vía, seguida del método de comparaciones múltiples de Tukey, considerándose la significancia para valores de $p \leq 0,05$.

4 CÁLCULOS TEÓRICOS.

La obtención de conformaciones de mínima energía, a través de la optimización de la geometría molecular de cada compuesto en el vacío, fue realizada, basado en la teoría de densidad funcional [67], [68], utilizando el nivel de cálculo DFT B3LYP/6-311 o DFT(B3LYP)/6-311G++(d,p) a través del programa Gaussian 9W (09, Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA) [69].

5 GENERACIÓN DE MÉTODOS 3D-QSAR.

5.1 SELECCIÓN Y ALINEAMIENTO DE LOS CONFÓRMEROS.

Los estudios CoMFA y CoMSIA fueron realizados con el programa Sybyl X-1.2 (1.2, Tripos International, St. Louis, MS, USA) instalado y ejecutado en un PC con CPU Intel Core i7 y Windows 10. Para la adquisición de los confórmers de cada molécula, cada compuesto fue dibujado en el programa ChemDraw y sometido a una optimización geométrica

preliminar usando mecánica molecular MM2, a través de la herramienta del programa ChemBio3D (15.1.0, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Luego, las estructuras fueron minimizadas por mecánica cuántica utilizando el método DFT B3LYP/3-21G y DFT B3LYP/6-311 utilizando el programa Gaussian 09W (09, Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA). Posteriormente, las estructuras en extensión .mol2 fueron importadas a Sybyl, y nuevamente minimizadas por método Powell [70] y asignando cargas MMFF94 a cada átomo [71]. Finalmente, las estructuras minimizadas fueron superpuestas a través del método de fijación átomo a átomo, escogiendo como fracción común para el alineamiento el núcleo quinónico, incluyendo los átomos de carbono unidos a los átomos de nitrógenos de las posiciones 2 y 4, y al átomo de carbono en posición 6, sin considerar hidrógenos ni el átomo de carbono terminal del grupo etilo en la posición 6 (**Figura 12**).

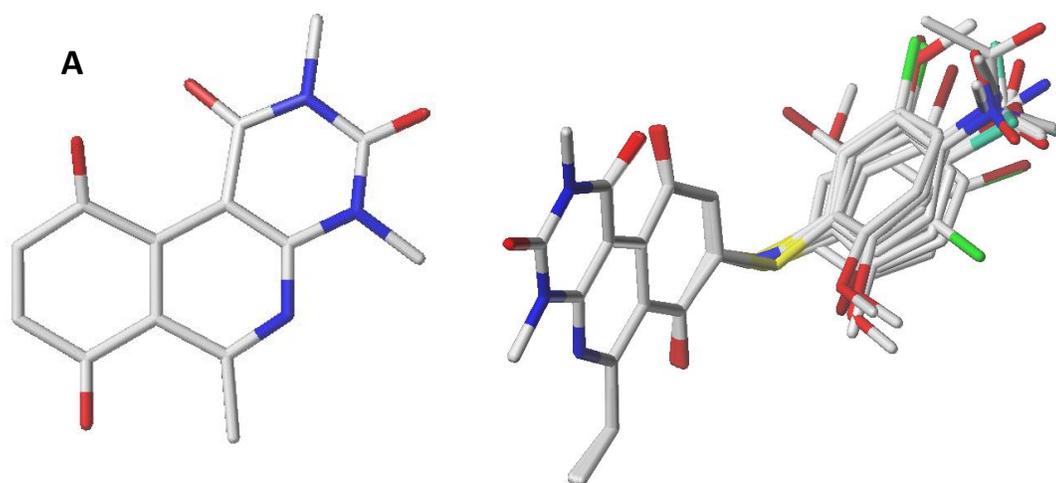


Figura 12. Resultado del alineamiento de conformeros en estudio QSAR. A: núcleo de alineación; B: Estructuras superpuestas de todos los compuestos empleados en los modelos CoMFA y CoMSIA.

5.2 SELECCIÓN DEL CONJUNTO DE DATOS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Ambos estudios fueron realizados a partir de la biblioteca de compuestos pirimidoisoquinolinquinonas, seleccionando 40 compuestos activos frente a SARM según se presenta en la Tabla 2. Compuestos sin actividad antibacteriana (CIM expresada como “≥”) y los compuestos declarados como mezcla de isómeros no fueron incluidos. La actividad antibacteriana, informada inicialmente a través de la CIM en µg/mL fue convertida a valor molar (M) y posteriormente expresada como pCIM ($-\log\text{CIM} = -\log[M]$). Para el estudio varias combinaciones del “conjunto de prueba” fueron evaluadas. Para esto, los compuestos fueron divididos en “conjunto de entrenamiento” (30 moléculas, 75%) y en “conjunto de prueba” (10 moléculas, 25%), asegurando que ambos grupos presenten

compuestos con alta, media, y baja actividad antibacteriana y procurando obtener una distribución uniforme que permite eliminar posibles problemas durante la validación externa.

Para la validación del modelo final, se escogió el “conjunto de prueba” que cumpliera con los parámetros estadísticos por la literatura en ambos modelos [72]–[74] (CoMFA y CoMSIA). La distribución de valores de pCIM para ambos grupos, conjunto de entrenamiento y de prueba, y para el total de los datos se muestran en la **Figura 13**. El rango de actividad antibacteriana, abarca 1.55 unidades logarítmicas, entre 4,4227 y 5,9725 (**Tabla 2**).

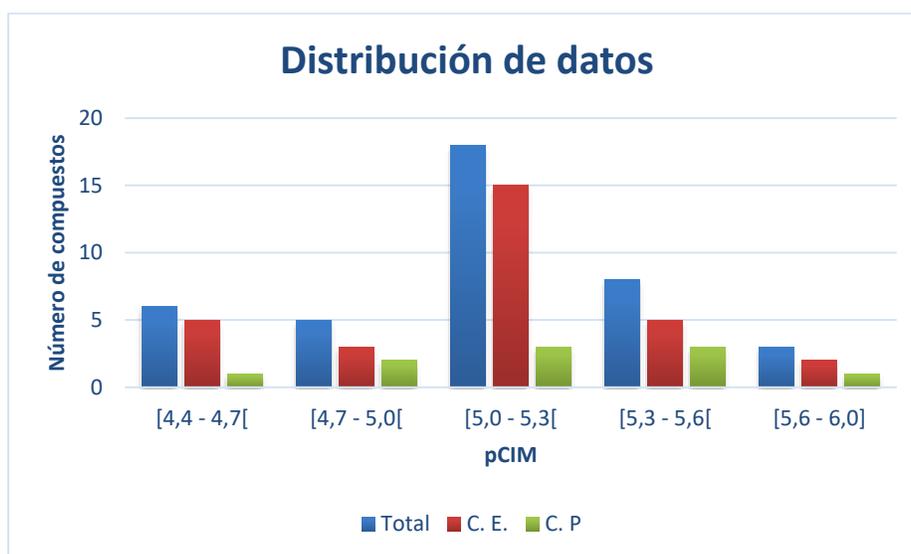
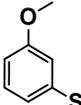
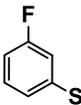
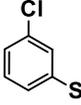
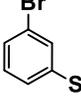
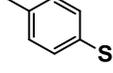
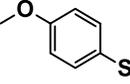
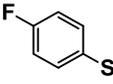
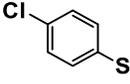
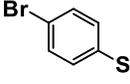
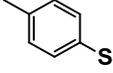
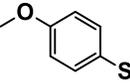
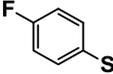
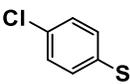
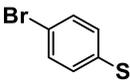
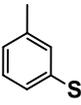
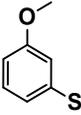
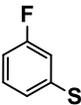
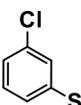
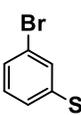
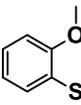
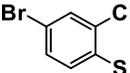


Figura 13. Distribución de valores de pCIM de los compuestos empleados para estudios QSAR.

Tabla 2. Compuestos empleados en estudios QSAR y valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) y pCIM (mol/L).

| N° | Compuesto | R ₁ | R ₂ | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | pCIM (mol/L) |
|----|-----------|----------------|----------------|--------------------------|--------------|
| | | | | | |
| 1 | 8 | | Et | 16 | 4,4505 |
| 2 | 14 | | Et | 16 | 4,4629 |
| 3 | 15 | | Et | 16 | 4,4227 |
| 4 | 16 | | Et | 8 | 4,7328 |
| 5 | 17 | | Et | 8 | 4,7525 |
| 6 | 18 | | Et | 4 | 5,0750 |
| 7 | 20 | | Et | 4 | 5,0369 |
| 8 | 21 | | Et | 16 | 4,4496 |
| 9 | 28 | | Et | 1 | 5,6282 |
| 10 | 29 | | Et | 0.5 | 5,9725 |
| 11 | 31 | | Et | 2 | 5,3687 |
| 12 | 33 | | Et | 4 | 5,0758 |
| 13 | 43 | | Me | 8 | 4,6918 |

| N° | Compuesto | R ₁ | R ₂ | CIM (µg/mL) | pCIM (mol/L) |
|----|-----------|---|----------------|-------------|--------------|
| 14 | 44 |  | Me | 4 | 5,0080 |
| 15 | 45 |  | Me | 4 | 5,0247 |
| 16 | 48 |  | Me | 2 | 5,3732 |
| 17 | 49 |  | Me | 4 | 5,0080 |
| 18 | 50 |  | Me | 4 | 5,0247 |
| 19 | 51 |  | Me | 4 | 5,0122 |
| 20 | 52 |  | Me | 4 | 5,0292 |
| 21 | 53 |  | Me | 4 | 5,0722 |
| 22 | 54 |  | Me | 2 | 5,3090 |
| 23 | 55 |  | Me | 8 | 4,7237 |
| 24 | 56 |  | Me | 4 | 5,0122 |
| 25 | 57 |  | Me | 2 | 5,3303 |
| 26 | 58 |  | Me | 2 | 5,3732 |
| 27 | P1 |  | Et | 8 | 4,7070 |
| 28 | P2 |  | Et | 4 | 5,0227 |
| 29 | P3 |  | Et | 16 | 4,4368 |

| N° | Compuesto | R ₁ | R ₂ | CIM (µg/mL) | pCIM (mol/L) |
|----|-----------|---|----------------|-------------|--------------|
| 30 | P4 |  | Et | 8 | 4,7257 |
| 31 | P5 |  | Et | 4 | 5,0433 |
| 32 | P6 |  | Et | 4 | 5,0849 |
| 33 | P7 |  | Et | 4 | 5,0227 |
| 34 | P8 |  | Et | 4 | 5,0389 |
| 35 | P9 |  | Et | 4 | 5,0268 |
| 36 | P10 |  | Et | 2 | 5,3443 |
| 37 | P11 |  | Et | 2 | 5,3859 |
| 38 | P13 |  | Et | 2 | 5,3399 |
| 39 | P16 |  | Et | 1 | 5,6869 |
| 40 | P17 |  | Et | 4 | 5,1146 |

5.3 CÁLCULOS DE CAMPO CoMFA Y CoMSIA.

La determinación de los descriptores de campo para los modelos CoMFA y CoMSIA se realiza ubicando el conjunto de entrenamiento alineado, en su totalidad, en un cubo que presenta un espaciado de cuadrícula de 2 Å en las direcciones x, y, z. Para el modelo CoMFA las energías de campo estérico y electrostático fueron calculadas empleando como átomo de prueba un carbono sp³ con un radio de Van der Waals de 1.54 Å y una carga de +1. Un valor de corte de 30.0 kcal/mol fue empleado para cada campo. Por su parte, el modelo CoMSIA fue determinado empleando parámetros estándar [75], los cuales

permiten calcular parámetros estérico, electroestático, hidrofóbico, donador de puente de hidrógeno y aceptor de puente de hidrógeno.

5.4 VALIDACIÓN INTERNA Y ANÁLISIS DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES.

La validación interna de los modelos se realiza a través del análisis de mínimos cuadrados parciales, conocido también como PLS (de sus siglas en inglés *Partial Least Squares*), que permite realizar una relación entre los descriptores CoMFA o CoMSIA (variables independientes) y el valor de pCIM experimental (variable dependiente) [76]. La determinación del mejor modelo se realiza a través de un análisis de validación cruzada a través del método *Leave One Out* (LOO), el cual genera el coeficiente de validación cruzada q^2 . Este entrega una medida de la calidad interna del modelo y el número óptimo de componentes. Finalmente una validación no cruzada fue realizada, con un valor de filtrado de columna de 2,0.

5.5 VALIDACIÓN EXTERNA.

Para considerar que un modelo QSAR presenta capacidad predictiva debe ser sometido a una validación externa y cumplir con los siguientes criterios [72]–[74]:

Tabla 3. Parámetros estadísticos y valores umbrales para validación de modelos QSAR.

| Condición | Parámetro | Valor umbral |
|-----------|---|-----------------------|
| 1 | q^2 | >0,5 |
| 2 | r^2 | >0,6 |
| 3 | r^2_o o r^2_o | Cercano a r^2 |
| 4 | k o k' | $0,85 < k(k') < 1,15$ |
| 5 | $(r^2 - r^2_o) / r^2$ o $(r^2 - r^2_o) / r^2$ | <0,1 |
| 6 | $ r^2_o - r^2_o $ | <0,3 |
| 7 | r^2_m | >0,5 |

Donde:

q^2 : cuadrado del coeficiente de validación cruzada LOO.

r^2 : cuadrado del coeficiente de correlación entre pCIM experimental y pCIM predicha para el conjunto de prueba.

r^2_o : cuadrado del coeficiente de correlación entre pCIM experimental y pCIM predicha para el conjunto de prueba con intercepto (0,0).

r^2_o : cuadrado del coeficiente de correlación entre pCIM predicha y pCIM experimental para el conjunto de prueba con intercepto (0,0).

k : pendiente de la regresión entre pCIM experimental y pCIM predicha para el conjunto de prueba con intercepto (0,0).

k' : pendiente de la regresión entre pCIM predicha y pCIM experimental para el conjunto de prueba con intercepto (0,0).

r_m^2 : parámetro de la capacidad predictiva externa del modelo. Se determina a través de la ecuación: $r_m^2 = r^2 \left(1 - \left| \sqrt{r^2 - r_0^2} \right| \right)$

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

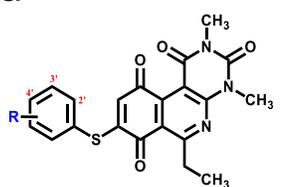
1. DISEÑO.

Luego de determinar que una serie de compuestos presentan actividad biológica (en nuestro caso actividad antibacteriana) es importante plantearse la siguiente pregunta, ¿Qué modificaciones estructurales, sintéticamente viables, nos permitirán mejorar su actividad, variar sus propiedades farmacocinéticas y/o disminuir su toxicidad? La respuesta a esta pregunta no es sencilla de responder y puede variar dependiendo del contexto, de las propiedades que se quieren modificar o qué tipo de mejora se busca.

Nuestro contexto establece, en primer lugar, que los compuestos obtenidos presentan actividad sobre bacterias Gram positivo, pero carecen de actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativo, posiblemente por una dificultad en atravesar la pared bacteriana de ésta última. En segundo lugar, la información estructural disponible se restringe a 16 moléculas que abordan la monosustitución en distintas posiciones del anillo aromático y un compuesto disustituido, lo cual limita la optimización de estos compuestos debido a la escasa información de su relación estructura - actividad [57]. Es por esto, que se hace manifiesta la necesidad de ampliar el número de compuestos a sintetizar, de manera racional, mediante el uso de estrategias que permitan optimizar estos compuestos antibacterianos. De esta forma se plantea diseñar y sintetizar 6 nuevas series de derivados de núcleo pirimidoisoquinolinquinona con el objetivo de profundizar el estudio de la relación estructura - actividad de estos compuestos para orientar la síntesis de moléculas con mejor actividad antibacteriana.

Con este objetivo en mente, se consideraron diversas modificaciones estructurales a partir de un conjunto de moléculas previamente desarrolladas en nuestro grupo de trabajo [57]. Estos compuestos de referencia se consideraron como los prototipos para el estudio de relación estructura-actividad, denominándolos a todos con la sigla "P". Las estructuras de los prototipos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Estructura prototipo utilizada para el diseño de nuevos compuestos y discusión de resultados.



| Posición | R | | | | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | H | Me | OMe | F | Cl | Br |
| 2' | P1 | P12 | P13 | P14 | P15 | P16 |
| 3' | - | P7 | P8 | P9 | P10 | P11 |
| 4' | - | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
| 2'Cl-4'Br | P17 | | | | | |

Las estrategias de diseño empleadas para estudiar la relación estructura–actividad de esta familia de compuestos, se detallan a continuación:

I. Gráfica de Craig.

La gráfica de Craig [77], corresponde a una herramienta clásica del diseño de fármacos. En esta gráfica se presentan diversos sustituyentes unidos a un anillo aromático en posición 4'. Cada sustituyente se posiciona en un sistema de coordenadas cartesianas. El eje X representa los valores para la constante de hidrofobicidad (π) calculados según:

$$\text{e.c. 1: } \pi_x = \log P_x - \log P_H; \text{ donde } P_x = \frac{[X]_{\text{orgánica}}}{[C_i-X]_{\text{acuosa}}}$$

y el eje Y representa los valores de la constante de Hammett (σ) que se calculan según:

$$\text{e.c. 2: } \sigma_x = \log K_x - \log K_H; \text{ donde } K_x = \frac{[Ax^-]}{[HAX]}$$

El centro de la gráfica ($\pi = 0$; $\sigma = 0$) representa el valor del átomo de hidrógeno como sustituyente para ambos parámetros (**Figura 14**).

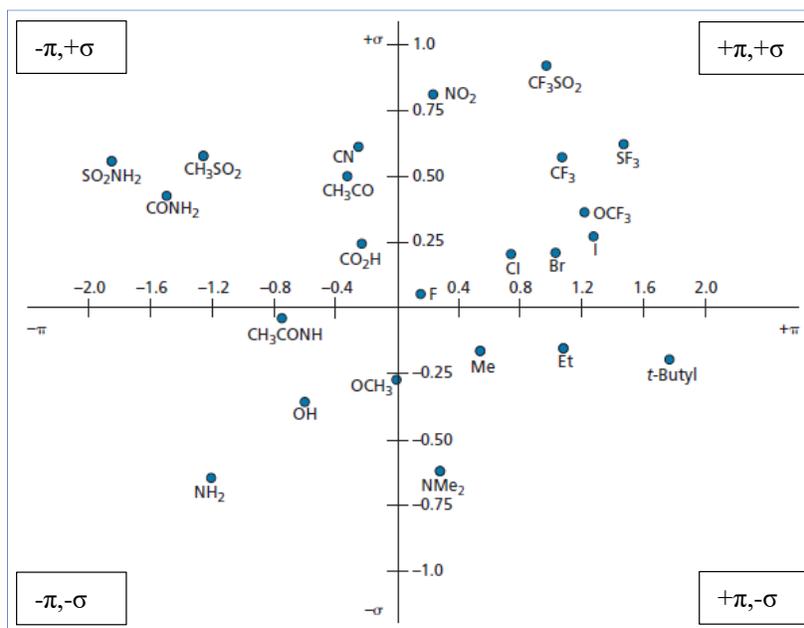


Figura 14. Gráfica de Craig. Extraído y modificado desde “An introduction to Medicinal Chemistry” [78].

Esta distribución permite una rápida visualización del sustituyente en función de sus propiedades relativas, posibilitando la elección e intercambio de un sustituyente en un compuesto o estableciendo si uno de estos parámetros puede modular la actividad biológica estudiada.

II. Cambio bioisostérico.

El bioisosterismo es un concepto acuñado por Harris Friedman, que deriva del isosterismo [79]–[82], quien lo definió inicialmente como “los átomos o moléculas que se ajustan a las definiciones de isósteros y que tienen el mismo tipo de actividad biológica” [83] la cual ha sido ampliada posteriormente por otros autores y establece como bioisósteros a 2 sustituyentes o grupos que presenten similitudes químicas o físicas y formas moleculares relacionadas, produciendo efectos o propiedades biológicas similares [84]–[88].

Dado esto, el cambio bioisostérico representa una estrategia ampliamente utilizada en la química medicinal para modificar racionalmente un compuesto, que ha permitido el estudio de la relación estructura - actividad de fármacos antiinflamatorios [89], [90], antimaláricos [91] o antibacterianos [92], solo por mencionar algunos ejemplos.

III. Free Wilson.

El análisis de Free-Wilson (FW) [93] es un método numérico, que permite el diseño de nuevos derivados a partir de la relación que existe entre la presencia o ausencia de sustituyentes, dentro de una familia de compuestos, y su respectivo valor de actividad biológica. El análisis permite obtener los coeficientes de FW (cFW) de cada sustituyente en una posición determinada (*orto*, *meta* o *para*), los cuales pueden ser valores positivos o negativos. Cuando el coeficiente es mayor a cero, la inclusión de ese sustituyente es favorable para la actividad farmacológica. De manera contraria, un valor de coeficiente menor a cero indica que es desfavorable realizar una sustitución en esa posición. Cuando el valor es cero, el sustituyente no tiene influencia en la actividad.

IV. Estudio por homología.

Corresponde a la generación de una serie de compuestos que difieren en un grupo CH_2 y puede ser desarrollada mediante la inserción o eliminación de este grupo desde la estructura. Esto permite conocer cómo cambia la actividad biológica de una serie de compuestos en función del largo de cadena [94]. Un ejemplo clásico de esta estrategia es el estudio de la variación de la potencia hipnótica de una serie homóloga de alcoholes [95].

Considerando lo anterior, se describe el propósito que cada estrategia busca en el estudio de la relación estructura-actividad.

1. La gráfica de Craig, se utiliza para la selección de sustituyentes en la posición 4' del anillo tiofenólico para analizar cómo el carácter hidrofóbico (π) y el carácter electrónico (σ) del sustituyente influyen la actividad antibacteriana de estos compuestos. Para este análisis se emplearán sustituyentes con valores pi (π) y sigma (σ) distribuidos en los cuatro cuadrantes. Además, se integrará al análisis, de manera independiente, el parámetro de refractividad molar (R.M.), con el fin de estudiar la influencia del volumen del sustituyente en la actividad antibacteriana.
2. Cambio Bioisostérico, a través del reemplazo del átomo de azufre que conecta el anillo de benceno con el sistema tricíclico por un átomo de nitrógeno. Las diferentes características electrónicas de estos dos átomos permitirán estudiar posibles nuevas familias de compuestos.
3. Estudio de Free Wilson, empleado para evaluar, a través del coeficiente de Free Wilson, la selección de un segundo sustituyente al anillo aromático.
4. Estudio por homología, empleado en tres zonas distintas de la molécula con el objetivo de estudiar modificaciones estructurales en esta familia de compuestos. Los cambios propuestos son:
 - a. Aumento de la distancia entre átomo de azufre y el anillo aromático.
 - b. La adición de alquiltioles, en reemplazo del anillo tiofenólico al núcleo tricíclico para establecerlos como alternativa al sistema aromático y un estudio por homología que permita obtener la distancia óptima de la cadena.
 - c. Disminución del largo de la cadena carbonada en posición 6 del núcleo tricíclico.

Un resumen de las modificaciones propuestas se muestra en la **Figura 15**. Resumen de modificaciones estructurales propuestas y las estrategias de diseño propuestas.

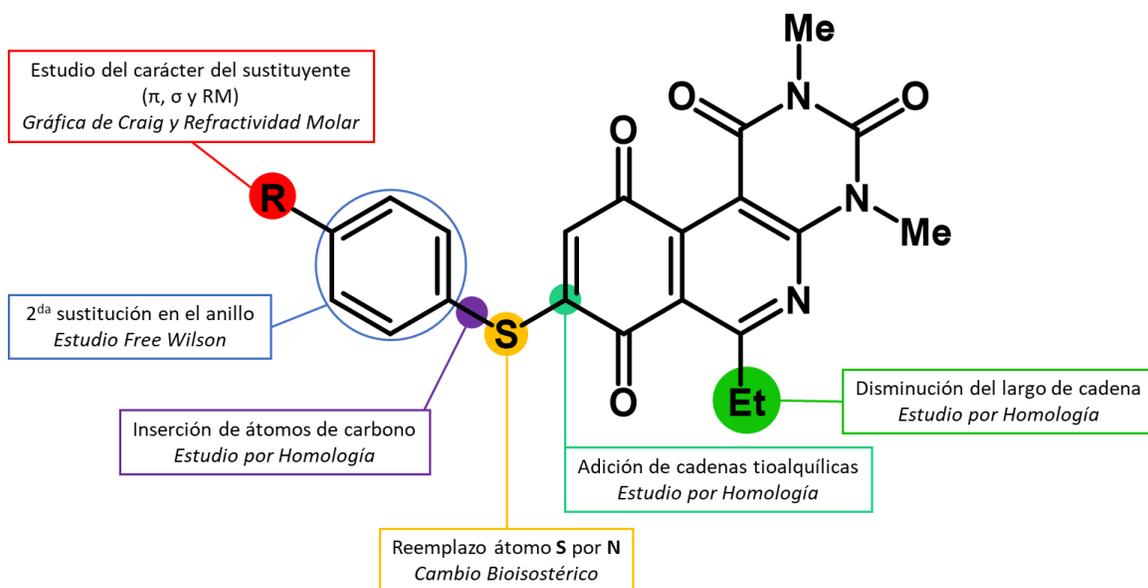


Figura 15. Resumen de modificaciones estructurales propuestas y las estrategias de diseño propuestas.

2. FREE – WILSON – RESULTADOS.

Como se señaló anteriormente, el análisis de FW permite el diseño racional de nuevos compuestos a través de la relación que existe entre características estructurales de una molécula y su actividad biológica. Para nuestro estudio se correlacionó la presencia o ausencia de un sustituyente en las posiciones 2' (*orto*), 3' (*meta*) y 4' (*para*) del anillo tiofenólico con la actividad antibacteriana de cada compuesto, expresada como pCIM (-logCIM) en unidades de concentración molar.

Este estudio empleó los compuestos recientemente reportados [57], los cuales presentan sustituciones metilo (Me), metoxilo (OMe), flúor (F), cloro (Cl) y bromo (Br). Para el análisis, la presencia del sustituyente en el anillo tiofenólico es representado con valor 1 y la ausencia de este se representa con valor 0. Considerando estos valores se construye una matriz para realizar una regresión multilínea considerando los valores de actividad antibacteriana. Los resultados obtenidos del análisis se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados obtenidos para el análisis de FW.

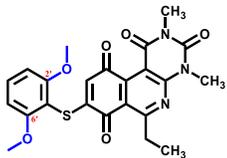
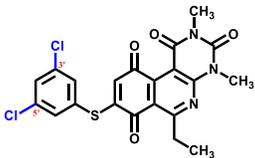
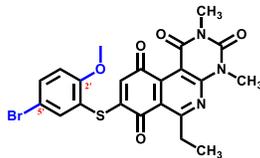
| | Coef. FW | | | | | |
|---------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | R | Me | OMe | F | Cl | Br |
| 2' (<i>orto</i>) | | -0,9653 | 0,255 | 0 | 0 | 0,602 |
| 3' (<i>meta</i>) | | -0,0622 | -0,046 | -0,0581 | 0,2594 | 0,301 |
| 4' (<i>para</i>) | | -0,0622 | -0,6481 | -0,3591 | -0,0416 | 0 |
| Intercepto: 5.0849 | | | | | | |

Los resultados muestran el resumen de coeficientes de FW (cFW) de la ecuación generada para este análisis. La **Tabla 5** se interpreta a partir de los valores obtenidos. Un coeficiente positivo significa que la presencia del sustituyente, en la posición señalada, mejora la actividad biológica e inversamente un valor negativo la empeora. Considerando esto, los peores sustituyentes a utilizar son metilo (Me) en posición 2' y metoxilo (OMe) en 4', proyectando compuestos con baja actividad antibacteriana sobre SARM. Por otra parte, sustituciones metoxilo (OMe) y bromo (Br) en posición *orto* del anillo tiofenólico y cloro (Cl) y bromo (Br) en posición meta serían favorables para la actividad antibacteriana.

Es importante señalar que, según FW los pares de posiciones 2' y 6' y 3' y 5' son equivalentes ya que no discrimina sobre la simetría de los sustituyentes en el anillo.

Considerando estos resultados se propone la síntesis de los siguientes compuestos:

Tabla 6. Compuestos escogidos a partir del análisis de Free-Wilson.

| | | |
|--|--|--|
|  |  |  |
| cFW 2'-OMe = 0,255 | cFW 3'-Cl = 0,2594 | cFW 2'-OMe = 0,255 cFW 3'-Br = 0,301 |

3. SÍNTESIS DE COMPUESTOS QUINÓNICOS.

La obtención de las moléculas objetivo inició con la síntesis del núcleo quinónico (**5**), por medio de una reacción "one pot" [58], con un rendimiento de 84%, a partir de los compuestos comerciales 2,5-dihidroxiacetofenona (**1**) y 1,3-dimetiluracilo (**4**), según la **Figura 16**. Esquema general de síntesis del núcleo quinónico

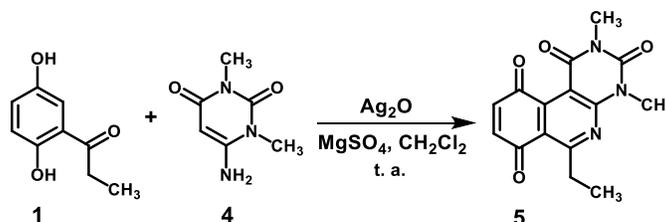


Figura 16. Esquema general de síntesis del núcleo quinónico.

Esta reacción consiste en una oxidación de la hidroquinona comercial (**1**) con óxido de plata I (Ag₂O) a temperatura ambiente [58] en diclorometano (CH₂Cl₂) y sulfato de magnesio para obtener la quinona activada (**1a**), la cual reacciona con el uracilo (**4**) a través de una reacción [3+3] previamente descrita [58]. Este proceso permite la obtención de una hidroquinona tricíclica intermediaria, la cual es rápidamente oxidada al compuesto final (**5**)

por la presencia de la hidroquinona inicial (**1**) y Ag_2O en el medio de reacción. El mecanismo de reacción propuesto se muestra en la **Figura 17**.

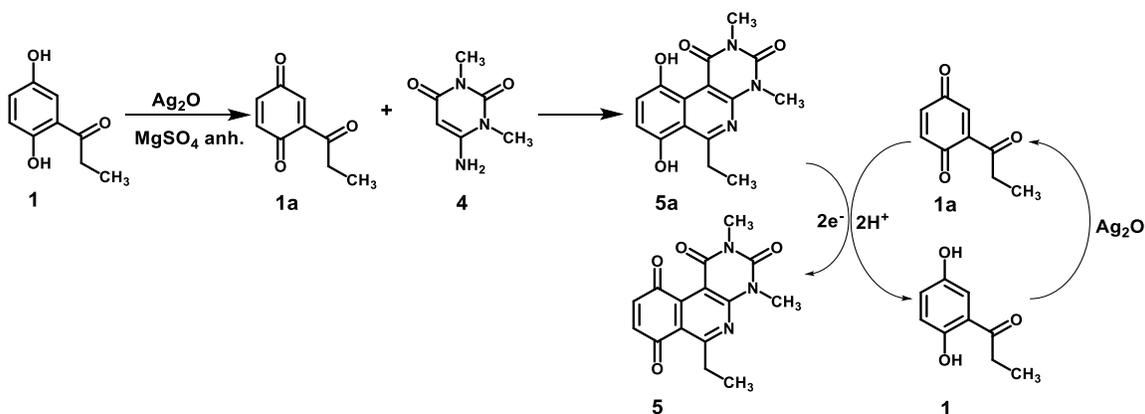
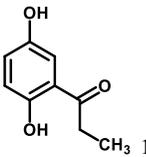
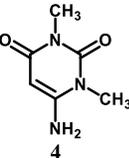
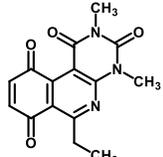
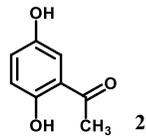
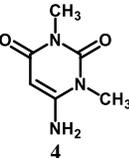
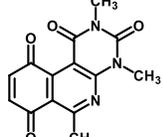
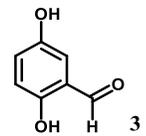
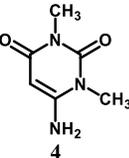
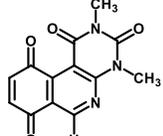


Figura 17. Probable curso de formación de la quinona **5** a partir de **1** y **4**.

Esta reacción nos permite obtener el núcleo tricíclico en un solo paso y con buenos rendimientos, evitando aislar el intermediario **5a**. A través del mismo procedimiento se obtuvo los compuestos **6** y **7**. Los reactantes utilizados, compuestos objetivos y rendimientos se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Preparación one-pot de las quinonas **5**, **6** y **7**^a.

| Reactantes | Compuesto | Nº | Rendimiento (%) |
|--|--|---|-----------------|
|  1 |  4 |  5 | 84 |
|  2 |  4 |  6 | 81 |
|  3 |  4 |  7 | 72 |

^a: En estas reacciones se utilizó una relación molar de 1:1:3:3 (hidroquinona: uracilo: Ag_2O : MgSO_4).
Tiempo de reacción: 3 horas.

Las estructuras obtenidas fueron caracterizadas a través de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HRMS y punto de fusión.

En una segunda etapa, se realizó la adición de los derivados aril(alquil)mercapto o anilino al núcleo tricíclico previamente sintetizado mediante una reacción de Michael

utilizando los procedimientos generales 2 y 3, respectivamente. La **Figura 18** resume los procedimientos realizados.

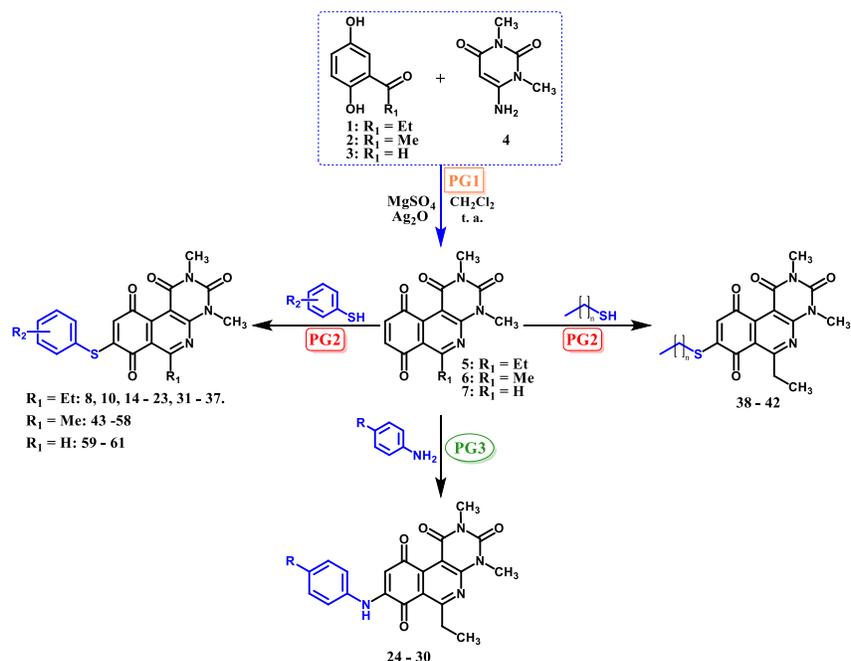


Figura 18. Esquema general de obtención de compuestos objetivo a través de los procedimientos generales empleados.

Esta reacción permitió conectar diferentes tioarilos, tioalquilos y anilinas comerciales al núcleo previamente obtenido, para obtener los compuestos objetivos. En algunos casos se realizaron modificaciones del proceso sintético general. La descripción de los resultados obtenidos se realiza a continuación:

Los derivados tioarilos (**8, 14 - 23, 31 - 37, 41 - 61**) y tioalquilos (**38 - 42**) se obtuvieron mediante la adición, por goteo lento de una solución diluida del respectivo compuesto tiólico sobre los distintos núcleos tricíclicos **5, 6** o **7**, a temperatura ambiente. Esto se realizó con el objetivo de evitar el ataque nucleofílico del grupo tiol al átomo de carbono 9 de este anillo, disminuyendo, de esta forma, la probabilidad de formación del compuesto de doble adición, lo cual ha sido reportado para otras quinonas [56]. Con este mismo objetivo, se empleó una relación estequiométrica entre el núcleo tricíclico y el derivado tiólico de 2: 1 (**Figura 19**).

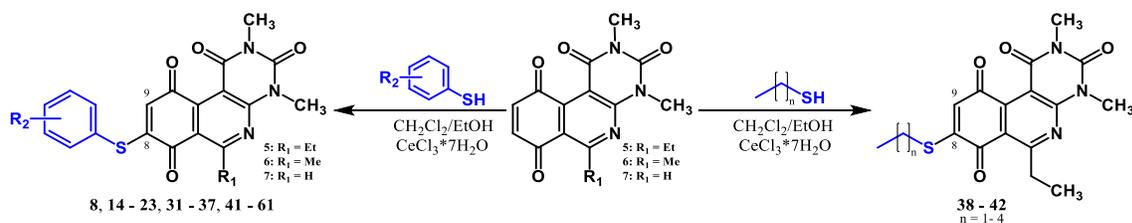


Figura 19. Esquema general de obtención de compuestos tioariles (izquierda) y tionalquiles (derecha).

Con este procedimiento fue posible obtener los compuestos objetivo, con rendimientos entre el 31% y 96%, sin la aparición de los derivados de doble adición ni la formación de los isómeros C-9, salvo para los compuestos **59 – 61**, en los cuales sus espectros $^1\text{H-RMN}$ sugieren la presencia de una mezcla de regioisómeros C-8 y C-9 en una proporción 73:27. A modo de ejemplo se muestra el espectro $^1\text{H-RMN}$ del derivado **60** (Figura 20).

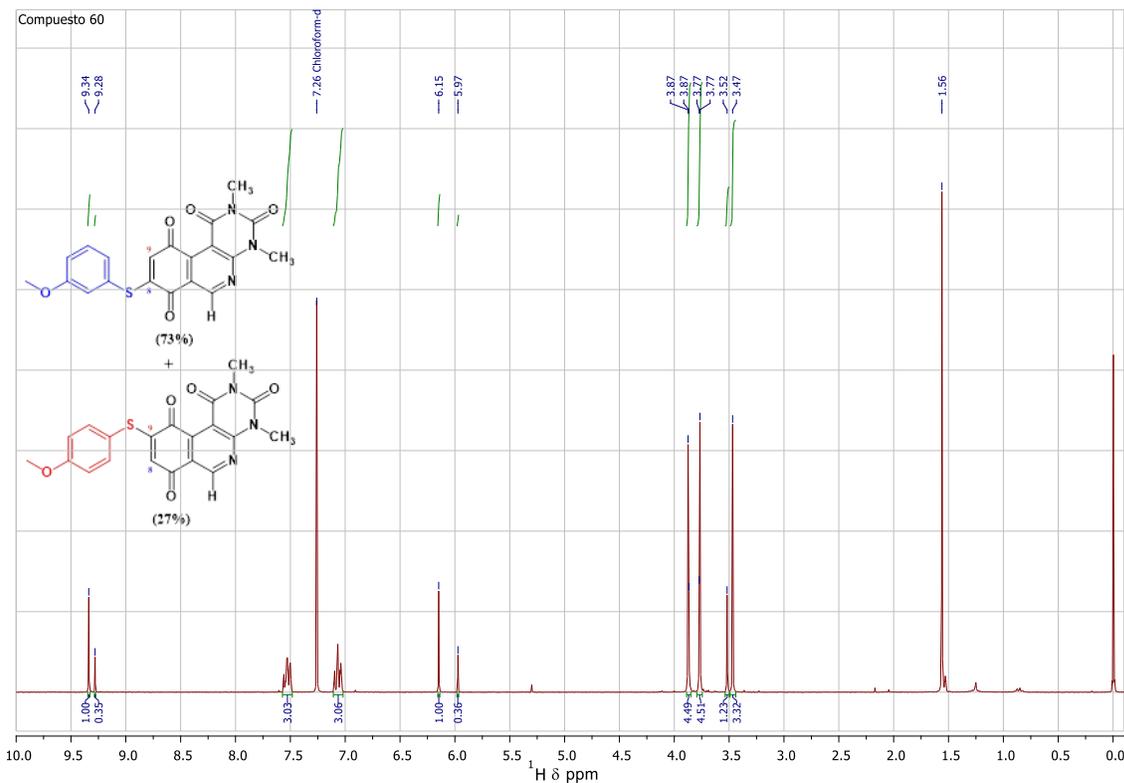


Figura 20. Espectro $^1\text{H-RMN}$ del compuesto **60**.

Este resultado es idéntico al reportado por Valderrama *et al.*, quien estudió la adición de aminas a núcleos fenantridin-7,10-quinonas, 6-H y 6-Me sustituidos (Figura 21) [96].

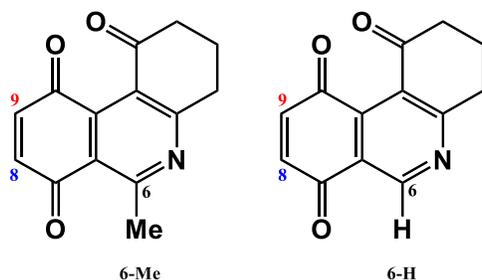


Figura 21. Núcleo fenantridin-7,10-quinonas, 6-H y 6-Me estudiadas por Valderrama et al.

Ellos demostraron que la adición de diferentes anilinas al núcleo quinónico 6-H sustituido genera una mezcla de isómeros, con proporciones que varían en función de la utilización de cerio como catalizador. Cuando se realiza la adición de anilinas a la quinona 6-H, en presencia de cerio, se obtuvo una mezcla de isómeros C-8 y C-9 en proporciones de 73% y 27%, respectivamente. En cambio, cuando se sustituye la quinona 6-Me se obtiene exclusivamente el derivado de monoación 8-C, independiente de la presencia de catalizador. Este antecedente y nuestros resultados sugieren la obtención de una mezcla de isómeros enriquecido en el derivado de monoación C-8 (**Figura 22**).

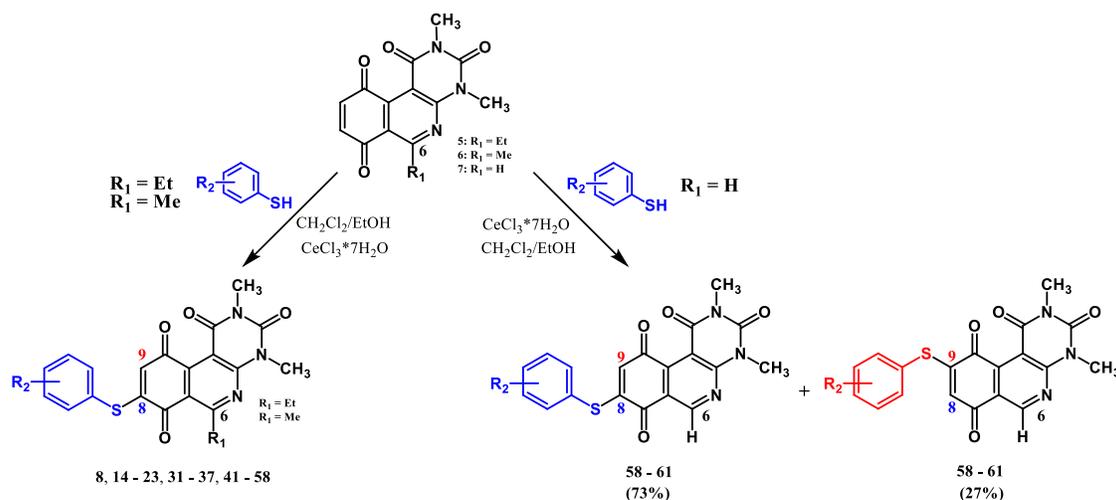


Figura 22. Regioselectividad en la reacción con quinonas 5 (6-Et), 6 (6-Me) o 7 (6-H).

La regioselectividad observada en las reacciones con las quinonas 5 y 6 y la mayor proporción de formación del isómero C-8 con la quinona 7 puede explicarse por el efecto del ión cerio, que actúa como catalizador [97], quien favorece el ataque nucleofílico en posición C-8 por coordinación con el heteroátomo de nitrógeno y/o con el grupo carbonilo de la posición C-10, lo cual favorecería su carácter electro-atractor y de esta manera, permitiendo la sustitución nucleofílica en C-8 [96]. Este resultado permite proyectar la síntesis y obtención de cada isómero y en particular el derivado C-9 sustituido, con el objetivo de determinar su actividad antibacteriana, obtener compuestos más activos y

estudiar estrategias sintéticas que permitan obtener compuestos con otras sustituciones en esa posición.

Por otra parte, dado que no fue posible obtener el compuesto **8** (4'-COOH) a través del procedimiento anterior, se realizó una modificación del proceso de síntesis. Por esto, se incluyó posterior a la adición, una separación líquido-líquido con una fase acuosa en medio básico para extraer el producto ácido. Luego, se realizó una neutralización con ácido, observándose la formación de un precipitado, el cual se purificó en columna. De esta forma, se obtuvo un sólido de color café con un 38% de rendimiento, que correspondió al compuesto **8**.

Otro caso particular fue el proceso de síntesis del compuesto **10**. Dado que Baruah *et al.* reportaron la obtención del derivado de tio-adición a la 1,4-naftoquinona cuando esta reacciona con 4-aminotiofenol [98], procedimos de manera habitual para generar el compuesto **10**. Sin embargo, en nuestro caso la reacción dio origen a 2 productos. Los espectros ¹H-RMN evidenciaron que los productos obtenidos correspondían, por una parte, al formado por la adición del átomo de nitrógeno anilínico al núcleo tricíclico **26** (31% de rendimiento; 46 mg), y por otra, a la adición de 2 unidades de quinona (**5**) al 4-aminotiofenol **26a** (5% de rendimiento; 12 mg), **Figura 23**.

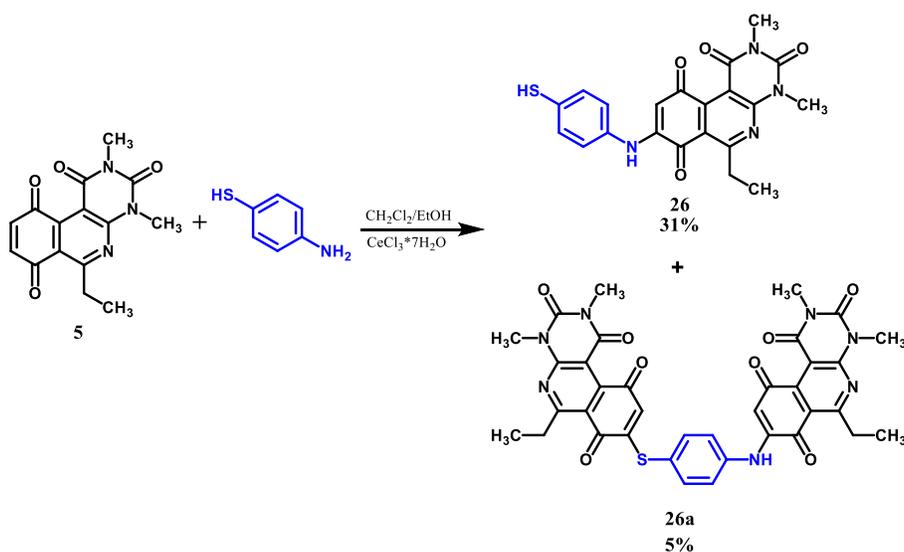


Figura 23. Obtención de los compuestos 26 y 26a.

A continuación, se muestra el espectro ¹H-RMN obtenido para el compuesto **26** (**Figura 24**).

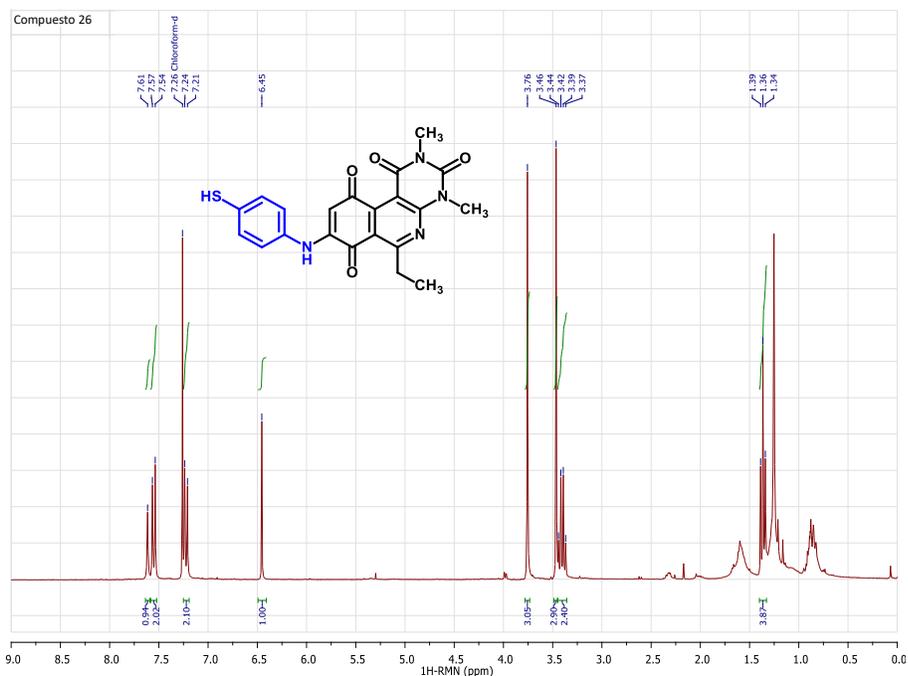


Figura 24. Espectro ^1H -RMN del compuesto 26.

A continuación, se muestra el espectro ^1H -RMN obtenido para el compuesto **26a** (Figura 25).

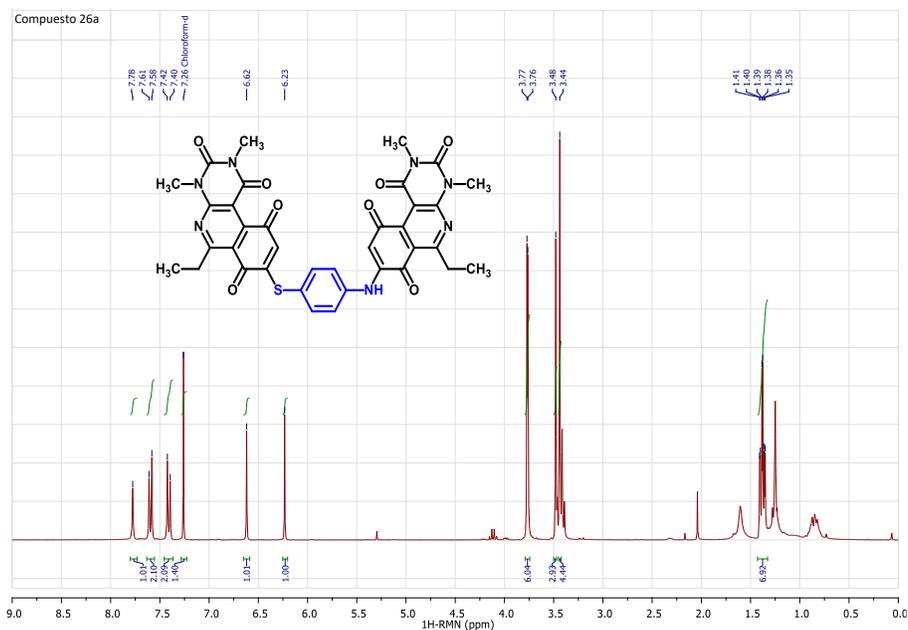


Figura 25. Espectro ^1H -RMN del compuesto 26a.

Dado esto, la alternativa de síntesis involucró la formación inicial del derivado 4'-nitrado (**17**) a través del PG2, el cual fue, posteriormente reducido al grupo amino, empleando la reducción de Béchamp [99] para obtener el compuesto **10**. En esta reacción

el grupo nitro se reduce por medio de la utilización de Fe^0 empleando como medio de reacción una mezcla de Agua/Metanol/Ácido acético. La estrategia de síntesis se resume en la **Figura 26**.

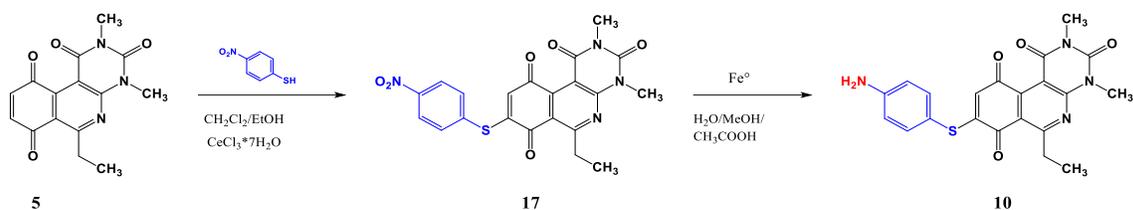


Figura 26. Esquema de obtención de los compuestos 17 y 10.

Finalmente, para esta serie de derivados, no fue posible obtener los compuestos **12** y **13**.

Por otra parte, considerando estos antecedentes y lo reportado por nuestro grupo [59], la adición de anilinas al compuesto **5**, para formar los derivados **24 – 25, 27 – 30**, se realizó empleando una razón estequiométrica entre el núcleo tricíclico y la respectiva anilina de 1: 2, sin la necesidad de diluir ni adicionar de manera controlada la anilina (PG3), ya que como se discutió anteriormente la sustitución en C-6 impide la monoación en C-9 y por otra parte, el átomo de nitrógeno enriquece el sistema quinónico, disminuyendo la electrofilia del carbono C-9, impidiendo de esta manera una doble sustitución. Así, con este procedimiento fue posible obtener los compuestos objetivos sin observar la presencia del isómero C-9 ni derivados producto de una doble adición.

Como excepción al proceso anterior, el ensayo de obtención del compuesto **9**, se realizó mediante la adición lenta del ácido para-aminobenzoico al compuesto **5**. Luego de dejar reaccionar durante 24 horas, el crudo de reacción se llevó a sequedad, y posteriormente se realizaron 3 lavados con 30 mL de diclorometano. Finalmente, el sólido obtenido fue purificado a través de columna cromatográfica, utilizando como fase móvil acetato de etilo. El espectro ^1H -RMN de este compuesto se muestra en la **Figura 27**.

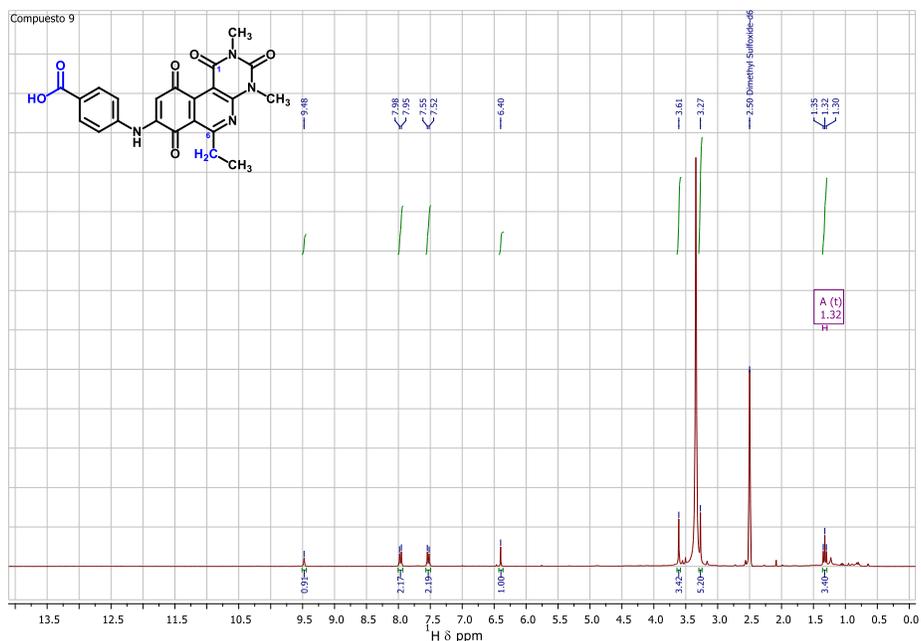


Figura 27. Espectro ^1H -RMN del compuesto 9.

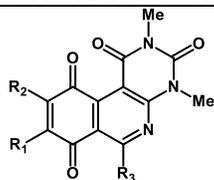
Es interesante observar que la señal del protón ácido del grupo ácido carboxílico del compuesto **9** no se observa en el espectro. Según Abraham *et al.* esto ocurre debido al amplio intercambio que sufren los hidrógenos ácidos, dificultando su detección a bajas concentraciones [100]. Por otro lado, la señal de los protones del grupo $-\text{CH}_2-$ en posición 6, se encuentran en la zona de absorción de la señal del agua del DMSO- d_6 en 3,3 ppm.

Finalmente, el detalle de las condiciones de reacción, caracterización y rendimientos de cada uno de los compuestos obtenidos se informa en la sección “parte experimental”.

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS COMPUESTOS QUINÓNICOS.

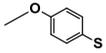
La actividad antibacteriana de los compuestos se determinó a través del parámetro de la concentración inhibitoria mínima, evaluada a través del test de microdilución en caldo, siguiendo las recomendaciones del CLSI [62]. Los resultados de actividad antibacteriana para los compuestos quinónicos sintetizados son informados en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Resultados de actividad antibacteriana de los compuestos quinónicos.



| Nº | Compuesto | | | CIM (µg/mL) | | | | | |
|----|----------------|----------------|----------------|-------------|------|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | SASM | SARM | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>K. pneumoniae</i> |
| 5 | H | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 6 | H | H | Me | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 7 | H | H | H | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 8 | | H | Et | 32 | 16 | 32 | >32 | >32 | >32 |
| 9 | | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 10 | | H | Et | >32 | >32 | 32 | >32 | >32 | >32 |
| 11 | | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 12 | | H | Et | NO | NO | NO | NO | NO | NO |
| 13 | | H | Et | NO | NO | NO | NO | NO | NO |
| 14 | | H | Et | 16 | 16 | 16 | >32 | >32 | >32 |
| 15 | | H | Et | 16 | 16 | 16 | >32 | >32 | >32 |
| 16 | | H | Et | 8 | 8 | 8 | >32 | >32 | >32 |
| 17 | | H | Et | 8 | 8 | 8 | >32 | >32 | 64 |
| 18 | | H | Et | 8 | 16 | 16 | >32 | >32 | >32 |
| 19 | | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 20 | | H | Et | 4 | 4 | 8 | >32 | >32 | >32 |
| 21 | | H | Et | >32 | 4 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 22 | | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 23 | | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 24 | | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 25 | | H | Et | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 |
| 26 | | H | Et | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 |
| 27 | | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 28 | | H | Et | 1 | 1 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 29 | | H | Et | 0,5 | 0,5 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 30 | | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |

| | | | | | | | | | |
|----|---|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 31 |  | H | Et | 2 | 2 | 2 | >64 | >64 | >64 |
| 32 |  | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 33 |  | H | Et | >64 | 4 | 32 | >64 | >64 | 64 |
| 34 |  | H | Et | >64 | >64 | 64 | >64 | >64 | >64 |
| 35 |  | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 36 |  | H | Et | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 37 |  | H | Et | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 |
| 38 |  | H | Et | >8 | >8 | >8 | >8 | >8 | >8 |
| 39 |  | H | Et | 8 | 4 | 8 | >32 | >32 | >32 |
| 40 |  | H | Et | 4 | 4 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 41 |  | H | Et | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 |
| 42 |  | H | Et | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 | >16 |
| 43 |  | H | Me | 8 | 8 | 8 | >32 | >32 | >32 |
| 44 |  | H | Me | 4 | 4 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 45 |  | H | Me | 4 | 8 | 8 | >32 | >32 | >32 |
| 46 |  | H | Me | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 47 |  | H | Me | 32 | 32 | >32 | >32 | >32 | >32 |
| 48 |  | H | Me | 2 | 4 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 49 |  | H | Me | 4 | 4 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 50 |  | H | Me | 4 | 8 | 8 | >32 | >32 | >32 |
| 51 |  | H | Me | 4 | 4 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 52 |  | H | Me | 4 | 4 | 8 | >32 | >32 | >32 |
| 53 |  | H | Me | 4 | 4 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 54 |  | H | Me | 2 | 4 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 55 |  | H | Me | 8 | 8 | 8 | >32 | >32 | >32 |
| 56 |  | H | Me | 4 | 8 | 8 | >32 | >32 | >32 |
| 57 |  | H | Me | 2 | 2 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| 58 |  | H | Me | 2 | 2 | 4 | >32 | >32 | >32 |

| | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|
| 59 |  | H | H | 16 | 16 | 32 | >32 | >32 | >32 | |
| 60 |  | H | H | 8 | 16 | >32 | >32 | >32 | >32 | |
| 61 |  | H | H | 16 | 16 | >32 | >32 | >32 | >32 | |
| | | | | VAN | 1 | 1 | 2 | NE | NE | NE |
| | | | | GEN | NE | NE | NE | 0.5 | 1 | 2 |

CIM = Concentración Inhibitoria Mínima; NE = No evaluada; NO = No obtenido; VAN = vancomicina; GEN = gentamicina.

Los resultados muestran que los compuestos obtenidos presentaron actividad antibacteriana, frente a bacterias Gram positivo, en rangos de 64 µg/mL a 0,5 µg/mL, sin presentar actividad, a las concentraciones ensayadas, en bacterias Gram negativo, con excepción de los compuestos **17** y **42** que presentaron una CIM de 64 µg/mL frente a *K. pneumoniae*.

En particular, los resultados para los compuestos diseñados para unirse a cadenas peptídicas (**8**, **9**, **10** y **11**) muestran que el compuesto **8** presentó actividad antibacteriana en bacterias Gram positivo en rangos de 16 a 32 µg/mL y el compuesto **10** presentó actividad sobre *E. faecalis* a una concentración de 32 µg/mL. Por su parte, los compuestos **9** y **11** no presentaron actividad en bacterias Gram positivo. Dado lo limitado de estos resultados es que se propuso la obtención de nuevos compuestos quinónicos que permitan entregar mayor información de la relación estructura-actividad de esta familia de compuestos. El análisis de esos resultados se detalla a continuación.

5. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

5.1. ESTUDIO DE LA CARACTERÍSTICA DEL SUSTITUYENTE EN POSICIÓN 4' DEL ANILLO AROMÁTICO.

El diseño planteado para la síntesis de nuevos compuestos, permite analizar cómo las modificaciones estructurales planteadas modulan la actividad antibacteriana.

Investigar estas interrogantes nos permite comprender que secciones estructurales son relevantes para la actividad antibacteriana y, además que conjunto de parámetros modulan la relación estructura-actividad de esta familia de compuestos. Junto a esto, la aplicación de esta información nos entrega herramientas para orientar la síntesis de forma racional de nuevos compuestos con miras a obtener un compuesto líder.

Según esto, para iniciar el estudio de relación estructura-actividad se analiza la influencia del sustituyente en posición 4' del anillo aromático sobre la actividad antibacteriana de esta familia de compuestos mediante dos vías independientes. La primera

de ellas, es la síntesis y evaluación de una serie de compuestos diseñados a través de la gráfica de Craig, la cual nos permite estudiar la influencia del carácter hidrofóbico (π) y electrónico (σ) del sustituyente en posición 4' sobre la actividad antibacteriana. La segunda, y con el mismo objetivo, corresponde al cálculo teórico de la refractividad molar (RM) del sustituyente.

Un resumen de las estrategias propuestas se representa en la **Figura 28**.

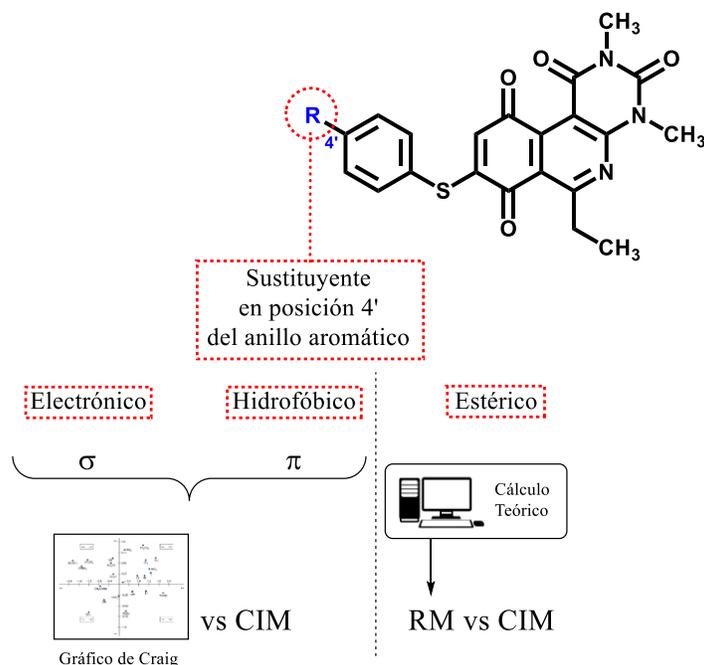


Figura 28. Esquema resumen de las estrategias utilizadas.

5.2. ANÁLISIS DEL GRÁFICO DE CRAIG EN FUNCIÓN A LA CIM.

El análisis de la influencia del factor electrónico e hidrofóbico del sustituyente, sobre la actividad antibacteriana, se realizó utilizando la gráfica de Craig [77], como herramienta de diseño para la síntesis y posterior evaluación de la actividad antibacteriana de nuevos compuestos pirimidoisoquinolinquinona. Utilizar esta gráfica permite generar compuestos con diferente carácter hidrofóbico (π) y electrónico (σ) al considerar sustituyentes ubicados en los 4 cuadrantes de la gráfica.

Considerando esto, a los compuestos **8** ($4' = \text{COOH}$) y **10** ($4' = \text{NH}_2$), mencionados inicialmente, se sumaron 6 derivados previamente obtenidos [57] que corresponden a los sustituyentes $4' = \text{hidrógeno}$, metoxilo, metilo, flúor, cloro, y bromo. Además, se sintetizaron los compuestos $4' \text{-OH}$ (**15**) y $4' \text{-NO}_2$ (**17**) y se evaluó su actividad antibacteriana frente a las seis bacterias descritas anteriormente. De esta forma, al ampliar el número de sustituyentes

a analizar es posible obtener información más precisa respecto a la influencia de las características de estos sustituyentes en la actividad antibacteriana. En la **Figura 29** se ordenan los sustituyentes utilizados en el análisis de forma creciente según su carácter hidrofóbico y electrónico.

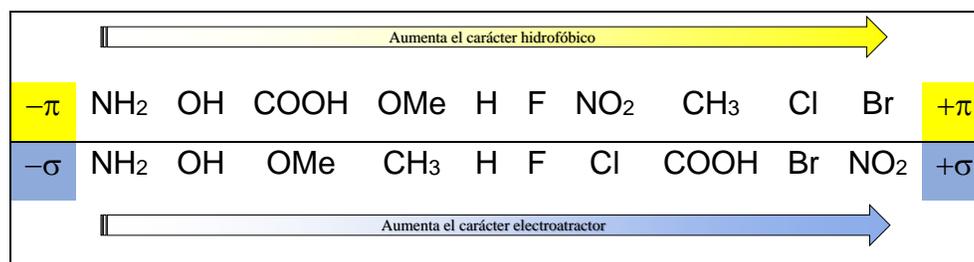


Figura 29. Distribución de los sustituyentes en función de su carácter hidrofóbico (arriba - amarillo) o electrónico (abajo - azul).

Es posible observar que los sustituyentes se distribuyen de manera distinta al ser ordenados en función a su carácter hidrofóbico o electrónico lo que puede dar cuenta de la influencia de cada uno de estos parámetros en la actividad biológica de estos compuestos.

Los resultados de actividad antibacteriana, expresada a través de la CIM ($\mu\text{g/mL}$), obtenidos para esta serie de compuestos se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. CIM de los compuestos analizados agrupados en función al carácter hidrofóbico del sustituyente.

| R | CIM $\mu\text{g/mL}$ | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|----------------|----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|--|
| | Aumenta el carácter hidrofóbico → | | | | | | | | | | |
| Compuesto | NH ₂ 10 | OH 15 | COOH 8 | OCH ₃ P5 | H P1 | F P2 | NO ₂ 17 | CH ₃ P6 | Cl P3 | Br P4 | |
| SARM | >32 | 16 | 16 | 16 | 8 | 8 | 8 | 4 | 4 | 4 | |
| SASM | >32 | 16 | 32 | 16 | 8 | 8 | 8 | 4 | 4 | 8 | |
| <i>E. faecalis</i> | 32 | 16 | 32 | 16 | 8 | 8 | 8 | 16 | 4 | 8 | |
| Carácter del sustituyente | -π, -σ | -π, -σ | -π, +σ | -π, -σ | - | +π, +σ | +π, +σ | +π, -σ | +π, +σ | +π, +σ | |

^a *Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positivo ATCC® 0,5 - 2 $\mu\text{g/mL}$ frente a SARM y SASM y 1 - 4 $\mu\text{g/mL}$ frente a *E. faecalis* acorde a la CLSI [62].*

En la **Tabla 9**, se muestran los diferentes sustituyentes utilizados para este estudio, ordenados de manera creciente de acuerdo a su carácter hidrofóbico, debido a que los resultados indican que este factor es el principal modulador de la actividad antibacteriana de los compuestos. El análisis muestra una tendencia para SARM, donde la disminución sostenida del valor de CIM, es decir, un aumento de la actividad antibacteriana, se relaciona con el aumento del carácter hidrofóbico del sustituyente. Para SASM y *Enterococcus faecalis*, se observa la misma tendencia con resultados atípicos para **15** u **8** y **P4** en SASM y **15** u **8**, **P6** y **P4** en *Enterococcus faecalis*. Respecto de las características electrónicas de los sustituyentes, se observa que, no existe una influencia de este factor en la modulación

de la actividad antibacteriana. Esto se refleja en que sustituyentes como COOH y NH₂ con características electrónicas distintas (+σ y -σ, respectivamente) poseen los valores más bajos de actividad antibacteriana de la serie. Asimismo, los pares de sustituyentes como NO₂/F y OH/OMe, que poseen valores distintos de electronegatividad pero con valores cercanos de hidrofobicidad, poseen el mismo valor de CIM. Finalmente, al comparar los derivados 4'-COOH (+σ, -π) y 4'-Me (-σ, +π) observamos que el menor valor de CIM se presenta en el compuesto con carácter electrodonor dado que su constante de hidrofobicidad es mayor.

5.3. ANÁLISIS DE LA REFRACTIVIDAD MOLAR EN FUNCIÓN A LA CIM.

La refractividad molar o RM, corresponde a un parámetro teórico calculado a partir de la ecuación de Lorentz-Lorenz. Este método es comúnmente utilizado para describir el volumen ocupado por un átomo o grupo de átomos en el espacio en unidades de cm³ de un mol de sustancia. Mediante el programa ChemSketch® [101] se calculó la RM de los diferentes sustituyentes unidos a un anillo aromático.

Siguiendo el mismo análisis anterior, la **Tabla 10** muestra los valores de RM calculados para los compuestos mencionados anteriormente y sus respectivos valores de CIM en bacterias Gram positivo.

Tabla 10. CIM de los compuestos analizados agrupados en función del volumen del sustituyente.

| R | CIM µg/mL | | | | | | | | | |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|-----------------|-----------|-----------------|----------|------------------|-----------|
| | H | F | OH | NH ₂ | CH ₃ | Cl | NO ₂ | COOH | OCH ₃ | Br |
| Compuesto | P1 | P2 | 15 | 10 | P6 | P3 | 17 | 8 | P5 | P4 |
| SARM | 8 | 8 | 16 | >32 | 4 | 4 | 8 | 16 | 16 | 4 |
| SASM | 8 | 8 | 16 | >32 | 4 | 4 | 8 | 32 | 16 | 8 |
| <i>E. faecalis</i> | 8 | 8 | 16 | 32 | 16 | 4 | 8 | 32 | 16 | 8 |
| RM* (cm ³ /mol) | 1.00 | 1.11 | 1.52 | 3.61 | 4.62 | 4.82 | 6.03 | 6.27 | 6.36 | 7.72 |

^a *Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC® 0,5 - 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 - 4 µg/mL frente a E. faecalis acorde a la CLSI [62]. * Valores normalizados respecto al átomo de hidrógeno.*

Los resultados muestran que no existe una tendencia al relacionar la CIM de los compuestos con el valor de RM del sustituyente en posición 4'. Por ejemplo, el compuesto **P1** que posee el menor tamaño de la serie tiene una actividad de 8 µg/mL en las 3 bacterias evaluadas. Al aumentar el volumen hacia el compuesto **10** con el grupo amino, la actividad cae significativamente llegando a valores >32 µg/mL. Esto sugiere que el aumento de volumen va en desmedro de la actividad, sin embargo, los compuestos **17** y **P4**, grupos nitro y bromo respectivamente, poseen mayor volumen que el compuesto **10** y su perfil de actividad es similar al compuesto **P1**. Por su parte el compuesto **8** posee un valor de RM

entre los valores de los compuestos **17** y **P4**, sin embargo, su valor de CIM disminuye respecto a estos dos compuestos. Es posible apreciar resultados similares para el resto de moléculas de la serie.

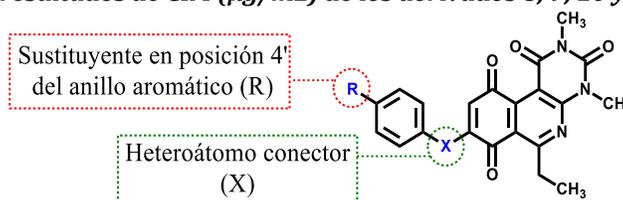
De esta forma el análisis de estas moléculas muestra que las diferencias de volumen entre los sustituyentes no dan cuenta del cambio en la actividad antibacteriana, situación similar ocurre al analizar el carácter electrónico de cada uno de ellos. En contraste, se observa una clara tendencia de aumento de actividad antibacteriana con aumento del carácter hidrofóbico del sustituyente, lo cual permite señalar que este es el factor principal que modula el efecto antibacteriano para la serie de compuestos 4' sustituidos.

5.4. CAMBIO BIOISOSTÉRICO: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL HETEROÁTOMO CONECTOR EN LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Como ya se ha mencionado, esta estrategia de diseño tiene por objetivo estudiar el eventual empleo de un átomo de nitrógeno como heteroátomo conector para el desarrollo de nuevos compuestos antibacterianos, considerando que el reemplazo del grupo tiol por un grupo amino ha sido ampliamente utilizado en química medicinal, como un cambio bioisostérico clásico, para el desarrollo de derivados farmacológicamente activos [102], [103].

Por esto, la influencia de este cambio sobre la actividad antibacteriana se evaluó, inicialmente, mediante la comparación de la actividad antibacteriana de los compuestos **8**, **9**, **10** y **11**, **Tabla 11**.

Tabla 11. Resumen de resultados de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los derivados **8, **9**, **10** y **11**.**



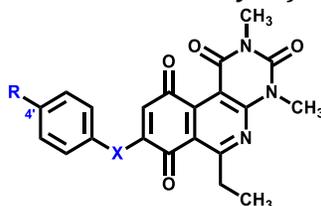
| R | CIM $\mu\text{g/mL}$ | | | | VAN ^a |
|--------------------|----------------------|----------|-----------------|-----------|------------------|
| | COOH | | NH ₂ | | |
| | S | NH | S | NH | |
| X | | | | | |
| Compuesto | 8 | 9 | 10 | 11 | |
| SARM | 32 | >32 | >32 | >32 | 1 |
| SASM | 16 | >32 | >32 | >32 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> | 32 | >32 | 32 | >32 | 2 |

^a Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC[®] 0,5 – 2 $\mu\text{g/mL}$ frente a SARM y SASM y 1 – 4 $\mu\text{g/mL}$ frente a *E. faecalis* acorde a la CLSI [62].

La **Tabla 11** muestra que los compuestos que presentan un átomo de nitrógeno como heteroátomo conector no presentaron actividad antibacteriana en ninguna de las bacterias ensayadas. Sumado a esto, al analizar de manera individual los compuestos **25** (4' = COOCH₃) y **26** (4' = SH) observamos que tampoco presentaron actividad antibacteriana (CIM >16 µg/mL) en ninguna de las bacterias evaluadas. Esto planteó la interrogante respecto a si la utilización de un átomo de nitrógeno como heteroátomo conector es deletéreo para la actividad antibacteriana para esta serie de compuestos.

Debido a que estos datos fueron insuficientes para dilucidar si los compuestos que poseen un átomo de nitrógeno (X = NH) como heteroátomo conector son inactivos como antibacterianos, se decidió aumentar el número de compuestos a analizar. Para esto, se sintetizó una serie de derivados anilínicos sustituidos en posición 4'. Los compuestos utilizados para este estudio y un resumen de su actividad antibacteriana en bacterias Gram positivo se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados de CIM de los derivados anilínicos y tiofenólicos.



| Serie anilina (X = NH) | | | | Serie tiofenol (X = S) | | | | | |
|------------------------|----|-----------------|-----------------|------------------------|------------------------|----|-----------------|-----------------|---------------|
| CIM µg/mL | | | | CIM µg/mL | | | | | |
| R | | SARM ATCC 43300 | SASM ATCC 29213 | EF ATCC 29212 | R | | SARM ATCC 43300 | SASM ATCC 29213 | EF ATCC 29212 |
| 24 | H | >32 | >32 | >32 | P1 | H | 8 | 8 | 8 |
| 27 | F | >32 | >32 | >32 | P2 | F | 8 | 8 | 8 |
| 28 | Cl | 1 | 1 | 4 | P3 | Cl | 4 | 4 | 4 |
| 29 | Br | 0.5 | 0.5 | 4 | P4 | Br | 4 | 8 | 8 |
| VAN^a | | 1 | 1 | 2 | VAN^a | | 1 | 1 | 2 |

^a *Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC[®] 0,5 – 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 – 4 µg/mL frente a E. faecalis acorde a la CLSI [62].*

Los resultados muestran que para la serie anilina, los compuestos **24 y 27** fueron inactivos sobre todas las bacterias Gram positivo evaluadas, a las concentraciones ensayadas, sumándose a los resultados observados previamente. Por otra parte, los compuestos **28 y 29** presentaron valores de CIM entre 0,5 y 4 µg/mL. Así, podemos observar que al comparar los valores de CIM de la serie anilina con sus respectivos análogos de la serie tiofenol se observan que los derivados anilínicos 4'-H y 4'-F fueron inactivos a las concentraciones ensayadas en todas las bacterias evaluadas. Por otra parte, el compuesto **28** presenta un valor de actividad antibacteriana 4 veces mayor que su

análogo tiofenólico **P3** sobre SARM y SASM. De igual manera, el compuesto **29**, posee valores de actividad antibacteriana entre 2 y 16 veces mayor que su análogo tiofenólico **P4**.

Con el objetivo de explicar estos resultados se realizó una optimización de las estructuras de ambas series y se observó diferencias en la conformación de mínima energía. La **Figura 30** muestra la conformación de mínima energía para los derivados 4'-H y 4'-Br de ambas series.

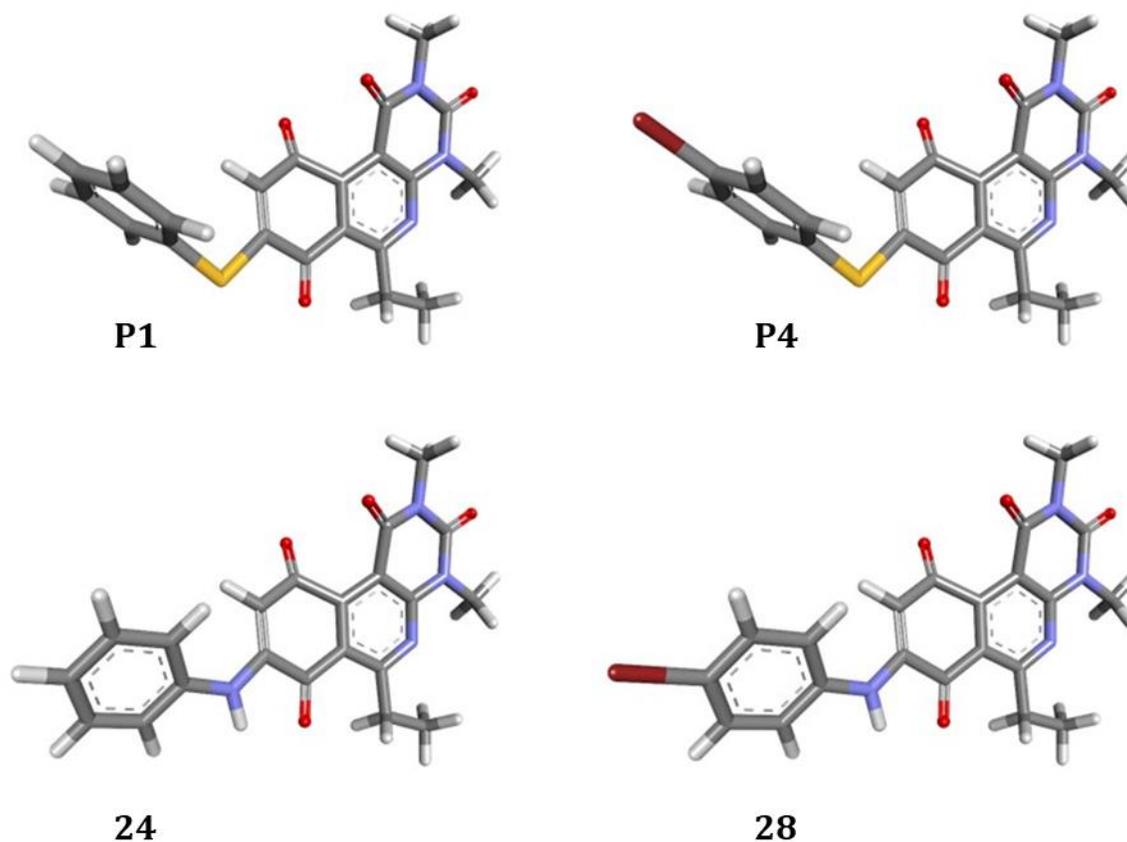
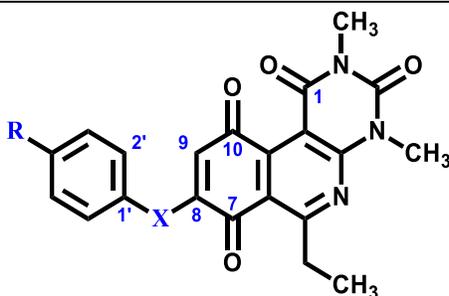


Figura 30. Conformaciones de mínima energía de los compuestos 4'-H y 4'-Br de ambas series. P1: 4'-H-tiofenol; P4: 4'-Br-tiofenol; 24: 4'-H-anilina y 28: 4'-Br-anilina. El núcleo pirimidoisoquinolinquinona de todas las estructuras se encuentra en el mismo plano para facilitar la comparación entre las conformaciones de los grupos 4'-R-aril-X. El nivel de cálculo utilizado fue DFT(B3LYP)/6-311++G(d,p).

La **Tabla 13** muestra las distancias calculadas del sustituyente R y los átomos de oxígeno de los grupos carbonilos en posición 7 (CO1) y el de la posición 10 (CO2) del núcleo quinónico, el ángulo entre el átomo de carbono 8, el heteroátomo y el átomo de carbono 1' y el ángulo diedro entre el plano del grupo benceno considerado por el enlace 1'-2' y el doble enlace de la quinona entre C-8 y C-9.

Tabla 13. Análisis de distancias y ángulos de enlace de los compuestos anilínicos y tiofenólicos.



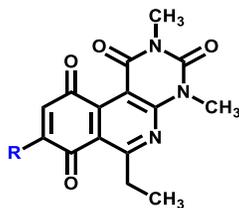
| Compuesto | R | X | Distancia R-CO1 (Å) | Distancia R-CO2 (Å) | Ángulo enlace C-X-C (°) | Ángulo diedro 1'-2'/8-9 (°) |
|-----------|----|---|---------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------|
| P1 | H | S | 8,37 | 7,18 | 101,77 | 70,28 |
| 24 | H | N | 7,81 | 8,29 | 130,20 | 33,71 |
| P2 | F | S | 8,60 | 7,37 | 101,79 | 72,45 |
| 27 | F | N | 8,05 | 8,46 | 129,83 | 34,83 |
| P3 | Cl | S | 9,02 | 7,68 | 101,70 | 72,24 |
| 28 | Cl | N | 8,46 | 8,87 | 130,33 | 32,63 |
| P4 | Br | S | 9,18 | 7,81 | 101,73 | 70,26 |
| 29 | Br | N | 8,62 | 9,01 | 130,32 | 32,58 |

Este análisis muestra un cambio importante en el ángulo que forma el átomo de nitrógeno y ambos átomos de carbono ($28,4^\circ$ promedio), respecto al mismo ángulo que se forma con el átomo de azufre. Esta condición genera una alteración de la distancia que existe entre el sustituyente en posición 4' y los grupos carbonilo señalados. Los ángulos diedros muestran diferencias de aproximadamente $37,9^\circ$ entre las series anilino y tiofenol. En la serie anilino el ángulo diedro en promedio es $71,3^\circ$, en cambio en la serie tiofenol es $33,4^\circ$. Estos resultados sugieren que la diferencia en la actividad antibacteriana entre las series podría atribuirse a la presencia de un grupo halógeno en R cuando X = NH. Siendo de menor relevancia R cuando X = S. A pesar de lo señalado los resultados obtenidos son insuficientes para realizar conclusiones sobre cómo el cambio de heteroátomo afecta la actividad farmacológica de estos compuestos, sin embargo, la información obtenida abre la puerta a la generación de una nueva serie de derivados de anilinas.

5.5. FREE WILSON.

Los compuestos diseñados a partir del análisis de FW permiten analizar si la disustitución en el anillo aromático permite obtener compuestos con actividad antibacteriana. A partir de los resultados ya expuestos se sintetizaron 3 compuestos. Para facilitar el análisis se incluyó un compuesto disustituido previamente obtenido y 5 derivados monosustituidos (Tabla 14).

Tabla 14. Valores de CIM de los compuestos diseñados a través del análisis de FW.



| | | CIM µg/mL | | | | | | | | |
|----------------------|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-------------|
| R | | | | | | | | | | |
| Compuesto | | 23 | P8 | P9 | 24 | 25 | P10 | P7 | P3 | P12* |
| SARM | >32 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| SASM | >32 | 32 | 32 | 2 | >64 | 4 | >4 | 4 | 4 | 4 |
| <i>E. faecalis</i> | >32 | 4 | 4 | 2 | 32 | 4 | >4 | 4 | 4 | 2 |
| <i>E. coli</i> | >32 | >32 | >32 | >64 | >64 | >32 | >4 | >32 | >32 | >32 |
| <i>P. aeruginosa</i> | >32 | >32 | >32 | >64 | >64 | >32 | >4 | >32 | >32 | >32 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >32 | - | - | >64 | 64 | - | - | - | - | - |

^a Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positivo ATCC® 0,5 – 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 – 4 µg/mL frente a *E. faecalis* acorde a la CLSI. ^b Gentamicina, control de calidad para bacterias Gram negativo ATCC® 0,25 – 1 *E. coli*, 0,25 – 2 frente a *P. aeruginosa* acorde a la CLSI [62].

Los resultados muestran que el derivado **24** presentó la misma CIM que el derivado mono metoxilado en SARM y, 16 y 2 veces más activo que el derivado **P9** sobre SASM y *E. faecalis*, respectivamente. Respecto al compuesto **25** se observa una disminución de la actividad antibacteriana al compararlo con su análogo monosustituido **P10**, sin embargo, presentó actividad antibacteriana sobre *K. pneumoniae*. Por su parte el derivado **P7** posee similar actividad que el derivado **P3** y una CIM dos veces mayor que el derivado **P12** sobre SARM, sin embargo, debido a su baja solubilidad no se observó actividad sobre las otras dos bacterias mencionadas. Finalmente, el derivado **23** no presentó actividad antibacteriana en ninguna de las bacterias ensayadas.

De esta forma, los compuestos obtenidos tras el análisis de FW muestran que la doble sustitución del anillo aromático puede entregar compuestos activos y por lo tanto modificaciones estructurales de este tipo deberían ser consideradas. El compuesto **24** fue quien presentó mejor perfil.

5.6. ESTUDIO POR HOMOLOGÍA.

Como ya se mencionó, este estudio se realiza por la inserción o eliminación de un grupo CH₂ en alguna porción de la molécula. En nuestro caso particular se empleó esta estrategia en tres zonas distintas de la molécula.

5.6.1. INFLUENCIA DEL DISTANCIAMIENTO DEL ÁTOMO DE AZUFRE Y EL ANILLO AROMÁTICO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

En primera instancia se decidió insertar grupos CH₂ entre el anillo aromático y el heteroátomo de azufre con el propósito de analizar cómo la inserción de estos átomos influye la actividad antibacteriana.

Considerando como estructura base los derivados **P1** y **P3** [57], se diseñaron y sintetizaron tres nuevos compuestos (**34**, **35** y **36**). Dado a que la inserción de átomos de carbono en la cadena provoca un aumento de los grados de libertad de estas moléculas, se incorporó el compuesto **37**, con el sustituyente 2-mercapto-benzotiazol, el que permitió analizar cómo un sistema rígido y de mayor volumen influye en la actividad antibacteriana.

Los compuestos utilizados para este estudio y los resultados de su actividad antibacteriana se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Resultados del estudio por homología en bacterias Gram positivo.

| R | CIM µg/mL | | | | | |
|--------------------|--|--|--|---|--|--|
| | Serie Homóloga 1 | | | Serie Homóloga 2 | | |
| |  |  |  |  |  |  |
| Compuesto | P1 | 18 | 19 | P3 | 20 | 47 |
| SARM | 8 | >64 | >32 | 4 | >32 | >16 |
| SASM | 8 | >64 | >32 | 4 | >32 | >16 |
| <i>E. faecalis</i> | 8 | 64 | >32 | 4 | >32 | >16 |

^a *Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC® 0,5 – 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 – 4 µg/mL frente a E. faecalis acorde a la CLSI [62].*

La comparación de los compuestos **P1** y **18**, muestra que la adición de un átomo de carbono entre el átomo de azufre y el anillo de benceno genera una pérdida de la actividad sobre SARM y SASM; y reduce 8 veces la actividad frente a *E. faecalis*. La adición de dos átomos de carbono (compuesto **19**), provoca la pérdida de la actividad antibacteriana en todas las bacterias evaluadas. El mismo fenómeno se observa al comparar el compuesto **20** con su homólogo **P3**. Por otra parte, la presencia del sustituyente 2-mercapto-benzotiazol en el compuesto **47**, también generó pérdida de la actividad, respecto a **P1**.

Esto sugiere que el aumento de la distancia entre el anillo aromático y el heteroátomo conector provoca la pérdida de actividad antibacteriana. Este fenómeno puede guardar relación con la conformación de los compuestos en su estado de mínima energía, por lo que se decidió realizar un cálculo teórico de cada compuesto. La **Figura 31**, muestra los resultados obtenidos para este experimento teórico.

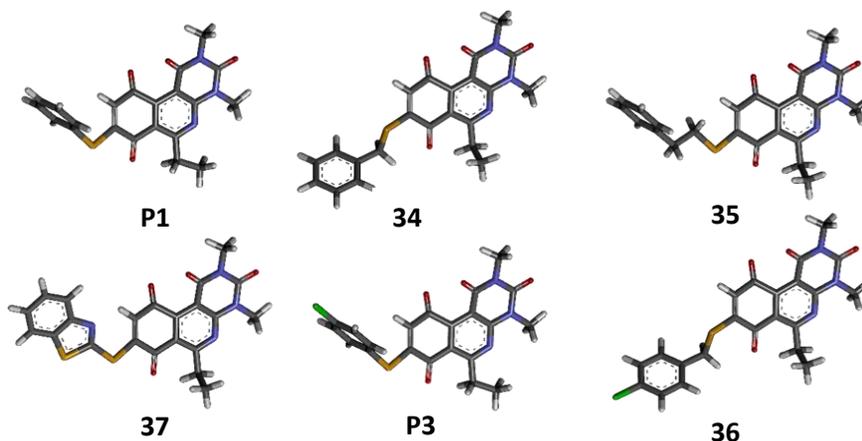


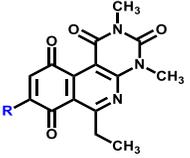
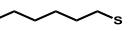
Figura 31. Conformaciones de mínima energía de los compuestos estudiados. **P1:** Bz-S-Quinona; **34:** Bz-CH₂-S-Quinona; **35:** Bz-CH₂-CH₂-S-Quinona, **37:** BT-S-Quinona, **P3:** 4'-Cl-S-Quinona y **36:** 4'-Cl-CH₂-S-Quinona. El núcleo pirimidoisoquinolinquinona de todas las estructuras se encuentra en el mismo plano para facilitar la comparación entre los distintos sustituyentes. El nivel de cálculo utilizado para optimizar todas las estructuras fue DFT(B3LYP)/6-311++G(d,p).

Los resultados de las conformaciones de mínima energía para ambas series homólogas muestran cambios de disposición espacial del anillo aromático (**34** vs **P1** y **36** vs **P3**) respecto al núcleo tricíclico y un aumento de la distancia entre este sistema aromático y el grupo carbonilo de la posición 10 (**35** vs **P1**), lo cual puede explicar la pérdida de actividad antibacteriana de estos derivados al compararlos con los derivados **P1** y **P3**. Al analizar el compuesto **37**, el cual presenta menos grados de libertad, observamos igualmente una pérdida de actividad. Esto puede generarse por el aumento del volumen del sustituyente o por el cambio del ángulo diedro entre ambos anillos. De esta forma, ninguna de estas modificaciones estructurales es favorable para la actividad antibacteriana de estos compuestos.

5.6.2. ADICIÓN DE TIOLES ALQUÍLICOS AL NÚCLEO QUINÓNICO.

Este estudio se realiza, adicionando cadenas tio-alquílicas, de distinto largo, al compuesto **5** como alternativa al empleo del anillo aromático. Esto tiene por objetivo determinar si los derivados tio-alquílicos presentan actividad antibacteriana y cuál es el largo óptimo de la cadena carbonada. Los compuestos utilizados para este estudio y los resultados de su actividad antibacteriana se muestran en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Compuestos empleados para el segundo estudio por homología y resultados de CIM de ambas series.

|  | CIM µg/mL | | | | | |
|---|---|---|---|--|---|---|
| | Serie Homóloga | | | | |  |
| R |  |  |  |  |  | |
| Compuesto | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | - |
| C = | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | - |
| SARM | >8 | 8 | 4 | >16 | >16 | 8 |
| SASM | >8 | 4 | 4 | >16 | >16 | 8 |
| <i>E. faecalis</i> | >8 | 8 | 4 | >16 | >16 | 8 |

^a Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC® 0,5 – 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 – 4 µg/mL frente a *E. faecalis* acorde a la CLSI [62].

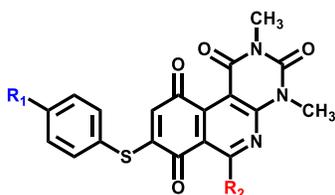
Los resultados muestran que la distancia óptima se asocia a la presencia de 3 y 4 átomos de carbono (compuestos **39** y **40**, respectivamente), ya que la actividad antibacteriana, en bacterias Gram positivo, se encuentra en rangos de 4 a 8 µg/mL. Los compuestos **38** (C = 2), **41** (C = 5) y **42** (C = 6) no presentaron actividad en las bacterias evaluadas, a las concentraciones ensayadas. De esta serie destaca el compuesto **39**, el cual presenta el doble de actividad antibacteriana que el compuesto **P1**.

5.6.3. REDUCCIÓN DE LA CADENA ETILO EN POSICIÓN 6 DEL NÚCLEO QUINÓNICO.

El último estudio por homología realizado planteó el objetivo de evaluar cómo influencia en la actividad antibacteriana la reducción del largo de cadena del sustituyente de la posición 6 del núcleo quinónico. Para esto se disminuyó el largo de la cadena del grupo etilo del compuesto **5** en un -CH₂- generando el compuesto **6** (R₂ = Metilo, Me) y eliminando esta cadena obteniéndose el compuesto **7** (R₂ = hidrógeno, H).

Los resultados obtenidos para la serie 6-metilo y la comparación con sus homólogos etilados se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Comparación de actividad antibacteriana de compuestos 6-etilo y 6-metilo.



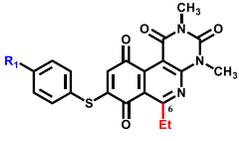
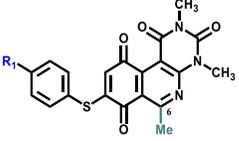
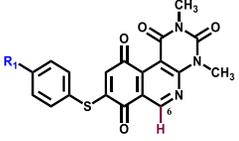
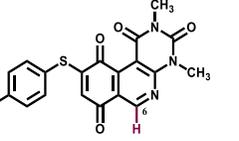
| R₂ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------|-----|------|-----|--------------------|-----|----------------------|------|----|------|----|--------------------|----|----------------------|------|----|------|----|--------------------|----|
| | SARM | | SASM | | <i>E. faecalis</i> | | | SARM | | SASM | | <i>E. faecalis</i> | | | SARM | | SASM | | <i>E. faecalis</i> | |
| R₁ | Et | Me | Et | Me | Et | Me | R₁ | Et | Me | Et | Me | Et | Me | R₁ | Et | Me | Et | Me | Et | Me |
| H | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | | | | | | | | | | | | | | |
| 2-Me | 32 | 4 | 32 | 4 | >32 | 4 | 3-Me | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4-Me | 4 | 2 | 4 | 4 | 16 | 4 |
| 2-OMe | 2 | 4 | 4 | 8 | 4 | 8 | 3-OMe | 4 | 4 | 8 | 8 | 4 | 8 | 4-OMe | 16 | 8 | 16 | 8 | 16 | 8 |
| 2-F | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | >32 | 3-F | 4 | 4 | 4 | 4 | 8 | 4 | 4-F | 8 | 4 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| 2-Cl | >32 | 32 | >32 | 32 | >32 | >32 | 3-Cl | 2 | 4 | 32 | 4 | 4 | 8 | 4-Cl | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 4 |
| 2-Br | 1 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 3-Br | 2 | 4 | 32 | 4 | 4 | 4 | 4-Br | 4 | 2 | 8 | 2 | 8 | 4 |

^a Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC® 0,5 – 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 – 4 µg/mL frente a *E. faecalis* acorde a la CLSI [62].

Los resultados muestran, en términos generales que no existen diferencias importantes entre los análogos que presentan cadena con grupos etilo o metilo en posición 6 del núcleo quinónico. Del total de resultado en 20 ocasiones (en verde) no existen cambios en el valor de CIM y 21 veces (en amarillo) se establece para las quinonas metiladas una variación de ± 1 dilución respecto a las quinonas etiladas. Finalmente, en 7 ocasiones (en rojo), y particularmente para el derivado 2-Me, se observa una actividad antibacteriana a lo menos 2 veces más potente para los derivados con grupo metilo en posición 6 respecto a los que presentan una cadena con grupo etilo en esa posición.

Por otro lado, no fue posible obtener los compuestos de núcleo 6-H debido a que al realizar la adición de distintos tiofenoles se generó una mezcla de isómeros, no realizándose el estudio de separación de estos derivados. Sin embargo, se decidió realizar la evaluación de la actividad antibacteriana de la mezcla, ya que los resultados obtenidos pueden determinar la necesidad de realizar ese estudio. Los valores de CIM de estas mezclas de isómeros, comparados con sus análogos etilados y metilados se muestran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Comparación de actividad antibacteriana de compuestos 6-sustituídos.

| Compuesto |  | | |  | | |  | | |  | | |
|--------------------|---|-----|----|---|-----|----|--|-----|-----|---|--|--|
| | P1 | P3 | P6 | 43 | 55 | 56 | 59 | 60 | 61 | | | |
| R ₁ | H | OMe | F | H | OMe | F | H | OMe | F | | | |
| SARM | 8 | 16 | 8 | 8 | 8 | 4 | 16 | 8 | 16 | | | |
| SARM | 8 | 16 | 8 | 8 | 8 | 8 | 16 | 16 | 16 | | | |
| <i>E. faecalis</i> | 8 | 16 | 8 | 8 | 8 | 8 | 32 | >32 | >32 | | | |

^a Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC® 0,5 – 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 – 4 µg/mL frente a *E. faecalis* acorde a la CLSI [62].

Los resultados muestran que la mezcla de isómeros obtenidas presentan actividad antibacteriana (con excepción de **60** y **61** en *E. faecalis*), aunque la mayoría de las veces, menor que sus homólogos 6-Metil y 6-Etil. A pesar de esto, este resultado proyecta como nuevo objetivo la separación de estos isómeros para determinar quién es responsable de la actividad y si es factible la modificación estructural de esos compuestos.

Por otra parte, los resultados en su conjunto muestran la tendencia que existe nuevamente un valor óptimo de lipofilia que modula la actividad antibacteriana de estos compuestos. Extender el largo de esta cadena puede ayudar a corroborar esta interrogante.

5.7. ADICIÓN DE SUSTITUYENTES EN POSICIÓN 9 DEL NÚCLEO QUINÓNICO.

Como complemento a los resultados obtenidos en esta investigación, un trabajo paralelo estudió cómo una segunda adición al núcleo quinónico, en posición 9, influencia la actividad antibacteriana de estos compuestos. Para esto se sintetizaron 3 nuevos derivados y se determinó su CIM. Los compuestos utilizados para este estudio y los resultados de su actividad antibacteriana se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Resultados de actividad antibacteriana de compuestos mono-adicionados (P1, P3 y 39) y di-adicionados (P18, P19 y P20).

| Compuesto | R ₁ | | R ₂ | | CIM µg/mL | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|--|---|---|
| |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SARM ATCC® 43300 | >16 | 8 | >32 | 8 | >16 | 4 | >16 | 4 |
| SASM ATCC® 29213 | >16 | 8 | >32 | 4 | >16 | 4 | >16 | 4 |
| <i>E. faecalis</i> ATCC® 29212 | >16 | 8 | >32 | 8 | >16 | 4 | >16 | 4 |

^a Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC® 0,5 – 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 – 4 µg/mL frente a *E. faecalis* acorde a la CLSI [62].

Los resultados obtenidos muestran que una segunda adición en el núcleo quinónico genera una pérdida de la actividad antibacteriana en estos compuestos, probablemente a causa de un impedimento estérico.

5.8. DESAFIO DEL MODELO.

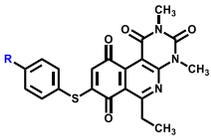
A partir de lo expuesto se propuso desafiar alguno de los resultados obtenidos, a partir de la síntesis y evaluación antibacteriana de nuevas moléculas. Para esto se sintetizaron 8 nuevos compuestos tiofenólicos 4' sustituidos. La elección de los sustituyentes consideró:

- Cubrir los 4 cuadrantes de la gráfica de Craig (4 compuestos).
- El aumento del carácter hidrofóbico del sustituyente (4 compuestos).

Considerando estos criterios, los sustituyentes escogidos fueron: $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_3\text{CONH}$, $-\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$.

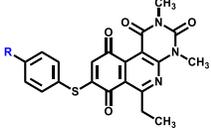
Posterior a la obtención sintética, a través del procedimiento general 2, se realizó de determinación de la CIM de cada uno de los compuestos. Los resultados de actividad antibacteriana de estos compuestos se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Resultados de CIM de compuestos 4'-sustituidos ordenados en función al carácter hidrofóbico del sustituyente.

| | | CIM µg/mL | | | | | | | | |
|---|---------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------|-----------|----------|------------------|-----------|-----------|-----------------|
| | | Aumenta el carácter hidrofóbico → | | | | | | | | |
| R | | NH ₂ | CH ₃ CONH | OH | CN | COOH | OCH ₃ | H | F | NO ₂ |
|  | Compuesto | 10 | 14 | 15 | 16 | 8 | P5 | P1 | P2 | 17 |
| | SARM | >32 | 16 | 16 | 8 | 16 | 16 | 8 | 8 | 8 |
| | SASM | >32 | 16 | 16 | 8 | 32 | 16 | 8 | 8 | 8 |
| | <i>E. faecalis</i> | 32 | 16 | 16 | 8 | 32 | 16 | 8 | 8 | 8 |
| | Carácter del sustituyente | -π,-σ | -π,-σ | -π,-σ | -π,+σ | -π,+σ | -π,-σ | -,- | +π,+σ | +π,+σ |

^a Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC® 0,5 – 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 – 4 µg/mL frente a *E. faecalis* acorde a la CLSI [62].

Tabla 20, continuación. Resultados de CIM de compuestos 4'-sustituidos ordenados en función al carácter hidrofóbico del sustituyente.

| | | CIM µg/mL | | | | | | | | |
|---|---------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------|-----------|-----------|---------------------------------|-----------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | | Aumenta el carácter hidrofóbico → | | | | | | | | |
| R | | N(CH ₃) ₂ | SCH ₃ | CH ₃ | Cl | Br | CH ₂ CH ₃ | CF ₃ | CH(CH ₃) ₂ | C(CH ₃) ₃ |
|  | Compuesto | 18 | 19 | P6 | P3 | P4 | 20 | 21 | 22 | 23 |
| | SARM | 16 | >32 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | >32 | >32 |
| | SASM | 8 | >32 | 4 | 4 | 8 | 4 | >32 | >32 | >32 |
| | <i>E. faecalis</i> | 16 | >32 | 16 | 16 | 8 | 8 | 32 | >32 | >32 |
| | Carácter del sustituyente | +π,-σ | +π,-σ | +π,-σ | +π,+σ | +π,+σ | +π,-σ | +π,+σ | +π,-σ | +π,-σ |

^a Vancomicina, control de calidad para bacterias Gram positiva ATCC® 0,5 – 2 µg/mL frente a SARM y SASM y 1 – 4 µg/mL frente a *E. faecalis* acorde a la CLSI [62].

Los resultados obtenidos muestran tendencias similares a las obtenidas inicialmente, ya que nuevamente se genera un aumento de la actividad antibacteriana asociada al aumento del carácter hidrofóbico del sustituyente de la posición 4' de anillo tiofenólico. Es posible apreciar un valor máximo de CIM de 4 µg/mL para el compuesto **20** (R = -CH₂CH₃) para SARM y SASM y 8 µg/mL para *E. faecalis*. Sustituyentes más hidrofóbicos (y más voluminosos), como -CH(CH₃)₂ (**22**) y -C(CH₃)₃ (**23**) no presentaron actividad antibacteriana y el compuesto **21** (-CF₃) que presenta un valor de hidrofobicidad del sustituyente similar a **20**, presentó actividad a 4 µg/mL en SARM y a una concentración de 32 µg/mL sobre *E. faecalis* (**Tabla 20**). Este resultado sugiere que existe un valor máximo de hidrofobicidad para el sustituyente presente en posición 4' del anillo tiofenólico.

Siguiendo este análisis, al reemplazar R = 4'-NH₂ (**10**) por 4'-N(CH₃)₂ (**18**), un sustituyente más hidrofóbico pero similar en carácter electrodonor (de -π, -σ a +π, -σ) observamos un aumento de actividad antibacteriana de >32 µg/mL a 16 µg/mL en SARM. Similar resultado se observa para SASM y *E. faecalis* con valores de actividad antibacteriana que cambian desde >32 µg/mL y 32 µg/mL para **10** a valores de 8 µg/mL y 16 µg/mL para el compuesto **18**, respectivamente.

Por su parte el carácter electrónico del sustituyente presentaría una mínima influencia sobre la actividad antibacteriana de esta familia de compuestos, ya que al comparar **20** (R = CH₂CH₃) y **21** (R = CF₃), los cuales poseen valores similares de π y diferentes de σ, presentaron el mismo valor de CIM en SARM. Estos resultados concuerdan con lo descrito anteriormente, al comparar parejas de sustituyentes como -F y -NO₂ o -Cl y -CH₃.

Finalmente, resultados distintos a los proyectados por la gráfica de Craig se obtuvieron para **19** (R = SCH₃) con valores de CIM de > 32 en las 3 bacterias Gram positivo ensayadas constituyéndose como un resultado atípico.

Además, considerando los resultados de la gráfica de Craig y del cambio bioisostérico se decidió sintetizar el derivado 6-etil-8-((4-iodofenil)amino)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (**30**), **Figura 32**.

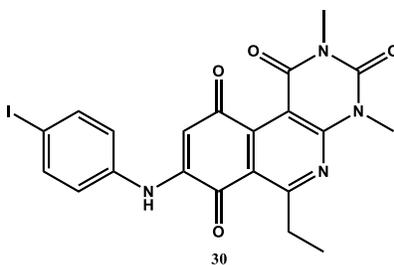


Figura 32. Estructura química del compuesto 30.

Los resultados de actividad antibacteriana muestran que este compuesto es inactivo en las 6 bacterias evaluadas, a las concentraciones ensayadas (CIM > 32 $\mu\text{g/mL}$). Esto puede deberse a que el valor de hidrofobicidad del yodo es mayor que la de los grupos etilo y CF_3 , establecidos como los sustituyentes de mayor hidrofobicidad permitida para la serie de compuestos tiofenólicos.

A partir de los resultados obtenidos es posible concluir que:

- La actividad antibacteriana de los compuestos tiofenólicos 4' sustituidos aumenta a medida que aumenta el carácter lipofílico del sustituyente en esa posición, con un valor máximo de CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$ en SASM y *E. faecalis* para el compuesto **20** (4' = etil) y 4 $\mu\text{g/mL}$ en SARM para el compuesto **21** (4' = CF_3).
- El reemplazo bioisostérico del heteroátomo conector de azufre a nitrógeno en compuestos 4' sustituidos, genera compuestos inactivos, salvo cuando R en 4' es cloro (**28**) o bromo (**29**), ya que se obtienen los compuestos más activos de todas las series.
- La inclusión de átomos de carbono entre el heteroátomo conector y el anillo aromático es deletérea para la actividad antibacteriana.
- La adición de cadenas alquílicas al núcleo quinónico, como alternativa a compuestos aromáticos, genera derivados activos solo si el largo de cadena es igual a 3 o 4 átomos de carbono. Otras sustituciones generan compuestos inactivos.
- La disminución de un átomo de carbono en la posición 6 generó compuestos con actividad antibacteriana similar a sus homólogos.
- La adición de una segunda sustitución en el anillo tiofenólico genera compuestos activos frente a bacterias Gram positivo.
- La presencia de un átomo de hidrógeno en posición 6, en reemplazo de una cadena carbonada, permite obtener una mezcla de isómeros. La actividad antibacteriana de la mezcla es menor que los compuestos con sustituyente metilo o etilo en la misma posición.

- La adición de un segundo grupo, en posición 9 del núcleo quinónico, genera la pérdida de actividad antibacteriana.
- El desafío de la gráfica de Craig ratifica los resultados previos relativos a que el carácter hidrofóbico del sustituyente modula la actividad antibacteriana.

Un resumen de las conclusiones señaladas se muestra en la **Figura 33**.

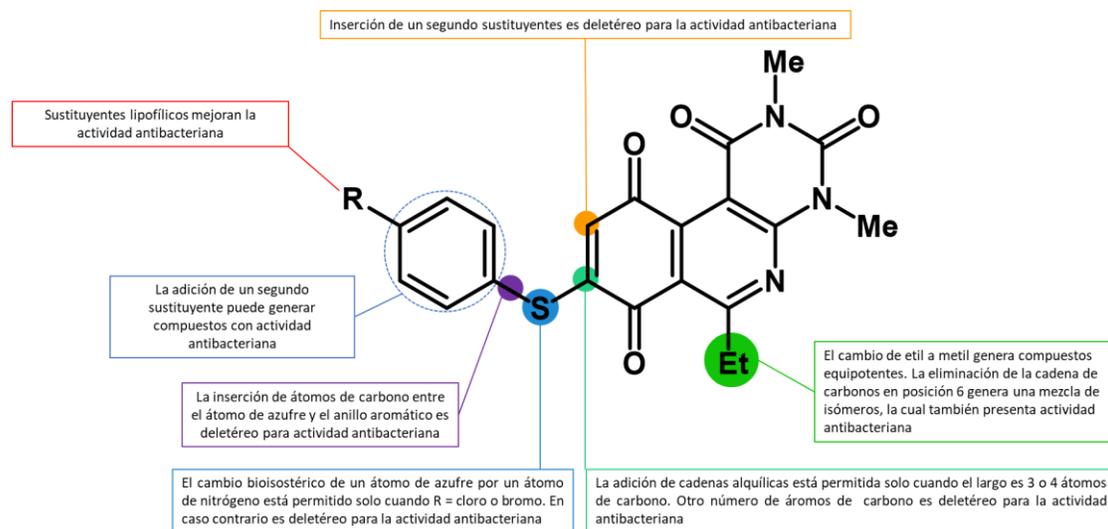


Figura 33. Resumen de la relación estructura-actividad de compuestos de núcleo pirimidoisoquinolinquinona.

6. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD CELULAR DE LOS COMPUESTOS QUINÓNICOS SINTETIZADOS.

Con el objetivo de evaluar la toxicidad celular de 5 de los compuestos sintetizados se realizó un estudio de citotoxicidad utilizando el ensayo convencional de microcultivo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Para esto se evaluó los efectos de los compuestos **17**, **28**, **29**, **31**, **40** y vancomicina sobre las líneas celulares N2a, SH-SY5Y, ambas de neuroblastoma y HEK293T la cual corresponde a una línea renal humana.

El ensayo se sustenta en la actividad reductiva de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, activa en células viables, que genera la reducción del MTT (amarillo en solución) a formazán (morado en solución), lo cual puede ser cuantificado a través de su absorbancia (**Figura 34**).

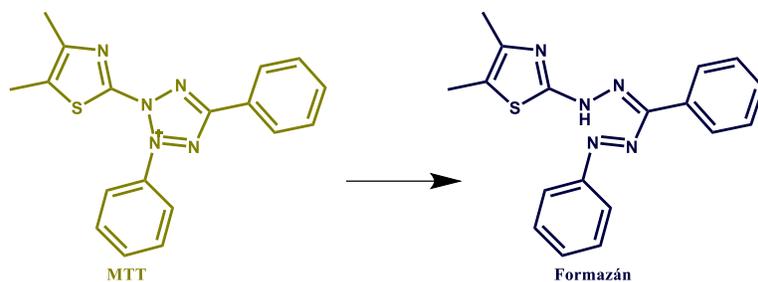
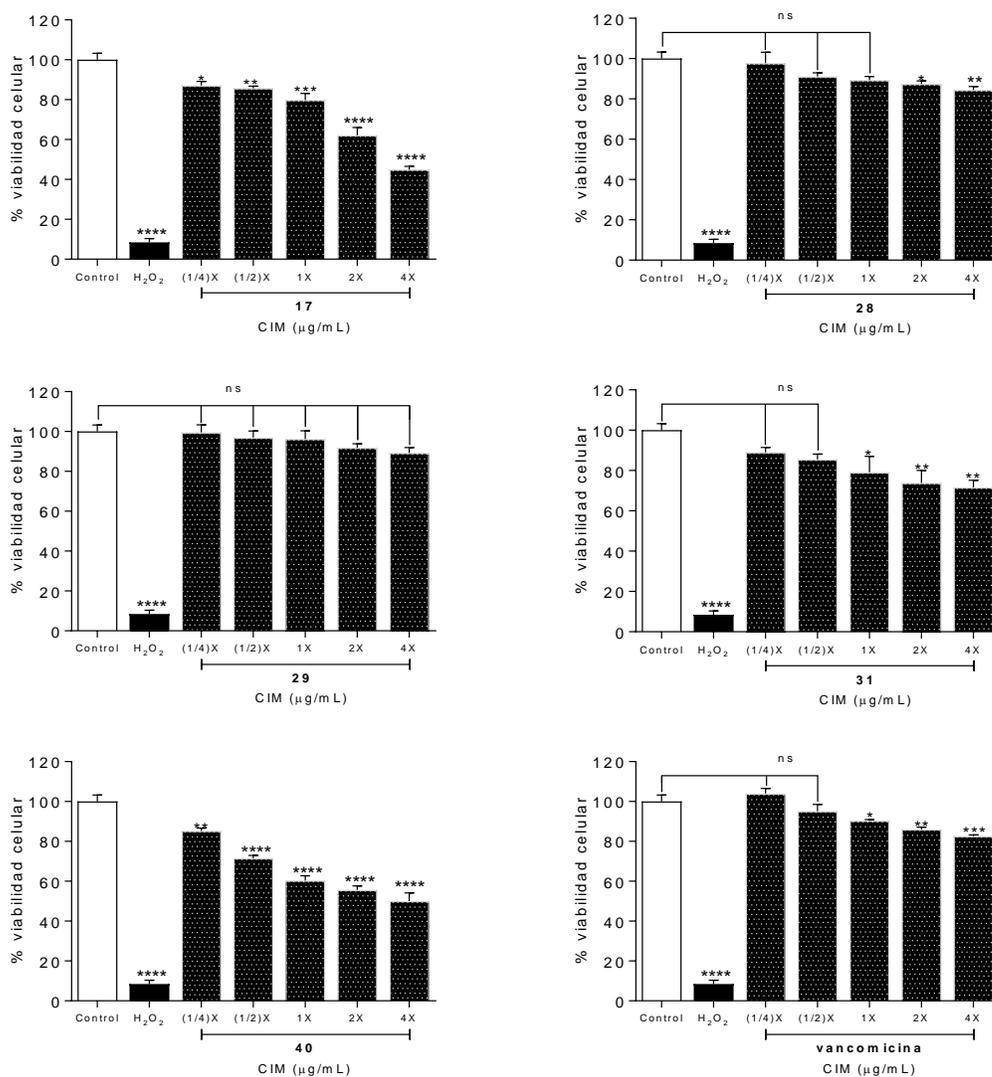


Figura 34. Representación del cambio químico y de coloración que sufre el MTT por acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial.

Los resultados de viabilidad celular obtenidos post-exposición aguda a los compuestos **17**, **28**, **29**, **31**, **40** y vancomicina sobre las líneas celulares N2a y SH-SY5Y, expresados como porcentaje de viabilidad celular, se muestran en las Tablas 21 y 22, respectivamente.

Tabla 21. Gráficas de viabilidad celular de células N2a post exposición aguda de los compuestos quinónicos y vancomicina.

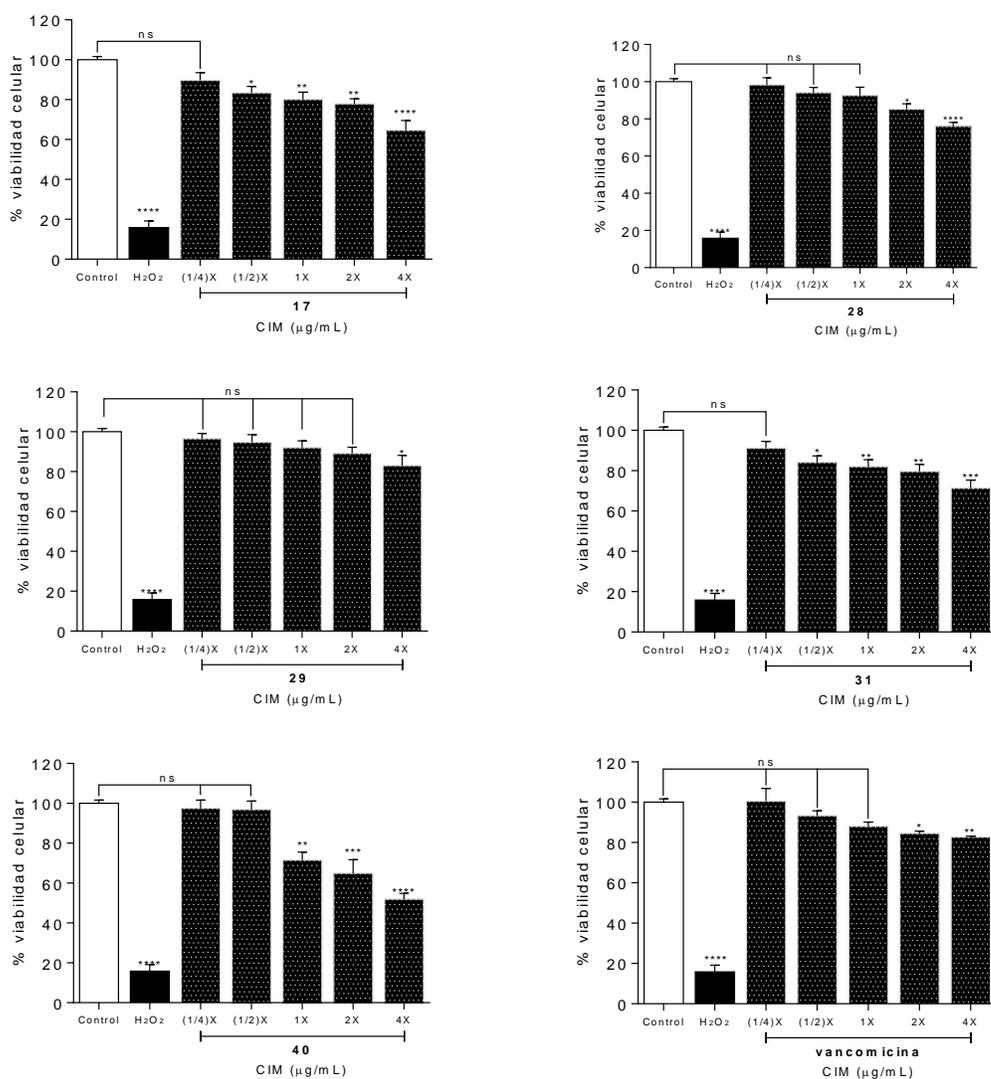
N2a



Porcentaje de viabilidad celular en células N2a expuestas a las distintas concentraciones de compuesto expresados en µg/mL durante 24 h. X: CIM (concentración inhibitoria mínima). Control: control positivo (DMEM + 1 % DMSO). H₂O₂: Control negativo (H₂O₂ + DMEM + 1 % DMSO). n = 3. n.s: p ≥ 0,05 = estadísticamente no significativo; *: p < 0,05 = estadísticamente significativo; **: p < 0,01 = estadísticamente significativo; *: p < 0,001 = estadísticamente significativo; ****: p < 0,0001 = estadísticamente significativo.**

Tabla 22. Gráficas de viabilidad celular de células SH-SY5Y post exposición aguda de los compuestos quinónicos y vancomicina.

SH-SY5Y



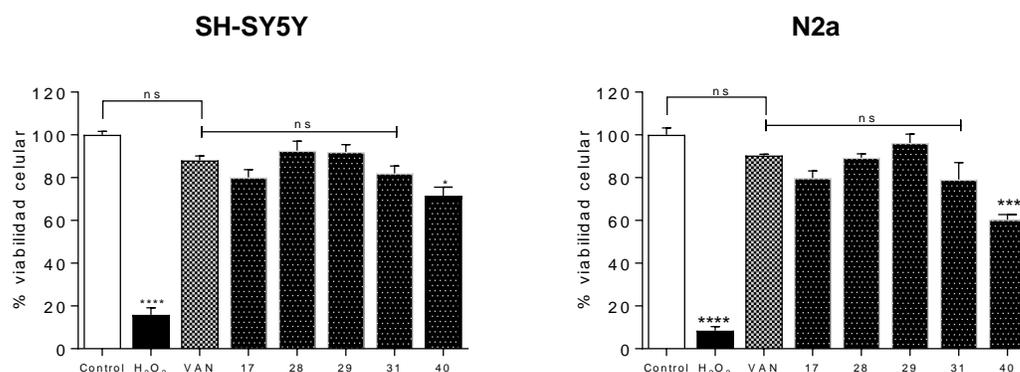
Porcentaje de viabilidad celular en células SH-SY5Y expuestas a las distintas concentraciones de compuesto expresados en $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h. X: CIM (concentración inhibitoria mínima). Control: control positivo (DMEM + 1 % DMSO). H₂O₂: Control negativo (H₂O₂ + DMEM + 1 % DMSO). n = 3. n.s: $p \geq 0,05$ = estadísticamente no significativo; *: $p < 0,05$ = estadísticamente significativo; **: $p < 0,01$ = estadísticamente significativo; *: $p < 0,001$ = estadísticamente significativo; ****: $p < 0,0001$ = estadísticamente significativo.**

Los resultados muestran que estos compuestos generan alteraciones en la viabilidad celular de diferente cuantía, al evaluarlos respecto a su concentración inhibitoria mínima y concentraciones cercanas a esta (CIM \pm 2). Por ejemplo, el compuesto **29** no presentó diferencias estadísticamente significativas de viabilidad celular, respecto al control positivo, en ninguna de las dos líneas celulares evaluadas, a las concentraciones del ensayo (CIM/4 – CIM*4) en un test de exposición por 24 horas, estableciéndose que no

existe efecto sobre la viabilidad de las líneas celulares ensayadas. En contraste el compuesto **40** presentó una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa respecto al control a todas las concentraciones evaluadas ($p < 0,05 - p < 0,0001$) en células N2a y en la CIM ($p < 0,05$), CIM x 2 ($p < 0,001$) y CIM x 4 ($p < 0,0001$) en células SH-SY5Y. Sumado al anterior, el compuesto **17**, también muestra disminución de la viabilidad de manera estadísticamente significativa, a las concentraciones ensayadas en la células evaluadas (con excepción de 1/4 CIM en N2a), alcanzando valores de viabilidad cercanas al 44% en células N2a, siendo el porcentaje de viabilidad más bajo que presenta alguno de estos compuestos en el ensayo realizado. Cabe señalar, que este compuesto presenta la CIM más alta del grupo (8 $\mu\text{g/mL}$) lo cual puede explicar los resultados obtenidos.

Además, los resultados muestran que vancomicina afecta la viabilidad celular de manera significativa de ambas líneas celulares a concentraciones de CIM, CIM x 2 y CIM x 4 (1, 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) en células N2a y CIM x 2 y CIM x 4 (2 y 4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) en células SH-SY5Y.

Tabla 23. Porcentaje de viabilidad celular en SH-SY5Y (izquierda) y N2a (derecha) expuestas a diferentes compuestos a sus respectivos valores de CIM en $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h. X: CIM (concentración inhibitoria mínima).



Control: control positivo (DMEM+ 1 % DMSO). **H₂O₂:** Control negativo (H₂O₂ + DMEM + 1 % DMSO). $n = 3$. *n.s:* $p \geq 0,05$ = estadísticamente no significativo; *: $p < 0,05$ = estadísticamente significativo; **: $p < 0,01$ = estadísticamente significativo; ***: $p < 0,001$ = estadísticamente significativo; ****: $p < 0,0001$ = estadísticamente significativo.

Sin embargo, al comparar la concentración correspondiente a la CIM de estos compuestos con la concentración correspondiente a la CIM de vancomicina, observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) en cuanto al porcentaje de viabilidad celular (**Tabla 23**), en ambas líneas, con excepción del compuesto **40** con el

cual se observa diferencias estadísticamente significativas en SH-SY5Y ($p < 0,05$) y N2a ($p < 0,001$) con porcentajes de viabilidad de 71% y 60% respectivamente.

Finalmente, al comparar los resultados respecto al control negativo de viabilidad (H_2O_2), se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001 - p < 0,05$) a todas las concentraciones evaluadas para todos los compuestos evaluados y, por lo tanto, no se generaría una disminución de la viabilidad celular equivalente a la provocada por el control negativo (datos no mostrados).

En relación a la línea HEK293T, no fue posible obtener resultados reproducibles, por lo tanto, estos no fueron informados.

7. ESTUDIOS 3D-QSAR CoMFA Y CoMSIA.

Los resultados obtenidos y presentados en este escrito pueden ser proyectados desde distintos ámbitos, siendo uno de ellos el desarrollo de nuevos derivados. En este sentido, este objetivo puede abordarse, por ejemplo, a partir del estudio de relación estructura-actividad realizado. Otra alternativa es emplear herramientas que complementen este trabajo. Una de ellas, son los estudios QSAR (de sus siglas en inglés *Quantitative structure-activity relationships*), los cuales son técnicas estadístico-matemáticas que buscan identificar, cuantificar y correlacionar propiedades fisicoquímicas con la actividad biológica de una serie de compuestos [78].

Un ejemplo de estudio QSAR, particularmente, un estudio 3D-QSAR (QSAR de tres dimensiones) es el método CoMFA (de sus siglas en inglés *Comparative molecular field analysis*), desarrollado por Cramer *et al.* [104], relaciona descriptores electrónicos y estéricos, considerando las moléculas como un todo, con el valor de actividad biológica que estas presentan. Por su parte, el método CoMSIA (de sus siglas en inglés *Comparative molecular similarity analysis*) desarrollado por Klebe *et al.* [75], permite complementar los resultados obtenidos desde el modelo CoMFA, determinando similitud molecular de los compuestos, informando de manera simultánea, descriptores electrónicos, estéricos, hidrofóbicos y propiedades donoras yceptoras de puentes de hidrógeno.

Para realizar estos análisis se debe emplear la conformación activa de cada compuesto. En nuestro caso, al no disponer de esa información, se emplea como alternativa, la conformación de mínima energía, la cual se asume es la conformación más probable de unión al sitio activo, por este motivo se realiza la minimización de cada una de las moléculas a estudiar. Junto a esto se realiza la determinación de cargas atómicas para

cada molécula, con el objetivo de determinar parámetros electroestáticos. Posteriormente, se debe proceder al alineamiento del conjunto de estructuras, proceso de alta importancia ya que los resultados son altamente sensibles a la forma en la cual las moléculas son superpuestas [105]. Para este grupo de moléculas el alineamiento se facilita al disponer de un núcleo rígido común, el cual se empleó para este proceso, **Figura 35**.

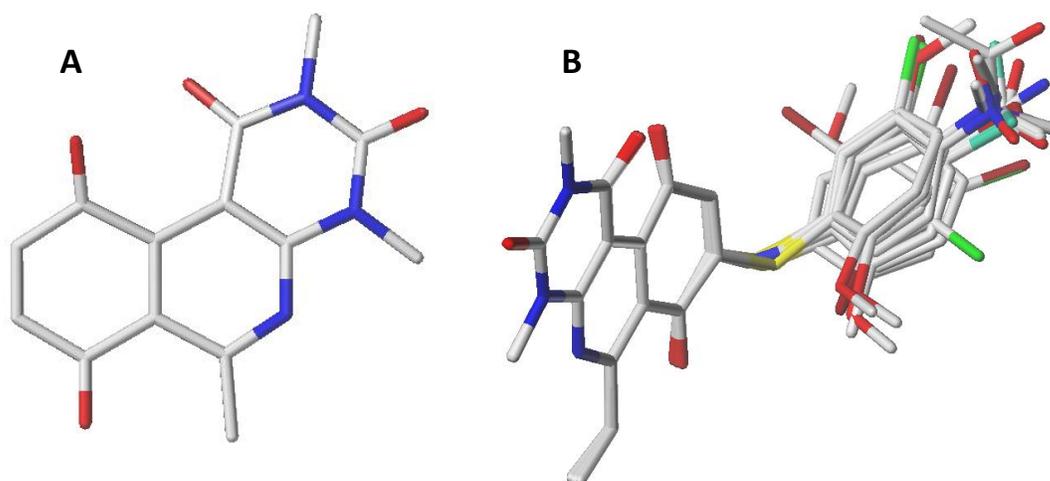


Figura 35. *A: Estructura común empleada como núcleo de alineamiento para modelos CoMFA y CoMSIA; B: Resultado del alineamiento de los compuestos superpuestos. Se observa que los anillos y heteroátomos conectores orientan de manera común con pequeñas variaciones individuales asociadas al sustituyente en cada uno de ellos.*

A partir de la **Figura 35**, es posible apreciar que existe un alineamiento adecuado del núcleo tricíclico para todos los compuestos, con una orientación similar para los distintos anillos aromáticos, cada uno de ellos influenciados por la presencia de sustituyentes. Dentro de este proceso es importante consignar diferencias entre los compuestos anilínicos y tiofenólicos, los cuales presentan orientaciones similares, pero diferencias en los ángulos que se forman entre el núcleo tricíclico, el heteroátomo conector y el anillo aromático (**Figura 36 A y B**), concordando con lo reportado previamente, sin existir diferencia en la alineación entre derivados anilínicos o tiofenólicos (**Figura 36 C**).

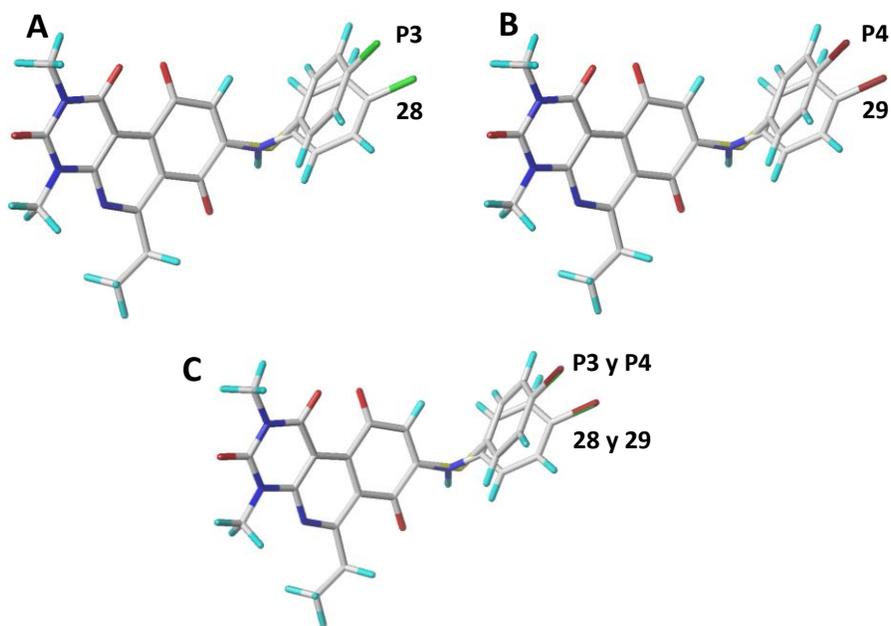


Figura 36. Comparación del alineamiento de compuestos tiofenólicos y anilínicos. A: Compuestos P3 vs 28; B: Compuestos P4 vs 29; C: compuestos P3 y P4 vs 28 y 29.

Posterior al proceso de alineamiento, se realiza la determinación de energías de campo y obtención de parámetros estadísticos. Para esto, los compuestos alineados son colocados en el centro de una caja, con distancias de enrejado de 2 Å, en la cual se calculan energías de interacción entre cada molécula y un átomo de prueba, en el caso del modelo CoMFA y carbono sp^3 con carga +1 [104], **Figura 37.**

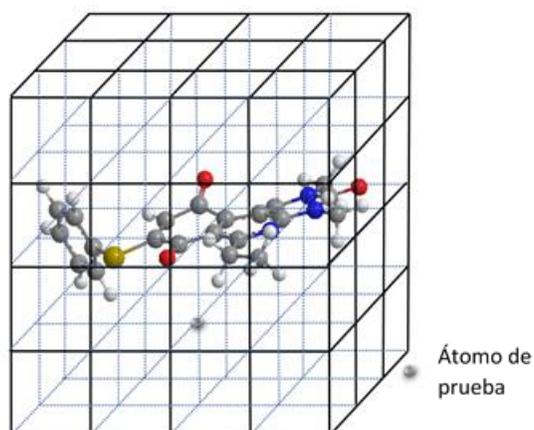


Figura 37. Representación de los compuestos dentro de la grilla de análisis junto a un átomo de prueba.

Para el modelo CoMSIA el átomo de prueba presenta un radio de 1 Å, carga +1, hidrofobicidad +1, valor de donador de puente de hidrógeno + 1 y aceptor de puente de hidrógeno +1 [75].

Luego de este proceso ambos modelos generan una ecuación que relaciona la actividad biológica con la contribución de cada campo en cada punto de la grilla. Para facilitar la interpretación de los resultados, estos se entregan como coeficientes estadísticos y mapas de contorno que muestran las regiones más importantes alrededor de las moléculas donde diferentes modificaciones estructurales pueden ser realizadas [106]. De esta forma, los resultados estadísticos obtenidos, para diferentes combinaciones de campo, se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Resultados estadísticos para modelos QSAR generados.

| Nº | Modelo | q ² | N | EEP | SEE | r ² ncv | F | r ² | Contribución de campo | | | | |
|----|------------------|----------------|---|-------|-------|--------------------|-------|----------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | | | | | Es | El | H | D | A |
| 1 | CoMFA Es-El | 0,573 | 8 | 0,260 | 0,097 | 0,945 | 44947 | 0,694 | 0,477 | 0,523 | - | - | - |
| 2 | CoMSIA Es-El | 0,609 | 2 | 0,227 | 0,157 | 0,814 | 58941 | 0,455 | 0,268 | 0,732 | - | - | - |
| 3 | CoMSIA Es-El-H-A | 0,745 | 4 | 0,190 | 0,093 | 0,939 | 96504 | 0,638 | 0,142 | 0,427 | 0,329 | - | 0,101 |
| 4 | CoMSIA Es-El-H-D | 0,706 | 9 | 0,229 | 0,089 | 0,956 | 48095 | 0,567 | 0,150 | 0,360 | 0,327 | 0,164 | - |
| 5 | CoMSIA Es-El-A | 0,657 | 8 | 0,241 | 0,111 | 0,928 | 33690 | 0,475 | 0,265 | 0,580 | - | - | 0,155 |
| 6 | CoMSIA Es-El-D-A | 0,572 | 4 | 0,247 | 0,137 | 0,874 | 33343 | 0,440 | 0,140 | 0,417 | - | 0,330 | 0,140 |
| 7 | CoMSIA Es-D | 0,541 | 6 | 0,266 | 0,168 | 0,818 | 17249 | 0,380 | 0,673 | - | - | 0,327 | - |
| 8 | CoMSIA Es-H-D | 0,616 | 7 | 0,249 | 0,101 | 0,937 | 46862 | 0,541 | 0,348 | - | 0,418 | 0,234 | - |
| 9 | CoMSIA El-H-A | 0,641 | 3 | 0,222 | 0,129 | 0,879 | 62742 | 0,685 | - | 0,468 | 0,468 | - | 0,240 |
| 10 | CoMSIA El-H-D-A | 0,706 | 9 | 0,229 | 0,091 | 0,954 | 45769 | 0,581 | - | 0,434 | 0,361 | 0,149 | 0,055 |
| 11 | CoMSIA-total | 0,704 | 7 | 0,219 | 0,091 | 0,949 | 58312 | 0,633 | 0,142 | 0,333 | 0,300 | 0,174 | 0,051 |

q²: Cuadrado del coeficiente de validación cruzada leave-one-out; N: número de componentes; SEP: error estándar de predicción; SEE: desviación estándar de la validación no cruzada; r²ncv: cuadrado del coeficiente de validación no cruzada; F: valor de test de Fisher; r²: es el r² predictivo del conjunto de prueba; Es: estérico; El: electroestático; H: hidrofóbico; D: donador de puente de hidrógeno; A: aceptor de puente de hidrógeno.

Para la elección del modelo final, se debe considerar diferentes parámetros estadísticos, que establezcan la robustez de este. El primero a considerar es el valor de q². Este es un indicador que permite establecer la capacidad predictiva interna del modelo QSAR y su valor debe ser mayor a 0,5. De la **Tabla 24** podemos ver que el modelo CoMFA y todos los modelos CoMSIA presentados cumplen con este criterio. Entre ellos destaca el modelo 3 (CoMSIA) compuesto de los parámetros estérico, electrónico, hidrofóbico y aceptor de puente de hidrógeno (Es-El-H-A) que presenta el valor de q² más alto (0,745). En segundo lugar, se debe considerar el valor de r², el cual permite evaluar la capacidad predictiva externa del modelo, el cual debe ser mayor a 0,6. Podemos observar que solo el modelo CoMFA (1) y los modelos CoMSIA (3, 9 y 11) cumplen con este parámetro. Entre ellos el modelo 9 presenta el mayor valor (0,685) para este grupo. Además, el o los modelos a seleccionar deben presentar:

- Un valor bajo de desviación estándar (SEE).
- Un número de componentes (N) cercano al tercio de la cantidad de componentes de conjunto de entrenamiento, en este caso 3.
- Un r²ncv cercano a 1.

Al considerar estos parámetros adicionales observamos que el modelo CoMFA cumple con estos, con excepción del N y los modelos CoMSIA 3 y 9 los satisfacen en su totalidad. Es importante señalar, que si bien el modelo 11 (CoMSIA-total) cumple con estos criterios, es descartado ya que presenta menor valor de q^2 respecto a 3 y menor valor de r^2 respecto a 9.

Sin embargo, estos parámetros propios de los modelos, no son suficientes para establecer su confiabilidad, ya que si bien, un modelo puede presentar valores altos de q^2 y r^2 , puede alejarse del modelo ideal de predicción, representada por una curva de pendiente igual 1 e intercepto igual a cero [72], [73]. Por este motivo, para que un modelo presente capacidad predictiva confiable debe presentar valores de actividad biológica experimental y actividad biológica predicha cercana a la pendiente de una ecuación $x = y$, dado que la actividad predicha por un buen modelo deber ser cercana al valor determinado experimentalmente. Para comprobar esto los modelos deben cumplir con las condiciones 3a o 3b, 4a o 4b, 5a o 5b y 6 [72], [73], los cuales se suman a los valores de q^2 y r^2 ya mencionados. Además, se suma el parámetro r^2_m (7) [74], el cual establece la cercanía entre los valores de actividad biológica experimental y predicha del conjunto de prueba. Es por esto que el modelo CoMFA (1) y los modelos CoMSIA 3 y 9 fueron sometidos a cada una de estas validaciones para establecer su confiabilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Resultados validación externa modelos QSAR.

| Condición | Parámetro | Valor umbral | CoMFA | CoMSIA-3 | CoMSIA-9 |
|-----------|-----------------------|--------------------|--------|----------|----------|
| 1 | q^2 | >0,5 | 0,573 | 0,745 | 0,641 |
| 2 | r^2 | >0,6 | 0,694 | 0,638 | 0,685 |
| 3a | r^2_o | Cercano a r^2 | 0,718 | 0,676 | 0,555 |
| 3b | r^2_o | Cercano a r^2 | 0,830 | 0,746 | 0,829 |
| 4a | k | $0,85 < k < 1,15$ | 1,028 | 1,034 | 1,028 |
| 4b | k' | $0,85 < k' < 1,15$ | 0,971 | 0,965 | 0,971 |
| 5a | $(r^2 - r^2_o) / r^2$ | <0,1 | -0,034 | 0,026 | 0,199 |
| 5b | $(r^2 - r^2_o) / r^2$ | <0,1 | -0,197 | -0,075 | -0,195 |
| 6 | $ r^2_o - r^2 $ | <0,3 | 0,112 | 0,070 | 0,274 |
| 7 | r^2_m | >0,5 | 0,586 | 0,602 | 0,435 |

De la **Tabla 25** se desprende que los modelos CoMFA y CoMSIA-3, el cual considera parámetros estéricos, electrónicos, hidrofóbico y aceptor de puente de hidrógeno, cumplen con todos los criterios de validación externa, estableciéndose como modelos robustos. Por otra parte, el modelo CoMSIA-9 no cumple con el último parámetro (naranja), no pudiendo validar los resultados obtenidos para el conjunto de prueba. Dado los resultados de

validación estadística, se descarta el modelo CoMSIA-9 y se validan los modelos CoMFA y CoMSIA-3.

Considerando estos resultados es posible determinar los valores de actividad antibacteriana predicha y el valor residual, que corresponde a la diferencia entre la actividad experimental y la predicha, para ambos modelos. Los resultados se muestran en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Valores de pCIM experimental y predichos, y valores residuales para compuestos analizados en estudios CoMFA y CoMSIA.

| Compuesto | CoMFA | | | CoMSIA | |
|-----------|-------------------|---------------|----------|---------------|----------|
| | pCIM experimental | pCIM predicho | Residual | pCIM predicho | Residual |
| 8 | 4,4505 | 4,43850 | 0,01200 | 4,44050 | 0,01000 |
| 14 | 4,4629 | 4,46336 | -0,00046 | 4,48790 | -0,02500 |
| 15 | 4,4227 | 4,43970 | -0,01700 | 4,46470 | -0,04200 |
| 16 | 4,7328 | 4,76080 | -0,02800 | 4,71280 | 0,02000 |
| 17 | 4,7525 | 4,73450 | 0,01800 | 4,66950 | 0,08300 |
| 18 | 5,0750 | 5,12300 | -0,04800 | 5,15000 | -0,07500 |
| 20* | 5,0369 | 4,87672 | 0,16018 | 4,86731 | 0,16959 |
| 21* | 4,4496 | 4,58954 | -0,13994 | 4,41014 | 0,03946 |
| 28 | 5,6282 | 5,80120 | -0,17300 | 5,75020 | -0,12200 |
| 29 | 5,9725 | 5,78550 | 0,18700 | 5,85750 | 0,11500 |
| 31 | 5,3687 | 5,38670 | -0,01800 | 5,42170 | -0,05300 |
| 33* | 5,0758 | 5,13020 | -0,05440 | 5,22434 | -0,14854 |
| 43 | 4,6918 | 4,79680 | -0,10500 | 4,85580 | -0,16400 |
| 44 | 5,0080 | 5,00100 | 0,00700 | 4,95500 | 0,05300 |
| 45 | 5,0247 | 5,01170 | 0,01300 | 5,03270 | -0,00800 |
| 48 | 5,3732 | 5,36820 | 0,00500 | 5,36920 | 0,00400 |
| 49 | 5,0080 | 4,98300 | 0,02500 | 4,92900 | 0,07900 |
| 50 | 5,0247 | 5,02691 | 0,00049 | 5,00240 | 0,02500 |
| 51 | 5,0122 | 5,02620 | -0,01400 | 5,03120 | -0,01900 |
| 52 | 5,0292 | 5,15120 | -0,12200 | 5,13720 | -0,10800 |
| 53 | 5,0722 | 5,10720 | -0,03500 | 5,17120 | -0,09900 |
| 54* | 5,3090 | 5,03513 | 0,27387 | 4,85964 | 0,44936 |
| 55* | 4,7237 | 4,41254 | 0,31116 | 4,41938 | 0,30432 |
| 56 | 5,0122 | 4,85020 | 0,16200 | 4,87220 | 0,14000 |
| 57* | 5,3303 | 5,04641 | 0,28389 | 4,95206 | 0,37824 |
| 58* | 5,3732 | 5,01067 | 0,36253 | 5,01878 | 0,35442 |
| P1* | 4,7070 | 4,89543 | -0,18843 | 4,90706 | -0,20006 |
| P2 | 5,0227 | 5,01470 | 0,00800 | 4,89670 | 0,12600 |
| P3 | 4,4368 | 4,40980 | 0,02700 | 4,45880 | -0,02200 |
| P4 | 4,7257 | 4,88570 | -0,16000 | 4,92370 | -0,19800 |
| P5 | 5,0433 | 5,02830 | 0,01500 | 4,99030 | 0,05300 |
| P6 | 5,0849 | 5,04190 | 0,04300 | 5,06890 | 0,01600 |
| P7 | 5,0227 | 4,98370 | 0,03900 | 4,97170 | 0,05100 |
| P8 | 5,0389 | 5,03590 | 0,00300 | 5,07890 | -0,04000 |
| P9 | 5,0268 | 5,06180 | -0,03500 | 5,06780 | -0,04100 |
| P10 | 5,3443 | 5,14130 | 0,20300 | 5,18230 | 0,16200 |
| P11 | 5,3859 | 5,40690 | -0,02100 | 5,37590 | 0,01000 |
| P13 | 5,3399 | 5,33290 | 0,00700 | 5,28890 | 0,05100 |
| P16* | 5,6869 | 5,36165 | 0,32525 | 5,41145 | 0,27545 |
| P17* | 5,1146 | 5,09148 | 0,02312 | 5,04086 | 0,07374 |

Los resultados muestran que todos los compuestos poseen valores residuales pequeños, con una desviación máxima de 0,36 (compuesto **58**) y 0,44 (compuesto **54**) unidades logarítmicas para los modelos CoMFA y CoMSIA, respectivamente. El rango de desviación para el modelo CoMFA fue entre -0,188 y 0,362, mientras que para el modelo CoMSIA el rango estuvo entre -0,20 y 0,44 unidades logarítmicas.

Así, los modelos CoMFA y CoMSIA fueron seleccionados en base a sus parámetros estadísticos, considerando parámetros de validación interna y externa. Además, estos datos permiten observar las diferencias en las contribuciones de campo en ambos estudios. Para el modelo CoMFA se observa una contribución de campo levemente mayor para el factor electrónico (52,3%) respecto al componente estérico (47,7%). En contraste, al analizar el modelo CoMSIA se aprecia que la contribución electrónica sigue siendo importante para la actividad antibacteriana de esta familia de compuestos (42,7%) pero el componente estérico (14,2%) es desplazado en relevancia por el carácter hidrofóbico (32,9%), lo cual se relaciona con lo observado anteriormente a través del estudio de relación estructura-actividad realizado. Conjuntamente, existe una pequeña contribución (10,1%) del campo aceptor de puente de hidrógeno en la serie de moléculas.

Además de los resultados estadísticos y capacidad predictiva, el estudio CoMFA informa la contribución de los componentes estéricos y electroestáticos a través de la generación de mapas de contorno alrededor de las moléculas estudiadas. En cada una de las imágenes el mapa de potencial estérico se informa con colores verde y amarillo. Las áreas del primer color indican que grupos voluminosos son favorables para la actividad biológica, en cambio, el color amarillo señala que grupos pequeños favorecen la actividad biológica. Por su parte, para el mapa de potencial electroestático se representa con colores rojo y azul. En este caso, el color rojo señala que sustituyentes electro-atradores favorecen la actividad biológica. Finalmente, el color azul indica que sustituciones electro-donoras favorecen la actividad biológica. El resultado global de los mapas de contorno obtenidos se muestra en la **Figura 38**.

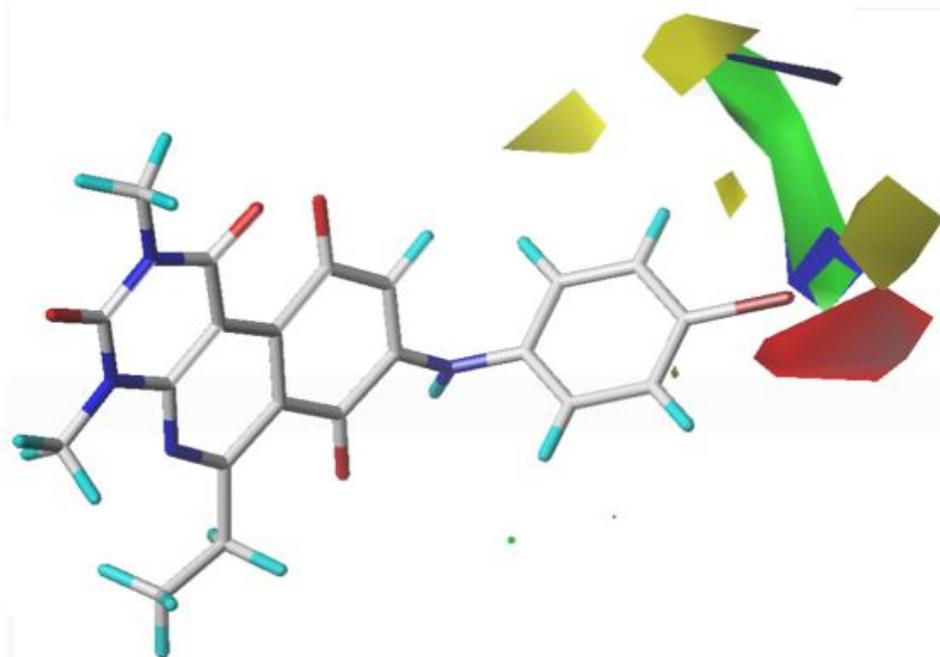


Figura 38. Modelo CoMFA total. Mapa alrededor de la molécula 29.

En la imagen se observa el compuesto **29**, el más activo de la serie, junto a los mapas de contorno obtenidos. Es posible apreciar la presencia de un poliedro verde de gran tamaño orientado principalmente a la posición 4' del anillo aromático. Cercano a esta zona se observan dos mapas de menor tamaño, uno de color azul y otro rojo. Finalmente, en zonas distantes a la molécula se muestran 3 poliedros amarillos de menor tamaño. No se observan otros mapas de contorno alrededor de la molécula, lo cual puede ser explicada por el menor número de sustituciones existentes en posiciones 2' y 3' de anillo aromático y en el núcleo tricíclico.

Al analizar los mapas por separado, se observa claramente la influencia del volumen del sustituyente en posiciones 3' y 4', ya los diferentes compuestos tiofenólicos 4' orientan el sustituyente a esa zona, desde el compuesto que presenta menor actividad antibacteriana (**15**) al más activo (**58**). Junto a estos, el compuesto **20** orienta muy adecuadamente el sustituyente a la zona verde y a uno de los poliedros amarillos, indicando este último caso que el aumento de volumen en esa zona perjudica la actividad antibacteriana. Además, es importante señalar que los resultados están fuertemente influenciados por la orientación espacial de los compuestos tiofenólicos, los cuales se presentan en mayor cuantía en el análisis, en desmedro de los anilínicos (**28** y **29**) mostrando diferencias en la orientación del sustituyente respecto al mapa estérico. Esto

queda de manifiesto al comparar el compuesto **29** (Figura 39-C) con los derivados **15**, **20** o **58** (Figura 39 A, B y D).

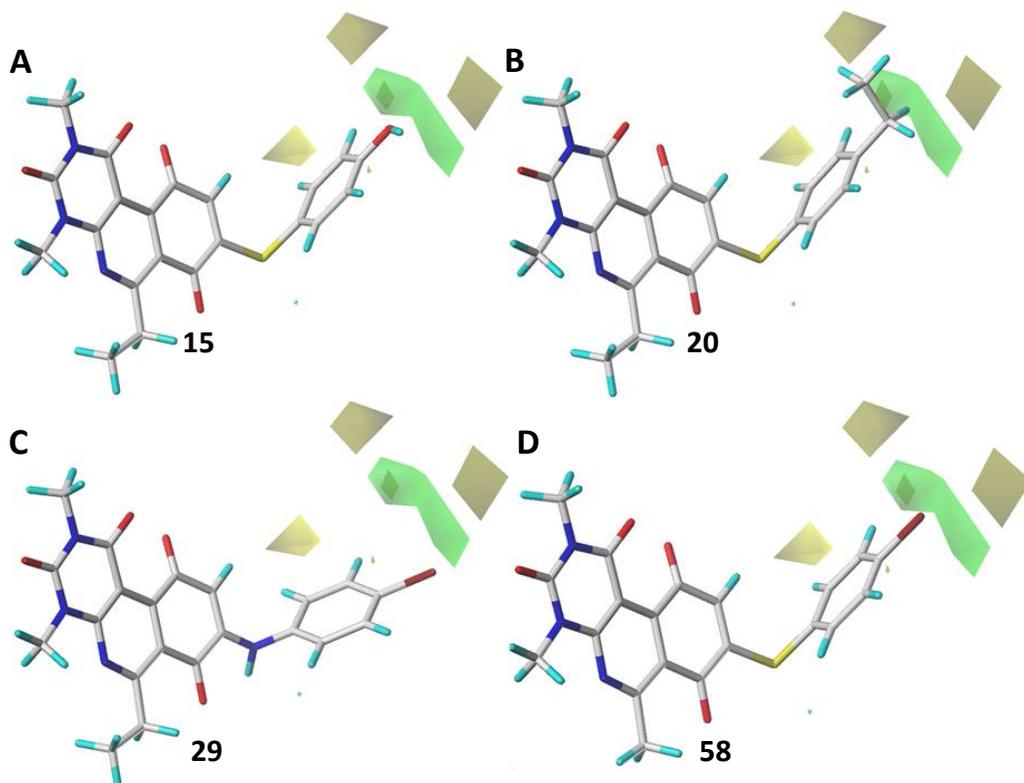


Figura 39. CoMFA estérico: verde, área favorecida para sustituyentes voluminosos, amarillos, área desfavorecida para sustituyentes voluminosos. A: compuesto 15; B: compuesto 20; C: compuesto 29; D: compuesto 58.

De esta forma, el modelo CoMFA generado sugiere el empleo de sustituyentes voluminosos en posiciones 3' y 4' del anillo tiofénico con el objetivo de obtener nuevos compuestos activos contra SARM.

Por otra parte, ninguno de los compuestos tiofénicos orienta directamente a los poliedros azul y rojo, los cuales se encuentran próximos entre ellos. Esto puede deberse a la diversidad de sustituyentes en la zona, con características electrónicas distintas, pero valores de actividad antibacteriana similar (**20** pCIM = 5,0369 vs **58** pCIM = 5,3732, **Figura 40, B y D**).

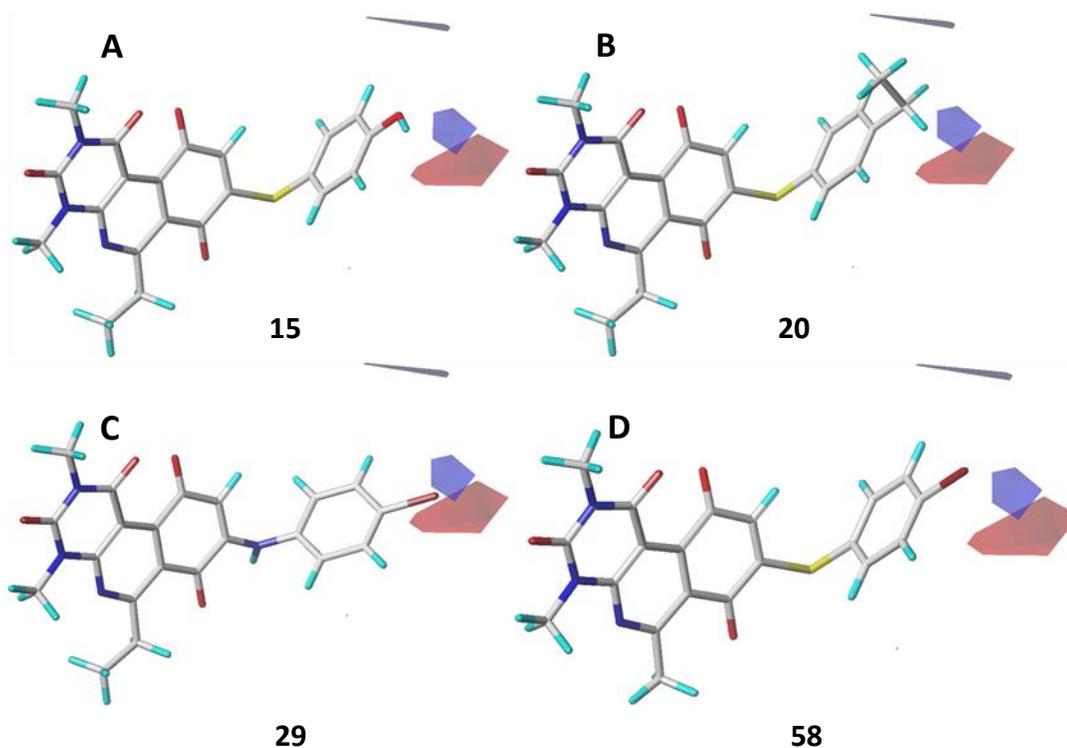


Figura 40. CoMFA electrostático: rojo, área favorecida para sustituyentes electro-attractores, azul, área favorecida para sustituyentes electro-donores. A: compuesto 15; B: compuesto 20; C: compuesto 29; D: compuesto 58.

Respecto a los compuestos anilínicos, el compuesto **29** (Figura 40 - C) se orienta con una preferencia levemente mayor al poliedro azul por sobre el rojo, lo que sugiere que el reemplazo del halógeno por sustituyentes electro-donores sería favorable para la actividad. De esta forma, si consideramos los resultados de los mapas estéricos y electrónicos se puede proponer derivados anilínicos con sustituciones 4'-Metil o 4'-Etil. Sustituyentes más voluminosos como 4'-isobutil o 4'-terbutil no son propuestos por la información de relación estructura-actividad obtenida y discutida anteriormente, la cual complementa estos resultados.

Por otra parte, y al igual que en el estudio CoMFA, el modelo CoMSIA informa la contribución a través de mapas de contorno alrededor de las moléculas estudiadas.

En cada una de las imágenes el mapa de potencial estérico se informa con colores verde y amarillo. Al igual que en el modelo CoMFA, las áreas del primer color indican que grupos voluminosos son favorables para la actividad biológica, en cambio, el color amarillo señala que grupos pequeños favorecen la actividad biológica. Por su parte, para el mapa de potencial electrostático se representa con colores rojo y azul. En este caso, el color rojo señala que sustituyentes electro-attractores favorecen la actividad biológica. En cambio, el

color azul indica que sustituciones electro-donoras favorecen la actividad biológica. El mapa hidrofóbico se representa con colores amarillo, el que indica que sustituyentes hidrofóbicos son beneficiosos para la actividad, en cambio el color plomo indica áreas hidrofóbicas desfavorables para la actividad biológica. Para los mapas donores y aceptores de puentes de hidrógeno, la actividad se ve favorecida cuando se representa con colores celeste y rosado, respectivamente. Finalmente, la actividad biológica se ve desfavorecida para estos descriptores cuando los mapas se muestran de color morado y rojo, respectivamente. El resultado global de los mapas de contorno obtenidos se muestra en la **Figura 41**.

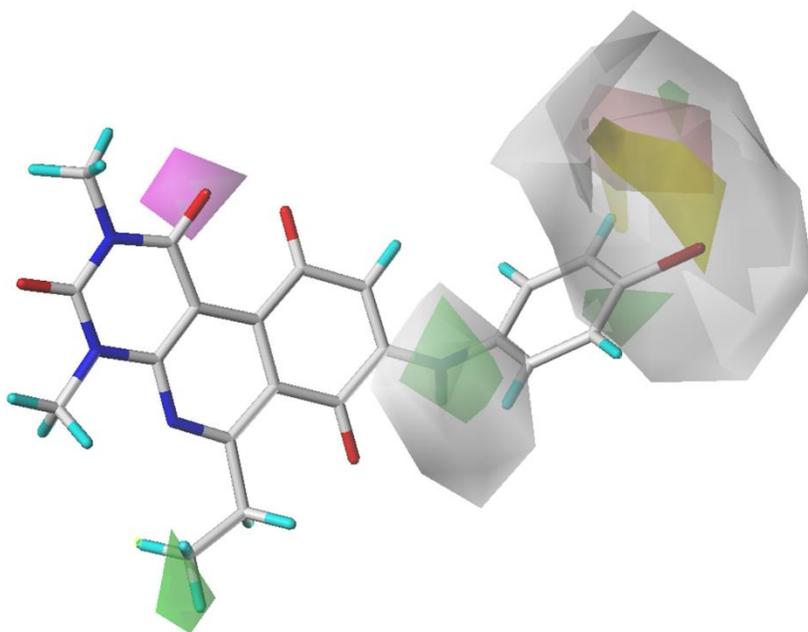


Figura 41. Modelo CoMSIA total. Mapa alrededor de la molécula 29.

De la imagen es posible apreciar que los mapas abarcan mayor área de la molécula (**29**, la más activa de la serie) en comparación al modelo CoMFA. Se observan 2 grandes poliedros plomo. Uno de ellos rodea 3 poliedros, de color amarillo, rojo y verde, alrededor de las posiciones 3', 4' y 5' del anillo aromático. El segundo está cercano a la posición 2' del anillo aromático. Por sobre él se observa una zona verde de menor tamaño. Otra zona verde se aprecia en la zona de la cadena de etilo de la posición 6 del anillo tricíclico. Sumado a los anteriores, se observa una zona rosada orientada principalmente hacia el grupo carbonilo de la posición 1 del anillo tricíclico, y no muy lejano al grupo carbonilo de la posición 10 del mismo anillo. Finalmente es importante destacar que existen mapas que no se aprecian de manera adecuada debido al solapamiento entre ellos.

Analizando de manera individual los mapas de contorno estérico (**Figura 42**), observamos un poliedro verde por debajo de los anillos aromáticos, particularmente cercano al compuesto **29**. Esto sugiere la importancia del anillo aromático en esta estructura. De manera contraria, una pequeña zona amarilla se encuentra cercana a la posición 4', indicando que sustituyentes voluminosos, como bromo (**58**) son desfavorables para la actividad antibacteriana. Se destaca esta situación para el compuesto **15** (el menos activo de la serie) quien orienta directamente el grupo -OH a esta zona. Otro poliedro verde, de tamaño pequeño, se encuentra a distancia media de la posición 5' del anillo aromático, lo cual sugiere que sustituir esa zona con sustituyentes como etilo podría ser beneficiosos para la actividad.

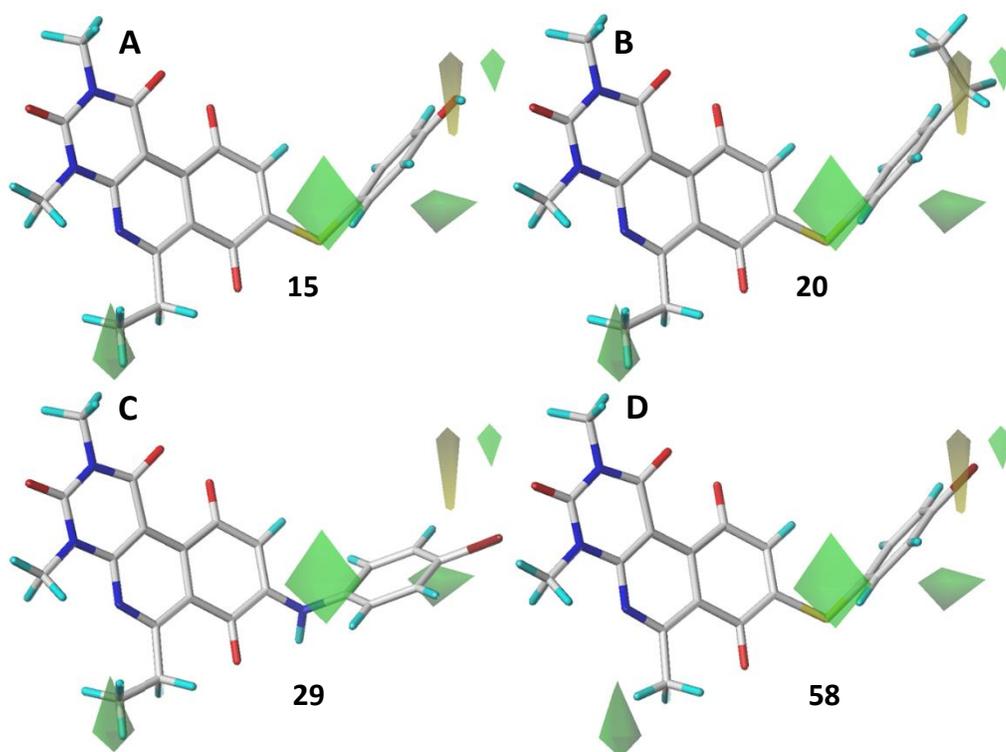


Figura 42. CoMSIA estérico: verde, área favorecida para sustituyentes voluminosos, amarillos, área desfavorecida para sustituyentes voluminosos. A: compuesto 15; B: compuesto 20; C: compuesto 29; D: compuesto 58.

Una tercera zona verde se presenta cercano al átomo de carbono terminal de la cadena 6-etilo (compuestos **15**, **20** y **29**), lo cual sugiere que esta cadena sería más adecuada que la 6-metilo (**58**) con el objetivo de tener compuestos con mejor actividad antibacteriana. Finalmente, una cuarta zona verde de gran tamaño se observa cercana a la posición 2' del anillo aromático, indicando que esta zona debe ser sustituida con sustituyentes voluminosos. Este resultado, puede explicar en parte el valor de actividad

antibacteriana del compuesto **P16**, el más activo de la serie de compuestos tiofenólicos (**Figura 43**).

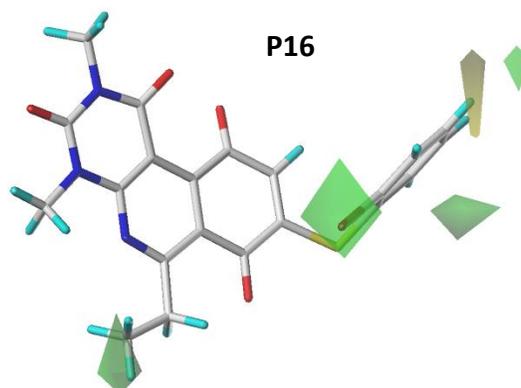


Figura 43. CoMSIA estérico: verde, área favorecida para sustituyentes voluminosos, amarillos, área desfavorecida para sustituyentes voluminosos. Mapa alrededor del compuesto P16.

Junto a lo señalado, es importante comentar las diferencias respecto al mapa estérico CoMFA, el cual está dispuesto de manera mayoritaria alrededor de las posiciones 3' y 4' del anillo aromático, a diferencia del pequeño mapa amarillo en esa zona reportado por el modelo CoMSIA y los mapas descritos en otras zonas de la molécula.

Los mapas de contorno electroestático se muestran solo en dos zonas. La primera de ellas corresponde a un gran poliedro azul ubicado directamente sobre la posición 4' del anillo aromático (**Figura 44**). Este resultado indica que sustituyentes electro - dadores deben ser preferidos para mejorar la actividad biológica. Dentro del grupo de compuestos destaca el **20**, el cual orienta completamente el sustituyente, en esta zona. Sin embargo, este resultado va en contra a la presencia de halógenos en esta zona, varios de los cuales presentan valores de pCIM en rangos medios, por ejemplo, el compuesto **58** (pCIM = 5,37). Finalmente, es importante destacar que nuevamente los compuestos anilínicos no orientan hacia la zona señalada, lo cual puede explicar su mayor actividad antibacteriana.

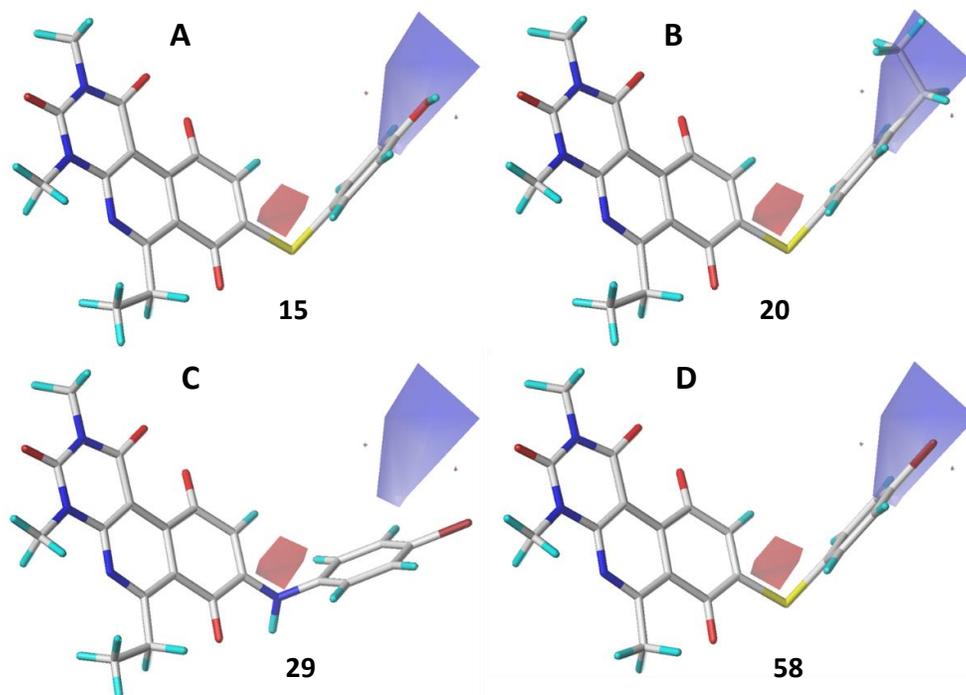


Figura 44. CoMSIA electrostático: rojo, área favorecida para sustituyentes electro-atractores, azul, área favorecida para sustituyentes electro-dadores. A: compuesto 15; B: compuesto 20; C: compuesto 29; D: compuesto 58.

El segundo mapa es de color rojo y se localiza entre el heteroátomo conector y la posición 2' del anillo aromático, lo cual indica que sustituyentes electro-atractores en esas zonas son beneficiosos para la actividad antibacteriana. Estos resultados pueden explicar, nuevamente, el resultado de actividad antibacteriana de **P16**, el compuesto más activo de la serie de tiofenoles (**Figura 45**).

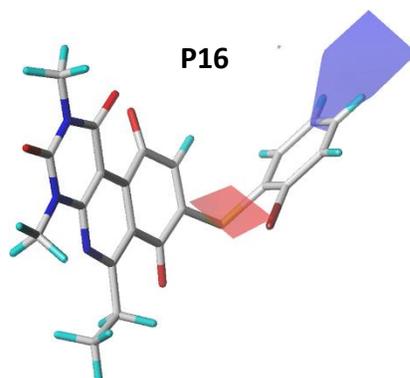


Figura 45. CoMSIA electrostático: rojo, área favorecida para sustituyentes electro-atractores, azul, área favorecida para sustituyentes electro-dadores. Mapa alrededor del compuesto P16.

El tercer par de mapas corresponde al componente hidrofóbico. En la **Figura 46** es posible observar la existencia de tres mapas, uno de ellos, de color amarillo alrededor de la

posición 4' del anillo aromático, el cual señala que la presencia de sustituyentes hidrofóbicos en esta posición es favorable para la actividad antibacteriana. Esto justifica y explica la actividad biológica de compuestos 4'-halogenados como bromo (**58**) o sustituyentes alquílicos como 4'-etil (**20**). Rodeando esta zona, y cercana a las posiciones 3' y 5' del anillo aromático, se encuentra un mapa de mayor tamaño de color plomo indicando que sustituciones hidrofóbicas en esa zona son perjudiciales para la actividad biológica, estableciendo, por lo tanto, una restricción al empleo de sustituyentes.

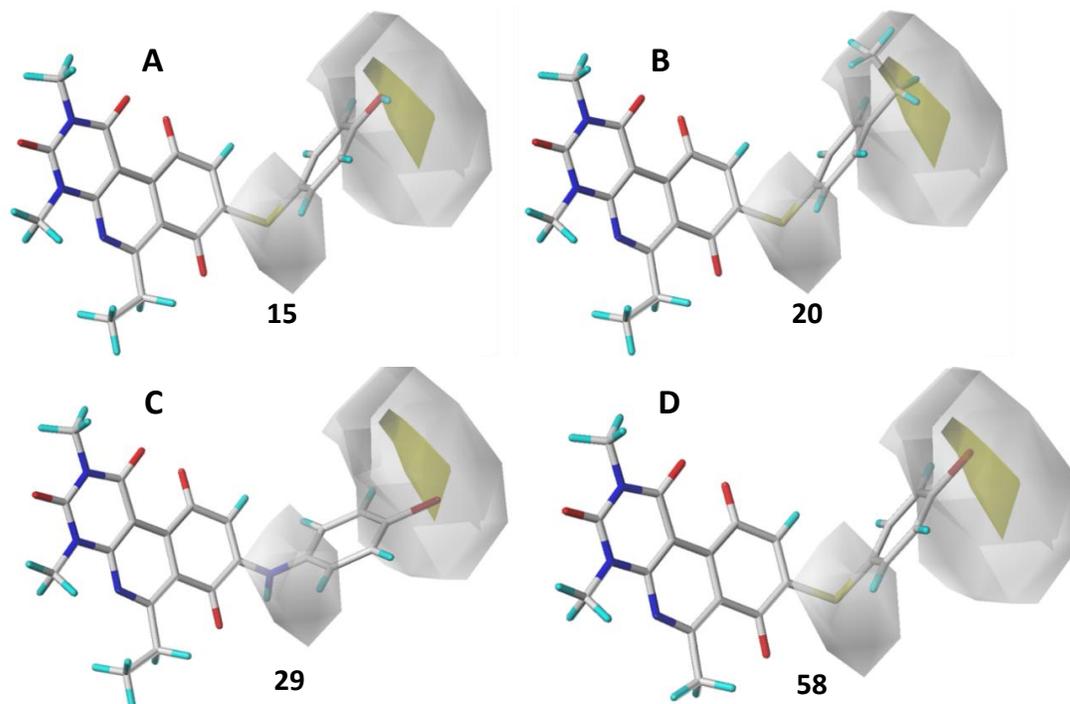


Figura 46. CoMSIA hidrofóbico: amarillo, área favorecida para sustituyentes hidrofóbicos; plomo, área desfavorecida para sustituyentes hidrofóbicos. A: compuesto 15; B: compuesto 20; C: compuesto 29; D: compuesto 58.

El tercer mapa, también corresponde a uno de color plomo, cercano a la posición 2', hacia el cual se orienta el sustituyente 2-bromo en la molécula **P14** (**Figura 47**). Esto sugiere la posibilidad de explorar otros sustituyentes en esa zona del anillo.

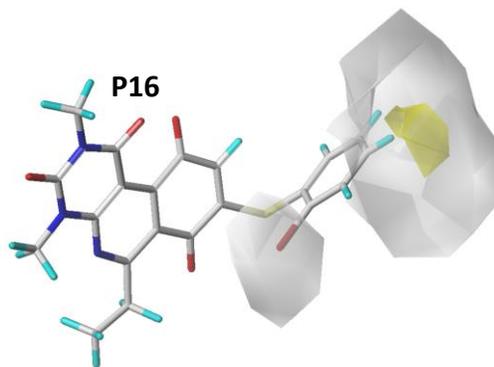


Figura 47. CoMSIA hidrofóbico: amarillo, área favorecida para sustituyentes hidrofóbicos; plomo, área desfavorecida para sustituyentes hidrofóbicos. Mapas alrededor del compuesto 16.

Estos resultados, sumados a los anteriores establecen un equilibrio entre los distintos parámetros que modulan la actividad antibacteriana dependiendo la zona de la molécula a sustituir. Por ejemplo, se puede analizar la influencia del sustituyente bromo (el cual es electro-atractor e hidrofóbico) ya que está presente en posición 2' (compuesto **P16**) y 4' (compuesto **P6**). Si comparamos sus pCIMs veremos que el compuesto **P16** presenta mayor actividad antibacteriana (pCIM = 5,69) que P6 (pCIM = 5,08) debido al carácter electro-atractor en posición 2', a pesar de su carácter hidrofóbico, el cual está desfavorecido en esta zona. En contraste el compuesto **P4** presenta actividad antibacteriana asociada principalmente a su carácter hidrofóbico, el cual está favorecido en posición 4', pero presenta menor pCIM que **P16** dado que en esa zona se prefieren sustituyentes electro-donores, siendo este descriptor el preponderante según los resultados informados previamente (42,7% vs 32,9%).

Finalmente, el mapa aceptor de puente de hidrógeno muestra dos áreas alrededor de las moléculas. El primero de ellos corresponde a una zona favorecida como aceptor de puente de hidrógeno, representado por la zona rosada cercana a los grupos carbonilo de la posición 1 y 10 del núcleo tricíclico. El segundo de ellos corresponde a un poliedro rojo, que indica que la presencia de átomos o grupos aceptores de puentes de hidrógeno son desfavorables para la actividad. Nuevamente este resultado se relaciona con la menor actividad antibacteriana del compuesto **17**, quien orienta el grupo -OH directamente a esa zona (**Figura 48**).

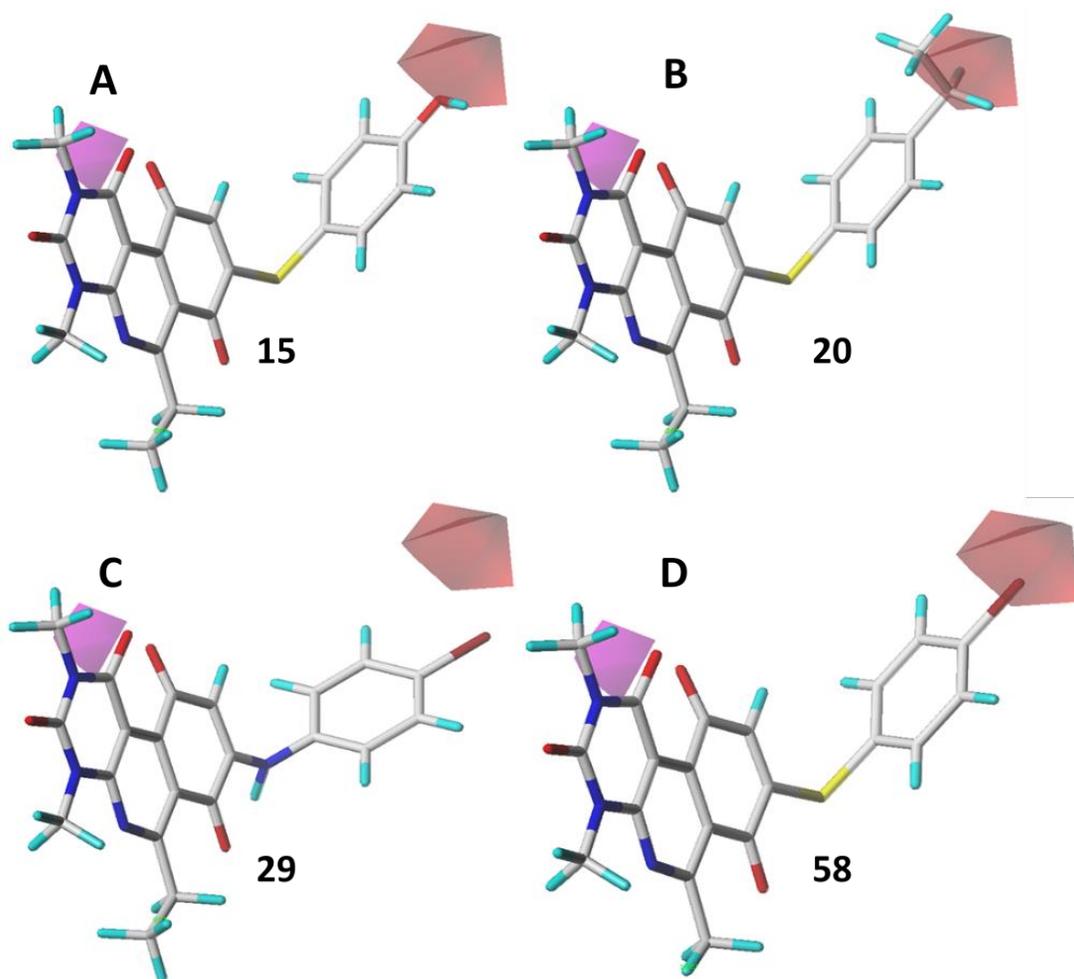


Figura 48. CoMSIA aceptor de puente de hidrógeno: morado, área favorecida para sustituyentes aceptores de puente de hidrógeno; rojo, área desfavorecida para sustituyentes aceptores de puentes de hidrógeno. A: compuesto 15; B: compuesto 20; C: compuesto 29; D: compuesto 58.

En resumen, los modelos generados presentan robustez estadística, siendo validados interna como externamente. Ambos modelos (CoMFA y CoMSIA) indican que el componente electrónico es el principal modulador de la actividad antibacteriana de estos compuestos. Sin embargo, el modelo CoMSIA indica una contribución importante del carácter hidrofóbico en la actividad antibacteriana, relacionándose así con los resultados obtenidos a partir de la relación estructura-actividad.

Por otra parte, los mapas de contorno generados entregan información asociada principalmente a las posiciones 2' y 4' del anillo tiofenólico, en donde diferentes combinaciones de sustituyentes pueden ser empleados. Entre las diferentes posibilidades destacan las modificaciones estructurales asociadas a la posición 2' del anillo aromático, ya que esta zona no ha sido suficientemente explorada.

8. PÉPTIDOS CATIÓNICOS ANTIBACTERIANOS.

Los resultados obtenidos dejan de manifiesto el potencial farmacológico que presenta esta familia de compuestos dado su perfil de actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivo y de toxicidad frente a células eucariontes. Además, los compuestos **17** y **42** fueron activos frente a *K. pneumoniae*, una enterobacteria Gram negativo a 64 µg/mL. Como antecedente adicional ensayos preliminares, de compuestos de esta familia mostraron actividad frente a bacterias Gram negativo en presencia de EDTA (datos no publicados). Estos resultados pueden explicarse a través de 2 mecanismos de acción del EDTA: aumentando la fluidez de la membrana lipídica [107] facilitando el paso de sustancias (en este caso los derivados quinónicos) a través de la membrana; o actuando como un sideróforo, aprovechando la alta afinidad del sistema de transporte de hierro, facilitando la entrada de los compuestos a la bacteria [108]. Así, estos resultados sugieren que es posible obtener actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativo al favorecer su ingreso a este tipo de organismos.

Teniendo esto en cuenta estos antecedentes y la necesidad crítica que existe en la generación de nuevos agentes activos frente a bacterias Gram negativo, es que se planteó la interrogante, ¿será posible que estos compuestos presenten actividad en bacterias Gram negativo a través de una estrategia que mejore su permeabilidad en este tipo de bacterias?. Con el objetivo de resolver esta pregunta es que se planteó como estrategia el estudio de la actividad antibacteriana de los compuestos quinónicos de manera conjunta a péptidos catiónicos antibacterianos.

¿POR QUÉ PÉPTIDOS CATIÓNICOS ANTIBACTERIANOS?

Los péptidos catiónicos antibacterianos corresponden a secuencias cortas de aminoácidos, generalmente entre 12 y 100 residuos [109], que constituyen parte del sistema inmune innato, los cuales presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y/o antiviral, con una rápida y eficiente actividad antimicrobiana [110]–[113].

Además, los péptidos antibacterianos se establecen como compuestos líderes atractivos para el desarrollo de nuevos agentes contra microorganismos resistentes a drogas, debido a su efecto antibacteriano de amplio espectro y baja tasa de aparición de resistencia [114]–[116].

Su mecanismo de acción más relevante, involucra la interacción electrostática con la membrana bacteriana (cargada negativamente), lo que conduce a una disrupción de su

composición, aumentando su permeabilidad y favoreciendo la formación de poros que llevan a la liberación de componentes intracelulares y muerte bacteriana **Figura 49**.

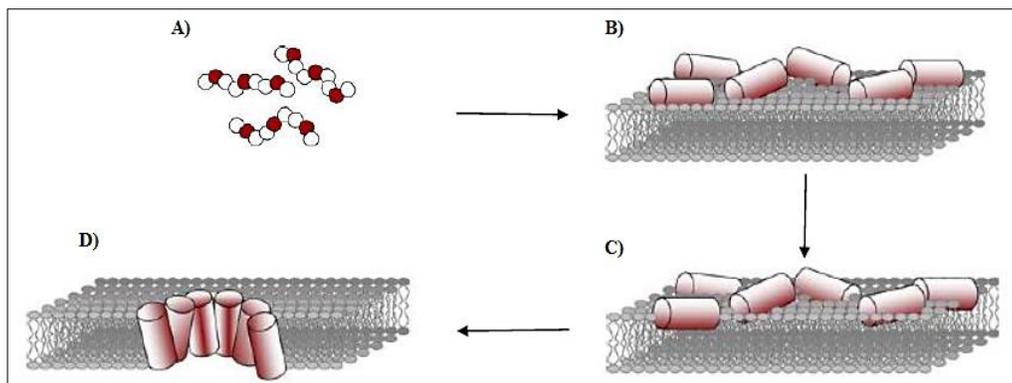


Figura 49. Mecanismo acción de péptidos antibacterianos: A) Péptido en solución. B) Interacción electrostática de los péptidos con la membrana bacteriana. C) Integración de los péptidos y pérdida de grosor de la membrana externa. D) Formación de poro, liberación componentes intracelulares y muerte bacteriana.

Sin embargo, una gran cantidad de péptidos, de cadena larga, presentan problemas de estabilidad *in vivo* dificultando su utilización. Además, sus altos costos de producción han llevado a la generación de derivados de cadena corta y ultracorta formados por la combinación de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos [117].

Atendiendo a esta información, una estrategia novedosa podría considerar, explorar la obtención de péptidos catiónicos de cadena corta y su posterior evaluación conjunta con compuestos quinónicos para estudiar la sinergia antibacteriana de este tipo de sistemas. Esta estrategia no ha sido abordada anteriormente y solo se ha reportado la obtención de compuestos quinónicos asociados a aminoácidos apolares, que distan de las características necesarias para penetrar en las membranas de bacterias Gram negativo [118], [119].

De esta forma se plantea el diseño de cadenas de péptidos catiónicos, su síntesis y evaluación antibacteriana. Para luego, realizar un estudio de sinergia en conjunto a compuestos quinónicos para determinar si este tipo de compuestos pueden presentar actividad sobre bacterias Gram negativas y a su vez ampliar su actividad sobre bacterias Gram positivas.

8.1. DISEÑO.

El diseño de las cadenas de péptidos a emplear se basa en la presencia de cargas positivas, a pH fisiológico, lo cual se asocia a su efecto antibacteriano. Junto a esto se busca

determinar el número de cargas positivas y el largo del péptido óptimo para obtener actividad antibacteriana frente a distintas bacterias prototipo.

En función de esto se propone, para este estudio, el empleo de aminoácidos básicos y apolares según los siguientes criterios:

1. Lisina y arginina: serán utilizados debido a que el pKa de sus grupos R son 10,5 y 12,5 respectivamente. Por lo tanto, se encontrarán protonados a pH fisiológico aportando cargas al péptido sintetizado.
2. Glicina: Combinaciones de glicina con aminoácidos catiónicos han presentado mejores actividades antibacterianas que análogos con otros aminoácidos apolares (ejemplo alanina o leucina) [109], [120] permitiendo disminuir el número de cargas del péptido y así encontrar el farmacóforo buscado.

Teniendo en cuenta estas consideraciones las secuencias de péptidos a sintetizar se muestran en la **Tabla 27**:

Tabla 27. Péptidos propuestos para el estudio.

| | | | |
|--------------|--------|---------------|--------|
| Pep1 | KKKKKK | Pep 8 | RRRRRR |
| Pep2 | KKKKKG | Pep 9 | RRRRRG |
| Pep 3 | KKKKGG | Pep 10 | RRRRGG |
| Pep 4 | KKKGGG | Pep 11 | RRGGGG |
| Pep 5 | KKGGGG | Pep 12 | RRGGGG |
| Pep 6 | KGGGGG | Pep 13 | RGGGGG |
| Pep 7 | GGGGGG | | |

K = Lisina; R = Arginina; G = Lisina;

8.2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS.

La obtención de péptidos objetivos se realizó empleando la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS). Esta técnica desarrollada por Merrifield [121], que consiste en la adición secuencial de aminoácidos protegidos a un soporte sólido. Este proceso inicia con la desprotección de la resina por medio del empleo de una mezcla de piperidina en DMF (20%). Luego, se realiza el anclaje del primer aminoácido a través de su extremo ácido terminal, lo que permite el crecimiento de la cadena a través del extremo amino libre. Es importante consignar que tanto el grupo amino, como el grupo R se encuentran protegidos, por lo cual, luego del anclaje se realiza la desprotección selectiva del grupo Fmoc, unido al grupo amino terminal, nuevamente con una mezcla piperidina-DMF (20%), lo que permite tener este extremo libre para realizar la elongación de la cadena. Esta reacción es favorecida a través del empleo de activadores, O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N,N-tetrametiluronio hexafluorofosfato y O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N,N-tetrametiluronio

tetrafluoroborato, para el primer y segundo acople respectivamente, los cuales permiten un rápido acoplamiento y un bajo grado de racemización [122]. Transcurrido el tiempo de reacción y la comprobación del acoplamiento [123], se procede a repetir, secuencialmente, el proceso descrito con el objetivo de extender la cadena hasta alcanzar la secuencia peptídica deseada.

Finalmente, para el proceso de clivaje y desprotección de grupos R, se utiliza una solución de ácido trifluoroacético (95%), el cual permite obtener el péptido de la resina con los grupos R libres. Un esquema general del proceso se muestra en la **Figura 50**.

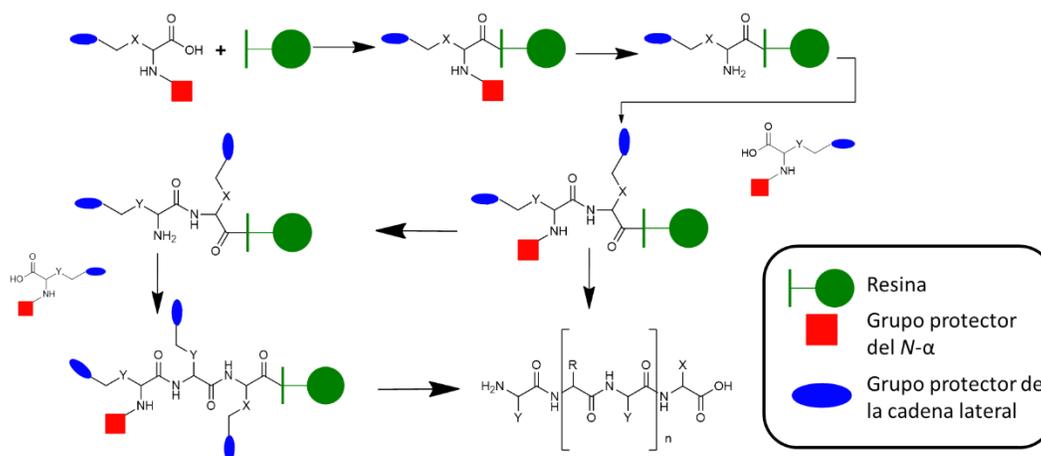


Figura 50. Esquema general de síntesis de péptidos.

A través de este procedimiento fue posible obtener los péptidos objetivos, con eficiencias de acople entre un 53% y 72%.

8.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS PÉPTIDOS SÍNTETIZADOS.

Los resultados de actividad antibacteriana de los péptidos sintetizados son reportados en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Resultados de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de los péptidos sintetizados.

| Compuesto | Secuencia | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | |
|---------------|-----------|--------------------------|------|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| | | SASM | SARM | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>K. pneumoniae</i> |
| Pep1 | KKKKKK | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep2 | KKKKKG | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 3 | KKKKGG | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 4 | KKKGGG | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 5 | KKGGGG | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 6 | KGGGGG | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 7 | GGGGGG | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 8 | RRRRRR | 64 | 128 | 256 | 256 | 256 | 256 |
| Pep 9 | RRRRRG | 256 | 256 | 256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 10 | RRRRGG | 256 | 256 | 256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 11 | RRRGGG | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 12 | RRGGGG | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| Pep 13 | RGGGGG | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 | >256 |
| VAN | | 1 | 1 | 2 | NE | NE | NE |
| GEN | | NE | NE | NE | 0,5 | 1 | 2 |

K = Lisina; R = Arginina; G = Lisina; RNE = No evaluada; CIM = Concentración Inhibitoria Mínima; VAN = vancomicina; GEN = gentamicina.

Los resultados muestran que el homopéptido de arginina (**Pep8**) presentó actividad antibacteriana en un rango de 64 $\mu\text{g/mL}$ a 256 $\mu\text{g/mL}$ en bacterias Gram positivo y a 256 $\mu\text{g/mL}$ en bacterias Gram negativo. Sumado a esto, los péptidos **Pep9** y **Pep10** presentaron actividad frente a bacterias Gram positivo a 256 $\mu\text{g/mL}$. Péptidos con menos de 4 argininas en la cadena no presentaron actividad en ninguna de las bacterias ensayadas.

Por otra parte, el homopéptido de lisina (**Pep1**), el homopéptido de glicina (**Pep7**) y los péptidos conformados por mezclas de estos aminoácidos no presentaron actividad antibacteriana a las concentraciones ensayadas.

Al contrastar nuestros resultados con los disponibles en la literatura es posible señalar que Guzmán *et al.* realizó la síntesis de homopéptidos de lisina y arginina de entre 7 y 14 residuos mostrando la inhibición del crecimiento de distintas bacterias Gram positivo [124]. En ese estudio se observó una mayor actividad antibacteriana de las secuencias compuestas por residuos de lisina, a diferencia de nuestro estudio que entregó como resultado que las secuencias compuestas por lisinas fueron inactivas a las concentraciones ensayadas. Sin embargo resultados contrapuestos fueron presentados por Svendsen y colaboradores en los cuales se menciona que residuos de arginina son más activos que secuencias conformadas por residuos de lisina [125].

Nuestros resultados también señalan que es necesario al menos 4 residuos de arginina para tener actividad en bacterias Gram positivo. Secuencias con menor cantidad de argininas no presentaron actividad antibacteriana a las concentraciones ensayadas. Dentro de estas secuencias destaca **Pep8**, un homopéptido de arginina de 6 residuos que además de tener la mejor actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivo de toda la

serie es el único que posee actividad en bacterias Gram negativo. A partir de lo expuesto, se establece en 4 el número de cargas mínimas para que estos péptidos presenten actividad en bacterias Gram positivo y 6 en Gram negativo. Esta información puede orientar la síntesis de nuevos derivados.

Este resultado puede deberse al número de cargas que poseen los péptidos. Svendsen [125] estableció que además de la carga del péptido, como un factor clave en la actividad antibacteriana de péptidos catiónicos, es la presencia de grupos voluminosos, independiente si el blanco son bacterias Gram positivo o Gram negativo. De esta forma una alternativa para mejorar la actividad antibacteriana de los péptidos sería la incorporación de grupos voluminosos en su secuencia. Además, otro estudio de homopéptidos de lisinas y argininas en bacterias Gram negativo determinó que se necesitan al menos 9 residuos de lisina y arginina para obtener actividad sobre *E. coli* a concentraciones de 10 μM y 30 μM , respectivamente. Para *P. aeruginosa* no se observó importante inhibición de crecimiento, independiente del largo del homopéptido [126].

9. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONJUNTA DE COMPUESTOS QUINÓNICOS Y PEP8.

Considerando la información obtenida en estudios previos en nuestro laboratorio, que derivados análogos a los descritos en esta tesis al ser combinados con EDTA, presentan actividad sobre bacterias Gram negativas. Consideramos abordar el estudio con compuestos análogos. Es por esto que según los antecedentes descritos anteriormente sobre la capacidad de péptidos antimicrobianos de generar disrupción en membranas bacterianas es que se decidió estudiar, a través de un estudio de sinergia, la actividad antibacteriana conjunta entre compuestos quinónicos y peptídicos.

Es por esto, que se estudió el efecto de la asociación de los compuestos **28** y **29**, con el péptido **Pep8** sobre las diferentes bacterias ATCC® previamente estudiadas. El efecto de la combinación se evaluó a través de la interpretación de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (CFI) definida como:

$$\sum CFI = CFI_A + CFI_B$$

Donde:

$$CFI_A = \frac{CIM_{(A-B)}}{CIM_{(A)}}$$

CFI_A = Concentración fraccionaria inhibitoria del compuesto A

$CIM_{(A-B)}$ = Concentración mínima inhibitoria del compuesto A en presencia del compuesto B

$CIM_{(A)}$ = Concentración mínima inhibitoria del compuesto A

Y

$$CFI_B = \frac{CIM_{(B-A)}}{CIM_{(B)}}$$

Donde:

CFI_B = Concentración fraccionaria inhibitoria del compuesto B

$CIM_{(B-A)}$ = Concentración mínima inhibitoria del compuesto B en presencia del compuesto A

$CIM_{(B)}$ = Concentración mínima inhibitoria del compuesto B

De acuerdo a *Gracia et al.* [64] se establece:

| <u>Resultado</u> | <u>Interpretación</u> |
|----------------------|-----------------------|
| $CFI \leq 0,5$: | Sinergismo |
| $0,5 < CFI \leq 4$: | Indiferencia |
| $CFI > 4$: | Antagonismo |

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana conjunta de los compuestos **28** y **29** y el péptido **Pep8**, en las distintas bacterias evaluadas se informan en las Tablas 29 y 30, respectivamente.

Tabla 29. Resultados de la actividad antibacteriana combinada de 28 y Pep8 sobre distintas bacterias ATCC.

| Bacteria | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | | | ΣCFI | Efecto |
|----------------------|--------------------------|------|---------|---------|--------------|--------|
| | 28 | Pep8 | 28/Pep8 | Pep8/28 | | |
| SARM | 1 | 64 | 1 | 64 | 2 | I |
| SASM | 1 | 128 | 1 | 64 | 1,5 | I |
| <i>E. faecalis</i> | 4 | 256 | 4 | 256 | 2 | I |
| <i>E. coli</i> | >32 | 256 | >32 | 256 | ND | ND |
| <i>P. aeruginosa</i> | >32 | 256 | >32 | 256 | ND | ND |
| <i>K. pneumoniae</i> | >32 | 256 | >32 | 256 | ND | ND |

* I: Indiferencia, ND: No determinable

Tabla 30. Resultados de la actividad antibacteriana combinada de 29 y Pep8 sobre distintas bacterias ATCC.

| Bacteria | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | | | ΣCFI | Efecto |
|----------------------|--------------------------|------|---------|---------|--------------|--------|
| | 29 | Pep8 | 29/Pep8 | Pep8/29 | | |
| SARM | 0,5 | 64 | 0,5 | 64 | 2 | I |
| SASM | 0,5 | 128 | 0,5 | 128 | 2 | I |
| <i>E. faecalis</i> | 4 | 256 | 4 | 256 | 2 | I |
| <i>E. coli</i> | >32 | 256 | >32 | 256 | ND | ND |
| <i>P. aeruginosa</i> | >32 | 256 | >32 | 256 | ND | ND |
| <i>K. pneumoniae</i> | >32 | 256 | >32 | 256 | ND | ND |

* I: Indiferencia, ND: No determinable

Los resultados muestran que la asociación de ambos compuestos quinónicos (**28** y **29**) con **Pep8** en bacterias Gram positivo no generó cambios en valores de CIM reportados

previamente estableciéndose, por lo tanto, indiferencia en la asociación de ambos compuestos.

En bacterias Gram negativo, no se observó actividad para los compuestos **28** y **29** (CIM > $\mu\text{g/mL}$), limitándose la actividad observada al péptido **Pep8**, a 256 $\mu\text{g/mL}$, según lo reportado previamente. Por este motivo, el resultado se establece como no determinable.

Estos resultados indican que no existe un beneficio al emplear de manera conjunta ambos tipos de compuestos, lo cual establece la necesidad de generar otra estrategia para obtener efecto frente a bacterias Gram negativo.

V. CONCLUSIONES

1. Las diversas estrategias de diseño empleadas permitieron orientar la síntesis de nuevos compuestos y obtener información de relación estructura-actividad relevante para la obtención de nuevos derivados activos.
2. A partir de los procesos sintéticos empleados se obtuvieron 55 compuestos quinónicos y 13 péptidos.
3. 34 compuestos quinónicos presentaron actividad antibacteriana frente a bacterias ATCC® Gram positivo en un rango de 64 a 0,5 µg/mL. El compuesto **29** se establece como el más activo de la serie.
4. Los compuestos **17** y **33** presentaron actividad antibacteriana contra *K. pneumoniae* ATCC® 700603 a 64 µg/mL.
5. Los compuestos **28** y **29**, no afectaron la viabilidad celular de manera significativa a sus respectivos valores de CIM en líneas N2a y SH-SY5Y. Además, los compuestos **17**, **28**, **29** y **31** no presentaron diferencias significativas al compararlos con vancomicina a sus respectivos valores de CIM.
6. Los modelos 3D-QSAR generados presentaron buenos parámetros estadísticos, siendo validados interna como externamente.
7. El CoMFA indica que los parámetros electrónicos y estéricos modulan en partes casi iguales (52,3% vs 47,7%) la actividad antibacteriana. Por su parte, los mapas de contorno muestran que sustituciones voluminosas en posiciones 3' y 4' del anillo tiofenólico son favorables para la actividad antibacteriana.
8. El modelo CoMSIA señala que los parámetros electrónicos e hidrofóbicos son los principales modulares de la actividad antibacteriana de estos compuestos con contribuciones del 42,7% y 32,9%, respectivamente. Los mapas de contorno muestran que sustituciones hidrofóbicas y electro-donoras deben ser preferidas en posición 4' del anillo tiofenólico, en cambio, para la posición 2' deben utilizarse sustituyentes electro-atradores e hidrofílicos.
9. Tres péptidos sintetizados presentaron actividad antibacteriana frente a bacterias ATCC® Gram positivo en un rango de 256 a 64 µg/mL. El péptido **Pep8** se establece como el más activo de la serie, presentando además actividad en bacterias Gram negativo ATCC® a 256 µg/mL.
10. La evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos **28** y **29** en conjunto al péptido **Pep8** se establece como indiferente.

VI. PROYECCIONES

1. Explorar modificaciones estructurales distintas a las ensayadas en este trabajo, como la oxidación de átomo de azufre, sustituciones 2' o 3' del anillo tiofenólico o cambios a nivel del anillo de uracilo, solo por dar algunos ejemplos.
2. Estudiar la regioselectividad para quinonas 6-hidrógeno, obtener ambos isómeros y evaluar y comparar su actividad antibacteriana.
3. Realizar modificaciones estructurales a los mejores compuestos sintetizados con el objetivo de mejorar sus propiedades "*drug-like*".
4. Estudiar el mecanismo de acción de este grupo de moléculas.
5. Evaluar los mejores compuestos frente a aislamientos clínicos.
6. Caracterizar farmacológica y microbiológicamente estos compuestos.
7. Estudiar la toxicidad y efectividad de estos compuestos *in vivo*.
8. Desafiar los modelos CoMFA y CoMSIA en vistas a obtener compuestos más activos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. Hughes and A. Karlén, “Discovery and preclinical development of new antibiotics,” *Ups. J. Med. Sci.*, vol. 119, no. 2, pp. 162–169, 2014.
- [2] A. Fleming, “On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*,” *Br. J. Exp. Pathol.*, vol. 10, no. 3, p. 226, 1929.
- [3] C. T. Walsh and T. A. Wencewicz, “Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective,” *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 67, no. 1, p. 7, 2014.
- [4] M. Renwick and E. Mossialos, “What are the economic barriers of antibiotic R&D and how can we overcome them?” Taylor & Francis, 2018.
- [5] B. Spellberg *et al.*, “The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 46, no. 2, pp. 155–164, 2008.
- [6] S. J. Projan, “Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery?,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 6, no. 5, pp. 427–430, 2003.
- [7] S. R. Norrby, C. E. Nord, and R. Finch, “Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 5, no. 2, pp. 115–119, 2005.
- [8] A. C. White Jr, R. L. Atmar, J. Wilson, T. R. Cate, C. E. Stager, and S. B. Greenberg, “Effects of requiring prior authorization for selected antimicrobials: expenditures, susceptibilities, and clinical outcomes,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 25, no. 2, pp. 230–239, 1997.
- [9] J. E. McGowan Jr and M. Finland, “Usage of antibiotics in a general hospital: effect of requiring justification,” *J. Infect. Dis.*, vol. 130, no. 2, pp. 165–168, 1974.
- [10] A. Coates, Y. Hu, R. Bax, and C. Page, “The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 11, p. 895, 2002.
- [11] J. M. Conly and B. L. Johnston, “Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox,” *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 159–160, 2005.
- [12] J. Campanini-Salinas, J. Andrades-Lagos, J. Mella-Raipan, and D. Vasquez-Velasquez, “Novel classes of antibacterial drugs in clinical development, a hope in post antibiotic era,” *Curr. Top. Med. Chem.*, 2018.
- [13] A. R. M. Coates and Y. Hu, “Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 152, no. 8, pp. 1147–1154, 2007.
- [14] S. Altman, “Antibiotics present and future,” *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 1, pp. 1–2, 2014.
- [15] A. E. Clatworthy, E. Pierson, and D. T. Hung, “Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 9, p. 541, 2007.
- [16] M. P. Jevons, “‘Celbenin’-resistant staphylococci,” *Br. Med. J.*, vol. 1, no. 5219, p. 124, 1961.
- [17] W. H. Organization, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization, 2014.
- [18] M. L. Cohen, “Changing patterns of infectious disease,” *Nature*, vol. 406, no. 6797, p. 762, 2000.

- [19] J. O'Neill, "Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance 2014." 2014.
- [20] B. Spellberg, J. H. Powers, E. P. Brass, L. G. Miller, and J. E. Edwards Jr, "Trends in antimicrobial drug development: implications for the future," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 38, no. 9, pp. 1279–1286, 2004.
- [21] G. H. Talbot, J. Bradley, J. E. Edwards Jr, D. Gilbert, M. Scheld, and J. G. Bartlett, "Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 42, no. 5, pp. 657–668, 2006.
- [22] R. Laxminarayan *et al.*, "Antibiotic resistance—the need for global solutions," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 13, no. 12, pp. 1057–1098, 2013.
- [23] I. P. Policy, "The 10 '20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 50, pp. 1081–1083, 2010.
- [24] OMS, "La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos," 2017. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>. [Accessed: 20-Oct-2018].
- [25] J. A. Karlowsky, N. Kaplan, B. Hafkin, D. J. Hoban, and G. G. Zhanel, "AFN-1252, a FabI inhibitor, demonstrates a Staphylococcus-specific spectrum of activity," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 8, pp. 3544–3548, 2009.
- [26] R. W. Scott and G. N. Tew, "Mimics of host defense proteins; strategies for translation to therapeutic applications," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 17, no. 5, pp. 576–589, 2017.
- [27] N. Srinivas *et al.*, "Peptidomimetic antibiotics target outer-membrane biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*," *Science (80-.)*, vol. 327, no. 5968, pp. 1010–1013, 2010.
- [28] T. L. Lincecum Jr *et al.*, "Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase," *Mol. Cell*, vol. 11, no. 4, pp. 951–963, 2003.
- [29] V. Hernandez *et al.*, "Discovery of a novel class of boron-based antibacterials with activity against gram-negative bacteria," *Antimicrob. Agents Chemother.*, p. AAC-02058, 2013.
- [30] G. Book, "Compendium of chemical terminology," *Int. Union Pure Appl. Chem.*, vol. 528, 2014.
- [31] W. S. Pierpoint, "o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides," *Biochem. J.*, vol. 112, no. 5, pp. 609–616, 1969.
- [32] D. Georgellis, O. Kwon, and E. C. C. Lin, "Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria," *Science (80-.)*, vol. 292, no. 5525, pp. 2314–2316, 2001.
- [33] A. G. Medentsev, A. Y. Arinbasarova, and V. K. Akimenko, "Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*," *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 41, no. 5, pp. 503–507, 2005.
- [34] S. Akai and Y. Kita, "recent progress in the synthesis of p-quinones and p-dihydro-quinones through oxidation of phenol derivatives. a review," *Org. Prep. Proced. Int.*, vol. 30, no. 6, pp. 603–629, 1998.
- [35] J. S. Novais *et al.*, "Antibacterial naphthoquinone derivatives targeting resistant strain Gram-

negative bacteria in biofilms,” *Microb. Pathog.*, vol. 118, pp. 105–114, 2018.

- [36] S. Yordanova, E. Vasileva-Tonkova, D. Staneva, S. Stoyanov, and I. Grabchev, “Synthesis and characterization of new water soluble 9, 10-anthraquinone and evaluation of its antimicrobial activity,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1168, pp. 22–27, 2018.
- [37] Y. Kumagai, Y. Shinkai, T. Miura, and A. K. Cho, “The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 52, 2012.
- [38] A. Brunmark and E. Cadenas, “Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 7, no. 4, pp. 435–477, 1989.
- [39] C.-K. Ryu, R.-E. Park, M.-Y. Ma, and J.-H. Nho, “Synthesis and antifungal activity of 6-arylamino-phthalazine-5, 8-diones and 6, 7-bis (arylthio)-phthalazine-5, 8-diones,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 9, pp. 2577–2580, 2007.
- [40] D. C. Moraes *et al.*, “ β -lapachone and α -nor-lapachone modulate *Candida albicans* viability and virulence factors,” *J. Mycol. Med.*, 2018.
- [41] M. KUROYA, N. ISHIDA, J. KONNO, T. SHIRATORI, M. MIURA, and Y. YOSHINARI, “Antiviral activity of several quinone and isoquinoline derivatives,” *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 6, no. 2, pp. 90–91, 1953.
- [42] E.-J. Lee *et al.*, “Induction of G2/M cell cycle arrest and apoptosis by a benz [f] indole-4, 9-dione analog in cultured human lung (A549) cancer cells,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 14, no. 20, pp. 5175–5178, 2004.
- [43] D. Vásquez, J. A. Rodríguez, C. Theoduloz, J. Verrax, P. B. Calderon, and J. A. Valderrama, “Synthesis and antitumor evaluation of 8-phenylaminopyrimido [4, 5-c] isoquinolinequinones,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 17, pp. 5060–5062, 2009.
- [44] C. Biot, H. Bauer, R. H. Schirmer, and E. Davioud-Charvet, “5-substituted tetrazoles as bioisosteres of carboxylic acids. Bioisosterism and mechanistic studies on glutathione reductase inhibitors as antimalarials,” *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 24, pp. 5972–5983, 2004.
- [45] D. H. Kim *et al.*, “Suppression of inflammatory responses by celastrol, a quinone methide triterpenoid isolated from *Celastrus regelii*,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 39, no. 9, pp. 819–827, 2009.
- [46] T. Ito, H. M. Nguyen, N. N. Win, H. Q. Vo, H. T. Nguyen, and H. Morita, “Three new sesquiterpene aminoquinones from a Vietnamese *Spongia* sp. and their biological activities,” *J. Nat. Med.*, vol. 72, no. 1, pp. 298–303, 2018.
- [47] K. Gong and W. Li, “Shikonin, a Chinese plant-derived naphthoquinone, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through reactive oxygen species: A potential new treatment for hepatocellular carcinoma,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 12, pp. 2259–2271, 2011.
- [48] V. P. Papageorgiou, A. N. Assimopoulou, E. A. Couladouros, D. Hepworth, and K. C. Nicolaou, “The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 38, no. 3, pp. 270–301, 1999.
- [49] N. Didry, M. Pinkas, and L. Dubreuil, “Antibacterial activity of naphthoquinones of plant origin,” in *Annales pharmaceutiques francaises*, 1986, vol. 44, no. 1, p. 73.
- [50] J. Wang *et al.*, “Antibacterial activity of juglone against *Staphylococcus aureus*: from apparent to proteomic,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 6, p. 965, 2016.

- [51] G. R. Allen, J. F. Poletto, and M. J. Weiss, "The Mitomycin Antibiotics. Synthetic Studies. II. 1 The Synthesis of 7-Methoxymitosene, an Antibacterial Agent," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 86, no. 18, pp. 3877–3878, 1964.
- [52] C. Ibis *et al.*, "Synthesis and biological evaluation of novel nitrogen-and sulfur-containing hetero-1, 4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 12, pp. 5861–5867, 2011.
- [53] J. P. Shrestha *et al.*, "Synthesis and bioactivity investigation of quinone-based dimeric cationic triazolium amphiphiles selective against resistant fungal and bacterial pathogens," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 126, pp. 696–704, 2017.
- [54] V. K. Tandon *et al.*, "2, 3-Disubstituted-1, 4-naphthoquinones, 12H-benzo [b] phenothiazine-6, 11-diones and related compounds: synthesis and biological evaluation as potential antiproliferative and antifungal agents," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 3, pp. 1086–1092, 2009.
- [55] V. K. Tandon, H. K. Maurya, M. K. Verma, R. Kumar, and P. K. Shukla, "On water'assisted synthesis and biological evaluation of nitrogen and sulfur containing hetero-1, 4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 6, pp. 2418–2426, 2010.
- [56] V. K. Tandon, R. B. Chhor, R. V Singh, S. Rai, and D. B. Yadav, "Design, synthesis and evaluation of novel 1, 4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 14, no. 5, pp. 1079–1083, 2004.
- [57] J. Campanini-Salinas *et al.*, "A New Kind of Quinonic-Antibiotic Useful Against Multidrug-Resistant *S. aureus* and *E. faecium* Infections," *Molecules*, vol. 23, no. 7, 2018.
- [58] J. A. Valderrama and D. Vásquez, "Design and synthesis of angucyclinone AB-pyrido [2, 3-d] pyrimidine analogues," *Tetrahedron Lett.*, vol. 49, no. 4, pp. 703–706, 2008.
- [59] D. Vásquez, J. A. Rodríguez, C. Theoduloz, P. B. Calderon, and J. A. Valderrama, "Studies on quinones. Part 46. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of aminopyrimidoisoquinolinequinones," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 11, pp. 5234–5242, 2010.
- [60] R. A. Houghten, "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 82, no. 15, pp. 5131–5135, 1985.
- [61] D. W. . Cockerill, F.R.;Wikler, M.A.; Alder, J.; Dudley, M.N.; Eliopoulos, G.M.; Ferraro, M.J.; Hardy, D.J.; Hecht and J. B. . et al. Hindler, J.A.; Patel, *CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*, Ninth edit. 2012.
- [62] P. A. Wayne, "CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement," *CLSI Doc. M100-S25, Clin. Lab. Stand. Inst.*, 2015.
- [63] V. Lorian, *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [64] L. S. Garcia, *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology Press, 2010.
- [65] I. Morales, C. Cerda-Troncoso, V. Andrade, and R. B. Maccioni, "The natural product curcumin as a potential coadjuvant in Alzheimer's treatment," *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 60, no.

2, pp. 451–460, 2017.

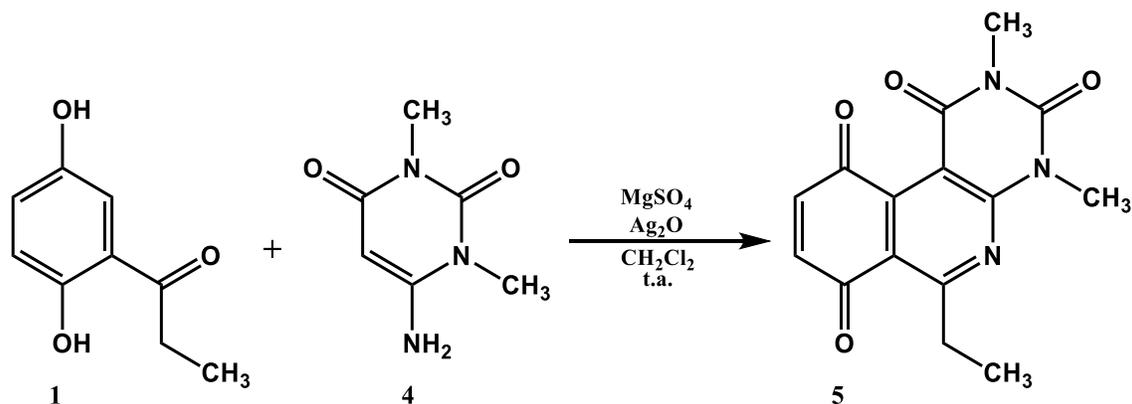
- [66] G. Prism, “6.0 software GraphPad Software, Inc.” .
- [67] A. D. Becke, “Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior,” *Phys. Rev. A*, vol. 38, no. 6, p. 3098, 1988.
- [68] C. Lee, W. Yang, and R. G. Parr, “Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density,” *Phys. Rev. B*, vol. 37, no. 2, p. 785, 1988.
- [69] M. Frisch *et al.*, “Gaussian 09, revision a. 02, gaussian,” *Inc., Wallingford, CT*, vol. 200, 2009.
- [70] M. J. D. Powell, “An efficient method for finding the minimum of a function of several variables without calculating derivatives,” *Comput. J.*, vol. 7, no. 2, pp. 155–162, 1964.
- [71] T. A. Halgren, “Maximally diagonal force constants in dependent angle-bending coordinates. II. Implications for the design of empirical force fields,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, no. 12, pp. 4710–4723, 1990.
- [72] A. Golbraikh and A. Tropsha, “Beware of q2!,” *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 20, no. 4, pp. 269–276, 2002.
- [73] A. Tropsha, “Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation,” *Mol. Inform.*, vol. 29, no. 6-7, pp. 476–488, 2010.
- [74] K. Roy, P. Chakraborty, I. Mitra, P. K. Ojha, S. Kar, and R. N. Das, “Some case studies on application of ‘rm2’ metrics for judging quality of quantitative structure–activity relationship predictions: emphasis on scaling of response data,” *J. Comput. Chem.*, vol. 34, no. 12, pp. 1071–1082, 2013.
- [75] G. Klebe, U. Abraham, and T. Mietzner, “Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity,” *J. Med. Chem.*, vol. 37, no. 24, pp. 4130–4146, 1994.
- [76] M. Clark, R. D. Cramer, and N. Van Opdenbosch, “Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field,” *J. Comput. Chem.*, vol. 10, no. 8, pp. 982–1012, 1989.
- [77] P. N. Craig, “Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies,” *J. Med. Chem.*, vol. 14, no. 8, pp. 680–684, 1971.
- [78] G. L. Patrick, *An introduction to medicinal chemistry*. Oxford university press, 2013.
- [79] I. Langmuir, “Isomorphism, isosterism and covalence.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 41, no. 10, pp. 1543–1559, 1919.
- [80] H. G. Grimm, “Über Bau und Grösse der Nichtmetallhydride,” *Zeitschrift für Elektrochemie und Angew. Phys. Chemie*, vol. 31, no. 9, pp. 474–480, 1925.
- [81] H. G. Grimm, “Allgemeines über die verschiedenen Bindungsarten,” *Zeitschrift für Elektrochemie und Angew. Phys. Chemie*, vol. 34, no. 9, pp. 430–437, 1928.
- [82] H. Erlenmeyer and M. Leo, “Über Pseudoatome,” *Helv. Chim. Acta*, vol. 15, no. 1, pp. 1171–1186, 1932.
- [83] H. L. Friedman, “Influence of isosteric replacements upon biological activity,” *Nasnrs*, vol. 206, pp. 295–358, 1951.
- [84] A. Burger, *Medicinal chemistry*, vol. 1. John Wiley & Sons, 1970.

- [85] C. W. Thornber, "Isosterism and molecular modification in drug design," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 8, no. 4, pp. 563–580, 1979.
- [86] L. M. Lima and E. J. Barreiro, "Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design," *Curr. Med. Chem.*, vol. 12, no. 1, pp. 23–49, 2005.
- [87] S. R. Langdon, P. Ertl, and N. Brown, "Bioisosteric replacement and scaffold hopping in lead generation and optimization," *Mol. Inform.*, vol. 29, no. 5, pp. 366–385, 2010.
- [88] N. A. Meanwell, "Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design," *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 8, pp. 2529–2591, 2011.
- [89] Y. Song *et al.*, "Synthesis, Structure– Activity Relationships, and in Vivo Evaluations of Substituted Di-tert-butylphenols as a Novel Class of Potent, Selective, and Orally Active Cyclooxygenase-2 Inhibitors. 2. 1, 3, 4-and 1, 2, 4-Thiadiazole Series," *J. Med. Chem.*, vol. 42, no. 7, pp. 1161–1169, 1999.
- [90] C. Almansa *et al.*, "Synthesis and SAR of a new series of COX-2-selective inhibitors: pyrazolo [1, 5-a] pyrimidines," *J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 3, pp. 350–361, 2001.
- [91] S. R. Cheruku *et al.*, "Carbon isosteres of the 4-aminopyridine substructure of chloroquine: Effects on p K a, hemein binding, inhibition of hemozoin formation, and parasite growth," *J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 14, pp. 3166–3169, 2003.
- [92] T. Uno *et al.*, "Synthesis of antimicrobial agents. 3. Syntheses and antibacterial activities of 7-(4-hydroxypiperazin-1-yl) quinolones," *J. Med. Chem.*, vol. 33, no. 10, pp. 2929–2932, 1990.
- [93] S. M. Free and J. W. Wilson, "A mathematical contribution to structure-activity studies," *J. Med. Chem.*, vol. 7, no. 4, pp. 395–399, 1964.
- [94] R. B. Silverman and M. W. Holladay, *The organic chemistry of drug design and drug action*. Academic press, 2014.
- [95] B. W. Richardson, "Lectures on experimental and practical medicine," *Br. Med. J.*, vol. 1, no. 328, p. 421, 1867.
- [96] J. A. Valderrama and J. A. Ibacache, "Regiochemical control in the amination reaction of phenanthridine-7, 10-quinones," *Tetrahedron Lett.*, vol. 50, no. 30, pp. 4361–4363, 2009.
- [97] Y. T. Pratt, "Quinolinequinones. VI. Reactions with Aromatic Amines¹," *J. Org. Chem.*, vol. 27, no. 11, pp. 3905–3910, 1962.
- [98] M. W. Singh, A. Karmakar, N. Barooah, and J. B. Baruah, "Variations in product in reactions of naphthoquinone with primary amines," *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 3, p. 10, 2007.
- [99] A. Béchamp, *De l'action des protosels de fer sur la nitronaphtaline et la nitrobenzine:: nouvelle méthode de formation des bases organiques artificielles de zinin*. 1854.
- [100] R. J. Abraham, J. J. Byrne, L. Griffiths, and M. Perez, "1H chemical shifts in NMR: Part 23, the effect of dimethyl sulphoxide versus chloroform solvent on 1H chemical shifts," *Magn. Reson. Chem.*, vol. 44, no. 5, pp. 491–509, 2006.
- [101] I. Advanced Chemistry Development, "Development, A.C. Acd/chemsketch, 6.00." 2002.
- [102] G. A. Patani and E. J. LaVoie, "Bioisosterism: a rational approach in drug design," *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 8, pp. 3147–3176, 1996.

- [103] D. A. Walsh, S. K. Franzyshe, and J. M. Yanni, "Synthesis and antiallergy activity of 4-(diarylhydroxymethyl)-1-[3-(aryloxy) propyl] piperidines and structurally related compounds," *J. Med. Chem.*, vol. 32, no. 1, pp. 105–118, 1989.
- [104] R. D. Cramer, D. E. Patterson, and J. D. Bunce, "Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, no. 18, pp. 5959–5967, 1988.
- [105] M. Akamatsu, "Current state and perspectives of 3D-QSAR," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 2, no. 12, pp. 1381–1394, 2002.
- [106] J. Verma, V. M. Khedkar, and E. C. Coutinho, "3D-QSAR in drug design-a review," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 10, no. 1, pp. 95–115, 2010.
- [107] M. Vaara, "Agents that increase the permeability of the outer membrane.," *Microbiol. Rev.*, vol. 56, no. 3, pp. 395–411, 1992.
- [108] J. B. Neilands, "Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 45, pp. 26723–26726, 1995.
- [109] A. Makovitzki, D. Avrahami, and Y. Shai, "Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 43, pp. 15997–16002, 2006.
- [110] R. E. W. Hancock and G. Diamond, "The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences," *Trends Microbiol.*, vol. 8, no. 9, pp. 402–410, 2000.
- [111] M. Zasloff, "Antimicrobial peptides of multicellular organisms," *Nature*, vol. 415, no. 6870, p. 389, 2002.
- [112] R. E. W. Hancock and R. Lehrer, "Cationic peptides: a new source of antibiotics," *Trends Biotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 82–88, 1998.
- [113] K. A. Brogden, M. Ackermann, P. B. McCray Jr, and B. F. Tack, "Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 22, no. 5, pp. 465–478, 2003.
- [114] G. Laverty, M. McLaughlin, C. Shaw, S. P. Gorman, and B. F. Gilmore, "Antimicrobial activity of short, synthetic cationic lipopeptides," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 75, no. 6, pp. 563–569, 2010.
- [115] S. Lohan, S. S. Cameotra, and G. S. Bisht, "Antibacterial evaluation of structurally amphipathic, membrane active small cationic peptidomimetics: synthesized by incorporating 3-amino benzoic acid as peptidomimetic element," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 83, pp. 102–115, 2014.
- [116] Y. Niu *et al.*, "Identification of γ -AApeptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activity," *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 44, pp. 12197–12199, 2011.
- [117] M. Ahn *et al.*, "Discovery of novel histidine-derived lipo-amino acids: applied in the synthesis of ultra-short antimicrobial peptidomimetics having potent antimicrobial activity, salt resistance and protease stability," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 68, pp. 10–18, 2013.
- [118] V. K. Tandon, D. B. Yadav, R. V Singh, A. K. Chaturvedi, and P. K. Shukla, "Synthesis and biological evaluation of novel (1)- α -amino acid methyl ester, heteroalkyl, and aryl substituted 1, 4-naphthoquinone derivatives as antifungal and antibacterial agents," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 15, no. 23, pp. 5324–5328, 2005.

- [119] A. R. Katritzky, L. Huang, and R. Sakhuja, "Efficient syntheses of naphthoquinone-dipeptides," *Synthesis (Stuttg.)*, vol. 2010, no. 12, p. 2011, 2010.
- [120] A. Makovitzki, J. Baram, and Y. Shai, "Antimicrobial lipopolypeptides composed of palmitoyl di- and tricationic peptides: in vitro and in vivo activities, self-assembly to nanostructures, and a plausible mode of action," *Biochemistry*, vol. 47, no. 40, pp. 10630–10636, 2008.
- [121] R. B. Merrifield, "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 14, pp. 2149–2154, 1963.
- [122] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, and D. Gillessen, "New coupling reagents in peptide chemistry," *Tetrahedron Lett.*, vol. 30, no. 15, pp. 1927–1930, 1989.
- [123] V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, and R. B. Merrifield, "Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction," *Anal. Biochem.*, vol. 117, no. 1, pp. 147–157, 1981.
- [124] F. Guzmán, S. Marshall, C. Ojeda, F. Albericio, and P. Carvajal-Rondanelli, "Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria," *J. Pept. Sci.*, vol. 19, no. 12, pp. 792–800, 2013.
- [125] M. B. Strøm, B. E. Haug, M. L. Skar, W. Stensen, T. Stiberg, and J. S. Svendsen, "The pharmacophore of short cationic antibacterial peptides," *J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 9, pp. 1567–1570, 2003.
- [126] P. Carvajal-Rondanelli *et al.*, "Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-negative bacteria," *Amino Acids*, vol. 48, no. 6, pp. 1445–1456, 2016.

VIII. PARTE EXPERIMENTAL

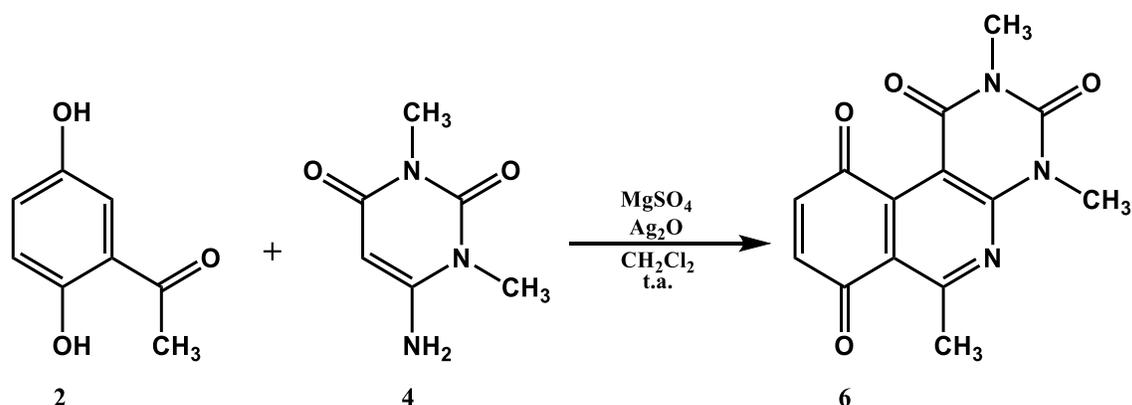


6-etil-2,4-dimetipirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (5).

Una solución de 1-(2,5-dihidroxifenil)-propan-1-ona (**1**, 166,2 mg, 1 mmol), 6-amino-1,3-dimetilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona (**4**, 155,2 mg, 1 mmol), MgSO_4 (361,1 mg, 3 mmol), Ag_2O (695,2 mg, 3 mmol) en CH_2Cl_2 (20 ml) se mantiene en agitación durante 3 horas. El crudo de reacción se filtra al vacío con papel filtro y celite en embudo Büchner utilizando CH_2Cl_2 para arrastrar el producto. La solución obtenida de la filtración se evapora hasta sequedad. El sólido resultante se purifica con 60 g de silica gel (0,063-0,200 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo = 9:1. Se obtiene un sólido de color amarillo, 251,4 mg, 0,84 mmol, 84% de rendimiento. Punto de fusión: 167,6 - 167,9 °C. HRMS $[\text{M}]^+$: m/z masa calculada $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4 = 299,09061$; masa encontrada = 299,09070.

^1H RMN (400 MHz; CDCl_3) δ 7,11 (d, $^3J = 10,3$ Hz, 1H, 9-H), 6,81 (d, $^3J = 10,3$ Hz, 1H, 8-H), 3,76 (s, 3H, 2-N CH_3), 3,47 (s, 3H, 4-N CH_3), 3,40 (c, $^3J = 7,3$ Hz, 2H, 6- CH_2CH_3), 1,34 (t, $^3J = 7,3$ Hz, 3H, 6- CH_2CH_3).

^{13}C RMN (100 MHz; CDCl_3) δ 185,0, 183,9, 171,2, 159,0, 152,9, 151,5, 146,6, 138,74, 138,69, 121,2, 105,4, 32,0, 30,6, 29,5, 12,5.

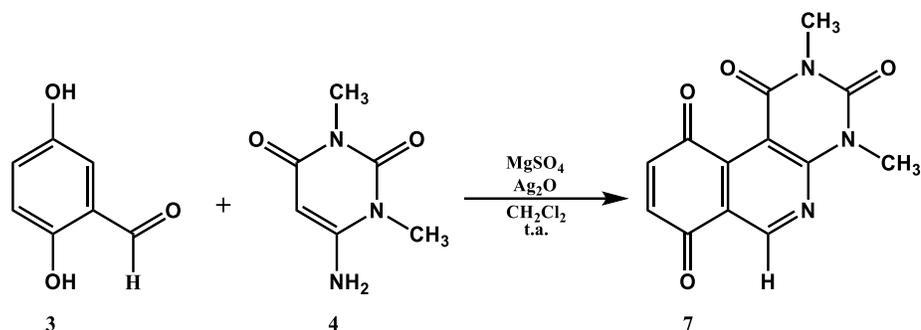


2,4,6-trimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (6).

Una solución de 1-(2,5-dihidroxifenil)-etan-1-ona (**2**, 152,2 mg, 1 mmol), 6-amino-1,3-dimetilpirimidina-2,4(1*H*, 3*H*)-diona (**4**, 155,2 mg, 1 mmol), MgSO₄ (361,1 mg, 3 mmol), Ag₂O (695,2 mg, 3 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml) se mantiene en agitación durante 3 horas. El crudo de reacción se filtra al vacío con papel filtro y celite en embudo Büchner utilizando CH₂Cl₂ para arrastrar el producto. La solución obtenida de la filtración se evapora hasta sequedad. El sólido resultante se purifica con 60 g de silica gel (0,063-0,200 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo = 9:1. Se obtiene un sólido de color amarillo, 233,9 mg, 0,82 mmol, 82% de rendimiento. Punto de fusión: 197,5 -198,5 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₁₄H₁₂N₃O₄ = 286,0832; masa encontrada = 286,0828.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,13 (d, ³J = 10,5 Hz, 1H, 9-H), 6,83 (d, ³J = 10,5 Hz, 1H, 8-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,47 (s, 3H, 4-NCH₃), 2,99 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 184,2, 183,4, 166,2, 158,3, 152,3, 150,9, 145,8, 138,4, 138,1, 121,1, 105,2, 30,1, 28,9, 26,6.

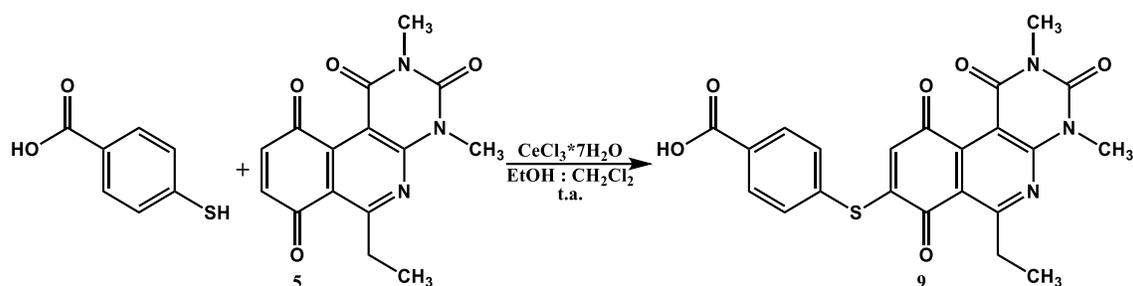


2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (7).

Una solución de 2,5-dihidroxibenzaldehído (**3**, 138,1 mg, 1 mmol), 6-amino-1,3-dimetilpirimidina-2,4(1*H*, 3*H*)-diona (**4**, 155,2 mg, 1 mmol), MgSO₄ (361,1 mg, 3 mmol), Ag₂O (695,2 mg, 3 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml) se mantiene en agitación durante 3 horas. El crudo de reacción se filtra al vacío con papel filtro y celite en embudo Büchner utilizando CH₂Cl₂ para arrastrar el producto. La solución obtenida de la filtración se evapora hasta sequedad. El sólido resultante se purifica con 60 g de silica gel (0,063-0,200 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo = 9: 1. Se obtiene un sólido de color amarillo, 184,4 mg, 0,68 mmol, 68% de rendimiento. Punto de fusión: 203,5 – 205,5 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₁₃H₁₀N₃O₄ = 272,0673; masa encontrada = 272,0671.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 9,30 (s, 1H, 6-H), 7,15 (d, ³J = 10,5 Hz, 1H, 9-H), 6,88 (d, ³J = 10,5 Hz, 1H, 8-H), 3,79 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,51 (s, 3H, 4-NCH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 182,8, 182,1, 158,2, 154,8, 153,1 150,8, 142,9, 140,6, 136,3, 122,6, 106,3, 30,5, 29,1.

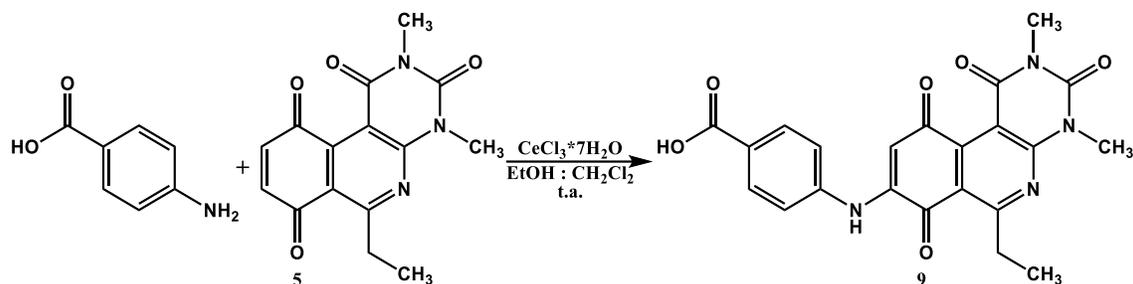


Ácido-4-((6-etil-2,4-dimetil-1,3,7,10-tetraoxo-1,2,3,4,7,10-hexahidropirimido[4,5-c]isoquinolin-8-il)thio)benzoico (8).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (149,65 mg, 0,50 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1:1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo lento una solución de ácido 4-mercaptobenzoico (38,55 mg, 0,25 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se agregan 10 mL de agua destilada a la solución y NaOH (0,1 M) hasta alcanzar el pH 10. Luego se realizan extracciones con acetato de etil (10 mL x2), para posteriormente filtrar el precipitado obtenido al vacío y lavarlo con etanol (15 mL x 3). Finalmente, el producto obtenido se recristaliza de etanol. Se obtiene un sólido de color naranja, 43,5 mg, 0,10 mmol, con 38,0% de rendimiento. Punto de fusión: > 250 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₂H₁₈N₃O₆S = 452,0916; masa encontrada = 452,0912.

¹H RMN (400 MHz; DMSO₆) δ 13,29 (s, 1H, 4'-COOH), 8,10 (d, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,76 (d, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,07 (s, 1H, 9-H), 3,59 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,30 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃) 3,23 (s, 3H, 4-NCH₃), 1,29 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; DMSO₆) δ 181,1, 180,4, 169,3, 167,0, 158,3, 155,1, 152,9, 151,2, 146,4, 135,8, 133,1, 133,0, 131,5 (2C), 127,8 (2C), 120,6, 105,8, 31,4, 30,3, 29,0, 12,3.

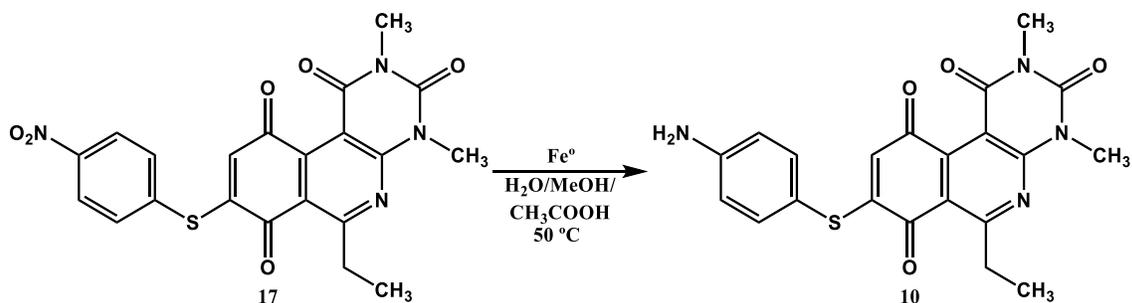


Ácido-4-((6-etil-2,4-dimetil-1,3,7,10-tetraoxo-1,2,3,4,7,10-hexahidropirimido[4,5-c]isoquinolin-8-il)amino)benzoico (9).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (101,76 mg, 0,34 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de ácido para-aminobenzoico (23,32 mg, 0,17 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1:1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. Luego se deja reaccionar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la reacción se lleva a sequedad, y posteriormente el sólido obtenido es lavado 3 veces con 30 mL de diclorometano. El sólido obtenido se purifica con 10 g de sílica gel (0,040-0,063 mm) utilizando como fase móvil acetato de etilo. Se obtiene un sólido de color rojo, 8,01 mg, 0,02 mmol, con 12,0% de rendimiento. Punto de fusión: > 250 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₂H₁₉N₄O₆ = 435,1305; masa encontrada = 435,1299.

¹H RMN (400 MHz; DMSO₆) δ 9,47 (s, 1H, NH), 7,97 (d, ³J = 8,6 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,54 (d, ³J = 8,7 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,40 (s, 1H, 9-H), 3,61 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,27 (c, ³J = 7,5 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃) 3,23 (s, 3H, 4-NCH₃), 1,32 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C-RMN (100 MHz; DMSO₆): No fue posible obtener dado la pobre solubilidad del compuesto.

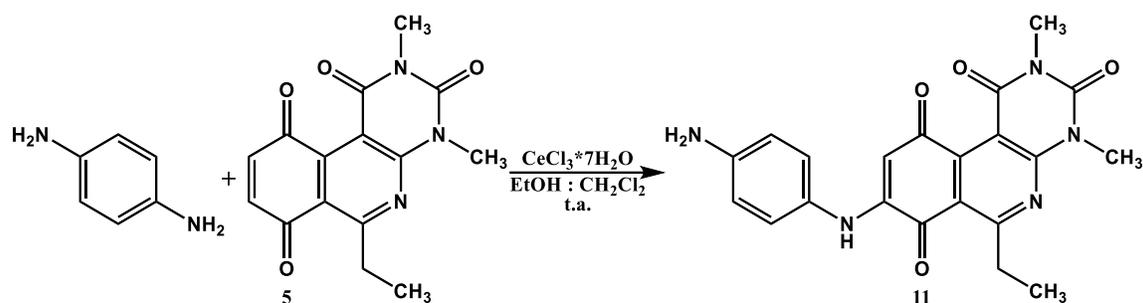


8-(4-aminotiofenil)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (10).

A una mezcla de agua: ácido acético: metanol = 1: 1: 1 (30 mL) que contiene de Fe^0 (368 mg, 6,6 mmol) se agrega 6-etil-2,4-dimetil-8-((4-nitrofenil)tio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **17** (149,3 mg, 0,33 mmol) y se agita durante 1 horas a 50°C. Transcurrido este tiempo se agregan 100 mL de agua y se neutraliza con NaHCO_3 y luego se extrae utilizando acetato de etilo (15 mL x 2). Posterior a esto, la fase orgánica se seca con NaSO_4 anhidro, se filtra y se seca al vacío. Finalmente, el crudo de reacción se purifica con 45 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 9: 1: 1. Se obtiene un sólido de color café, 42,2 mg, 0,10 mmol, con 31,0% de rendimiento. Punto de fusión: > 250 °C. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z masa calculada $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ = 423,1137; masa encontrada = 423,1125.

^1H RMN (400 MHz; CDCl_3) δ 7,24 (d, $^3J = 8,5$ Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 6,73 (d, $^3J = 8,5$ Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,22 (s, 1H, 9-H), 4,01 (s, 2H, 4'- NH_2), 3,74 (s, 3H, 2-N CH_3), 3,42 (s, 3H, 4-N CH_3), 3,40 (c, $^3J = 7,3$ Hz, 2H, 6- CH_2CH_3), 1,35 (t, $^3J = 7,3$ Hz, 3H, 6- CH_2CH_3).

^{13}C RMN (100 MHz; CDCl_3) δ 181,5, 181,2, 170,7, 158,5, 158,1, 152,7, 151,1, 148,9, 147,5, 137,0 (2C), 127,7, 120,8, 116,3 (2C), 113,4, 105,4, 31,7, 30,2, 29,0, 12,2.

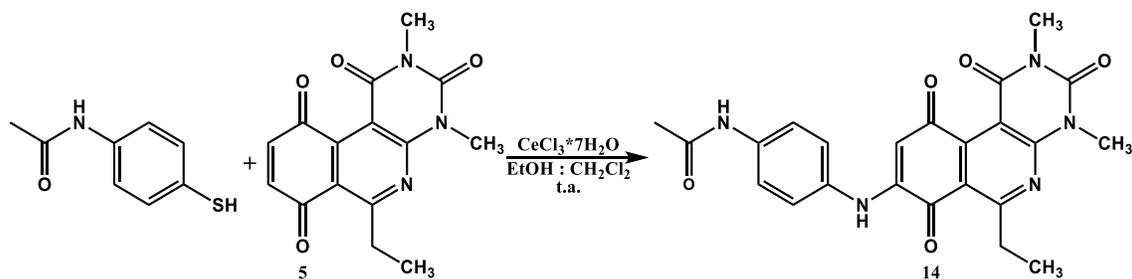


8-(4-amino-fenilamino)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (11).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (149,6 mg, 0,50 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH= 1: 1 (20 ml), se le adiciona mediante goteo lento una solución de 1,4-fenilendiamina (27,0 mg, 0,25 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil cloroformo: acetato de etilo = 8: 1. Se obtiene un sólido de color verde, 51,7 mg, 0,13 mmol, con 51% de rendimiento. Punto de fusión: > 250 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₂₀N₅O₄ = 406,1515; masa encontrada = 406,1528.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,26 (d, ³J = 8,3 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 7,26 (s, 1H, NH), 6,75 (d, ³J = 8,4 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 6,23 (s, 1H, 9-H), 3,99 (s, 2H, 4'-NH₂), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,44 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C-RMN (100 MHz; CDCl₃): 181,5, 181,2, 170,7, 158,5, 158,1, 152,7, 151,1, 148,9, 147,5, 137,0 (2C), 127,7, 120,8, 116,4 (2C), 113,5, 105,4, 31,7, 30,2, 29,0, 12,2.

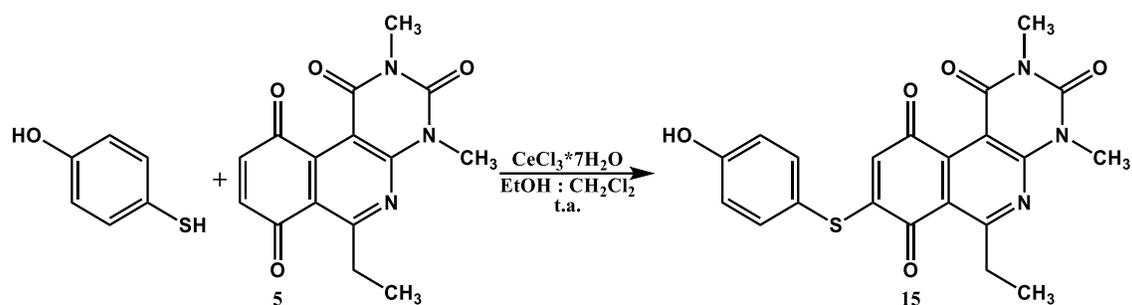


***N*-(4-((6-etil-2,4-dimetil-1,3,7,10-tetraoxo-1,2,3,4,7,10-hexahidropirimido[4,5-c]isoquinolin-8-il)tio)fenil)acetamida (14).**

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (149,65 mg, 0,50 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1:1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo lento una solución de *N*-(4-mercaptofenil)acetamida (41,81 mg, 0,25 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo = 3: 1. Se obtiene un sólido de color naranja, 79,0 mg, 0,17 mmol, con 69,2% de rendimiento. Punto de fusión: 170,2 - 173,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₃H₂₁N₄O₅S = 465,1233; masa encontrada = 465,1246.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,99 (s, 1H, NHCO), 7,69 (d, ³J = 8,3 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,43 (d, ³J = 8,4 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,15 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,42 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,40 (c, ³J = 7,5 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 2,21 (s, 3H, COCH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,3, 180,8 (2C), 170,8, 168,9, 158,5, 157,2, 152,7, 151,0, 147,2, 140,6, 136,5 (2C), 127,7, 121,1 (2C), 120,6, 105,4, 31,7, 30,2, 29,1, 24,7, 12,1.

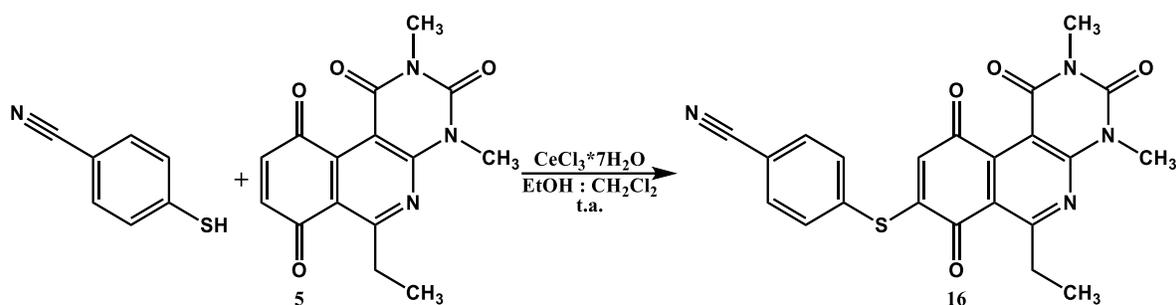


6-etil-8-(4-hidroxitiofenil)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (15).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (254,40 mg, 0,85 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH_2Cl_2 : EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-hidroxitiofenol (51,72 mg, 0,41 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 : EtOH = 1:1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo = 9: 0,8. Se obtiene un sólido de color naranja, 127,0 mg, 0,3 mmol, con 72,0% de rendimiento. Punto de fusión: 208,0 – 210,0 °C (d). HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z masa calculada $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ = 424,0967; masa encontrada = 424,0963.

^1H RMN (400 MHz; CDCl_3) δ 7,38 (d, $^3J = 8,7$ Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 6,97 (d, $^3J = 8,7$ Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,21 (s, 1H, 4'-OH), 6,15 (s, 1H, 9-H), 3,77 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,46 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,43 (c, $^3J = 7,3$ Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,38 (t, $^3J = 7,3$ Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

^{13}C RMN (100 MHz; CDCl_3) δ 181,5, 181,0, 171,0, 159,1, 158,2, 157,6, 155,8, 152,7, 151,0, 147,4, 137,4 (2C), 127,7, 120,8, 117,6 (2C), 117,0, 31,8, 30,3, 29,2, 12,2.

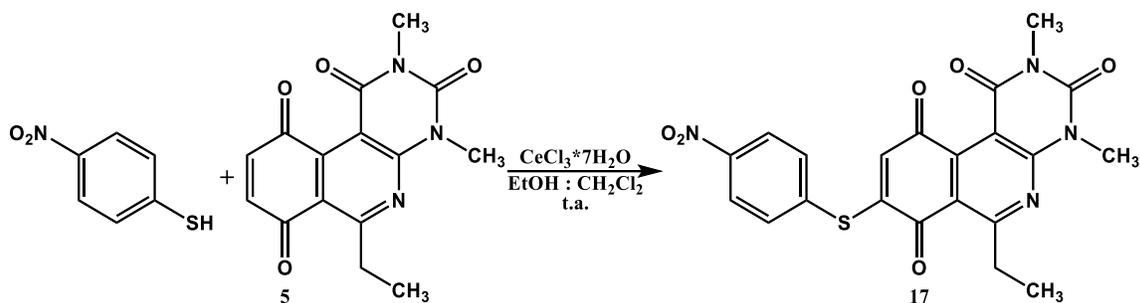


4-((6-etil-2,4-dimetil-1,3,7,10-tetraoxo-1,2,3,4,7,10-hexahidropirimido[4,5-c]isoquinolin-8-il)tio)benzonitrilo (16).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (158,62 mg, 0,53 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo lento una solución de 4-mercaptobenzonitrilo (35,15 mg, 0,26 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1:1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo = 9: 1. Se obtiene un sólido de color naranja, 82,17 mg, 0,19 mmol, con 72,0% de rendimiento. Punto de fusión: 202,9 - 205,7 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₂H₁₇N₄O₄S = 433,0892; masa encontrada = 433,0971.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,80 (d, ³J = 8,0 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,69 (d, ³J = 8,0 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,21 (s, 1H, 9-H), 3,76 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,44 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,37 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,1, 180,2, 171,0, 158,3, 154,6, 152,9, 151,0, 146,9, 136,2 (2C), 134,0, 133,7 (2C), 128,4, 120,3, 117,6, 114,6, 105,5, 31,8, 30,2, 29,1, 12,1.

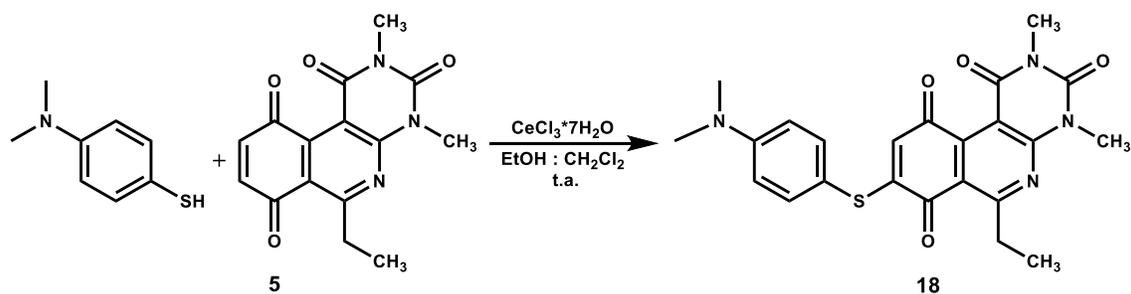


6-etil-2,4-dimetil-8-(4-nitrotiofenil)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (17).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (300,00 mg, 1,0 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-nitrotiofenol (77,80 mg, 0,5 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 10: 1: 4. Se obtiene un sólido de color amarillo, 220,5 mg, 0,49 mmol, con 96,0% de rendimiento. Punto de fusión: 188,8 - 190,1 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₇N₄O₆S = 453,0869; masa encontrada = 453,0871.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 8,34 (d, ³J = 8,7 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,75 (d, ³J = 8,7 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,24 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,42 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,40 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,0, 181,0, 170,9, 158,3, 154,3, 152,9, 151,0, 149,1, 146,9, 136,4 (2C), 136,1, 128,6, 125,1 (2C), 120,2, 105,4, 31,8, 30,3, 29,1, 12,1.

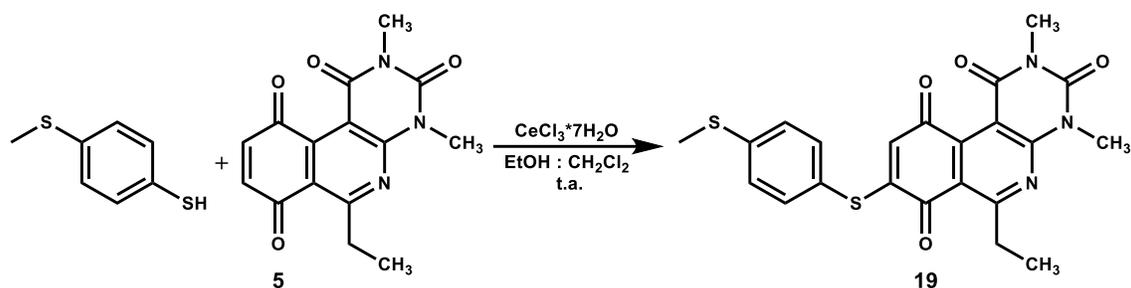


8-((4-dimetilamino)fenil)tio)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (18).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **1** (101,76 mg, 0,34 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo lento una solución de 4-(dimetilamino)benzenotiol (26,05 mg, 0,17 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 9: 0,5: 1. Se obtiene un sólido de color burdeo, 49,56 mg, 0,11 mmol, con 66,2 % de rendimiento. Punto de fusión: 214,0 - 216,0 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₃H₂₃N₄O₄S = 451,1440; masa encontrada = 451,1447.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,31 (d, ³J = 8,6 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,75 (d, ³J = 8,6 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 6,21 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,40 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 3,03 (s, 6H, 4'-N(CH₃)₂), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,7, 181,5, 170,7, 158,7, 158,6, 152,8, 151,9, 151,3, 147,7, 136,7 (2C), 127,8, 121,0, 113,6 (2C), 110,6, 105,5, 77,2, 40,3, 31,8, 30,3, 29,2, 12,3.

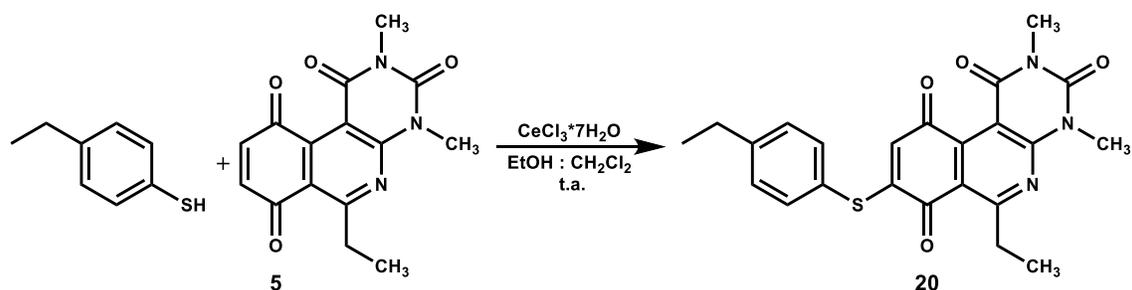


6-etil-2,4-dimetil-8-((4-metiltio)fenil)tio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (19).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (209,50 mg, 0,70 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH= 1:1 (10 mL) se le adiciona mediante goteo una solución de 4-(metiltio)bencenotiol (54,69 mg, 0,35 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1:1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 3: 0,5: 2. Se obtiene un sólido de color rojo, 72,56 mg, 0,16 mmol, con 45,6% de rendimiento. Punto de fusión: 181,6 - 184,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₂H₂₀N₃O₄S₂ = 454,0895; masa encontrada = 454,0894.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,41 (d, ³J = 8,1 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 7,33 (d, ³J = 8,2 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,19 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,4 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 2,53 (s, 3H, SCH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,33, 180,8, 170,7, 158,4, 156,8, 152,7, 151,1, 147,3, 143,1, 135,8 (2C), 127,9, 127,4 (2C), 122,4, 120,6, 105,4, 31,7, 30,2, 29,1, 15,2, 12,1.

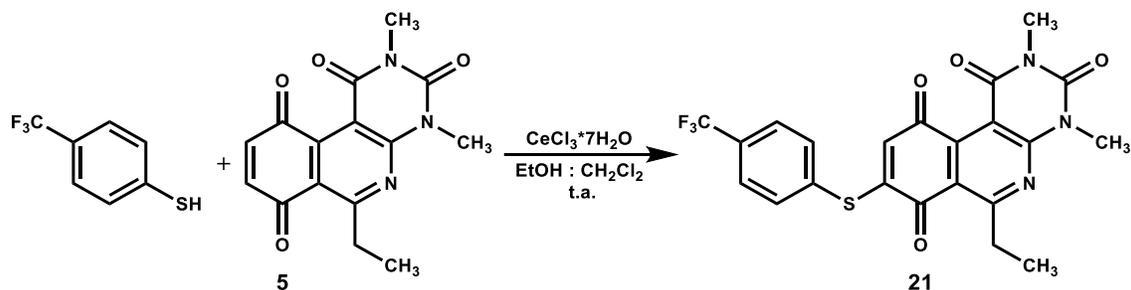


6-etil-8-((4-etilfenil)tio)-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (20).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (111,00 mg, 0,37 mmol), triclorigenato de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-etilbencenotiol (40,57 mg, 0,29 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 12:0,5:5. Se obtiene un sólido de color amarillo, 112,1 mg, 0,26 mmol, con 83,3% de rendimiento. Punto de fusión: 172,5 - 174,6 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₃H₂₂N₃O₄S = 436,1253; masa encontrada = 436,1331.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,43 (d, ³J = 7,9 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,33 (d, ³J = 7,9 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,18 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 2,72 (c, ³J = 7,6 Hz, 2H, 4'-CH₂CH₃), 1,37 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 4'-CH₂CH₃), 1,28 (t, ³J = 7,6 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,4, 180,9, 170,7, 158,4, 157,2, 152,7, 151,1, 147,4, 147,4, 135,7 (2C), 130,1 (2C), 127,8, 123,7, 120,6, 105,4, 31,7, 30,2, 29,0, 28,7, 15,3, 12,2.

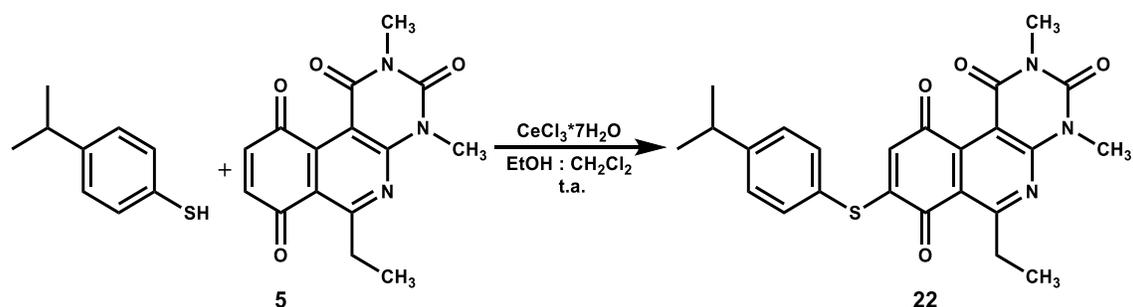


6-etil-2,4-dimetil-8-((4-(trifluorometil)fenil)tio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (21).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **1** (152,64 mg, 0,51 mmol), tricloruro de cerio(III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1:1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-(trifluorometil)bencenotiol (46,32 mg, 0,26 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 12: 0,5: 5. Se obtiene un sólido de color amarillo, 109,4 mg, 0,23 mmol, con 88,5% de rendimiento. Punto de fusión: 204,0 - 206,2 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₂H₁₇F₃N₃O₄S = 476,0814; masa encontrada = 476,0812.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,77 (d, ³J = 8,1 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,69 (d, ³J = 8,1 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,18 (s, 1H, 9-H), 3,76 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,42 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,37 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,2, 180,4, 170,9, 158,3, 155,3, 152,8, 151,0, 147,1, 136,1 (2C), 132,8 (c, 1C, ²J= 33,1), 132,2, 128,2, 127,2 (c, 2C, ³J= 3,6), 123,5 (c, 1C, ¹J= 272,8), 120,4, 105,5, 31,8, 30,2, 29,1, 12,1.

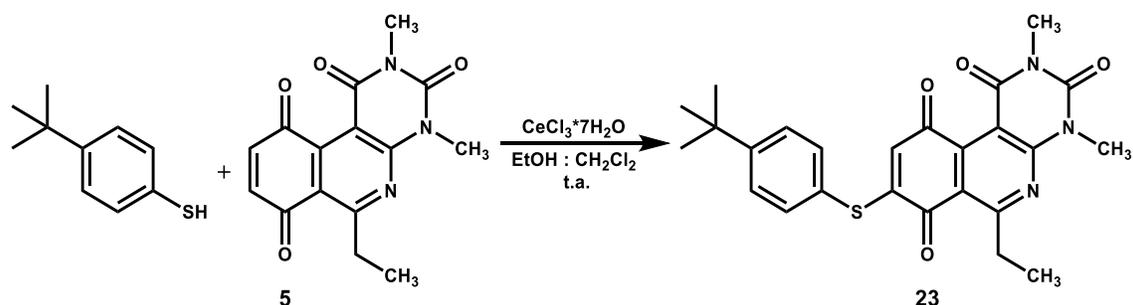


6-etil-8-((4-isopropilfenil)tio)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (22).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (110,73 mg, 0,37 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH= 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo lento una solución de 4-isopropilbencenotiol (27,41 mg, 0,18 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH= 1:1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 12: 0,5: 1. Se obtiene un sólido de color naranja, 34,61 mg, 0,077 mmol, con 42,8% de rendimiento. Punto de fusión: 134,6 - 137,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₄H₂₄N₃O₄S = 450,1488; masa encontrada = 450,1499.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,43 (d, ³J = 8,0 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,35 (d, ³J = 8,0 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,17 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,42 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,40 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 3,03 - 2,90 (m, 1H, 4'-CH(CH₃)₂), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃), 1,28 (d, ³J = 6,9 Hz, 6H, 4'-CH(CH₃)₂).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,6, 181,0, 170,8, 158,5, 157,3, 152,8, 152,1, 151,2, 147,5, 135,8 (2C), 128,7 (2C), 127,9, 123,9, 120,7, 105,5, 34,2, 31,8, 30,2, 29,1, 23,9 (2C), 12,2.

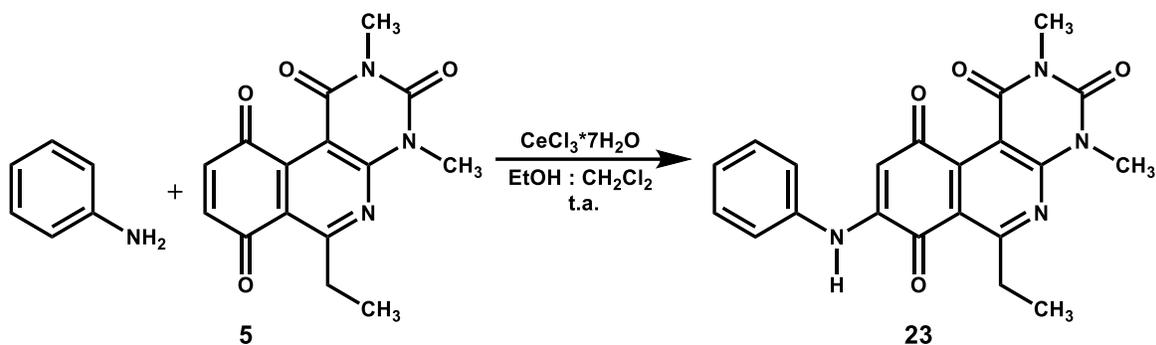


8-((4-(*tert*-butil)fenil)tio)-6-etil-2,4-dimetil-pirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (23).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (245,40 mg, 0,82 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL) se le adiciona mediante goteo una solución de 4-(*tert*-butil)bencenotiol (71,50 mg, 0,43 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 12: 0,5: 5. Se obtiene un sólido de color naranja, 120,52 mg, 0,26 mmol, con 60,6% de rendimiento. Punto de fusión: 157,6 - 160,7 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₅H₂₆N₃O₄S = 464,1644; masa encontrada = 464,1653.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,52 (d, ³J = 8,2 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,45 (d, ³J = 8,1 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,19 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,42 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,37 (t, ³J = 7,4 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (s, 9H, 4'-C(CH₃)₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,7, 181,0, 170,9, 158,6, 157,3, 154,4, 152,8, 151,2, 147,5, 135,5 (2C), 128,0, 127,9, 127,7, 126,2, 123,7, 120,7, 105,5, 35,1, 31,8, 31,4, 31,3, 30,3, 29,2, 12,3.

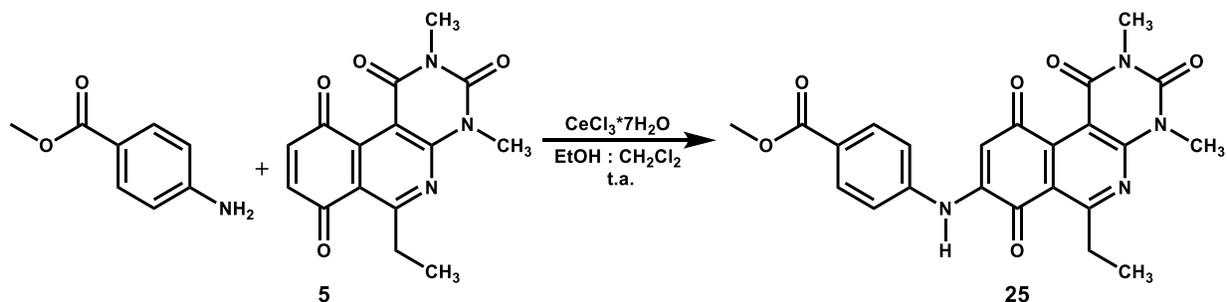


6-etil-8-(fenilamino)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (24).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona 2 (98,77 mg, 0,33 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de 1) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (20 ml), se le adiciona anilina (61,47 mg, 0,66 mmol) y se deja reaccionar durante 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 1: 2: 4. Se obtiene un sólido de color morado, 97,6 mg, 0,25 mmol, con 76,0% de rendimiento. Punto de fusión: 189,0 - 190,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₉N₄O₄ = 391,1406; masa encontrada = 391,1412.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,60 (s_{ancho}, 1H, NH), 7,42 (t, ³J = 7,8 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,23 (m, 3H, 2'-H, 4'-H y 6'-H), 6,46 (s, 1H, 9-H), 3,76 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,47 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,37 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 182,2, 180,0, 170,2, 158,7, 153,1, 151,2, 149,3, 144,6, 137,2, 129,8 (2C), 125,8, 122,3 (2C), 119,5, 105,9, 103,7, 31,8, 30,2, 29,1, 12,1.

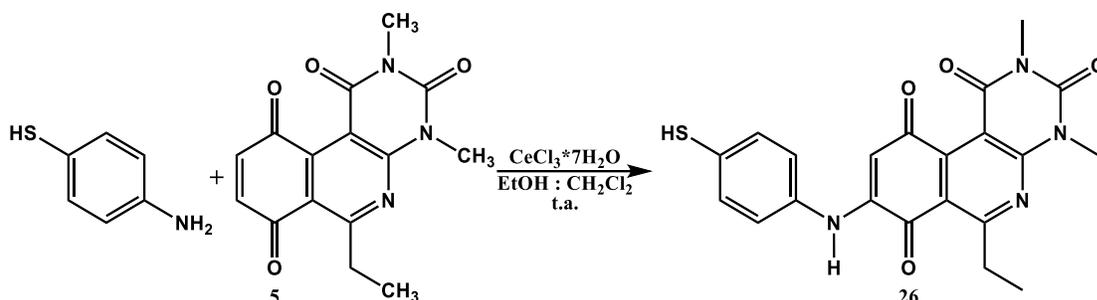


8-(4-metilester-fenilamino)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (25).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (98,77 mg, 0,33 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de 1) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (20 ml), se le adiciona 4-metilesteranilina (97,77 mg, 0,66 mmol) y se deja reaccionar durante 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil cloroformo: acetato de etilo = 20: 1. Se obtiene un sólido de color rojo, 53,81 mg, 0,12 mmol, con 36% de rendimiento. Punto de fusión: > 250,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₃H₂₁N₄O₆ = 449,1461; masa encontrada = 449,1469.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,10 (d, ³J = 8,1 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,76 (s, 1H, NH), 7,31 (d, ³J = 8,1 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,63 (s, 1H, 9-H), 3,93 (s, 3H, 4'-COOCH₃), 3,77 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,47 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,38 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 182,4, 179,6, 170,4, 155,4, 151,9, 143,3, 141,6, 134,5, 132,6 (2C), 131,4, 123,9 (2C), 120,6, 118,9, 110,4, 108,9, 105,5, 57,6, 31,9, 30,2, 29,1, 12,0.

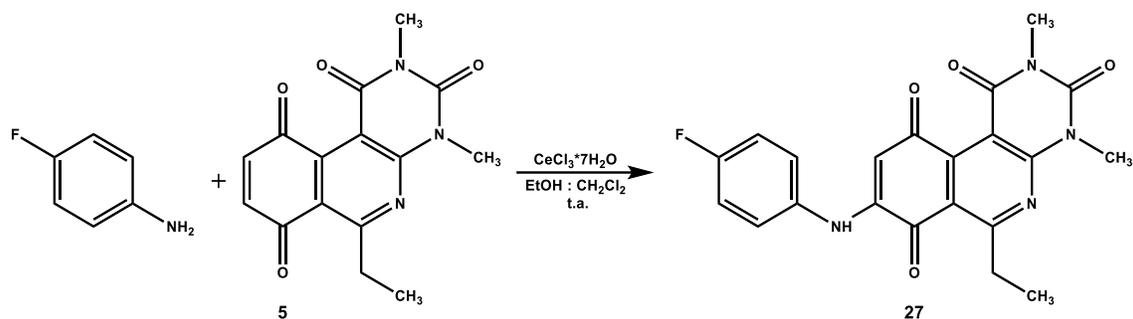


6-etil-8-((4-mercaptofenil)amino)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (26).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (209,50 mg, 0,70 mmol), triclورو de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-aminotiofenol (43,82 mg, 0,35 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 15: 1: 3. Se obtiene un sólido de color morado, 45,6 mg, 0,11 mmol, con 30,8% de rendimiento. Punto de fusión: 201,8 - 203,1 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈N₄O₄S = 423,1125; masa encontrada = 423,1127.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,61 (s, 1H, NH), 7,56 (d, ³J = 7,3 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,23 (d, ³J = 7,3 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,45 (s, 1H, 9-H), 3,76 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,46 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 4H, 6-CH₂CH₃ y SH).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) No fue posible obtener el espectro de carbono 13.

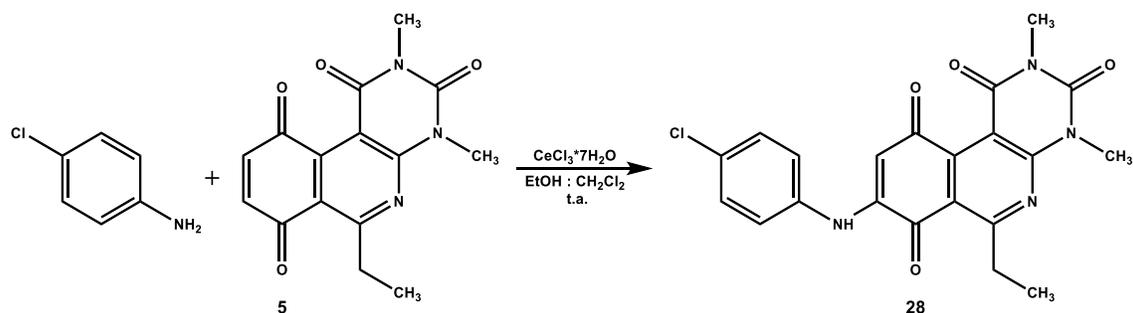


6-etil-8-((4-fluorofenil)amino)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (27).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona 1 (98,77 mg, 0,33 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (20 ml), se le adiciona 4-fluor-anilina (73,33 mg, 0,66 mmol) y se deja reaccionar durante 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil cloroformo: acetato de etilo: éter de petróleo = 10: 3: 3. Se obtiene un sólido de color morado, 93,92 mg, 0,23 mmol, con 69,3% de rendimiento. Punto de fusión: 216,1 – 216,9 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈FN₄O₄ = 409,1312; masa encontrada = 409,1307.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,49 (s, 1H, NH), 7,24 – 7,20 (m, 2H, 2'-H y 6'-H), 7,17 – 7,09 (m, 2H, 3'-H y 5'-H), 6,30 (s, 1H, 9-H), 3,76 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,47 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,37 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 182,3, 180,0, 170,3, 160,5 (d, 1C, ¹J = 247), 158,8, 153,2, 151,3, 149,4, 145,2, 133,2 (d, 1C, ⁴J = 2,9 Hz), 124,8 (d, 2C, ³J = 8,3 Hz), 119,5, 116,9 (d, 2C, ²J = 22,8 Hz), 106,1, 103,4, 31,9, 30,3, 29,2, 12,2.

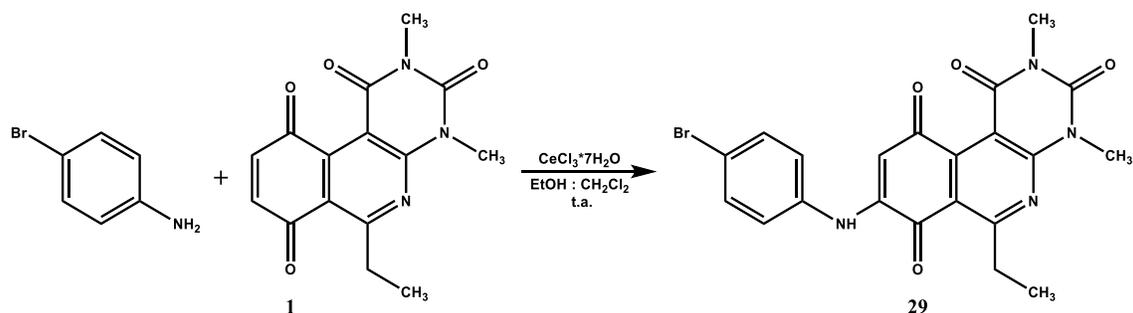


8-((4-clorofenil)amino)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (28).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona 1 (98,77 mg, 0,33 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de 1) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (20 ml), se le adiciona 4-cloro-anilina (84,19 mg, 0,66 mmol) y se deja reaccionar durante 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil cloroformo: acetato de etilo: éter de petróleo = 2: 1: 2. Se obtiene un sólido de color morado, 72,22 mg, 0,17 mmol, con 52,7% de rendimiento. Punto de fusión: 206,0 – 207,0 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈ClN₄O₄ = 425,1017; masa encontrada = 425,1021.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,56 (s_{ancho}, 1H, NH), 7,39 (d, ³J = 8,8 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,20 (d, ³J = 8,8 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,40 (s, 1H, 9-H), 3,76 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,47 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,40 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 182,2, 179,8, 170,3, 158,6, 153,1, 151,2, 149,1, 144,3, 135,8, 131,0, 129,3 (2C), 123,5 (2C), 119,3, 105,9, 104,0, 31,8, 30,2, 29,1, 12,1.

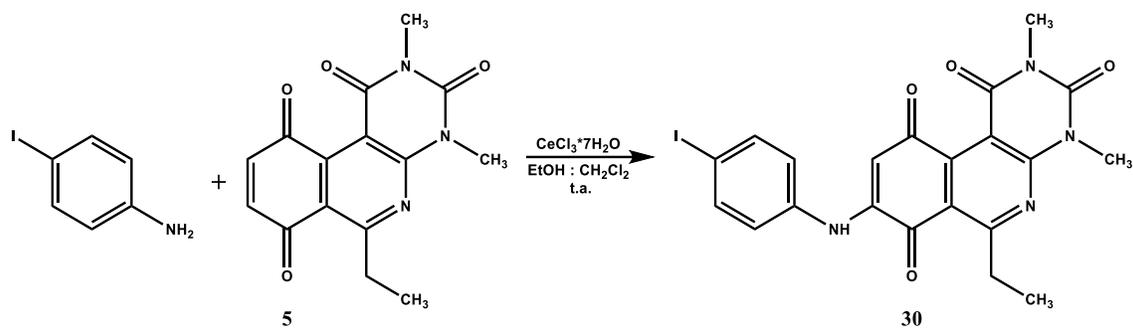


8-(4-bromo-fenilamino)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (29).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona 1 (98,77 mg, 0,33 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de 1) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (20 ml), se le adiciona 4-bromo-anilina (113,5 mg, 0,66 mmol) y se deja reaccionar durante 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 4: 1: 4. Se obtiene un sólido de color morado, 103,2 mg, 0,22 mmol, con 67,4% de rendimiento. Punto de fusión: > 250,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈BrN₄O₄ = 469,0511; masa encontrada = 469,0515.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,55 (s, 1H, NH), 7,54 (d, ³J = 8,7 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,15 (d, ³J = 8,7 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,42 (s, 1H, 9-H), 3,76 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,47 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,40 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 182,2, 179,8, 170,3, 158,6, 153,1, 151,2, 149,1, 144,2, 136,4, 132,9 (2C), 123,7 (2C), 119,3, 118,7, 105,9, 104,1, 31,8, 30,2, 29,1, 12,1.

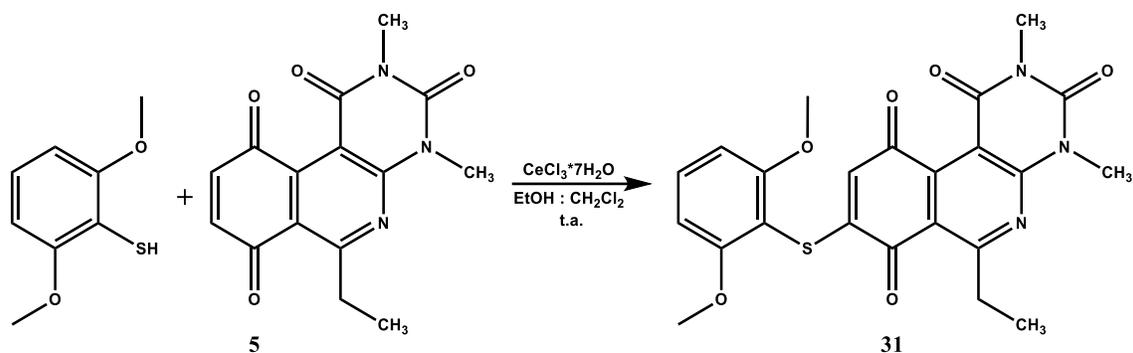


6-etil-8-((4-iodofenil)amino)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (30).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (155,63 mg, 0,52 mmol), triclورو de cerio (III) heptahidratado (5% mol de 1) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (20 ml), se le adiciona 4-iodoanilina (227,79 mg, 1,04 mmol) y se deja reaccionar durante 16 hrs. El crudo de reacción se purifica con 40 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando cloroformo como fase móvil. Se obtiene un sólido de color morado, 252,98 mg, 0,49 mmol, con 93,6% de rendimiento. Punto de fusión: > 250,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈IN₄O₄ = 517,0373; masa encontrada = 517,0372.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,73 (d, ³J = 8,1 Hz, 3H, 3'-H y 5'-H), 7,55 (s_{ancho}, 1H, NH), 7,02 (d, ³J = 8,2 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,43 (s, 1H, 9-H), 3,76 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,47 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,40 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 182,2, 179,8, 170,3, 158,6, 153,1, 151,2, 149,4, 144,0, 138,8 (2C), 137,1, 123,8 (2C), 119,3, 105,9, 104,3, 89,3, 31,8, 30,2, 29,1, 12,0.

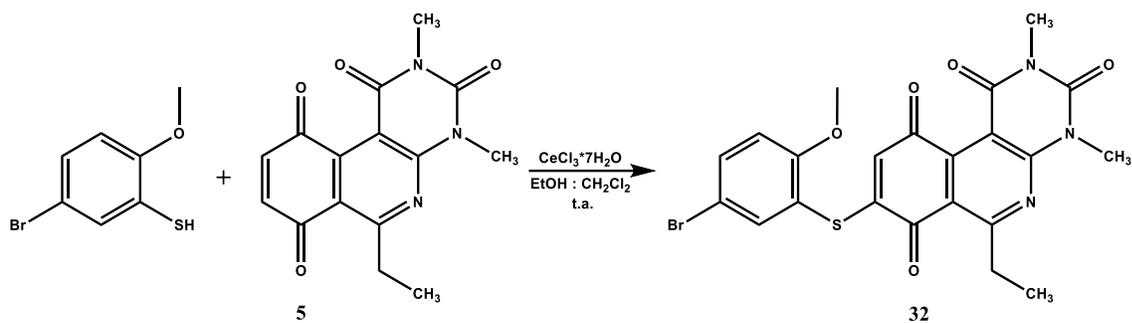


6-etil-2,4-dimetil-8-((2,6-dimetoxifenil)tio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (31).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (107,74 mg, 0,36 mmol), triclورو de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de 2,6-dimetoxitiofenol (30,64 mg, 0,18 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 9: 1: 3. Se obtiene un sólido de color rojo, 51,42 mg, 0,11 mmol, con 63,5% de rendimiento. Punto Fusión: 223,0 – 223,7 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₃H₂₂N₃O₆S = 468,1229; masa encontrada = 468,1226.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,45 (t, ³J = 8,4 Hz, 1H, 4'-H), 6,66 (d, ³J = 8,4 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 6,07 (s, 1H, 9-H), 3,84 (s, 6H, 2'-OCH₃ y 6'-OCH₃), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,2 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,3 (2C), 170,5, 161,3 (2C), 158,6, 154,1, 152,6, 151,1, 147,5, 133,2, 126,8, 121,0, 105,4, 104,5 (2C), 102,0, 56,4 (2C), 31,7, 30,2, 29,0, 12,2.

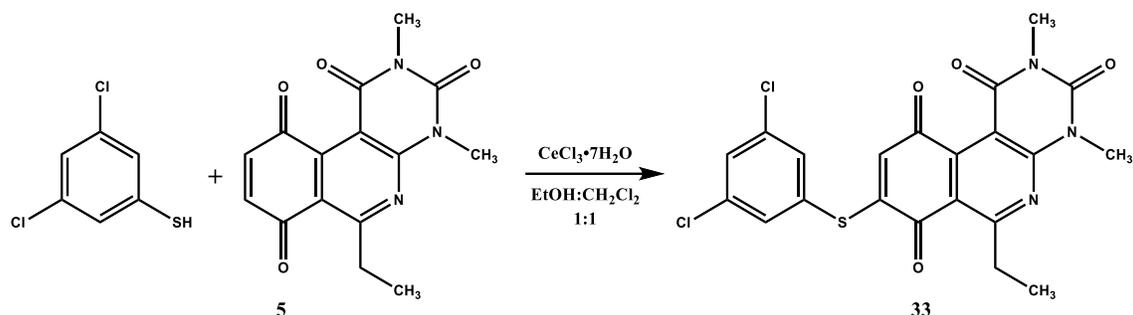


8-((5-bromo-2-metoxifenil)tio)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (32).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (107,74 mg, 0,36 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1 : 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de 5-bromo-2-metoxitiofenol (39,44 mg, 0,18 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1 : 1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 20: 1: 4. Se obtiene un sólido de color naranja, 72,29 mg, 0,14 mmol, con 76,4% de rendimiento. Punto Fusión: 221,0 – 222,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₂H₁₉BrN₃O₅S = 516,0229; masa encontrada = 516,0237.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,63 (c, ⁴J = 2,4 Hz, 1H, 6'-H), 7,61 (d, ³J = 8,7, ⁴J = 2,6 Hz, 1H, 4'-H), 6,93 (d, ³J = 8,6 Hz, 1H, 3'-H), 6,11 (s, 1H, 9-H), 3,85 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,44 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,41 (c, ³J = 7,2 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,2, 180,8, 170,7, 159,2, 158,4, 153,8, 152,7, 151,1, 147,2, 139,5, 135,7, 127,7, 120,7, 116,7, 113,5, 113,3, 105,4, 56,4, 31,7, 30,2, 29,1, 12,1.

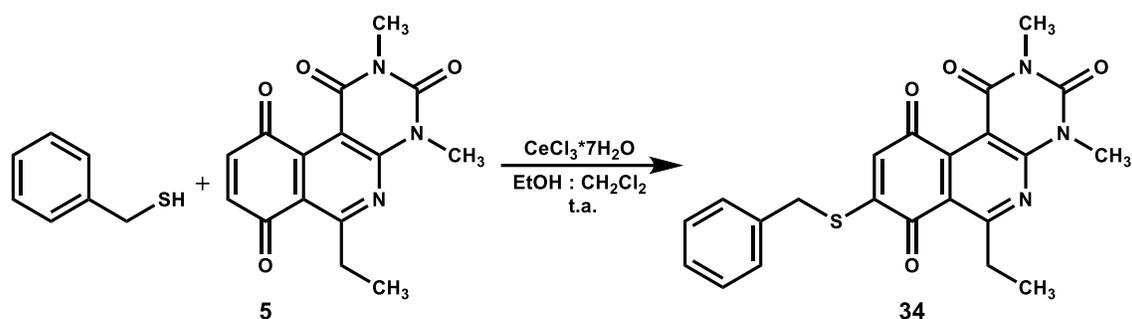


8-(3,5-diclorotiofenil)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (33).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (104,75 mg, 0,35 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de 3,5-diclorotiofenol (32,23 mg, 0,18 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1:1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 20: 1: 7. Se obtiene un sólido de color amarillo, 57,16 mg, 0,12 mmol, con 69,1% de rendimiento. Punto Fusión: 179,8 – 182,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₆Cl₂N₃O₄S = 476,0239; masa encontrada = 476,0235.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,44 (s, 2H, 2'-H y 6'-H), 7,52 (s, 1H, 4'-H); 6,24 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,40 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,36 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,1, 180,3, 170,9, 158,6, 145,9, 152,8, 151,0, 147,0, 136,6, 133,6 (2C), 131,1, 130,5, 128,4 (2C), 120,3, 105,5, 31,7, 30,2, 29,1, 12,1.

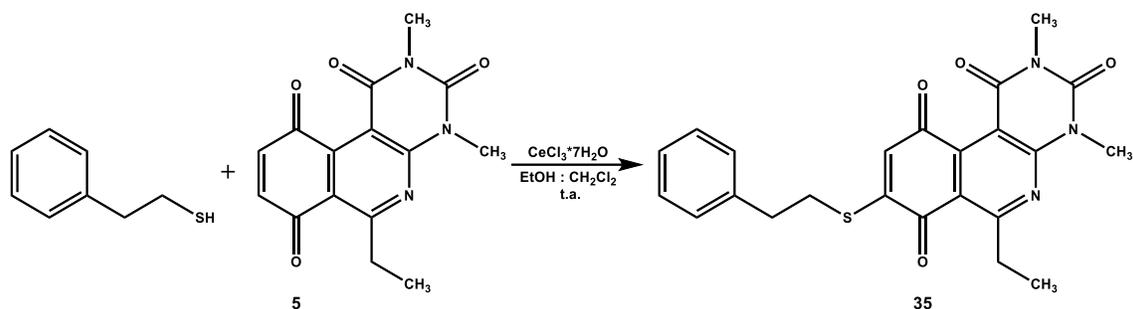


8-(benziltio)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (34).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (101,80 mg, 0,34 mmol), triclورو de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH= 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de benzilmercaptano (21,11 mg, 0,17 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 9: 1: 3. Se obtiene un sólido de color amarillo-anaranjado, 46,36 mg, 0,11 mmol, con 66,0% de rendimiento. Punto de fusión: 181,0 – 182,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₂H₂₀N₃O₄S = 422,1175; masa encontrada = 422,1171.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,33 (t, ³J = 7,3 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,26 – 7,24 (m, 3H, 2'-H, 4'-H y 6'-H), 6,70 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,46 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,37 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 3,13 – 3,00 (m, 4H, ArC₂H₄S), 1,34 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 180,7 (2C), 170,7, 158,5, 154,9, 152,7, 151,1, 147,0, 138,9, 128,8 (2C), 128,5 (2C), 127,0, 126,5, 120,7, 105,4, 33,7, 32,3, 31,7, 30,2, 29,1, 12,1.

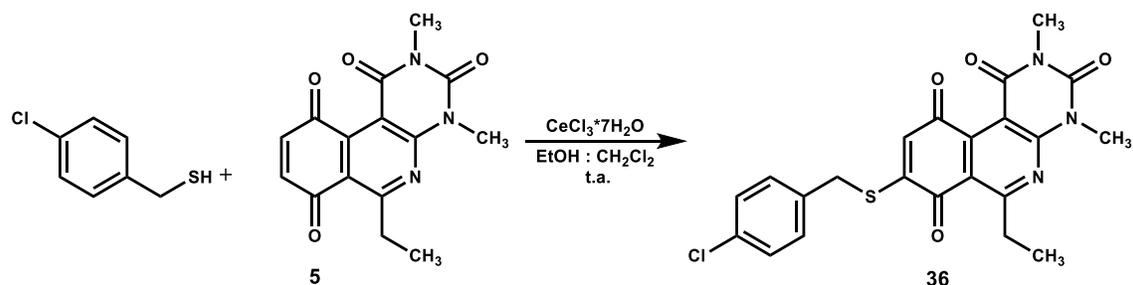


6-etil-8-(fenetiltio)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (35).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (203,50 mg, 0,68 mmol), triclورو de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **1**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1:1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de feniletilmercaptano (47,00 mg, 0,34 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 10: 1: 6. Se obtiene un sólido de color amarillo-anaranjado, 117,59 mg, 0,27 mmol, con 79,0% de rendimiento. Punto de fusión: 170,0 – 171,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₃H₂₂N₃O₄S = 436,1331; masa encontrada = 436,1332.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,33 (t, ³J = 7,3 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,26 – 7,24 (m, 3H, 2'-H, 4'-H y 6'-H), 6,70 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,46 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,37 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 3,13 – 3,00 (m, 4H, ArC₂H₄S), 1,34 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 180,7 (2C), 170,7, 158,5, 154,9, 152,7, 151,1, 147,0, 138,9, 128,8 (2C), 128,5 (2C), 127,0, 126,5, 120,7, 105,4, 33,7, 32,3, 31,7, 30,2, 29,1, 12,1.

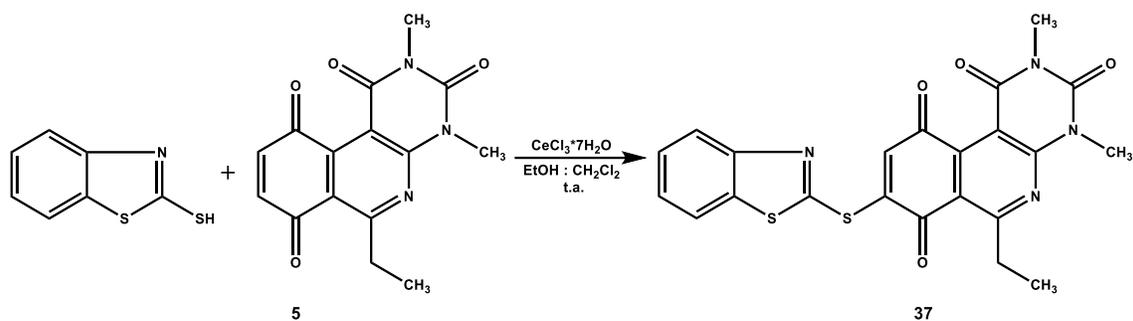


8-((4-clorobencil)tio)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraone (36).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (209,50 mg, 0,77 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-clorofeniletilmercaptano (63,46 mg, 0,40 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 10: 1: 5. Se obtiene un sólido de color naranja, 59,26 mg, 0,13 mmol, con 32,1% de rendimiento. Punto de fusión: 191,0 – 191,8 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₂H₁₉ClN₃O₄S = 456,0785; masa encontrada = 456,0775.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,33 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H y 6'-H), 6,72 (s, 1H, 9-H), 4,02 (s, 2H, Ar-CH₂-S), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,45 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,36 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,33 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 180,7, 180,6, 170,7, 158,4, 154,1, 152,7, 151,0, 146,9, 134,0, 132,4, 130,2 (2C), 129,2 (2C), 127,1, 120,6, 105,4, 35,0, 31,7, 30,2, 29,1, 12,1.

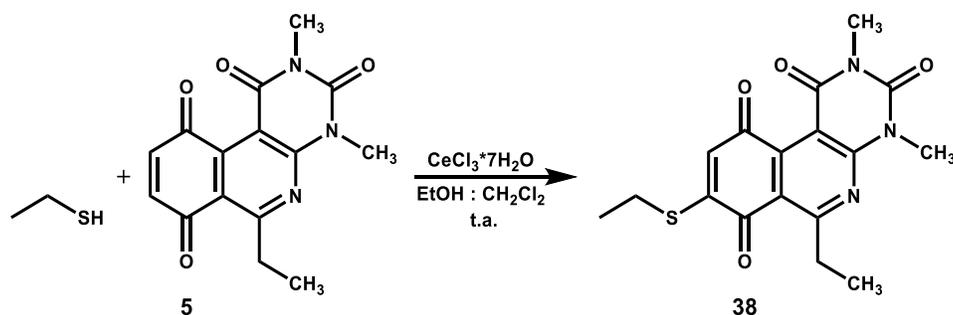


8-(benzo[d]tiazol-2-iltio)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (37).

Una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (195,53 mg, 0,65 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 ml), se le adiciona mediante goteo una solución de 2-mercaptobenzotiazol (55,2 mg, 0,33 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 ml) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1ml/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 9: 1: 3. Se obtiene un sólido de color amarillo, 111,48 mg, 0,24 mmol, con 71,5 % de rendimiento. Punto de fusión: > 250°C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₂H₁₇N₄O₄S₂ = 465,0690; masa encontrada = 456,0691.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 8,07 (d, ³J = 8,1 Hz, 1H, 7'-H), 7,89 (d, ³J = 8,1 Hz, 1H, 4'-H), 7,54 (t, ³J = 7,6 Hz, 1H, 5'-H), 7,47 (t, ³J = 7,6 Hz, 1H, 6'-H), 7,25 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,42 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,38 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 1,34 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,5, 179,9, 170,9, 158,2, 156,7, 153,6, 152,9, 151,0, 150,5, 146,8, 136,9, 131,4, 126,7, 123,6, 121,5, 120,2, 105,4, 31,7, 30,2, 29,1, 12,1.

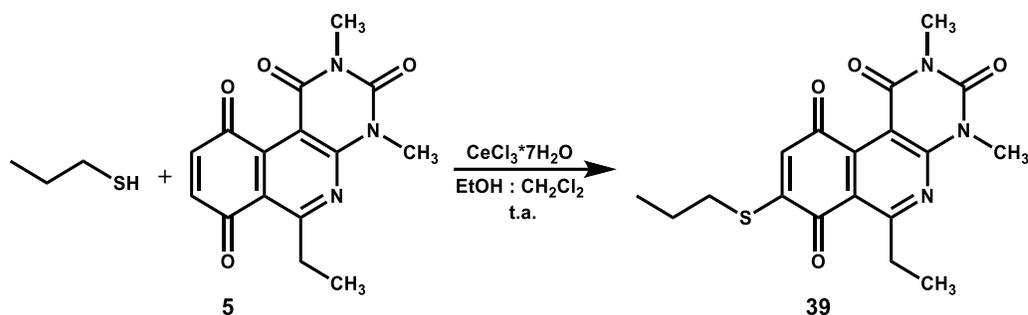


6-etil-8-(etiltio)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (38).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (149,65 mg, 0,50 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se adiciona mediante goteo una solución de etanetiol (15,53 mg, 0,25 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 15: 3: 4. Se obtiene un sólido de color naranja, 43,13 mg, 0,12 mmol, con 48,1% de rendimiento. Punto de fusión: 171,3 – 172,8 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₁₇H₁₈N₃O₄S = 360,1018; masa encontrada = 360,1010.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 6,67 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,46 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,37 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 2,85 (c, ³J = 7,4 Hz, 2H, 8-S-CH₂CH₃), 1,43 (t, ³J = 7,4 Hz, 3H, 8-S-CH₂CH₃), 1,33 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 180,8, 180,7, 170,7, 158,5, 155,1, 152,7, 151,1, 147,1, 126,5, 120,8, 105,4, 31,7, 30,2, 29,1, 24,9, 12,5 12,1.

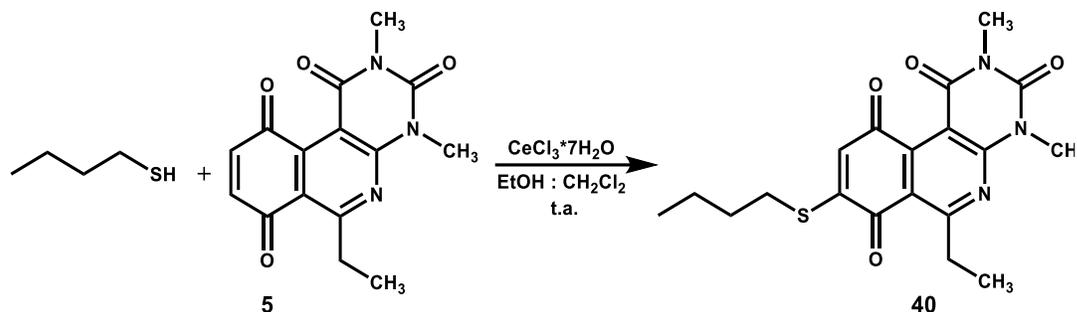


6-etil-2,4-dimetil-8-(propiltio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (39).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (203,52 mg, 0,68 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de propanetiol (25,89 mg, 0,34 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 2: 1: 4. Se obtiene un sólido de color naranja, 52,28 mg, 0,14 mmol, con 40,3% de rendimiento. Punto de fusión: 163,8 – 164,9 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₁₈H₂₀N₃O₄S = 374,1175; masa encontrada = 374,1172.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 6,68 (s, 1H, 9-H), 3,76 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,48 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,39 (c, ³J= 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 2,81 (t, ³J=7,3 Hz, 2H, 8-S-CH₂CH₂CH₃); 1,82 (m, 2H, 8-S-CH₂CH₂CH₃), 1,35 (t, ³J=7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃), 1,11 (t, ³J=7,4 Hz, 3H, 8-S-CH₂CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 180,84, 180,78, 170,7, 158,6, 155,4, 152,7, 151,1, 147,2, 126,5, 120,8, 105,4, 32,8, 31,7, 30,2, 29,1, 20,9, 13,7, 12,1.

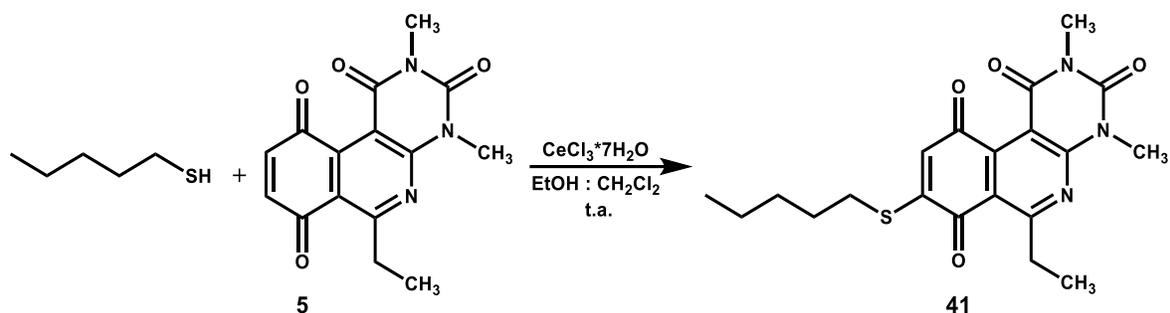


8-(butiltio)-6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (40).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (239,43 mg, 0,80 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de butanetiol (71,50 mg, 0,36 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 4: 0,5: 3. Se obtiene un sólido de color naranja, 89,11 mg, 0,23 mmol, con 58,2% de rendimiento. Punto de fusión: 158,8 - 160,5 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₁₉H₂₂N₃O₄S = 388,1331; masa encontrada = 388,1326.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 6,67 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,46 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,37 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 2,82 (t, ³J = 7,3 Hz, 2H, 8-S-CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,74 (q, ³J = 7,3 Hz, 2H, 8-S-CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,51 (s, ³J = 7,3 Hz, 2H, 8-CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,34 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃), 0,97 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 8-CH₂CH₂CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 180,82, 180,75, 170,7, 158,5, 155,4, 152,7, 151,1, 147,1, 126,4, 120,8, 105,4, 31,7, 30,6, 30,2, 29,3, 29,1, 22,2, 13,5, 12,1.

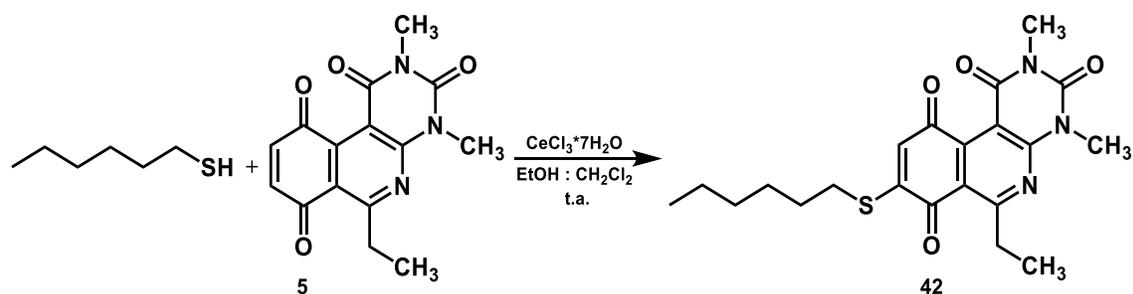


6-etil-2,4-dimetil-8-(pentiltio)-pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (41).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **5** (203,52 mg, 0,68 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de pentanetiol (35,43 mg, 0,34 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 8: 1: 6. Se obtiene un sólido de color naranja, 60,23 mg, 0,15 mmol, con 43,2% de rendimiento. Punto de fusión: 155,4 – 157,1 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₂₄N₃O₄S = 402,1483; masa encontrada = 402,1488.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 6,67 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,46 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,37 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 2,81 (t, ³J = 7,3 Hz, 2H, 8-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,77 (q, ³J = 7,3 Hz, 2H, 8-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,51 – 1,35 (m, 4H, 8-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃ y 8-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,34 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃), 0,92 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 8-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 180,8, 180,7, 170,7, 158,4, 155,4, 152,7, 151,1, 147,1, 126,4, 120,8, 105,4, 31,7 31,2, 30,8, 30,2, 29,1, 27,0, 22,2, 13,9, 12,1.

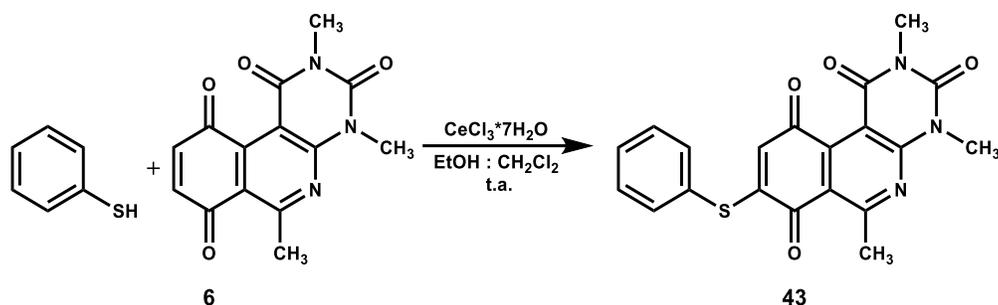


6-etil-8-(hexiltio)-2,4-dimetil-pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (42).

A una solución de 6-etil-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **5** (200.00 mg, 0,67 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **5**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de hexanetiol (40,19 mg, 0,34 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 2: 1: 4. Se obtiene un sólido de color naranja, 73,18 mg, 0,18 mmol, con 51,8% de rendimiento. Punto de fusión: 152,7 – 154,1 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₂₆N₃O₄S = 416,1655; masa encontrada = 416,1644.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 6,65 (s, 1H, 9-H), 3,73 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,44 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,35 (c, ³J = 7,3 Hz, 2H, 6-CH₂CH₃), 2,80 (t, ³J = 7,3 Hz, 2H, 8-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,74 (q, ³J = 7,3 Hz, 2H, 8-S-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,47 (q, 2H, 8-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,47 (m, 4H, 8-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃ y 8-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,32 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 6-CH₂CH₃), 0,88 (t, ³J = 7,3 Hz, 3H, 8-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 180,8, 180,7, 170,7, 158,4, 155,4, 152,5, 151,1, 147,1, 126,4, 120,8, 105,4, 31,7 31,2, 30,8, 30,1, 29,0, 28,7, 27,3, 22,5, 14,0, 12,1.

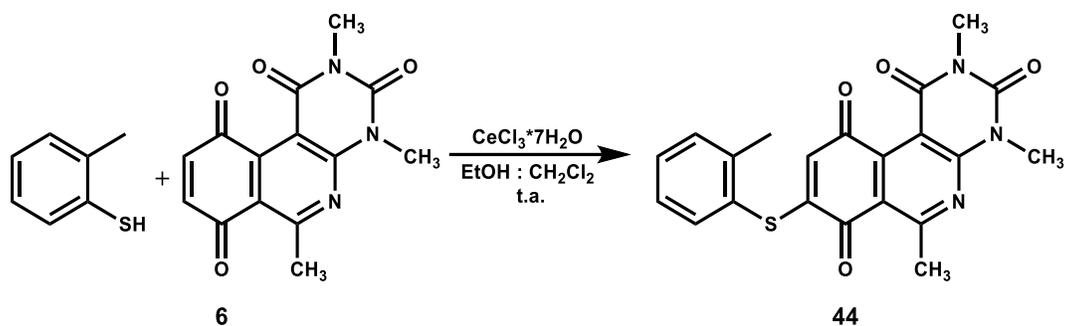


8-(feniltio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (43).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (245,32 mg, 0,86 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de bencenotiol (47,04 mg, 0,43 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 12: 1: 8. Se obtiene un sólido de color amarillo, 109,6 mg, 0,28 mmol, con 65,3% de rendimiento. Punto de fusión: 206,0 – 208,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₆N₃O₄S = 394,0862; masa encontrada = 394,0862.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,53 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H y 6'-H), 6,18 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,01 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,1, 180,9, 166,3, 158,3, 156,5, 152,7, 151,0, 146,9, 135,7 (2C), 130,7, 130,5 (2C), 128,1, 127,1, 120,9, 105,7, 30,2, 29,1, 26,9.

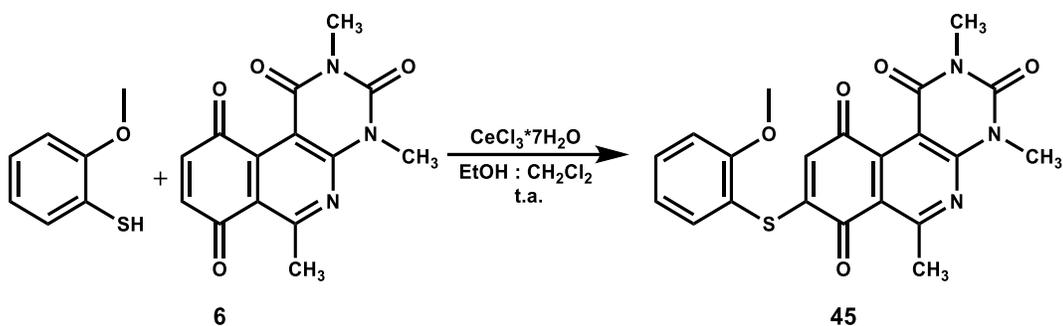


2,4,6-trimetil-8-((2-metilfenil)tio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (44).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (239,00 mg, 0,84 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 2-metiltiofenol (51,00 mg, 0,41 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 2: 1: 6. Se obtiene un sólido de color amarillo, 112,9 mg, 0,28 mmol, con 67,6% de rendimiento. Punto de fusión: 204,5 – 205,8 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈N₃O₄S = 408,1011; masa encontrada = 408,1018.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,38 (d, ³J = 7,2 Hz, 1H, 6'-H), 7,34 – 7,30 (m, 3H, 3', 4' y 5'-H), 6,19 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,03 (s, 3H, 6-CH₃), 2,41 (s, 3H, 2'-Me).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,4, 181,0, 166,4, 158,5, 156,8, 152,8, 151,1, 147,1, 140,7, 136,3, 132,7, 131,8, 130,4, 128,2, 126,8, 121,1, 105,8, 30,4, 29,1, 27,1, 21,4.

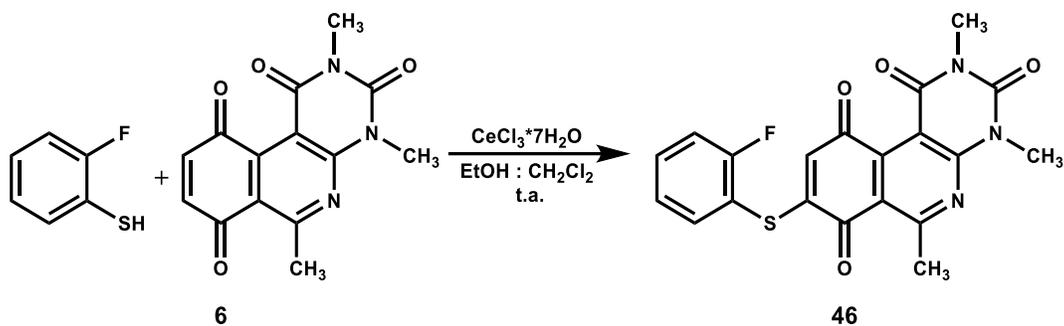


2,4,6-trimetil-8-((2-metoxifenil)tio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (45).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (200.00 mg, 0,70 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 2-metoxitiofenol (50.01 mg, 0,36 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 9: 1: 6. Se obtiene un sólido de color naranja, 139,9 mg, 0,33 mmol, con 92,6% de rendimiento. Punto de fusión: 170,2 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈N₃O₅S = 424,0958; masa encontrada = 424,0967.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,52 (t, ³J = 7,8 Hz, 2H, 4'-H y 6'-H), 7,06 (t, ³J = 7,5 Hz, 1H, 3'-H y 5'-H), 6,11 (s, 1H, 9-H), 3,86 (s, 3H, 2-OCH₃), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,01 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,2, 181,1, 166,2, 160,0, 158,4, 154,5, 152,6, 151,0, 147,0, 137,5, 133,0, 127,7, 122,0, 121,2, 114,4, 112,0, 105,7, 56,1, 30,2, 29,0, 26,9.

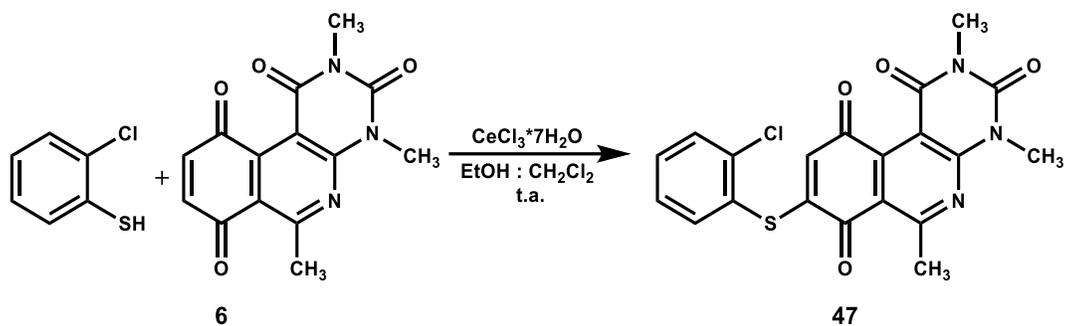


8-((2-fluorofenil)tio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (46).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **6** (228,70 mg, 0,80 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 2-fluortiofenol (51,06 mg, 0,40 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 2: 2: 5. Se obtiene un sólido de color amarillo, 111,9 mg, 0,27 mmol, con 68,3% de rendimiento. Punto de fusión: 216,2 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₅FN₃O₄S = 412,0768; masa encontrada = 412,0767.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,50 – 7,56 (m, 2H, 4'-H y 6'-H), 7,22 – 7,28 (m, 2H, 3'-H y 5'-H), 6,14 (s, 1H, 9-H), 3,71 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,40 (s, 3H, 4-NCH₃), 2,98 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,1, 180,8, 166,3, 162,7 (d, 1C, ⁴J = 251,4 Hz), 158,3, 153,8, 152,7, 151,0, 146,8, 137,5, 133,8 (d, 1C, ¹J = 8,0 Hz), 128,2, 125,9 (d, 1C, ²J = 3,9 Hz), 120,9, 117,2 (d, 1C, ²J = 22,2 Hz), 114,4 (d, 1C, ⁴J = 18,8 Hz), 105,7, 30,3, 29,1, 27,0.

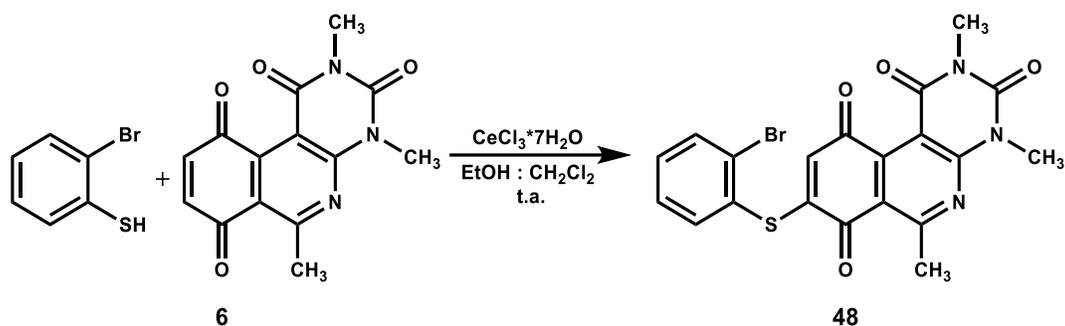


8-((2-clorofenil)tio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (47).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **6** (200.00 mg, 0,70 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 2-clorotiofenol (50.00 mg, 0,34 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 3: 1: 4. Se obtiene un sólido de color amarillo, 130,2 mg, 0,30 mmol, con 88,0% de rendimiento. Punto de fusión: 208,5 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₅ClN₃O₄S = 428,0468; masa encontrada = 428,0472.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,64 (m, 2H, 3'-H y 6'-H), 7,40 (m, 2H, 4'-H y 5'-H), 5,87 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,48 (s, 3H, 4-NCH₃), 2,95 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,9, 180,6, 166,2, 158,3, 153,6, 152,0, 151,0, 145,8, 139,8, 137,8, 132,4, 131,2, 128,4, 127,9, 126,0, 121,3, 105,5, 30,2, 29,0, 26,7.

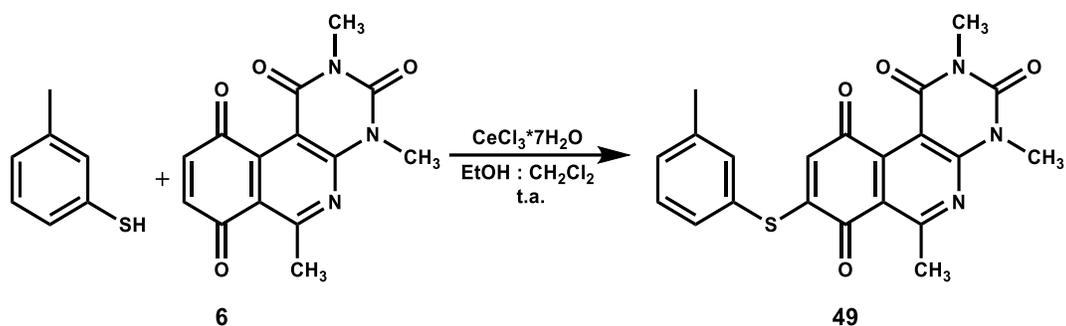


8-((2-bromofenil)tio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (48).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **6** (200,02 mg, 0,70 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 2-bromotiofenol (66,17 mg, 0,35 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 15: 3: 5. Se obtiene un sólido de color amarillo, 159,8 mg, 0,34 mmol, con 96,7% de rendimiento. Punto de fusión: 210,7 °C (d). HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₅BrN₃O₄S = 471,9968; masa encontrada = 471,9967.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,81 (d, ³J = 7,5 Hz, 1H, 3'-H), 7,66 (d, ³J = 7,7 Hz, 1H, 6'-H), 7,42 (m, 2H, 4'-H y 5'-H), 6,06 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,44 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,03 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 180,9, 180,7, 166,3, 158,3, 153,8, 152,8, 151,0, 146,8, 137,9, 134,6, 132,4, 130,7, 129,2, 128,7, 128,1, 120,9, 105,8, 30,2, 29,0, 26,9.

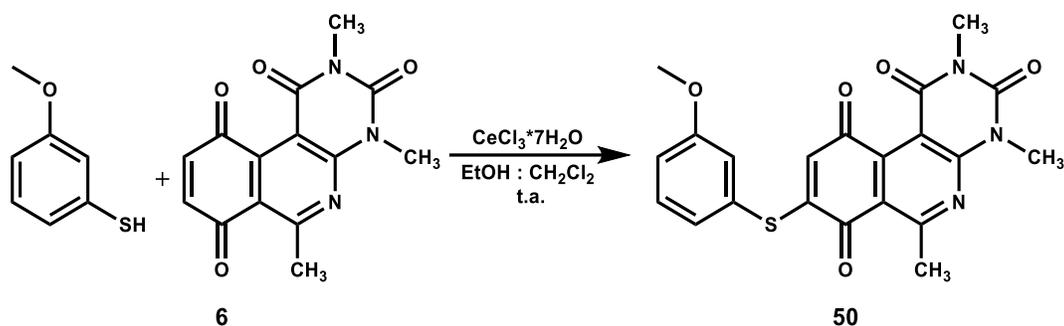


2,4,6-trimetil-8-((3-metilfenil)tio)pirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (49).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (235,22 mg, 0,82 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 3-metiltiofenol (51,12 mg, 0,41 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 9: 1: 6. Se obtiene un sólido de color naranja, 108,8 mg, 0,27 mmol, con 64,9% de rendimiento. Punto de fusión: 158,3 – 159,9 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈N₃O₄S = 408,1012; masa encontrada = 408,1018.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,49 (d, ³J = 7,5 Hz, 1H, 6'-H), 7,39 – 7,45 (m, 2H, 2'-H y 5'-H), 7,31 (t, ³J = 7,5 Hz, 1H, 4'-H), 6,01 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,02 (s, 3H, 6-CH₃), 2,42 (s, 3H, 3'-CH₃)

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,1 (2C), 166,3, 158,4, 155,3, 152,7, 151,0, 147,0, 143,1, 136,7, 133,7, 133,3, 127,9, 127,6, 126,2, 120,3, 106,7, 30,2, 29,1, 27,0, 20,5.

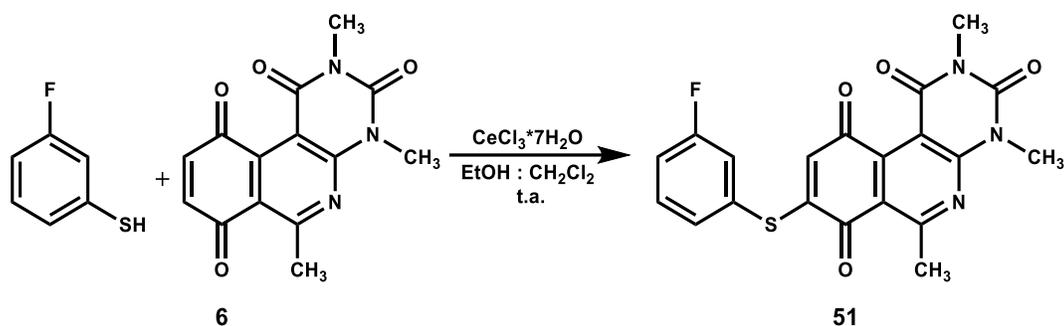


2,4,6-trimetil-8-((3-metoxifenil)tio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (50).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (208,41 mg, 0,73 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 3-metoxitiofenol (51,40 mg, 0,37 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 9: 1: 6. Se obtiene un sólido de color amarillo, 124,3 mg, 0,29 mmol, con 80,1% de rendimiento. Punto de fusión: 177,1 – 178,6 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈N₃O₅S = 424,0976; masa encontrada = 424,0967.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,41 (t, ³J = 8,0 Hz, 1H, 5'-H), 7,11 (d, ³J = 7,7 Hz, 1H, 6'-H), 7,06 (s, 1H, 2'-H), 7,05 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H, 4'-H), 6,23 (s, 1H, 9-H), 3,84 (s, 3H, 3'-CH₃), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,01 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,2 180,9, 166,3, 160,8, 158,3, 156,4, 152,7, 151,0, 146,9, 131,3, 128,1, 128,0, 127,7, 120,9 120,7, 116,6, 105,7, 55,5, 30,2, 29,1, 26,9.

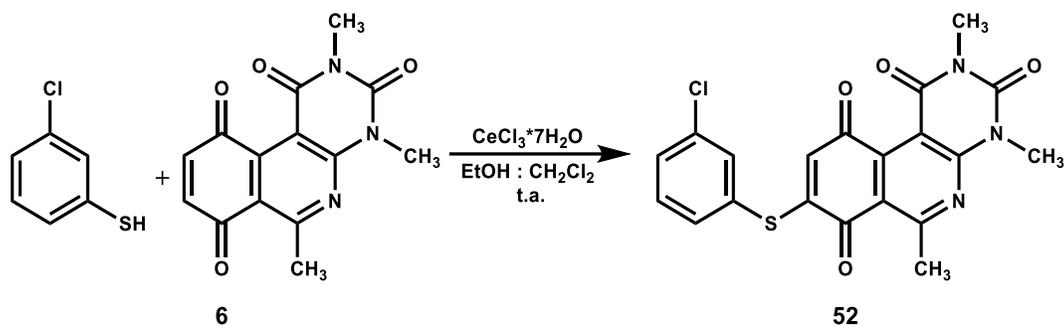


8-((3-fluorofenil)tio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (51).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **6** (200,06 mg, 0,70 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 3-fluortiofenol (44,86 mg, 0,35 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 1: 1: 6. Se obtiene un sólido de color amarillo, 126,4 mg, 0,31 mmol, con 87,8% de rendimiento. Punto de fusión: 170,1 – 172-5 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₅FN₃O₄S = 412,0761; masa encontrada = 412,0767.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,47 – 7,55 (m, 1H, 2'-H), 7,36 – 7,21 (m, 3H, 4'-H, 5'-H y 6'-H), 6,22 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,44 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,02 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,1, 180,7, 170,8, 162,9 (d, 1C, ¹J = 251,5 Hz), 158,3, 155,5, 152,8, 151,1, 146,9, 132,0 (d, 1C, ³J = 8,0 Hz), 131,8 (d, 1C, ⁴J = 3,2 Hz), 129,4 (d, 1C, ³J = 7,6 Hz), 128,1, 122,9 (d, 1C, ²J = 22,1 Hz), 120,9, 118,3 (d, 1C, ¹J = 20.8 Hz), 105,8, 30,2, 29,1, 26,9.

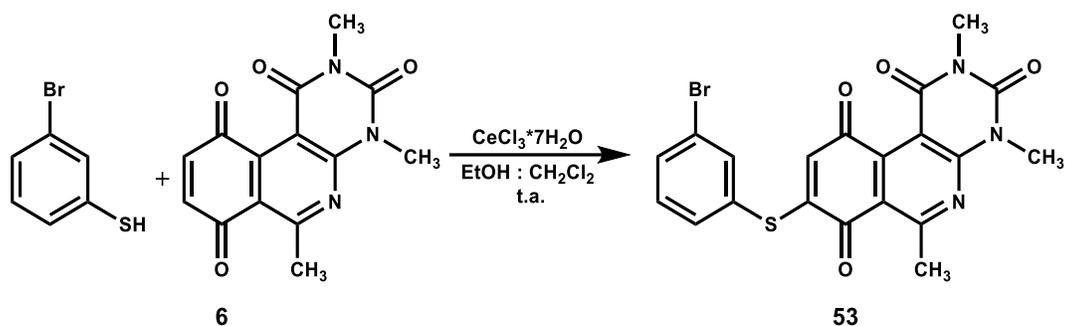


8-((3-clorofenil)tio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (52).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (200,11 mg, 0,70 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 3-clorotiofenol (50,07 mg, 0,35 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 4: 1: 4. Se obtiene un sólido de color amarillo, 123,5 mg, 0,29 mmol, con 83,4% de rendimiento. Punto de fusión: 160,2 – 162,5 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₄ClN₃O₄S = 428,0468; masa encontrada = 428,0472.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,49 (m, 4H, 2'-H, 4'-H, 5'-H y 6'-H), 6,20 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,44 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,01 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,0, 180,6, 166,4, 158,3, 155,6, 152,7, 151,0, 146,8, 136,0, 135,4, 133,8, 131,4, 131,0, 129,0, 128,3, 120,8, 105,7, 30,2, 29,1, 26,9.

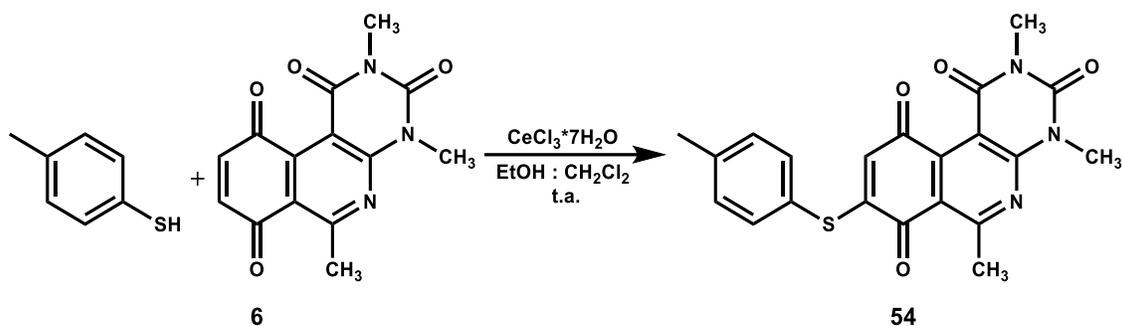


8-((3-bromofenil)tio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (53).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (156,06 mg, 0,55 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 3-bromotiofenol (47,04 mg, 0,25 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 2: 1: 6. Se obtiene un sólido de color amarillo, 75,1 mg, 0,16 mmol, con 63,9% de rendimiento. Punto de fusión: 137,5 – 139,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₅BrN₃O₄S = 471,9956; masa encontrada = 471,9967.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,71 (s, 1H, 2'-H), 7,67 (d, ³J = 7,8 Hz, 1H, 4'-H), 7,49 (d, ³J = 7,8 Hz, 1H, 6'-H), 7,40 (t, ³J = 7,9 Hz, 1H, 5'-H), 6,22 (s, 1H, 9-H), 3,75 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,45 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,02 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,1, 180,6, 166,4, 158,3, 155,6, 152,8, 151,0, 138,2 (2C), 134,3 (2C), 134,0, 131,7, 129,3, 128,3, 123,9, 120,8, 30,3, 29,1, 26,9.

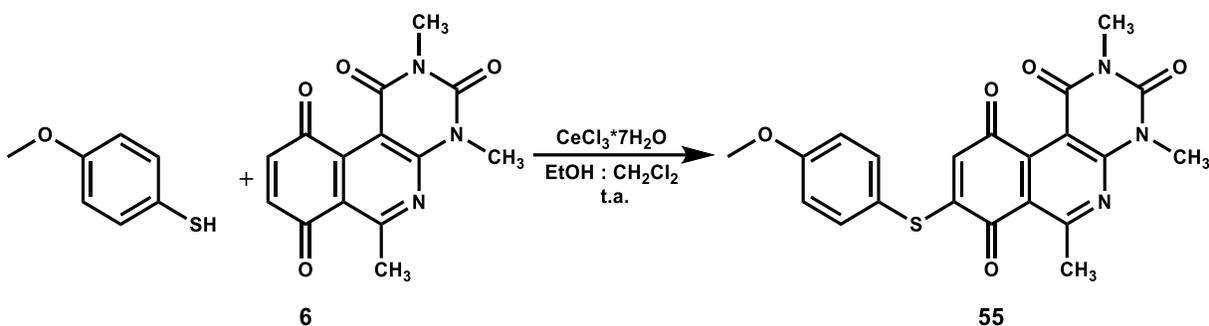


2,4,6-trimetil-8-((4-metilfenil)tio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (54).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (229,02 mg, 0,80 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-metiltiofenol (51,04 mg, 0,41 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 9: 1: 6. Se obtiene un sólido de color naranja, 105,9 mg, 0,26 mmol, con 64,7% de rendimiento. Punto de fusión: 188,5 – 191,2 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈N₃O₄S = 408,1018; masa encontrada = 408,1018.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,40 (d, ³J = 8,0 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 7,30 (d, ³J = 8,0 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 6,17 (s, 1H, 9-H), 3,73 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,00 (s, 3H, 6-CH₃), 2,42 (s, 3H, 4'-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,2, 181,0, 166,3, 158,4, 156,9, 152,7, 151,0, 147,0, 141,3, 135,5 (2C), 130,7, 131,2 (2C), 128,0, 123,1, 120,9, 105,8, 30,2, 29,1, 26,9, 21,4.

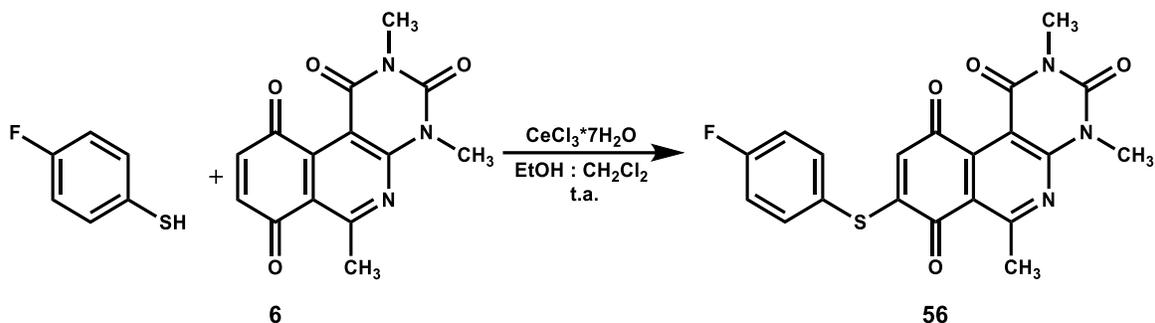


2,4,6-trimetil-8-((4-metoxifenil)tio)pirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (55).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **6** (206,50 mg, 0,72 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-metoxitiofenol (49,82 mg, 0,36 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 3: 1: 4. Se obtiene un sólido de color naranja, 105,33 mg, 0,25 mmol, con 69,1% de rendimiento. Punto de fusión: 198,0.0 – 199,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₁H₁₈N₃O₅S = 424,0967; masa encontrada = 424,0963.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,43 (d. 2H, 3'-H y 5'-H), 7,02 (d. 2H, 2'-H y 6'-H), 6,16 (s, 1H, 9-H), 3,86 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,73 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,00 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,2, 181,0, 166,2, 161,6, 158,3, 157,3, 152,6, 151,0, 147,0, 137,2 (2C), 128,0, 121,0, 117,2, 116,1 (2C), 105,7, 55,5, 30,2, 29,0, 26,9.

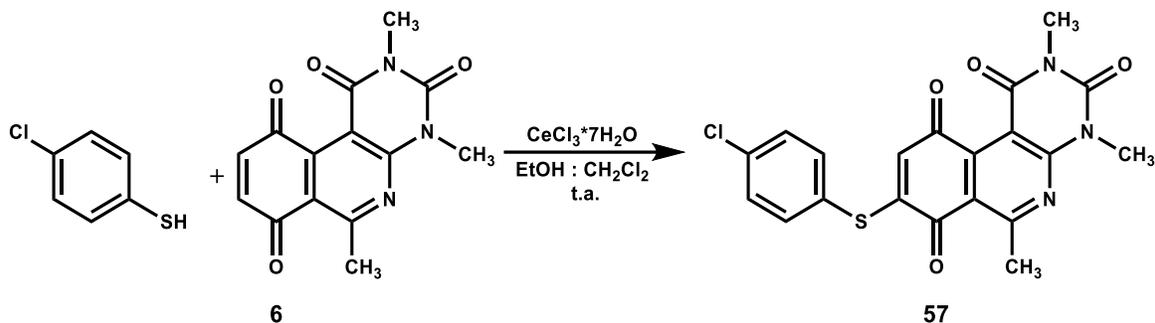


8-((4-fluorofenil)tio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (56).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **6** (228,10 mg, 0,80 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-fluorotiofenol (48,90 mg, 0,38 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 1: 1: 2. Se obtiene un sólido de color amarillo, 109,1 mg, 0,27 mmol, con 69,8% de rendimiento. Punto de fusión: 190,3 – 192,9 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₄FN₃O₄S = 412,0771; masa encontrada = 412,0767.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,51 (dd, ³J = 8,5 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,21 (t, ³J = 8,5 Hz, 2H, 2H y 6'-H), 6,15 (s, 1H, 9-H), 3,73 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,43 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,00 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,1, 180,6, 166,4, 165,7, 158,3, 155,6, 152,7, 151,0, 146,9, 131,8 (d, 1C, ³J = 8,0 Hz), 131,5 (d, 1C, ¹J = 3,4 Hz), 129,1 (d, 1C, ³J = 8,0 Hz), 128,2, 122,6 (d, 1C, ²J = 22,1 Hz), 120,8, 118,1 (d, 1C, ²J = 22,1 Hz), 105,7, 30,2, 29,1, 26,9.

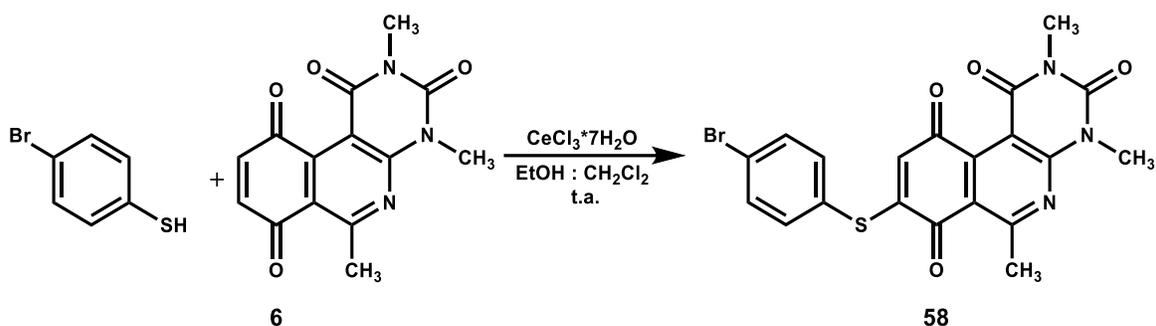


8-((4-clorofenil)tio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (57).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (200.02 mg, 0,70 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-clorotiofenol (50.00 mg, 0,35 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 2: 2: 5. Se obtiene un sólido de color amarillo, 121,3 mg, 0,28 mmol, con 82,0% de rendimiento. Punto de fusión: 195,3 – 197,3 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₅ClN₃O₄S = 428,0477; masa encontrada = 428,0472.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,46 – 7,51 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 4'-H y 5'-H), 6,19 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,44 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,02 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,0, 180,7, 166,3, 158,3, 155,9, 152,7, 151,0, 146,8, 137,5, 137,0 (2C), 130,8 (2C), 128,2, 126,7, 125,6, 120,9, 105,7, 30,3, 29,1, 26,9.

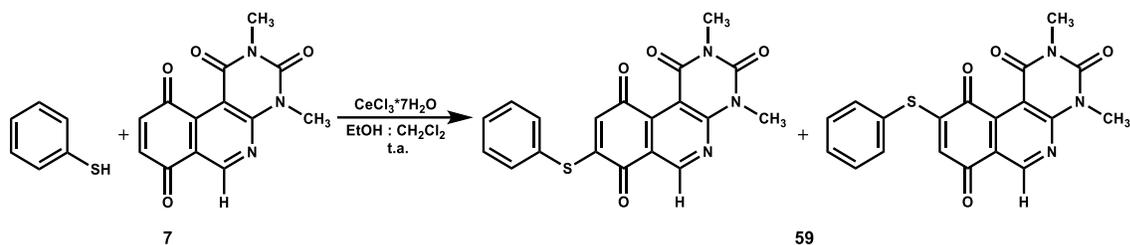


8-((4-bromofenil)tio)-2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (58).

A una solución de 2,4,6-trimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **6** (151,12 mg, 0,53 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **6**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-bromotiofenol (50,05 mg, 0,26 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 5: 2: 2. Se obtiene un sólido de color naranja, 100,5 mg, 0,21 mmol, con 80,4% de rendimiento. Punto de fusión: 194,4 – 195,9 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₄BrN₃O₄S = 471,9964; masa encontrada = 471,9967.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ 7,65 (d, ³J = 8,4 Hz, 2H, 3'-H y 5'-H), 7,41 (d, ³J = 8,4 Hz, 2H, 2'-H y 6'-H), 6,19 (s, 1H, 9-H), 3,74 (s, 3H, 2-NCH₃), 3,44 (s, 3H, 4-NCH₃), 3,01 (s, 3H, 6-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ 181,0, 180,7, 166,4, 158,3, 155,8, 152,8, 151,0, 146,8, 137,2 (2C), 133,8 (2C), 128,2, 126,3, 125,7, 120,8, 105,8, 30,3, 29,1, 26,9.

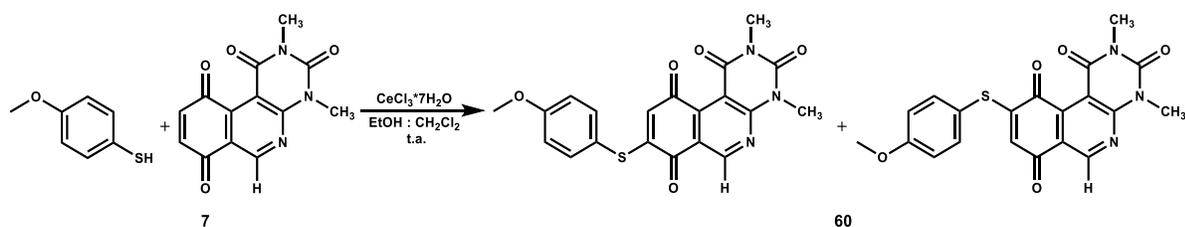


8-((feniltio)-2,4,dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona y 9-((feniltio)-2,4,dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona (59).

A una solución de 2,4,dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2H,4H)-tetraona **7** (100,00 mg, 0,38 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **7**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de bencenotiol (20,93 mg, 0,19 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 2: 1,5: 5. Se obtiene un sólido de color amarillo, 43,1 mg, 0,11 mmol, con 60,1 % de rendimiento. Punto de fusión: 172,4 – 174,4 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₁₉H₁₆N₄O₄S = 380,0705; masa encontrada = 380,0706.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) No informado.

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) No informado.

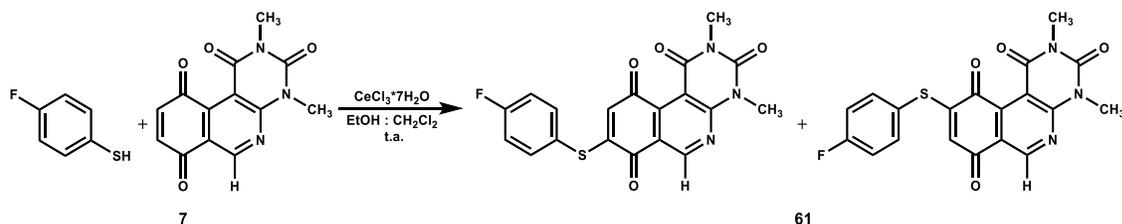


2,4,dimetilpirimido-8-((4-metoxifenil)tio)[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona y 2,4,dimetilpirimido-9-((4-metoxifenil)tio)[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (60).

A una solución de 2,4,dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **7** (100,00 mg, 0,38 mmol), tricloruro de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **7**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-metoxitiofenol (26,64 mg, 0,19 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 3: 1: 4. Se obtiene un sólido de color naranja, 55,2 mg, 0,14 mmol, con 71,3% de rendimiento. Punto de fusión: 190,2,0 – 191,9 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₂₀H₁₆N₃O₅S = 410,0811; masa encontrada = 410,0807.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) No informado.

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) No informado.



8-((4-fluorofenil)tio)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona y 9-((4-fluorofenil)tio)-2,4-dimetilpirimido[4,5-c]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona (61).

A una solución de 2,4,dimetilpirimido[4,5-*c*]isoquinolin-1,3,7,10(2*H*,4*H*)-tetraona **7** (100,00 mg, 0,38 mmol), triclورو de cerio (III) heptahidratado (5% mol de **7**) en una mezcla de CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (10 mL), se le adiciona mediante goteo una solución de 4-fluorotiofenol (24,35 mg, 0,19 mmol) disuelto en CH₂Cl₂: EtOH = 1: 1 (30 mL) desde una bureta de llave lateral a una velocidad aproximada de 1mL/ 30min por 16 horas. El crudo de reacción se purifica con 60 g de silica gel (0,040 - 0,063 mm) utilizando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo: éter de petróleo = 2: 2: 5. Se obtiene un sólido de color amarillo, 51,3 mg, 0,13 mmol, con 68,3% de rendimiento. Punto de fusión: 185,2 – 187,0 °C. HRMS [M+H]⁺: m/z masa calculada C₁₉H₁₃FN₃O₄S = 398;0532 masa encontrada = 398,0536.

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) No informado.

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) No informado.