



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
Campus Tuxtepec

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Síntesis y evaluación antifúngica de ésteres
acilvalilmetílicos derivados de imidazol y
triazol

T E S I S

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

YURELI CHIGUILS PÉREZ

Director de Tesis

Dr. Lemuel Pérez Picaso

Co-director de Tesis

Dra. María de los Ángeles Martínez Rivera

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México 2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO	DEP/2018/MCQ/021
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 17 de octubre de 2018

C. YURELI CHIGUILS PÉREZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. Hermenegilda Moreno Díaz	UNPA	Presidente
Dra. María de los Ángeles Martínez Rivera	IPN-ENCB	Vocal
Dr. Francisco Daniel Díaz Coutiño	UNPA	Secretario
Dr. Omar Viñas Bravo	UNPA	1er Suplente
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín	UNPA	2do Suplente

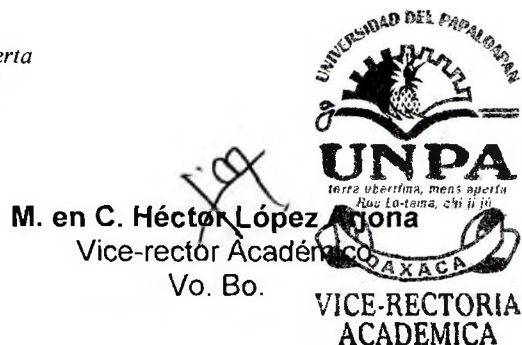
Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado



M. en C. Héctor López Jona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.

C.c.p. Dr. Lemuel Pérez Picaso – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

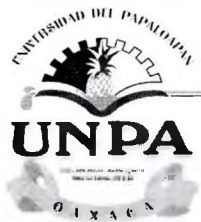
CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/113
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 17 de octubre de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL

JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias Químicas de **C. Yureli Chiguils Pérez**, matrícula **16130003**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Síntesis y evaluación antifúngica de ésteres acilvalilmetílicos derivados de imidazol y triazol**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta

Bou Lo-tama, chi jí jú


Dra. Sandra J. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Yureli Chiguils Pérez
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Química orgánica de la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec y en el Laboratorio de Micología médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN), bajo la dirección del Dr. Lemuel Pérez Picaso y la co-dirección de la Dra. María de los ángeles Martínez Rivera. Se agradece a Conacyt por la beca otorgada (CVU: 782893), al proyecto “Síntesis de epiditiodicetopiperazinas y su evaluación bilógica” por el financiamiento y a LINAN-UNPA (INFRA-2015-01-252013).

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer a mis padres, gracias por ser mi soporte que, aunque a distancia siempre me apoyan, gracias a los dos por siempre confiar en mí y motivarme siempre a dar lo mejor, a sus llamadas de apoyo en esos momentos que fueron necesarias y sus palabras de aliento y a hacer de mi lo que ahora soy, los quiero con el corazón entero.

¡A mi segunda mama, yoyita! gracias por todo el amor para tu nieta y por tus palabras, tus enseñanzas de nunca darse por vencida y regar esta plantita con tu amor, cariño y comprensión, espero siempre te sientas orgullosa de mí.

¡A mis Hermanos Julissa y César por sus ocurrencias, por ser unos buenos hermanos y a ti Buli por darme a mis sobrinos que son parte de mi felicidad, Toñito, Luis y mi Ame!

A Doña lupita por aceptarme en su casa y considerarme una hija más. Gracias por todo su cariño y apoyo en esta etapa de mi vida, por sus buenas comidas, platicas largas y palabras de aliento.

¡Y a ti Val, mi persona favorita, que bueno llegaste a mi vida! Llegaste en el momento perfecto, gracias por todos los momentos compartido, por tu compañía tan cálida en estas desveladas tan largas, por esos buenos cafés para tartar de no dormirnos, por todo tu amor, comprensión, apoyo y palabras de aliento que me has dado y hacer de esto una gran aventura, sin duda esto no habría sido posible sin ti, eres un gran soporte en mí vida. ¡Eres increíble, esto apenas comienza para las dos... GRACIAS POR TODO! Te adoro con el alma entera.

A ti Yunito, gracias por tu amistad todo este tiempo, también por ser mi soporte en los días no tan buenos, por escucharme siempre y compartir más que una amistad conmigo, sabes que te quiero como una hermana y eres muy importante para mí, ¡mi vecina de laboratorio! quisiera escribirte muchas cosas más, pero podrías llorar y ese no es punto, te quiero infinitamente!

A ti Mayrita, gracias también por ser otro soporte en mi vida y que, aunque no en persona, pero siempre estuviste para escucharme y alentarme ¡te quiero muchísimo! A mi Amigo

Héctor, ¡manto te quiero mucho y tienes un lugar muy especial en mí corazón! gracias por tu amistad todo este tiempo.

A mis compañeros de trabajo en el laboratorio en química orgánica Gaby, Bren, Aby y Karen por hacer más amenos los días dentro del laboratorio y los buenos chistes entre vapores
jaja ¡Cromatografía! xD

A mis revisores de tesis: Dra. Gilda, Dr. Francisco, Dr. Abelardo y Dr. Omar, gracias por las aportaciones que hicieron para que este fuera un mejor trabajo.

Al equipo de trabajo en el laboratorio de micología médica por los buenos momentos compartidos en el laboratorio, gracias por hacer amena mi estancia por allá, a Fabi por prestarme la cepa, a Alex por tu tiempo y enseñarme a trabajar con microorganismos y principalmente a la Dra. María de los Ángeles, gracias por recibirme y apoyarme con toda la parte de la actividad biológica en este trabajo y por sus observaciones.

También quiero agradecer a el Dr. Emanuel, por enseñarme a hacer un poco de docking, muchas gracias por todo su tiempo y por las aportaciones que hizo a mi trabajo y también al Dr. Adolfo por los espectros de masas adquiridos.

A mis compañeritos los chicos materiales Tere, Edgar, Mich por los buenos momentos que compartimos en las clases, fue agradable ser parte de esta generación ¡los aprecio mucho!
¡Y a todas las personas que aportaron algo durante esta etapa de mi vida, gracias!

Y a mi director, El Dr Lemuel Pérez Picaso. Muchas gracias por la confianza en mí para desarrollar este trabajo, por el apoyo que me ha dado durante estos años, me atrevería a decir que más que un asesor se convirtió en mi amigo y lo valoro mucho. ¡Gracias por todo su tiempo invertido y sus enseñanzas!

Finalmente, quiero agradecer a todos los profesores que tuve a lo largo de este proceso, contribuyeron a lo que ahora soy, gracias por enseñarme a amar la química, que sin duda cambio mi vida. Fue la mejor decisión que he tomado.

-terra ubérrima, mens apert-

DEDICATORIA

a mi familia



“El grado sumo del poder es contemplar el por qué”

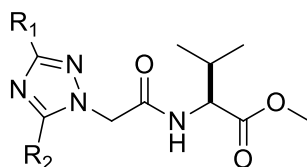
-Sócrates

Resumen

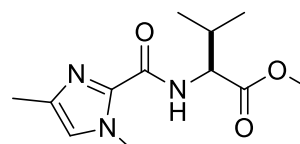
Los heterociclos son estructuras que constituyen una unidad clave en algunos fármacos y muestran una amplia variedad de actividades biológicas. Entre este tipo de compuestos se encuentran los azoles que son compuestos heterocíclicos de cinco miembros, planos y que contienen en sus anillos uno o más heteroátomos de los cuales al menos uno, es nitrógeno. Por otro lado, en la búsqueda de nuevas entidades químicas biológicamente activas, una estrategia utilizada, es la inserción de residuos de aminoácidos, porque son los componentes fundamentales y juegan un papel primordial en los organismos vivos. Además, que presentan ventajas como: baja toxicidad, biocompatibilidad y diversidad estructural. Considerando los antecedentes antes mencionados el presente trabajo describe la síntesis de 6 derivados de valina; 5 compuestos *N*-alquilados (**20a-b**, **22a-c**) que se prepararon por la alquilación del derivado bromado del éster valilmetílico (**18**) con un azol y 1 acilaminoéster derivado de imidazol **16a**, además la evaluación de la actividad antifúngica frente a hongos filamentosos (*A. fumigatus*, *F. temperatum* y *F. falciforme*) y levaduras (*C. krusei*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*). Sólo el compuesto **16a** mostró inhibición frente a hongos filamentosos (*A. fumigatus* 44.3%); mientras que, todos los demás compuestos mostraron actividad antifúngica frente a las levaduras siendo los más activos **20a** (*C. krusei* 61.9%, *C. glabrata* 87.2%, *C. parapsilosis* 45.9%), **20b** (*C. krusei* 21.2%, *C. glabrata* 74.3%, *C. parapsilosis* 14.3%) y **22b** (*C. krusei* 22.7%, *C. glabrata* 71.7%, *C. parapsilosis* 24.5%). Por otro lado, se efectuó un estudio de acoplamiento molecular que se llevó acabo utilizando como receptor a la proteína CYP51 (PDB:5HS1) y como ligantes los compuestos sintetizados (**16a**, **20a-b**, **22a-c**). Se observó que los compuestos con mayor porcentaje de inhibición (**20b** y **22b**) mostraron interacciones tipo π -alquil y π - π con los residuos Tyr 126, el complejo hemoglobina 601 y Leu 380, lo que posiblemente mejoro la interacción con el sitio activo de la enzima y la selectividad hacia *C. glabrata*. Finalmente, todos los compuestos sintetizados se caracterizaron por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H y ^{13}C) y espectrométricas (IR y ESI-MS).



20a; R₁=R₂=H
20b; R₁=Me, R₂=NO₂



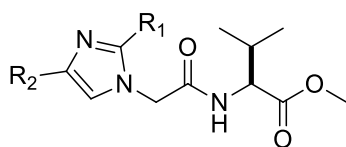
22a; R₁=R₂=H
22b; R₁=Me, R₂=Ph
22c; R₁=CO₂Me, R₂=H



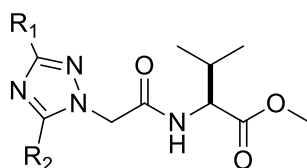
16a

Abstract

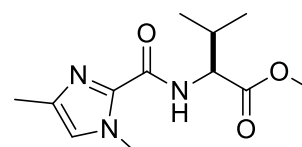
Heterocycles are key structural units present in a vast number of drugs with diverse pharmacological activity. In this respect, azoles are a class of heterocycles characterized by at least one nitrogen atom in its structure. The coupling of amino acids with heterocycles have interesting advantages, for example, low toxicity, biocompatibility and structural diversity. The present work reports the synthesis of six valine derivatives; five target compounds (**20a-b**, **22a-c**) were prepared by means of alkylation of the brominated derivative of the valilmethyl ester (**18**) with an azole and one acylamino ester derived from imidazole **16a**. Next, the synthesized compounds were evaluated as antifungal agents in against filamentous fungi (moulds: *A. fumigatus*, *F. temperatum* and *F. falciforme*) and yeast (*C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*). The compound **16a** showed inhibition against moulds (*A. fumigatus* 44.3%); while, all the other compounds showed antifungal activity against yeasts, being the most active **20a** (*C. krusei* 61.9%, *C. glabrata* 87.2%, *C. parapsilosis* 45.9%), **20b** (*C. krusei* 21.2%, *C. glabrata* 74.3%, *C. parapsilosis* 14.3%) and **22b** (*C. krusei* 22.7%, *C. glabrata* 71.7%, *C. parapsilosis* 24.5%). In other instances, we carried out a molecular docking study using the CYP51 protein (PDB: 5HS1) as a receptor and the synthesized compounds as ligands (**16a**, **20a-b**, **22a-c**). It was observed that the compounds with the highest percentage of inhibition (**20b** and **22b**) showed π -alkyl and π - π type interactions with the residues Tyr 126, the complex hemoglobin 601 and Leu 380, which probably enhanced the interaction ligand-receptor and the selectivity towards *C. glabrata*. Finally, all the synthesized compounds were characterized by spectroscopic (^1H and ^{13}C NMR) and spectrometric (IR and ESI-MS) techniques.



20a; R₁=R₂=H
20b; R₁=Me, R₂=NO₂



22a; R₁=R₂=H
22b; R₁=Me, R₂=Ph
22c; R₁=CO₂Me, R₂=H



16a

Contenido

Resumen	I
Abstrac	II
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VI
Índice de esquemas	VII
Índice de espectros	VIII
Abreviaturas y Símbolos	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Características generales de los hongos	2
2.2 Antimicótico	2
2.3 Química medicinal	5
2.3.1 Diseño de sustancias bioactivas	5
2.4 La enzima CYP51	6
2.5 Métodos para el estudio de la sensibilidad de los antifúngicos	7
III. ANTECEDENTES	9
3.1 Heterociclos	9
3.2 Enlace amida	9
3.3 Síntesis	11
3.4 Actividad biológica de derivados de imidazol y triazol	14
3.5 Derivados de valina	17
IV. JUSTIFICACIÓN	18
V. HIPÓTESIS	18

VI. OBJETIVOS	19
6.1 General	19
6.2 Específicos	19
VII. METODOLOGÍA	20
7.1 Materiales y reactivos	20
7.2 Síntesis	22
7.3 Evaluación biológica	25
7.4 Estudio de análisis molecular	26
VIII. RESULTADOS	28
8.1 Síntesis	28
8.1.1 Síntesis de ésteres <i>N</i> -imidazolil y <i>N</i> -triazolilacetilvalilmetílicos	33
8.1.2 Síntesis de ésteres <i>N</i> -triazolilacetilvalilmetílicos	41
8.1.3 Síntesis de 1,2,4 triazoles 1,3,5 disustituidos	45
8.2 Espectrometría infrarroja (FTIR)	48
8.3 Espectrometría Masas	48
8.4 Evaluación antifúngica	50
8.5 Estudios de acoplamiento molecular	54
8.5.1 Optimización de la geometría	56
8.5.2 Acoplamiento molecular	58
IX. CONCLUSIONES	62
X. PARTE EXPERIMENTAL	63
XI. REFERENCIAS	75
XII. ANEXO	80

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1.	Estructuras químicas representativas de agentes antifúngicos	4
2.	Enzima CYP51 (PDB: 5HS1)	7
3.	Imidazol y triazol	9
4.	Estructura básica del enlace amida	10
5.	Sal de imidazolio	14
6.	Derivados de imidazol	14
7.	Compuestos conjugados de aminoácidos con un constituyente tiazol	15
8.	Derivados de triazoles acoplados a aminoácidos	15
9.	Derivados de 1, 2, 4-triazoles-tioéster	16
10.	Derivados de 3-fenil imidazolpropano	16
11.	Ésteres de benzoimidazol	17
12.	Éster <i>N</i> -benzoilvalilmetílico	17
13.	Metodología para el método de microdilución en placa	26
14.	Síntesis de ésteres <i>N</i> -imidazolil y <i>N</i> -triazolilacetilvalilmetílicos	28
15.	Síntesis del éster de valina (14)	28
16.	Análisis retrosintético	33
17.	Síntesis de la α -bromoamida 18	33
18.	Síntesis del éster <i>N</i> -imidazolilacetilvalilmetílico (20)	38
19.	Síntesis del éster <i>N</i> -triazolilacetilvalilmetílico (22)	41
20.	Comparación de la actividad inhibitoria entre el compuesto 20a y 22b	51
21.	Comparación de la actividad inhibitoria entre los compuestos 20a y 20b	52
22.	Comparación de la actividad inhibitoria de los compuestos 22a-22c	53
23.	Comparación entre el compuesto 16a y 23	53
24.	Enzima CYP51 (PDB:5HS1)	54
25.	Gráfica de RMDS vs residuo	55
26.	Determinación de la coordenada (RMSD) con el voriconazol y la enzima CYP51	55
27.	Compuesto 22b en el sitio activo de la enzima, a) 2D, b) 3D	58
28.	Relación estructura-acoplamiento molecular	60

Índice de tablas

Tabla	Título	Página
1.	Mecanismos de acción de antifúngicos y actividad.	3
2.	Condiciones de reacción del compuesto 16a	29
3.	Condiciones de reacción para la síntesis de α -bromoamida	34
4.	Síntesis del éster imidazolilacetilvalilmetílico	38
5.	Ésteres de imidazolilacetilvalilmetílicos	38
6.	Desplazamientos de RMN de ^1H de los compuestos 20a y 20b	39
7.	Desplazamientos de RMN de ^1H de los compuestos 20a y 20b	40
8.	Condiciones de reacción para la síntesis de éster <i>N</i> -triazolilacetilvalilmetílico (22a)	41
9.	Ésteres triazolilacetilvalilmetílicos	42
10.	Desplazamientos de RMN de ^1H de los ésteres triazolilacetilvalilmetílicos	43
11.	Desplazamientos en RMN de ^{13}C de los ésteres triazolilacetilvalilmetílicos	44
12.	Síntesis de triazoles 1,2,4	45
13.	Desplazamientos en RMN de ^1H de los triazoles 1,3,5 sustituidos	46
14.	Desplazamientos en RMN de ^{13}C de los triazoles 1,3,5 sustituidos	47
15.	ESI-MS de los compuestos sintetizados	49
16.	Porcentajes de inhibición de los compuestos sintetizados	50
17.	Curvas de energía de optimización de los compuestos	56
18.	Interacciones de los compuestos sintetizados en el sitio activo de la enzima CYP51	59

Índice de esquemas

Esquema	Título	Página
1.	Biosíntesis del ergosterol	7
2.	Síntesis de derivados <i>N</i> -cloroacetilados	11
3.	Síntesis de aminoácidos <i>N</i> -protegidos	11
4.	Síntesis de líquidos iónicos de imidazolio	12
5.	Síntesis de β -hidroxiacetamidas	12
6.	Síntesis de acetamidobenzoimidazoles	13
7.	Mecanismo de reacción por el método de la carbodiimida	13
8.	Formación de triazol	46

Índice de espectros

Espectro	Título	Página
1.	RMN de ^1H del compuesto 16a	30
2.	RMN de ^{13}C del compuesto 16a	31
3.	Experimento gHMBC del compuesto 16a	32
4.	RMN de ^1H del compuesto 18	35
5.	RMN de ^{13}C del compuesto 18	36
6.	Experimento gHMBC compuesto 18	37
7.	ESI-MS del compuesto 16a	48

Abreviaturas y Símbolos

AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
Boc	terbutiloxicarbonilo
Cbz	benciloxicarbonilo
CC	Cromatografía en columna
CC ₅₀	Concentración citotóxica media
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
cm	centímetro
cm ⁻¹	Numero de onda
CMI	Concentración mínima inhibitoria
d	Señal doble
dd	Señal doble de doble
ddd	Señal doble de doble de doble
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dh	Señal doble de héptuplas
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
dt	Señal doble de triples
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
<i>g</i> HMBC	gradient-Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<i>g</i> HSQC	gradient-Heteronuclear Spectrum Quantum Correlation
Hz	Hertz (Hercio)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento en RMN
Kcal	Kilocaloría
°C	Grados centígrados
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
%	Porcentaje
δ	Desplazamiento químico en RMN

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas las infecciones fúngicas con falla terapéutica han ido en aumento, esto puede deberse a una baja biodisponibilidad del fármaco en sangre, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos,¹ así como el uso indiscriminado de los antibióticos, lo que ha propiciado la resistencia *in vitro* o *in vivo*.² Además, existen otros factores que han convertido a los hongos en uno de los principales agentes patógenos como es el aumento progresivo de pacientes inmunocomprometidos e individuos infectados con VIH (según la OMS en 2016 había 36.7 millones y en 2017 aumento 1.8 millones más de infectados en el mundo), cáncer e intervenciones quirúrgicas (cirugías y trasplantes).^{3,4}

Dentro de la práctica clínica las levaduras *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp son los agentes que se han aislado con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos. Mientras que los hongos filamentosos comúnmente encontrados son: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Penicillium* spp. y *Zygomycetes* spp. Los primeros antifúngicos utilizados fueron griseofulvina y nistatina, no obstante, hoy en día existen un sin número de antimicóticos clasificados en: polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, pirimidinas fluoradas, entre otros.⁴ Sin embargo, se ha observado un defecto en la terapia antimicótica a diversos fármacos que incluyen a el ketonazol, fluconazol e incluso la anfotericina B.¹

Una nueva herramienta en la búsqueda de nuevos compuestos de uso terapéutico es el acoplamiento de moléculas bioactivas con aminoácidos o residuos de péptidos con el fin de incrementar su actividad biológica.⁵⁻⁷ Por lo cual, en el presente trabajo se propone la síntesis de nuevas moléculas derivadas de imidazol y triazol acoplados a aminoácidos con el fin de ser evaluados como agentes antifúngicos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Características generales de los hongos

El reino de los hongos comprende muchas especies que están vinculadas a un amplio espectro de enfermedades en los seres humanos. Los hongos son organismos eucariontes que poseen muchos de los organelos e inclusiones citoplasmáticas que están presentes en las células de organismos eucarióticos superiores y crecen en dos formas básicas: levaduras (unicelulares) y mohos que son filamentosos (pluricelulares).⁸

La composición estructural de la célula fúngica varía por especies pero comúnmente se han encontrado carbohidratos, ergosterol y β -1,3-glucano-quitina en la pared celular, excepto en la especie *Zygomycetes* que tiene quitosano en su estructura en lugar de quitina, además de contener otras proteínas.⁹ El sitio blanco en la célula fúngica, frecuentemente es la membrana celular, la cual presenta ergosterol, a diferencia de las células de mamíferos que contienen colesterol. Adicionalmente, la célula fúngica presenta organelos intracitoplásmicos membranosos con el contenido de ergosterol similar al de la membrana citoplásmica. Al afectar la síntesis del ergosterol, el daño celular será considerable, debido a que forma parte de los organelos intracitoplásmicos de la célula fúngica (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vacuolas, membrana nuclear, etc.), este efecto aumenta la permeabilidad de la célula e impide el crecimiento del hongo.⁴

2.2 Antimicótico

Existen compuestos que intervienen con el ciclo normal de vida de la célula fúngica o inhiben sus funciones y se les conoce como antimicóticos o antifúngicos. Los

antifúngicos pueden clasificarse de acuerdo a su mecanismo de acción (Tabla 1), estructura, interacción con el sitio activo y su toxicidad.⁴

Tabla 1. Mecanismos de acción de antifúngicos y actividad.¹⁰

Sitio de acción en la célula fúngica	Agente antifúngico	Mecanismo de acción
Membrana	Polienos	Se une al ergosterol causando la muerte celular
Membrana	Azoles	Inhibe la enzima CYP 450 responsable de la síntesis de ergosterol
Núcleo	Fluocitosina	Interfiere con la síntesis de DNA al inhibir timidilato sintetasa
Pared celular	Equinocandinas	Inhibe la síntesis de glucano, destruye la estructura de la pared celular causando lisis celular.

Los antifúngicos tienen una amplia diversidad estructural (Fig. 1) y existe una relación directa entre una unidad de la molécula con la actividad que presentan y se conoce como grupo farmacóforo; por ejemplo, al efectuar la evaluación biológica de una librería de compuestos relacionados se observó que las moléculas que contienen un heterociclo de cinco miembros son las que presentan actividad, por lo que este motivo estructural es el grupo farmacóforo.⁴

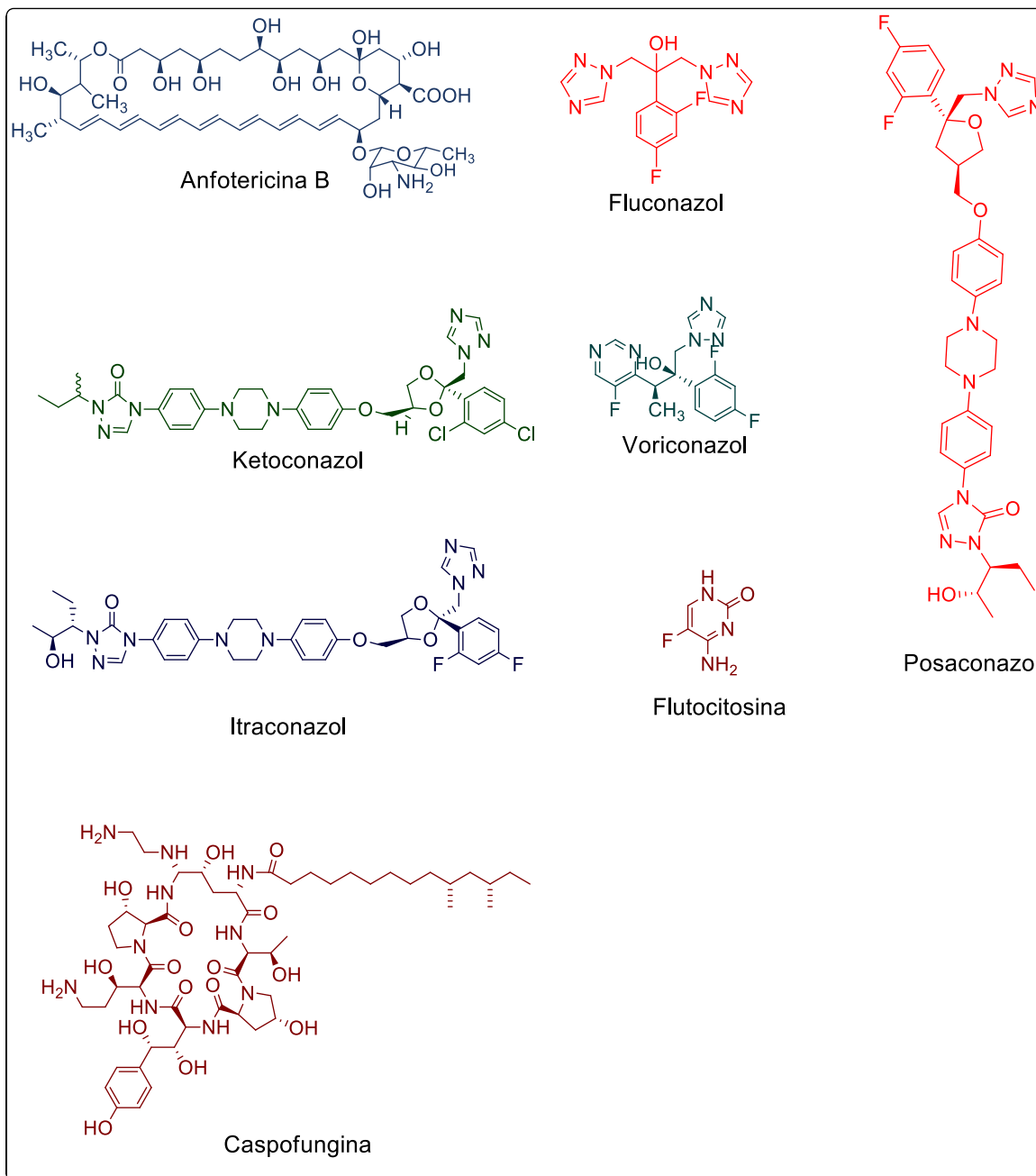


Figura 1. Estructuras químicas representativas de agentes antifúngicos

Existen diferentes farmacóforos tales como: anillos bencílicos halogenados cerca del anillo imidazol o triazol, las pirimidinas, lipopéptidos, entre otros. Todos estos farmacóforos han sido de gran importancia para el diseño de nuevos antifúngicos.⁴

Sin embargo, una preocupante desventaja del uso de fármacos terapéuticos frente a hongos patógenos, es que estos organismos están formados por células eucariotas que tienen procesos biológicos parecidos a las células humanas y por esto generan cierta toxicidad provocando así efectos adversos.¹¹

Debido a esto es necesario la búsqueda y diseño de nuevas entidades químicas que combatan la infección generada por las nuevas cepas multirresistentes a los antifúngicos comunes.

2.3 Química medicinal

También llamada farmacéutica, la química medicinal tiene como objetivo el estudio químico de las entidades nuevas, partiendo de propiedades fisicoquímicas, grupos funcionales, tratando de elucidar las relaciones entre su estructura, propiedades químicas y su respuesta biológica.

Debido a que la mayoría de los fármacos son de naturaleza orgánica, la química medicinal tiene sus fundamentos en la química orgánica y en la farmacología principalmente.

2.3.1 Diseño de sustancias bioactivas

En los últimos años, el diseño de nuevos fármacos ha cambiado gracias al avance en muchas disciplinas. El desarrollo de nuevos fármacos tiene su inicio en la formación del complejo entre la molécula de fármaco y un sitio receptor en una macromolécula biológica, lo que ha hecho posible la identificación de macromoléculas diana.¹²

Una metodología, es el uso de componentes matemáticos y computacionales con el propósito de analizar el comportamiento dinámico de los complejos. Lo que contribuye al diseño de nuevas moléculas bioactivas. Uno de los enfoques del uso de técnicas computacionales consisten en estimar la solubilidad y la permeabilidad

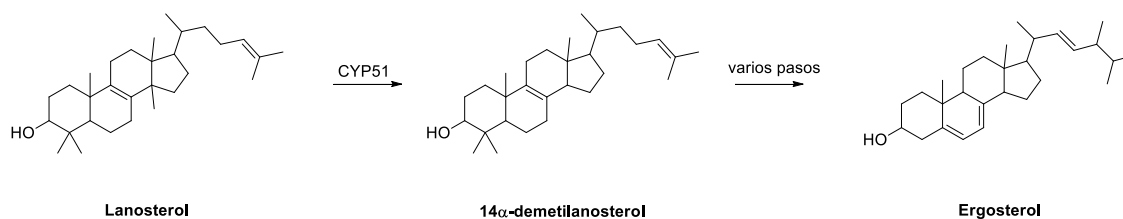
del fármaco, en este contexto existe “la regla de 5 o regla de Lipinski” la cual predice que la mala absorción o permeación es más probable cuando hay más de 5 donadores de enlaces hidrógeno, 10 aceptores de enlaces hidrógeno, un peso molecular superior a 500 Da y el valor calculado para Log P sea mayor a 5.¹³

Otra estrategia, es el modelado molecular, la cual busca moléculas candidatas a fármacos, mediante la elección de moléculas denominadas ‘cabezas de serie’, simula el comportamiento de las moléculas que poseen gran probabilidad de exhibir una acción específica.^{14,15} De la misma forma, dentro de las herramientas de modelado molecular se encuentra el acoplamiento molecular (docking), técnica que es de gran utilidad para predecir la estructura de los complejos intermoleculares que se establecen entre dos o más moléculas (ligando-receptor, proteína-ligando, etc.). Uno de los casos más estudiados es la interacción proteína–ligando, cuyo objetivo principal es predecir energías y modos de enlace, y que suele hacerse previamente a un estudio experimental.¹⁶ En estudios donde se aplica el acoplamiento molecular, usualmente se considera que la mejor conformación es aquella que reporta la menor energía de unión.^{16,17} Alternativamente, puede ser seleccionada del clúster más poblado entre los clúster obtenidos después del acoplamiento molecular y en ocasiones, también se selecciona aquella con el menor valor de RMSD (Root Mean Square Deviation) con respecto a una estructura de referencia.¹⁸ Finalmente, el uso de esta metodología permite obtener, la interacción proteína-ligando con la probabilidad más alta de unión al sitio activo de su receptor para cada ligando y con energías de unión menores a las reportadas por los criterios de selección ofrecidos por el programa de docking.

2.4 La enzima CYP51

La CYP51 (esterol-14 α -desmetilasa) es una enzima perteneciente al complejo de enzimas P51, es esencial para la supervivencia de los hongos debido a que su función es la biosíntesis del ergosterol que es el componente básico de la

membrana de los hongos (Esquema 1), por lo tanto, se considera un objetivo en el desarrollo de nuevos inhibidores antifúngicos.



Esquema 1. Biosíntesis del ergosterol

Por otra parte, los antifúngicos del tipo azol se diseñaron para inhibir a la enzima CYP51, debido a que ésta proporciona integridad a la membrana fúngica, por esta razón su inhibición detiene el crecimiento de los hongos. El modo de acción de los azoles implica la coordinación directa del nitrógeno nucleofílico del anillo heterocíclico como el sexto ligando del ión férrico hemo y las cadenas laterales de los fármacos azólicos interactúan con la estructura polipeptídica CYP51.

Sin embargo, debido a que el enzima objetivo es esta unida a la membrana, es difícil de cristalizar para efectuar el análisis de rayos X;

por lo tanto, no se encontraron datos experimentales disponible para la estructura de esta enzima por lo que en la simulación del estudio molecular de este trabajo se utilizó una enzima del banco de datos de proteínas (PDB) con un 65% de identidad; la CYP51 de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 5HS1, Fig. 2).

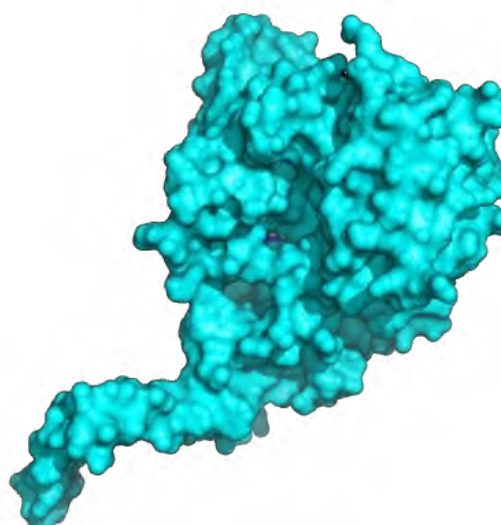


Figura 2. Enzima CYP51 (PDB: 5HS1)

2.5 Métodos para el estudio de la sensibilidad de los antifúngicos

Cuando la anfotericina B y la 5-fluorocitosina eran de los únicos tratamientos para el tratamiento de las infecciones fúngicas, no estaba muy justificada la realización

de pruebas de sensibilidad antifúngica. Sin embargo, a medida que la industria farmacéutica fue introduciendo en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones de los ya conocidos, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de los mismos y detectar las posibles resistencias.

Con base a esto, el “Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio” (CLSI, por sus siglas en inglés), creó un comité para el estudio y la estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, se propusieron los métodos de macro y microdilución y difusión en disco para levaduras, como el M27-A3 y M44-A y para hongos filamentosos M38-A. Básicamente consisten en cuantificar la inhibición de crecimiento producida por el antifúngico comparada con el crecimiento de la levadura o moho en el mismo medio, pero sin antifúngico. El medio de cultivo, pH, inóculo, tiempo y temperatura de incubación deben ajustarse estrictamente a lo recomendado en estas técnicas debido a que cualquier variación puede afectar los resultados.¹⁹

Tomando esto como referencia en el presente trabajo se hizo un énfasis en el método M38-A debido a que el interés de la evaluación biológica fueron los hongos filamentosos.

III. ANTECEDENTES

3.1 Heterociclos

Los heterociclos son estructuras que tienen un rol importante en distintas áreas, como la farmacología, agricultura, síntesis, entre otras; constituyen una unidad clave en algunos fármacos y muestran una amplia variedad de actividades biológicas; consecuentemente existe un gran interés en ellos. Entre este tipo de compuestos se encuentran los azoles,²⁰ que son compuestos heterocíclicos de cinco miembros, planos, que contienen en sus anillos uno o más heteroátomos, de los cuales al menos uno es nitrógeno.^{21,22} El imidazol presenta en su estructura dos nitrógenos; uno en la posición 1 y otro en 3; mientras en el triazol se localizan en las posiciones 1, 2, 4 y también pueden ser 1, 2, 3 (Fig. 3). Ambos compuestos son solubles en disolventes polares, poseen actividades antibacterianas, antiinflamatorias, antifúngicas, analgésicas y antimaláricas.^{22,23}

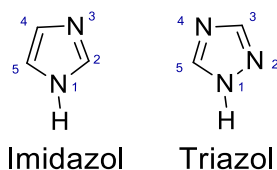


Figura 3. Imidazol y triazol

3.2 Enlace amida

Por otro lado, la funcionalidad amida es una característica común en moléculas naturales o sintéticas; es omnipresente en los organismos ya que las proteínas juegan un papel crucial en todos los procesos biológicos y aparece en el 25% de los fármacos conocidos.²⁴ Además de que la estructura básica del enlace amida proporciona un grupo aceptor y un donador de puente de hidrógeno (Fig. 4)

Aceptor de puente

Donador
de puente**Figura 4.** Estructura básica del enlace amida

Una singularidad del enlace amida es la isomería *cis-trans* que presenta debido al carácter sp^2 (60:40) del enlace C-N. Se sabe que los enlaces amida planares ocurren en la conformación *trans*, esta planaridad es mantenida debido a una energía de barrera rotacional causada por el carácter parcial del doble enlace de la amida, la diferencia de energía entre una isomería *cis* y *trans* es de 2.5 kcal/mol.

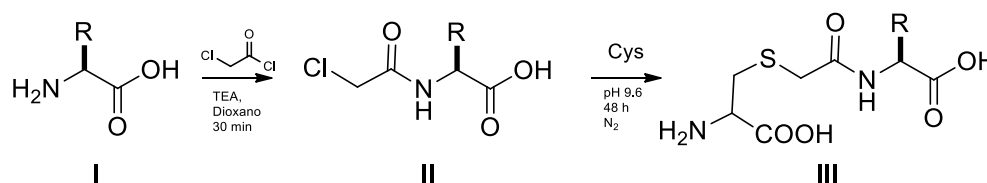
Una razón importante del uso de aminoácidos acoplados con moléculas bioactivas es su especificidad en moléculas dianas *in vitro*, selectividad, permeabilidad celular y baja toxicidad, que además en muchas investigaciones realizadas ha proporcionado una mayor potencia de acción a las moléculas ensayadas.⁷

En la literatura existen muchos reportes de la síntesis de esta funcionalidad. Por ejemplo, la reacción típica entre un ácido carboxílico y una amina no ocurre de forma espontánea a temperatura ambiente, se necesitan temperaturas elevadas (200 °C) para que esto se pueda llevar a cabo.

Por esta razón existen otras rutas de síntesis para obtener esta funcionalidad de forma más eficaz, para lo cual se efectúa la activación del ácido carboxílico mediante el uso de reactivos de acoplamiento que generan intermediarios activos tales como: cloruros de ácido, anhídridos (mixtos), anhídridos carbónicos o ésteres activos.²⁴⁻²⁶

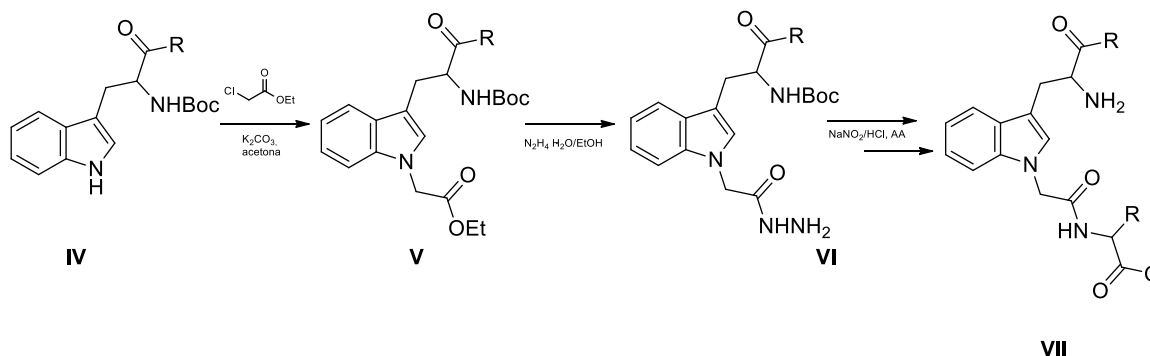
3.3 Síntesis

En 1975, Moussebois *et al.*,²⁷ realizó la síntesis de derivados *N*-cloroacetilados de aminoácidos, diseñados como agentes alquilantes que permiten la fijación de grupos voluminosos como sustituyentes, tales como polipéptidos artificiales, o los grupos tiol de las proteínas. En el primer paso el grupo amino libre del aminoácido funciona como iniciador o punto de partida, en el segundo el cloruro del cloroacetilo **II** ahora forma la cabeza del polipéptido lo que le permite reaccionar con el grupo tiol de cisteína de forma selectiva (Esquema 2).



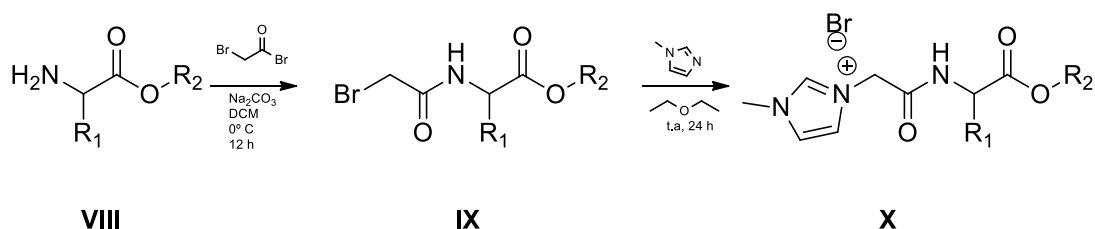
Esquema 2. Síntesis de derivados *N*-cloroacetilados

El Dr. Abdel-Rahman hizo una modificación del reordenamiento de Curtius y sintetizó derivados de aminoácidos *N*-protegidos utilizando acil azidas (Esquema 3),²⁸ partió del derivado **IV** tratándolo con etil cloroacetato para obtener **V**, posteriormente lo trató con el hidrato de hidrazina para obtener **VI**. Finalmente, utilizó el método vía azidas para efectuar el acoplamiento con otro aminoácido.



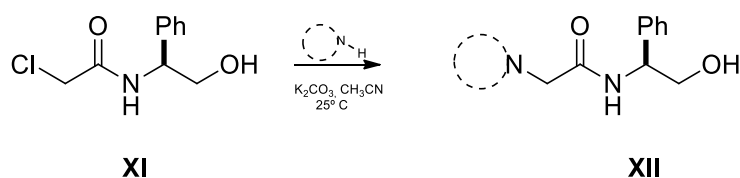
Esquema 3. Síntesis de aminoácidos *N*-protegidos

Por otro lado, el grupo de investigación del Dr. Gathergood,²⁹ sintetizó líquidos iónicos basados en sales de imidazolio utilizando ésteres de aminoácidos (Esquema 4). El primer paso fue una esterificación de Fischer–Speier con cloruro de tionilo en presencia de alcoholes alquílicos y obtuvieron **VIII**, en el segundo paso hicieron la acilación de **VIII** con bromuro de bromoacetilo para obtener el intermediario α -bromoamida **IX** y por último éste (**IX**) lo hicieron reaccionar con una amina (metilimidazol) y obtuvieron el líquido iónico **X**.



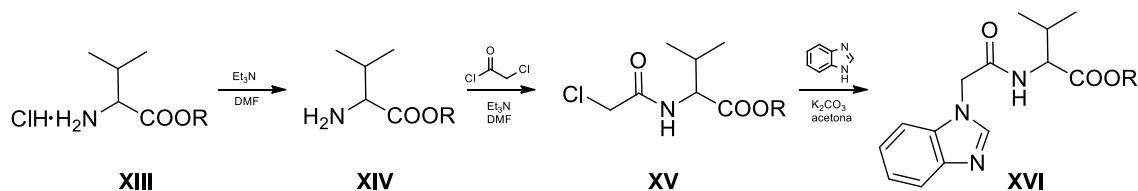
Esquema 4. Síntesis de líquidos iónicos de imidazolio

Asimismo, Hernández-Fernández *et al.*,³⁰ sintetizaron β -hidroxiacetamidas (Esquema 5), utilizando diferentes aminas heterocíclicas, partiendo del derivado cloroamida **XI** y mediante una *N*-alquilación obtuvieron el producto deseado **XII**.



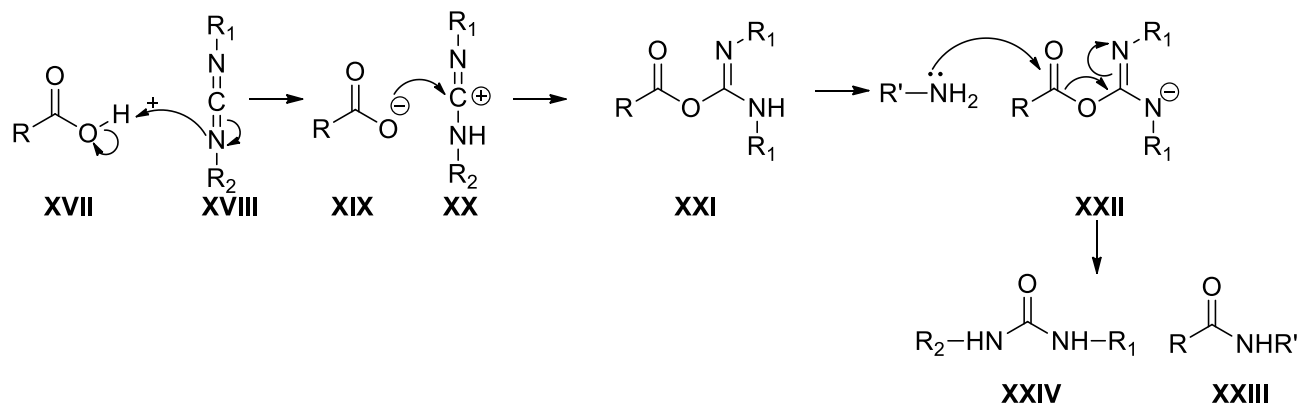
Esquema 5. Síntesis de β -hidroxiacetamidas

El grupo de trabajo del Dr. Georghiou y Abdel-Wahab³¹ sintetizaron acetamido benzoimidazoles partiendo del clorhidrato del éster del aminoácido **XIII** tratándolo con trietilamina en dimetilformamida para liberar la amina **XIV** (Esquema 6), posteriormente el compuesto se hizo reaccionar con cloruro de cloroacetilo para obtener el intermediario cloroamida **XV** y mediante una *N*-alquilación obtener el respectivo acetamido benzoimidazol **XVI**.



Esquema 6. Síntesis de acetamidobenzoimidazoles

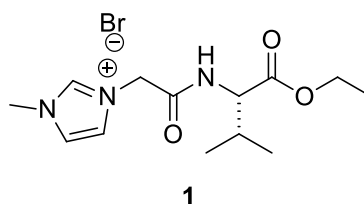
Otra metodología utilizada para la formación del enlace amida es el uso de una carbodiimida como agente acoplante (Esquema 7). En 1955,³² Sheehan y su grupo de trabajo con el fin de obtener un tripéptido, se utilizó por primera vez la *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), obtuvieron buenos resultados y en menor tiempo. Esta metodología parte del ácido **XVII** que reacciona con **XVIII** para obtener el intermediario *O*-acilisourea **XXI**, posteriormente el éster activo recibe un ataque nucleofílico por parte del grupo amino de otro aminoácido **XXII** y se obtiene el enlace amida **XXIII** y como subproducto la dialquilurea de la respectiva carbodiimida **XXIV**.^{24,26,33}



Esquema 7. Mecanismo de reacción por el método de la carbodiimida

3.4 Actividad biológica de derivados de imidazol y triazol

Diversas sales de imidazolio derivados de aminoácidos como fenilalanina y valina fueron sintetizadas en 2012 por el Dr. Gathergood y colaboradores.³⁴ Estos compuestos fueron evaluados frente a diversas cepas de bacterias y hongos. Dentro de los mejores resultados el compuesto **1** (Fig. 5), mostró muy buena actividad inhibitoria frente a *T. mentagrophytes*, que es un hongo filamentoso dermatofito de interés médico y veterinario.



$IC_{50}=62.5 \mu M$ *T.mentagrophytes*

Figura 5. Sal de imidazolio

La Dra. Banfi y su grupo de investigación,³⁵ obtuvo nuevos derivados de imidazoil-piridincarboxamidrazona (Fig. 6) en donde modificaron el sustituyente en el anillo aromático, estos compuestos mostraron actividad antifúngica frente a cepas de *Candida albicans* y *Candida glabrata*, algunos con MICS por debajo de los compuestos de referencia; anfotericina B (1 y 4 mg/mL) y miconazol (8 y 32 mg/mL).

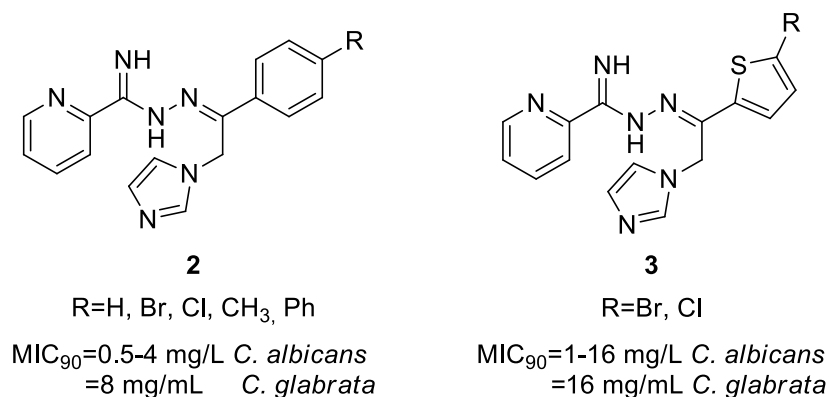


Figura 6. Derivados de imidazol

más activos frente a las cuatro especies de hongos al mostrar un mayor porcentaje de inhibición.

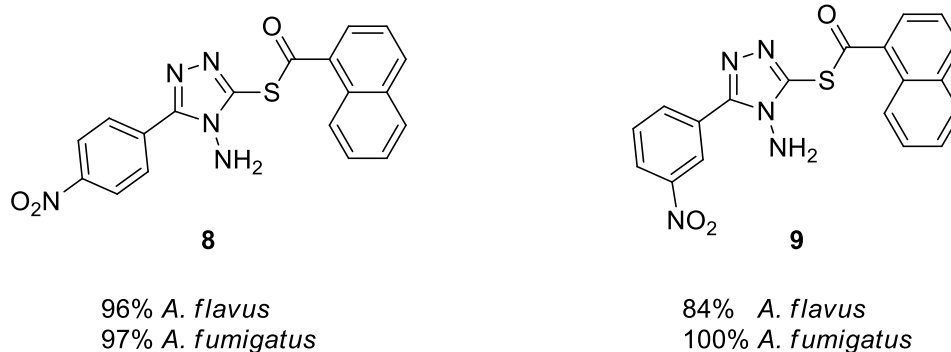


Figura 9. Derivados de 1, 2, 4-triazoles-tioéster

La Dra. Castellano et al,³⁸ sintetizó una serie de derivados (Fig.10) de 3-fenil-1-(1,1'-bifenil-4-il)-2-(1*H*-imidazol-1-il)propano (**10a** y **10b**) que fueron evaluados *in vitro* frente a levaduras (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, y *C. neoformans*), mediante el método de microdilución en placa con resultados positivos (0.9-5.5 μ M).³⁹

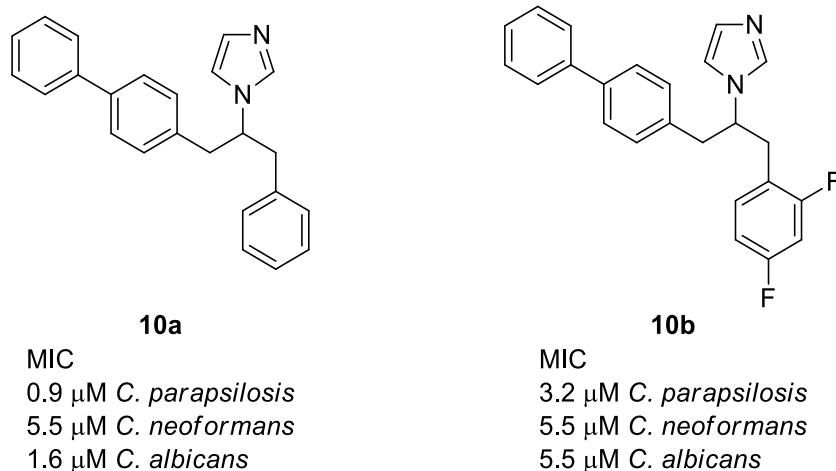


Figura 10. Derivados de 3-fenil imidazolpropano

En otro proyecto el Dr. Abdel-Wahab *et al*,³¹ evaluaron nuevos benzoimidazoles (Fig. 11) en donde el grupo farmacóforo fue el acetamidobenzoimidazol y

modificaron el aminoéster, siendo el más activo, el compuesto **11a**, utilizando como referencia anfotericina B (MIC=0.49 $\mu\text{g/mL}$)

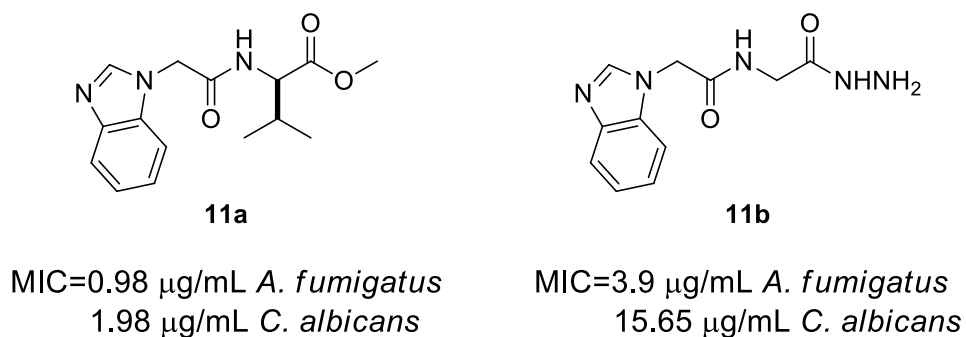
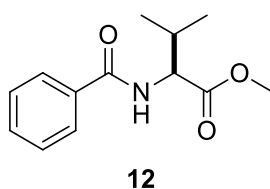


Figura 11. Ésteres de benzoimidazol

3.5 Derivados de valina

Chiguils y colaboradores en 2016,⁴⁰ sintetizaron derivados *N*-acilaminoésteres y dipéptidos en donde el farmacóforo fue benzamida modificando el aminoácido y los sustituyentes del anillo aromático (Fig. 12). Estos compuestos se evaluaron frente a diferentes cepas de levaduras, hongos filamentosos y bacterias en donde el compuesto **12** mostró un mayor porcentaje de inhibición frente a hongos filamentosos.



70.4% *A. fumigatus*
68.9% *F. temperatum*

Figura 12. Éster *N*-benzoilvalilmetílico

IV. JUSTIFICACIÓN

El uso irracional de los antibióticos y antifúngicos, ha ocasionado la aparición de cepas resistentes a los tratamientos terapéuticos. Este hecho se ha convertido en un problema de salud pública, agravado por; la facilidad con la que se adquieren estos medicamentos, la automedicación y la falta de voluntad para terminar el tratamiento antifúngico y/o antibacteriano, por lo que esta tendencia continuará incrementándose en el presente siglo paralela al aumento de enfermos de SIDA, el uso de fármacos inmunosupresores y la sobrevida de pacientes con enfermedades metabólicas degenerativas.

Debido a esto es necesario efectuar la búsqueda de nuevas moléculas que inhiban el crecimiento de cepas multirresistentes. Estos nuevos antimicóticos deben de ser más específicos, menos tóxicos y de bajo costo.

V. HIPÓTESIS

Los ésteres imidazolil y triazolilacetilvalilmetílicos sintetizados presentarán actividad antifúngica.

VI. OBJETIVOS

6.1 General

- Sintetizar, evaluar y efectuar el docking molecular de los derivados de ésteres *N*-imidazolilacetilvalilmetílicos, *N*-imidazolilcarbonilvalilmetílicos y *N*-triazolilacetilvalilmetílicos con la enzima CYP51 (PDB: 5HS1).

6.2 Específicos

1. Realizar la síntesis de ésteres *N*-imidazolilacetilvalilmetílicos, *N*-imidazolilvalilmetílicos y *N*-triazolilacetilvalilmetílicos.
2. Efectuar la caracterización mediante RMN, espectrometría de masas e IR, de los compuestos sintetizados.
3. Evaluar la actividad antifúngica de los ésteres *N*-imidazolilacetilvalilmetílicos, *N*-imidazolilcarbonilvalilmetílicos y *N*-triazolilacetilvalilmetílicos frente a *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium temperatum*, *Fusarium falciforme*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis*.
4. Efectuar un estudio de acoplamiento molecular de los compuestos activos frente a la enzima CYP51.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Materiales y reactivos

Los reactivos como: ácido benzoico, ácido 3-metoxibenzoico, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) son marca Meyer. El imidazol, triazol, bromuro de bromoacetilo, valina, carbonato de sodio (Na_2CO_3), ácido 1,4-dimetil-1H-imidazol-5-carboxílico, cloruro de trimetilsilano (TMSCl), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), hidroxibenzotriazol (HOBt), trietilamina (TEA), diisopropiletilamina (DIPEA), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) y acetonitrilo (CH_3CN), se adquirieron comercialmente con Sigma-Aldrich. Los disolventes como diclorometano (CH_2Cl_2), metanol (MeOH), acetato de etilo (AcOEt), hexano y acetona se adquirieron grado técnico.

Cromatografía

Para cromatografía en capa fina (TLC) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor, ALUGRAM Xtra SIL G con indicador de fluorescencia UV_{254} de Macherey-Nagel y como fase móvil, sistemas de elución de hexano-acetato de etilo, CH_2Cl_2 -MeOH, hexano-acetona en diferentes proporciones dependiendo de la naturaleza de cada compuesto. Para su revelado se utilizó luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm).

Para cromatografía en columna, se empleó gel de sílice de 230-400 mallas MN Kieselgel 60 de Macherey-Nagel, utilizando como fase móvil mezclas de acetato de etilo-hexano y CH_2Cl_2 -MeOH en diversas proporciones dependiendo del compuesto.

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN se adquirieron con un equipo VARIAN 400MR, a 400 MHz para espectros de ^1H y 100 MHz para los espectros de ^{13}C , se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) y dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. La elección del disolvente dependió de la solubilidad del compuesto. Se utilizó el software MestReNova versión 9.0.1 para la manipulación de los FIDs.

Espectrometría de masas

Pretratamiento de la muestra

Aproximadamente 1 mg de cada compuesto se disolvió en 1 mL de metanol absoluto y posteriormente se centrifugó a 4 °C, 18 000 gravedades durante 20 min; se tomó del sobrenadante 100 μL y se diluyó en 900 μL de metanol acidificado con 0.1 % v/v de ácido fórmico. Posteriormente se introdujeron las muestras al sistema de espectrometría.

La determinación de la masa molecular se realizó mediante la inyección por infusión directa a un espectrómetro de masas SYNAPT G2-Si provisto de; una cámara de ionización por electrorociado, un filtro de masas de cuádruplo sencillo y un analizador de masas de tiempo de vuelo.

Puntos de fusión

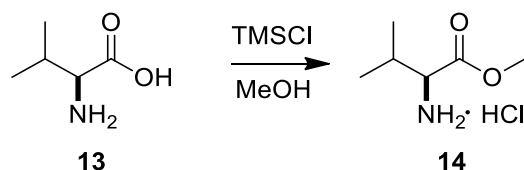
Los puntos de fusión se determinaron por la técnica de capilar abierto en un equipo automatizado Stanford Research Systems EZ-Melt MPA 102, en escala de Celsius.

Espectroscopia de infrarrojo

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier e interferómetro Dynascan PerkinElmer Espectrum 100.

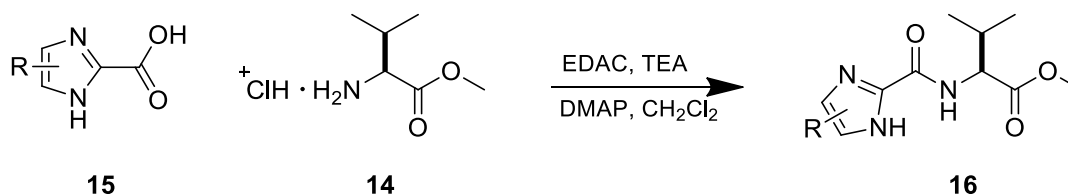
7.2 Síntesis

Metodología general para la síntesis del éster valilmetílico (14)



En un matraz de bola de 50 mL provisto con agitación magnética, se colocó 1 equivalente de valina y se le agregaron 2 equivalentes molares de cloruro de trimetilsilano (TMSCl). Posteriormente se agregaron 5 mL de metanol y se dejó 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se colocó en el rotavapor y se llevó a sequedad. El producto de reacción se analizó por RMN y ESI-MS y se utilizó sin posterior purificación.⁴¹

Síntesis de éster N-imidazolilcarbonilvalilmetílico (16)

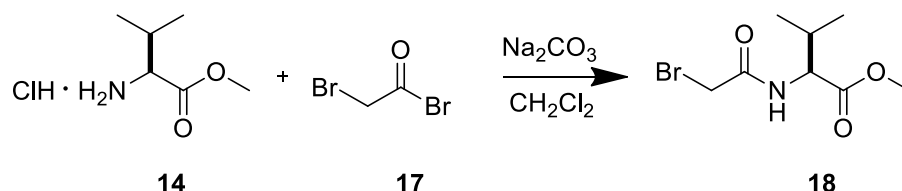


En un matraz de bola de 50 mL acondicionado con agitación magnética se colocó una mezcla de ácido 1,4-dimetil-1H-imidazol-5-carboxílico (**15**, 1.2 eq), dimetilaminopiridina (DMAP catalítico) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC, 1.5 eq), se disolvió en 10 mL diclorometano (CH_2Cl_2) por dos horas a una temperatura entre 0-4 °C. Posteriormente a la mezcla de reacción se le agregó trietilamina (TEA, 2 eq) y el éster valilmetílico (**14**, 1 eq) en una sola porción. La reacción se dejó en agitación durante 24 h, transcurrido ese tiempo se diluyó con CH_2Cl_2 (30 mL) y se trató con una solución saturada de cloruro de amonio (NH_4Cl , 10 mL), la fase orgánica se extrajo y la fase acuosa se trató con CH_2Cl_2 (3x20 mL). Se reunieron las fases orgánicas y el disolvente se evaporó en un rotavapor con alto

vacío. Los compuestos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna y se analizaron por RMN y espectrometría de masas.

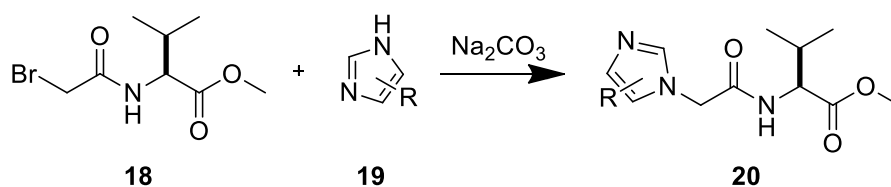
Síntesis de ésteres *N*-imidazolil y *N*-triazolilacetilvalilmetílico

Síntesis de α -bromoamida (**20**)

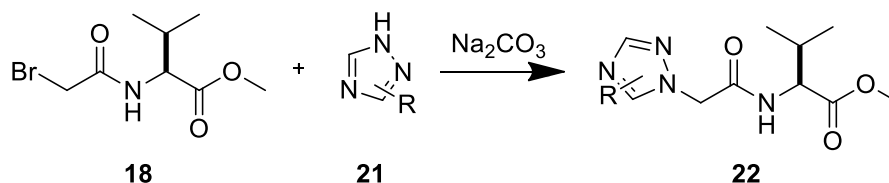


En un matraz provisto de agitación se colocó una mezcla del éster valilmetílico (**14**) (1 eq), carbonato de sodio (Na_2CO_3 , 2 eq) en CH_2Cl_2 , a la disolución se le adicionó el bromuro de bromoacetilo (**17**, 1.5 eq) por goteo y se dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo la reacción se trató con agua (15 mL), la fase orgánica se extrajo y la fase acuosa se trató con CH_2Cl_2 (3x20 mL). Se reunieron las fases orgánicas y se concentraron en un rotavapor a alto vacío, posteriormente, se purificó mediante cromatografía en columna y se caracterizó mediante RMN.²⁹

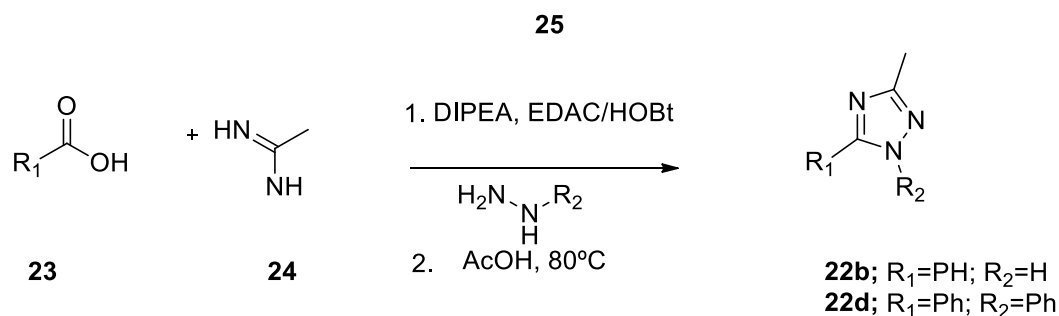
Síntesis de éster *N*-imidazolilacetilvalilmetílico



En un matraz provisto de agitación se colocó una mezcla de la α -bromoamida (**18**, 1 eq), el azol correspondiente (**19**, 1 eq) y Na_2CO_3 (2 eq) en acetonitrilo, la reacción se dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se trató con agua (15 mL) y CH_2Cl_2 (20 mL), la fase orgánica se extrajo y la fase acuosa se trató con CH_2Cl_2 (3x20 mL) se reunieron las fases orgánicas y se concentraron en un rotavapor a alto vacío, finalmente el producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna y se caracterizó mediante RMN y ESI-MS.³⁰

Síntesis de éster N-triazolilacetilvalilmetílico

En un matraz provisto de agitación se colocó una mezcla de la α -bromoamida (**18**, 1 eq), el azol correspondiente (**21**, 1 eq) y Na_2CO_3 (2 eq) en DMSO, la reacción se calentó a 70 °C durante 6 h, transcurrido ese tiempo se trató con agua (15 mL) y CH_2Cl_2 (20 mL), la fase orgánica se extrajo y la fase acuosa se trató con CH_2Cl_2 (3x20 mL), las fases orgánicas se reunieron y se concentraron en un rotavapor a alto vacío, finalmente, el producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna y se caracterizó mediante RMN y ESI-MS.

Síntesis de 1,2,4-triazoles 1,3,5 sustituidos

En un matraz provisto de agitación se colocó la mezcla de reacción del derivado de ácido (1 eq), acetamidina (1.5 eq), EDAC (1.1 eq), HOBt (1.1 eq) y diisopropiletilamina (DIPEA, 3 eq) en DMF (9 mL). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 5 h a temperatura ambiente, hasta el término de la materia prima, posteriormente se adicionó AcOH (10 eq), y la hidracina correspondiente (1.5 eq), se calentó a 80 °C durante 4 h.⁴² Transcurrido ese tiempo se trató con una solución concentrada de NaHCO_3 (20 mL) y se agregó AcOEt (20 mL), la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3x20 mL). Las fases orgánicas se reunieron y se concentraron en un rotavapor a alto vacío. Los

productos de la reacción se purificaron mediante cromatografía en columna y se caracterizaron mediante RMN.

7.3 Evaluación biológica

Método de microdilución en placa M38-A para hongos filamentosos

Se utilizó el método de microdilución en placa el cual se basa en la comparación del crecimiento fúngico con y sin el fármaco, calculado en % de inhibición del crecimiento.

Esta metodología se ha utilizado en el género *Aspergillus*; el inóculo se prepara a partir de un cultivo de 7 días de crecimiento a 35 °C en agar dextrosa de papa (PDA), que induce la formación de conidios. Se hizo la reactivación de la cepa de hongos filamentosos en medio PDA, y se incubó, la cepa de *Aspergillus fumigatus* durante 4 días a 37 °C, mientras *Fusarium temperatum* y *Fusarium falciforme* durante 7 días a 27 °C. La reactivación de las levaduras *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* se hizo en medio líquido en extracto de peptona dextrosa (YPD) y se incubaron por 24 h, posteriormente se sembró en medio sólido YPD por estría cruzada, y se incubó por 24 h a 37 °C.

Para la preparación de los compuestos se tomaron 64 mg de cada compuesto y se llevaron a una concentración de 12.8 mg/mL en DMSO, posteriormente se diluyeron en una solución de agua estéril 1:20 para eliminar la toxicidad del DMSO, quedando a una concentración final de 640 µg/mL.

Transcurrido el tiempo de incubación de cada especie de hongo se hizo la recolección de los conidios con PBS + tween al 1% y se ajustó con medio RPMI a una concentración de 1×10^6 conidios/mL. Para la recolección de conidios en las levaduras se hizo la extracción de los conidios en PBS y se ajustó a 1×10^4 conidios/mL en medio RPMI.

Finalmente, en una placa de 96 pozos se puso en contacto el hongo en medio RPMI y el compuesto (Fig. 13), cada compuesto se analizó por triplicado, se utilizaron tres blancos, el primero fue el hongo en RPMI con DMSO, el segundo fue DMSO y medio RPMI y el tercero el hongo en medio RPMI y un antibiótico de referencia, en este caso fue la anfotericina y fluconazol. Por último, transcurridas 48 h (hongos filamentosos) y 24 h (levaduras) se hicieron las lecturas en un medidor de placas a 492 nm y se evaluó el porcentaje de inhibición de cada compuesto comparado con el blanco del hongo en medio RPMI.

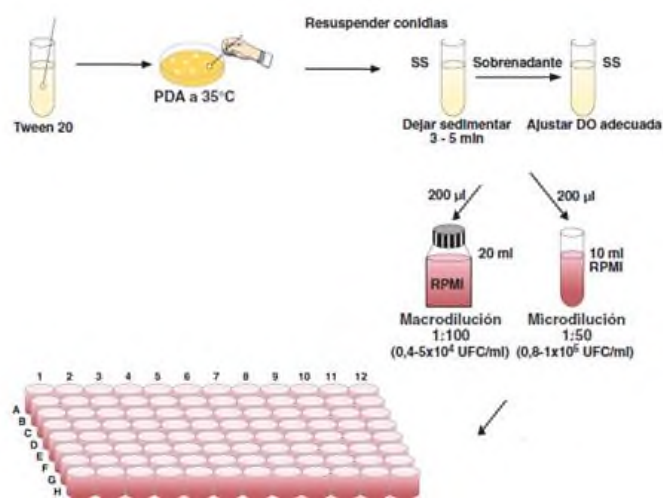


Figura 13. Metodología para el método de microdilución en placa

Se utilizó el método reportado por Rodríguez Hurtado en 2015,⁴³ en el cual se modificó el método reportado por Ström 2002, colocando 100 µL de los compuestos sintetizados más 100 µL de las suspensiones del microorganismo.

7.4 Estudio de análisis molecular

La estructura cristalina de la enzima CYP51 con el voriconazol (PDB:5hs1) se tomó de la base de datos Protein Data Bank (PDB). Los cálculos de acoplamiento se realizaron con el programa AutoDock, el cual se realizó empleando 1000

ejecuciones en cada experimento. Los cálculos para determinar los mínimos de energía se hicieron en el programa Gaussian versión 09 con un nivel de teoría DFT utilizando un funcional híbrido de correlación B3LYP y con una base 6-31G(p). Para visualizar los datos de los mínimos de energía se utilizó Chemcraft. Se utilizó Discovery Studio versión v17.2.0.16349 y Pymol versión 2.1.0, para la visualización de las moléculas en el sitio activo de la enzima.

VIII. RESULTADOS

8.1 Síntesis

En el presente trabajo se describe la síntesis del éster imidazolilcarbonilvalilmetílico (**16**) mediante el acoplamiento del ácido con el aminoéster (**14**), además, se sintetizaron los ésteres *N*-imidazolilacetilvalilmetílicos (**20**) y *N*-triazolilacetilvalilmetílicos (**22**) (Fig. 14), mediante la *N*-alquilación del heterociclo correspondiente (imidazol **19** o triazol **21**) con el derivado bromado de valina (**18**).

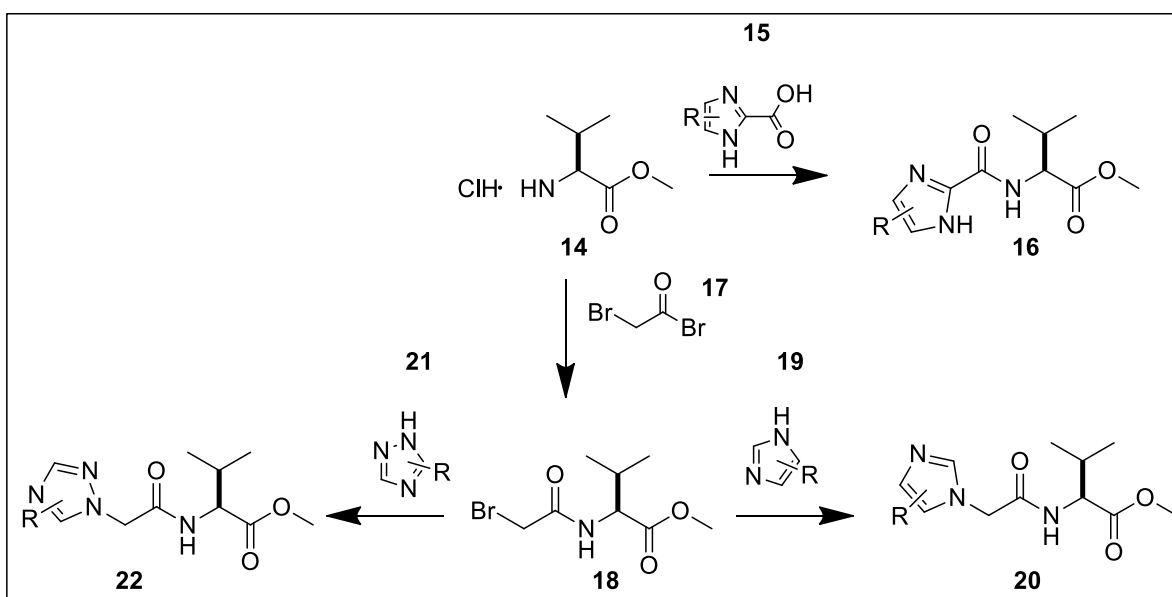


Figura 14. Síntesis de ésteres *N*-imidazolil y *N*-triazolilacetilvalilmetílicos

La síntesis inicia con la obtención del clorhidrato del metil éster de valina (**14**). El compuesto **14** se realizó mediante el tratamiento de la valina (**13**) con TMSCl en MeOH durante 24 h y se obtuvo con un rendimiento del 90%.

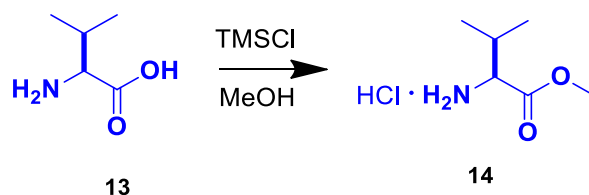
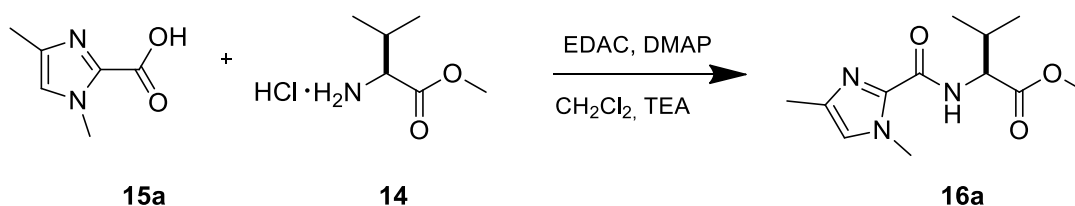


Figura 15. Síntesis del éster de valina (**14**)

Síntesis del éster imidazolilcarbonilvalilmetílico (16a)

La síntesis del compuesto **16a** se realizó con la metodología propuesta, sin embargo, el rendimiento de reacción fue bajo (16 %), por lo tanto, se utilizaron diferentes condiciones de reacción (Tabla 2) en las cuales se modificaron las variables de tiempo, temperatura y volumen de disolvente. En el experimento 2 se modificó la temperatura para evitar la formación del intermediario *N*-acilurea e incrementar la formación de la *O*-acilisourea, que es un intermediario clave en este tipo de condiciones; se observó un incremento del rendimiento comparado con el experimento 1; con el fin de mejorar el rendimiento en el experimento 3 se liberó previamente la amina del clorhidrato, sin embargo, continuaba siendo un rendimiento bajo. Por lo tanto, en el experimento 4, se modificó el tiempo de reacción obteniendo con ello, un mejor rendimiento (67 %).

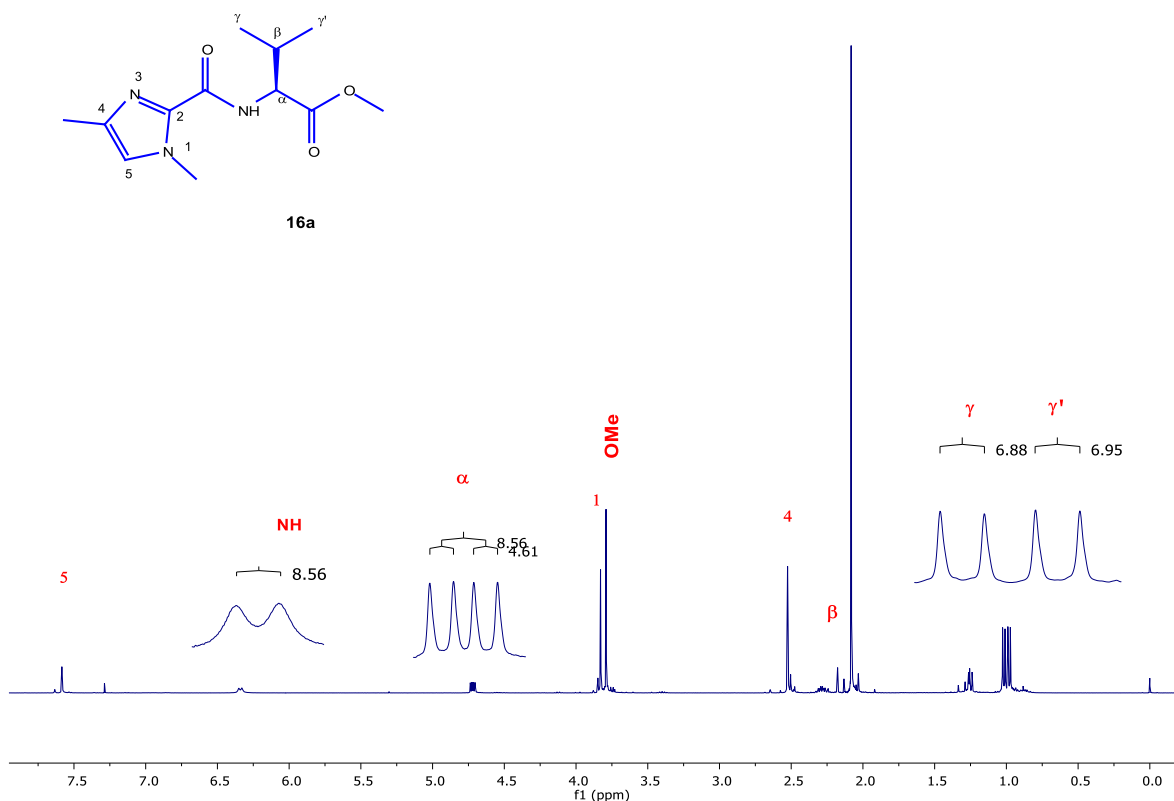
Tabla 2. Condiciones de reacción del compuesto **16a**

EXPERIMENTO	TIEMPO (h)	VOLUMEN (mL)	TEMPERATURA (°C)	RENDIMIENTO (%)
1	12	10	t.a.	16
2	12	5	0-4	40
3	12 (amina libre)	5	0-4	56
4	24	5	0-4	67

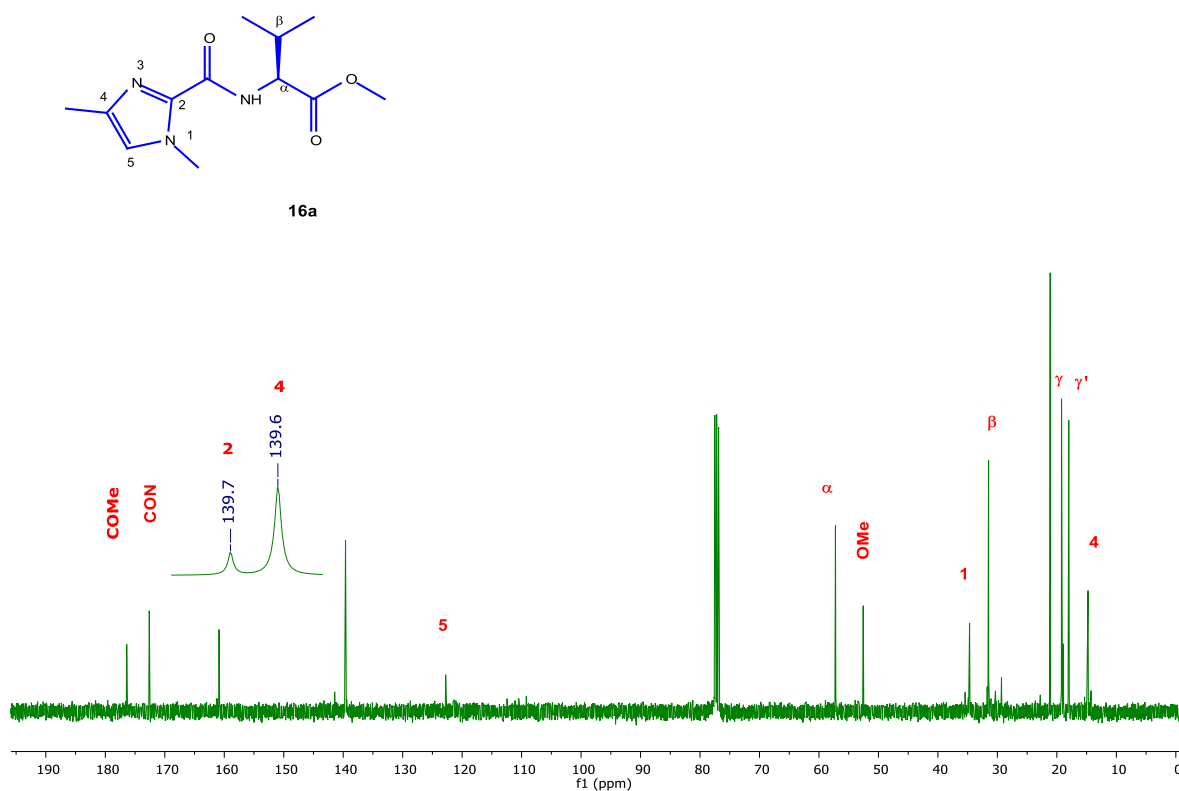
Una vez sintetizado el compuesto se realizó su caracterización mediante RMN de ^1H y ^{13}C .

(S)-2-(1,4-dimetil-1H-imidazol-5-carboxamida)-3-metilbutanoato de metilo (16a)

En el espectro de RMN del compuesto **16a** (Espectro 1) se observan 8 señales de protones diferentes. En la región aromática solo se observa una señal simple en 7.58 ppm, correspondiente al protón H-5 del anillo aromático. La señal d en 6.32 ppm corresponde al protón de la amida, ésta se acopla con el H_α ($J_{\text{NH-H}\alpha} = 8.6 \text{ Hz}$). La señal dd en 4.75 ppm se asignó al H_α la cual también se acopla con el H_β ($J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}=4.6 \text{ Hz}$), que tiene un desplazamiento de 2.28 ppm. Los metilos del grupo isopropilo del aminoácido presenta dos tipos de protones γ y γ' con desplazamientos de 0.99 y 1.00 ppm, estos se acoplan con H_β ($J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta} = 6.8 \text{ Hz}$) y se observan como señales d. En 3.79 ppm absorbe el metilo base oxígeno, mientras en 2.53 ppm el metilo localizado en la posición 4 del anillo y en 3.83 ppm el metilo base nitrógeno.

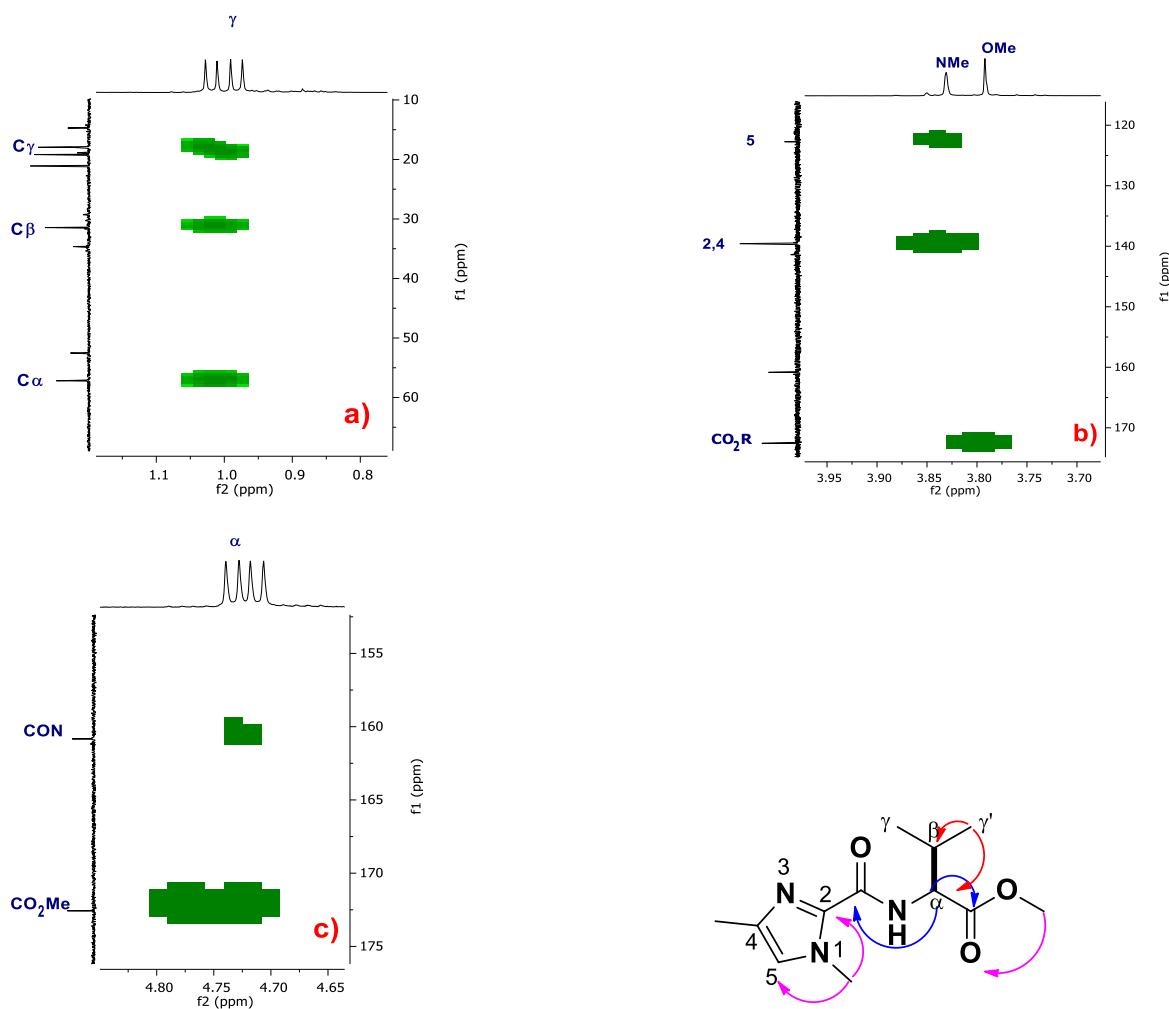
**Espectro 1. RMN de ¹H del compuesto 16a**

En el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **16a** (Espectro 2) se observan 11 señales de carbonos diferentes correspondientes al compuesto. Las señales de 139.7, 139.6 y 122.8 ppm corresponden a las señales de los carbonos del anillo aromático del imidazol, mientras que las señales de los metilos unidos a las posiciones 1 y 4 se localizan en 34.7 y 14.8 ppm, respectivamente. La señal en 57.2 ppm corresponde al carbono α mientras la de 52.6 ppm corresponde al metilo de base oxígeno. En 31.5, 19.2 y 18.0 ppm se observan las señales correspondientes a la cadena del aminoácido (β , γ y γ' , respectivamente).



Espectro 2. RMN de ^{13}C del compuesto **16a**

La asignación de las señales de 172.6 y 160.9 ppm se realizó mediante el experimento gHMBC (Espectro 3) y estas corresponden a los carbonilos del éster y de la amida, respectivamente. Esto se puede corroborar con la correlación del metilo del éster con su respectivo carbonilo (inciso b), además se confirmó la conectividad entre el heterociclo y el aminoéster al observar la señal del H α que correlaciona con ambos carbonilos (inciso c).



Espectro 3. Experimento gHMBC del compuesto 16a

8.1.1 Síntesis de ésteres *N*-imidazolil y *N*-triazolilacetilvalilmetílicos

En la búsqueda de la metodología para la síntesis de los ésteres imidazolil y triazolilacetilvalilmetílicos (Fig. 16), se realizó el análisis retrosintético de las moléculas objetivo, planteando como precursores a la bromoacetamida **18** y el correspondiente azol **19**.

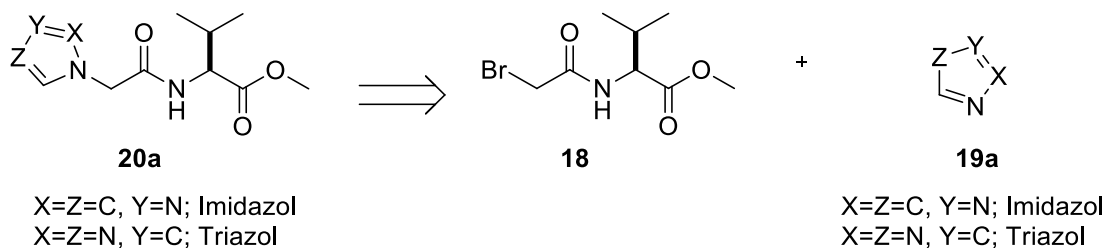


Figura 16. Análisis retrosintético

Síntesis de la α -bromoamida (**18**)

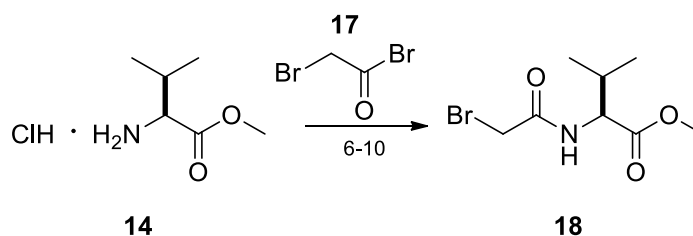


Figura 17. Síntesis de la α -bromoamida **18**

En la síntesis del compuesto **18** (Fig. 17) se probaron distintas metodologías (Tabla 3), en las primeras dos se usó TEA como base para liberar la amina del clorhidrato (experimento 6 y 7), sin embargo, el uso de este método resultó en la formación de una impureza colorida (sal de amonio) y trazas del producto, ya que la base compite como nucleófilo por el centro activo, por lo cual, se optó por utilizar como base Na_2CO_3 (experimento 8-10), el cual, al estar en exceso, además de liberar el grupo amino del clorhidrato, neutraliza la formación del HBr desprendido durante la reacción. Una vez liberado el grupo amino se procede a la rápida formación de **18**, evitando con ello la formación de subproductos indeseados. En los siguientes

experimentos (8 y 9) se obtuvo el producto, sin embargo, a temperatura ambiente se obtuvo con un mayor rendimiento. Al utilizar un sistema bifásico con el fin de incrementar el rendimiento, no se obtuvo un mejor resultado (experimento 10).

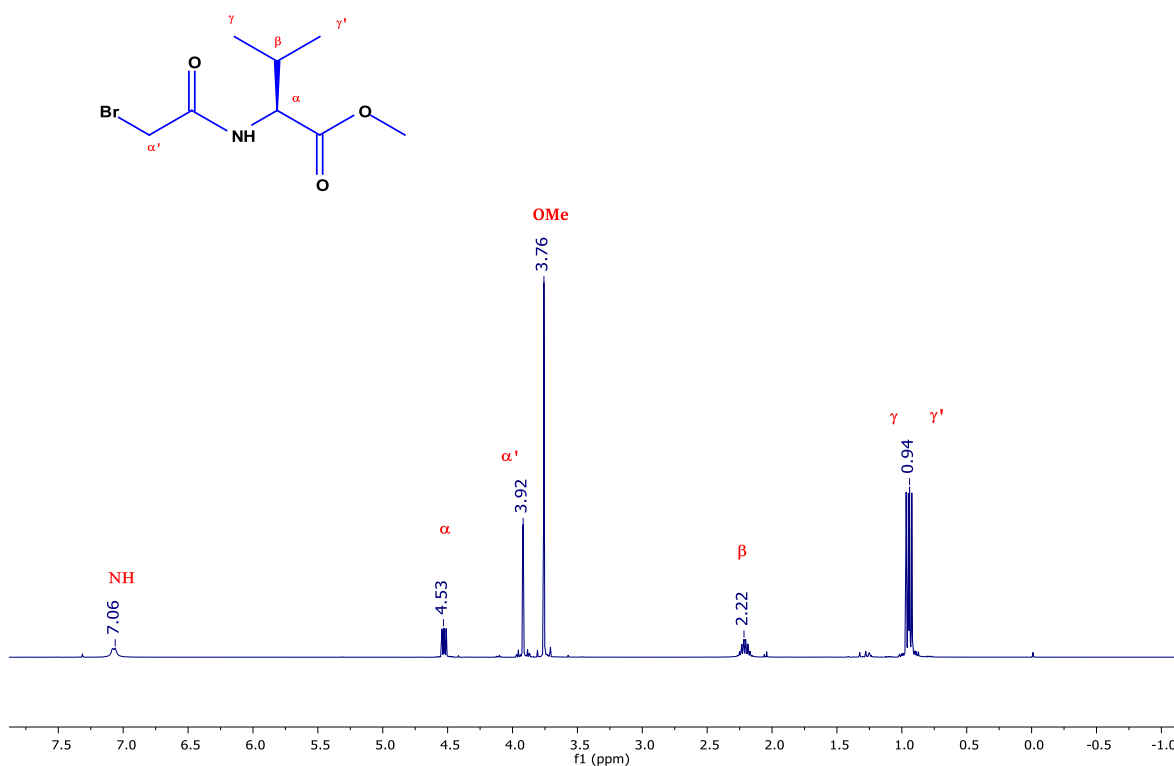
Tabla 3. Condiciones de reacción para la síntesis de α -bromoamida

EXPERIMENTO	CONDICIONES	TEMPERATURA (°C)	RENDIMIENTO (%)
6	CH ₂ Cl ₂ / 2 eq TEA	t.a.	trazas
7	CH ₂ Cl ₂ / 3 eq TEA	t.a.	--
8	CH ₂ Cl ₂ / 2 eq Na ₂ CO ₃	0-4	40
9	CH ₂ Cl ₂ / 2 eq Na ₂ CO ₃	t.a.	66
10	CH ₂ Cl ₂ , H ₂ O/2 eq Na ₂ CO ₃	t.a.	50

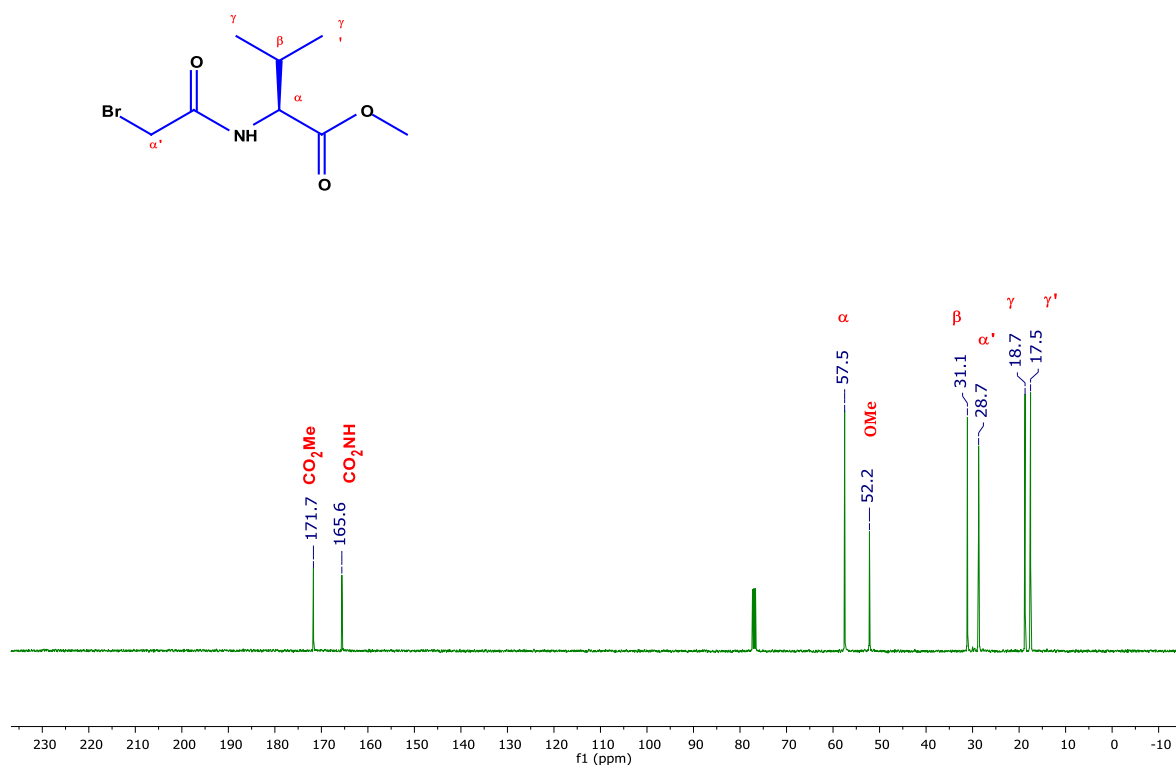
Posteriormente se realizó su caracterización mediante RMN de ¹H y ¹³C.

(S)-2-(2-bromoacetamida)-3-metilbutanoato de metilo (18)

En el espectro del compuesto **18** (Espectro 4) se observan 7 señales que integran para 13 protones. En 7.06 ppm como una señal doble ($J_{\text{NH-H}\alpha} = 8.6 \text{ Hz}$) se observa la señal del protón de la amida, la cual se acopla con el H_α que tiene un desplazamiento de 4.53 ppm, y se observa como una señal dd y en 2.22 ppm la señal correspondiente al H_β . Las señales simples en 3.92 y 3.76 ppm se asignaron a las absorciones de los protones $\text{H}_{\alpha'}$ y del metilo base oxígeno, mientras las dos absorciones dobles en 0.93 y 0.94 ppm corresponden a los dos metilos del grupo isopropilo.

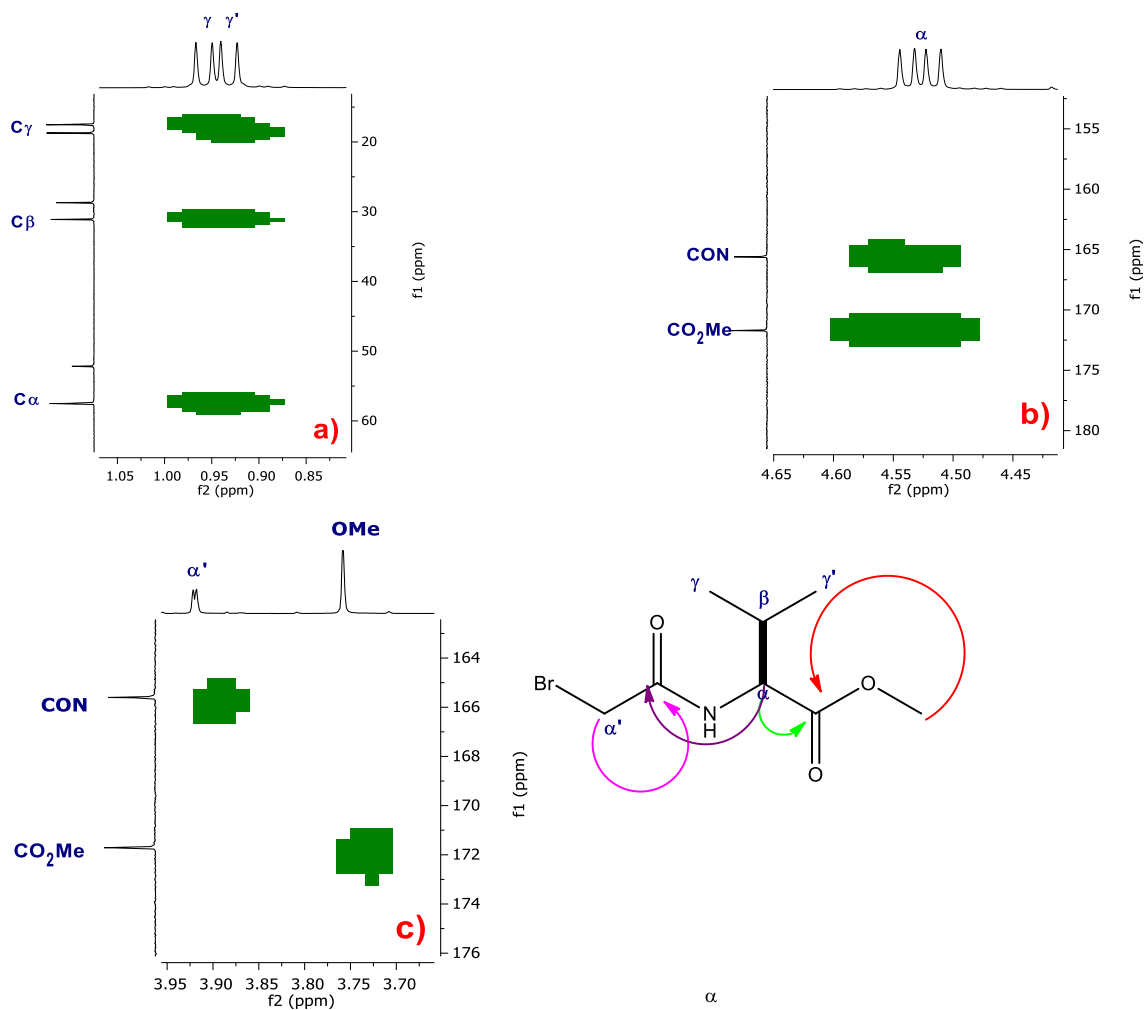
**Espectro 4. RMN de ^1H del compuesto 18**

En el espectro RMN de ^{13}C del compuesto **18** (Espectro 5) se observan 8 señales de carbonos diferentes. En 171.7 y 165.6 ppm se observan las señales de los carbonilos correspondientes al éster y a la amida. En 57.5 ppm se observa la señal del C_α y en 52.2 ppm la señal del metilo base oxígeno. Las señales que absorben a 31.1, 18.7 y 17.5 ppm se asignaron a los C_β , C_γ y $\text{C}_{\gamma'}$ respectivamente; mientras el $\text{C}_{\alpha'}$ tiene un desplazamiento de 28.7 ppm.



Espectro 5. RMN de ^{13}C del compuesto **18**

Mediante el experimento $g\text{HMBC}$ (Espectro 6) se puede corroborar la estructura de la molécula, a través de la correlación de la señal del protón H_α se confirma la conectividad de la molécula (inciso b), al observar que el protón H_α correlaciona con los carbonilos del éster y de la amida, lo cual corrobora que ambos fragmentos están unidos y el carbonilo que correlaciona con la señal del metilo base de oxígeno corresponde al éster y aquel que correlaciona con el $\text{H}_{\alpha'}$ (inciso c) corresponde al carbonilo de la amida.



Espectro 6. Experimento gHMBC compuesto **18**

Una vez obtenido el producto se procedió a realizar la alquilación del azol respectivo (Fig. 18) con la α -bromoamida (**18**), en presencia de Na_2CO_3 .

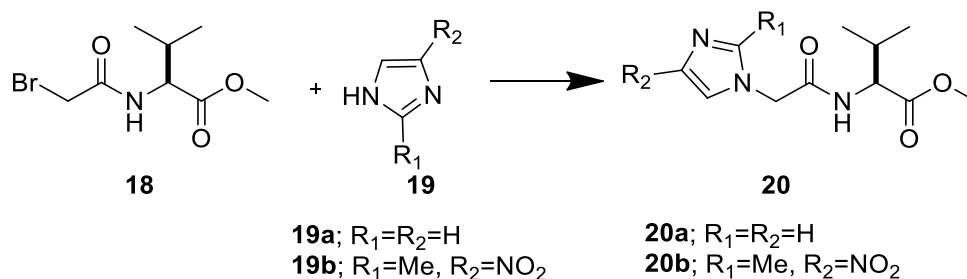


Figura 18. Síntesis del éster *N*-imidazolilacetilvalilmetílico (**20**)

Para la síntesis del compuesto (**20a**) se probaron dos metodologías en donde se modificó el disolvente de la reacción (Tabla 4). El mejor resultado se obtuvo con acetonitrilo con un rendimiento del 77% (experimento 12).

Tabla 4. Síntesis del éster imidazolilacetilvalilmetílico

EXPERIMENTO	DISOLVENTE	TIEMPO (h)	TEMPERATURA (°C)	RENDIMIENTO
11	CH_2Cl_2	24	t.a	60
12	CH_3CN	23	t.a	77

Finalmente, con las mejores condiciones de reacción se realizó la alquilación del respectivo derivado de imidazol con el derivado α -bromoamida (Tabla 5).

Tabla 5. Ésteres de imidazolilacetilvalilmetílicos

COMPUESTO	AZOL	RENDIMIENTO (%)
20a	1,3-imidazol	77
20b	2-metil-4-nitroimidazol	44

Los rendimientos variaron posiblemente debido a que el compuesto **20b** tiene un mayor impedimento estérico, además de que el grupo nitro le retira densidad electrónica al sistema aromático por efecto inductivo, lo que disminuye la

reactividad, reduciendo así, la formación del compuesto **20b**. Se comprobó que para el compuesto **20b** el regioisómero obtenido es el sustituido en la posición 1 del imidazol, esto se atribuye al impedimento estérico que existe en la posición dos y cuatro del heterociclo. Finalmente, se realizó la elucidación estructural mediante RMN ^1H y ^{13}C de ambos compuestos.

Al comparar los desplazamientos químicos en RMN de ^1H de los compuestos **20a** y **20b** (Tabla 6) no se observa una diferencia significativa para los protones que corresponden a la porción del grupo acetilvalilmetílico, solo difieren en los desplazamientos de los protones aromáticos debido a si el heterociclo esta sustituido o no. En el compuesto **20b** al estar disustituido solo se observa el desplazamiento del H-4 en 7.83 ppm, mientras en el compuesto **20a** al no tener sustituyentes se observan las tres señales de los protones de imidazol H-2, H-4, H-5. Además, en el compuesto **20b** se observa una señal extra en 2.43 ppm correspondiente al metilo del azol sustituido en la posición 2 dentro del heterociclo.

Tabla 6. Desplazamientos de RMN de ^1H de los compuestos **20a** y **20b**

	20a (δ)	20b (δ)
H-2	7.58 (1H, sa)	
H-4	7.18 (1H, d, $J=1.3$ Hz)	7.83 (1H, s)
H-5	7.03 (1H, d, $J=1.2$ Hz)	
NH	7.42 (1H, d, $J=8.6$ Hz)	7.11 (1H, d, $J=8.4$ Hz)
H$_{\alpha'}$	4.77 (2H, s)	4.77 (2H, s)
H$_{\alpha}$	4.52 (1H, dd, $J=8.6,$ $J=5.1$ Hz)	4.53 (1H, dd, $J=8.4,$ $J=5.1$ Hz)
OMe	3.75 (3H, s)	3.75 (3H, s)
H$_{\beta}$	2.16 (1H, m)	2.20 (1H, m)
H$_{\gamma}$	0.92 (3H, d, $J=7.1$ Hz)	0.94 (3H, d, $J=6.8$ Hz)
H$_{\gamma'}$	0.86 (3H, d, $J=6.9$ Hz)	0.89 (3H, d, $J=6.8$ Hz)
Me-2		2.43 (3H, s)

Al contrastar los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de los compuestos **20a** y **20b** (Tabla 7) en la región correspondiente a la parte alifática del aminoácido (57.0-18.0 ppm) las absorciones son similares. No se observan diferencias significativas en los desplazamientos de los carbonilos del éster y la amida (172.1 y 167.0-165.3 ppm, respectivamente). En la región de los aromáticos para el compuesto **20b** las absorciones de los C-2 y C-4 son muy cercanas posiblemente por efecto del grupo nitro que al disminuir la densidad electrónica desprotege al C-4 desplazándolo a campos altos. Además, se observa una señal extra en 13.0 ppm correspondiente al metilo sustituido en la posición dos del heterociclo en el compuesto **20b**.

Tabla 7. Desplazamientos de RMN de ^1H de los compuestos **20a** y **20b**

	20a (δ)	20b (δ)
CO₂Me	172.1	172.1
CON	167.0	165.3
C-2	138.1	146.2
C-4	130.5	146.3
C-5	119.7	121.6
C$_{\alpha'}$	49.9	49.4
C$_{\alpha}$	57.2	58.0
OMe	52.3	52.5
C$_{\beta}$	30.9	31.1
C$_{\gamma}$	19.1	19.1
C$_{\gamma'}$	17.9	17.9
Me-2		13.0

8.1.2 Síntesis de ésteres *N*-triazolilacetilvalilmetílicos

Para la síntesis de los ésteres *N*-triazolilacetilvalilmetílicos (Fig. 19), en un primer intento (experimento 13) se utilizó la metodología empleada para la síntesis del compuesto **20a**, sin embargo, no hubo reacción, por lo tanto, se hizo una modificación de las variables de disolvente y temperatura (Tabla 8).

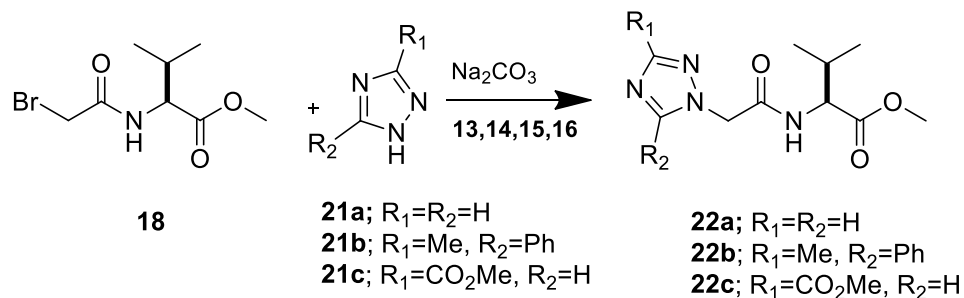


Figura 19. Síntesis del éster *N*-triazolilacetilvalilmetílico (**22**)

Tabla 8. Condiciones de reacción para la síntesis de éster *N*-triazolilacetilvalilmetílico (**22a**)

EXPERIMENTO	DISOLVENTE	TIEMPO (h)	TEMPERATURA (°C)	RENDIMIENTO (%)
13	CH ₃ CN	24	t.a.	NR
14	CH ₃ CN	6	60	85
15	DMSO	6	60	77

En el experimento **13** no existió la formación del compuesto **22a**, debido a que no hubo la suficiente energía de activación para llevar a cabo el ataque nucleofílico por parte del triazol, por lo tanto, al incrementar la temperatura se favoreció la activación del triazol (experimento 14).⁴⁴ Con el fin de incrementar el rendimiento de la reacción se modificó el tipo de disolvente aprótico polar, utilizando DMSO (experimento 15), sin embargo, este no fue mayor al experimento 14, de modo que las condiciones óptimas para la esta reacción S_N2 son las del experimento 14.

Finalmente, con las mejores condiciones de reacción se realizó la alquilación de la α -bromoamida con el respectivo derivado de triazol (Tabla 9).

Tabla 9. Ésteres triazolilacetilvalilmetílicos

Compuesto	Azol	Rendimiento (%)
22a	1,2,4-Triazol	85
22b	3-metil-5-fenil-1,2,4-triazol	17
22c	3-carboximetil-1,2,4-triazol	57

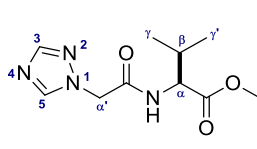
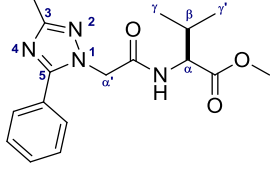
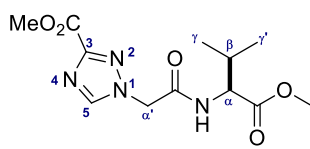
Los rendimientos decayeron al estar sustituido el heterociclo, mientras en el compuesto **22a** el rendimiento fue de 77%, en **22b** decayó a 17%, posiblemente por el impedimento estérico provocado por los sustituyentes y en **22c** debido a la presencia de un sustituyente electroatractor que disminuyó la reactividad del heterociclo, reduciendo la formación del producto.

Una vez obtenidos los compuestos se realizó su caracterización mediante RMN de ^1H y ^{13}C .

Confrontando los desplazamientos químicos de RMN de ^1H de los compuestos **22a-22c** (Tabla 10) se puede observar que no existe diferencia significativa en los desplazamientos químicos correspondientes al fragmento del acetilaminoéster. En la región aromática se observan las variaciones por efecto de los sustituyentes en el heterociclo. En el compuesto **22a** se observan 2 señales correspondientes a los protones H-3 y H-5 (8.28 y 8.07 ppm, respectivamente), mientras en el compuesto **22b** al estar 3,5 disustituido no se observa ninguna señal de protones aromáticos y en el compuesto **22c** al estar monosustituido en la posición tres solo se observa una señal correspondiente al protón H-5 (8.42 ppm). Además, en el compuesto **22b** se observan señales adicionales correspondientes a un metilo (2.53 ppm) y al grupo

fenilo (8.07-7.82 ppm). Para el compuesto **22c** la señal extra en 3.66 ppm corresponde al metilo base oxígeno sustituido en la posición tres del triazol.

Tabla 10. Desplazamientos de RMN de ^1H de los ésteres triazolilacetilvalilmetílicos

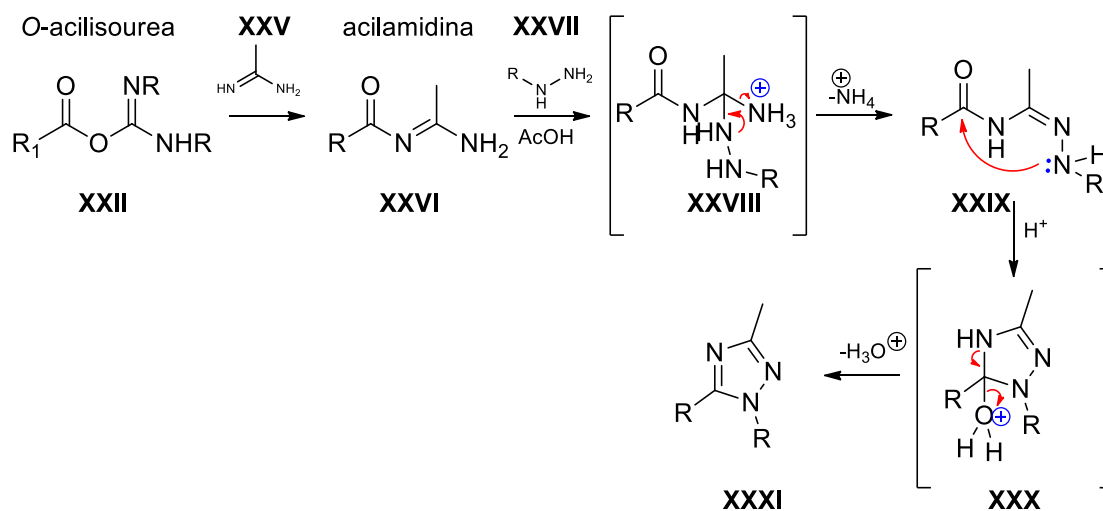
			
	22a (δ)	22b (δ)	22c (δ)
H-3	8.28 (1H, s)	--	
H-5	8.07 (1H, s)	--	8.42 (1H, s)
NH	7.14 (1H, d, $J=8.6$ Hz)	6.37 (1H, d, $J=8.6$ Hz)	7.39 (1H, d, $J=8.4$ Hz)
H$_{\alpha'}$	4.96 (2H, s)	4.86 (2H, s)	5.17 (1H, d, $J=16.3$ Hz),
H$_{\alpha}$	4.53 (1H, dd, $J=8.6$, $J=4.9$ Hz)	4.53 (1H, dd, $J=8.6$, $J=4.9$ Hz)	4.46 (1H, dd, $J=8.5$, 5.1 Hz)
OMe	3.73 (3H, s)	3.71 (3H, s)	3.92 (3H, s)
H$_{\beta}$	2.17 (1H, dh, $J=6.9$, $J=4.9$ Hz)	2.18 (1H, dh, $J=6.9$, $J=4.8$ Hz)	2.15 – 2.03 (1H, m)
H$_{\gamma}$	0.90 (3H, d, $J=6.9$)	0.91 (3H, d, $J=6.9$ Hz)	0.85 (1H, d, $J=6.8$ Hz)
H$_{\gamma'}$	0.86 (3H, d, $J=6.9$)	0.84 (3H, d, $J=6.9$ Hz)	0.81 (1H, d, $J=6.8$ Hz)
OMe-3			3.66 (3H, s)
Me-3		2.53 (3H, s)	
Ph		8.07 (1H, dd, $J=7.1$, 1.6 Hz), 7.86 – 7.79 (2H, m), 7.82 (2H, dd, $J=7.0$, 1.5 Hz)	

Analizando los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C de los compuestos **22a-22c** (Tabla 11) se pueden agrupar las absorciones correspondientes a los carbonilos del éster (δ 171.9-172.1) y el carbonilo de la amida (δ 165.1-165.9), de igual forma las señales en el segmento correspondiente al acetilaminoéster son muy similares; la señal del $\text{C}_{\alpha'}$ con desplazamiento de 51.3-52.4 ppm. Para el metilo base oxígeno en 52.4-52.9 ppm, entre 57.5-57.8 ppm el C_{α} , de 31.0-31.1 ppm C_{β} . Los C_{γ} y $\text{C}_{\gamma'}$

entre 19.0-19.1 ppm y en 17.7-17.8 ppm, respectivamente. En la región de los carbonos aromáticos al presentar diferentes sustituciones y por efecto de los sustituyentes los carbonos C-3 y C-5 se ven ligeramente afectados en cada compuesto. Además, en el compuesto **22b** se observan siete señales adicionales, seis carbonos de aromáticos correspondientes al grupo fenilo, y en 12.0 ppm la señal del metilo sustituido en la posición 3 del anillo aromático. En el compuesto **22c**, se observan dos señales adicionales; un carbonilo en 160.3 ppm y en 52.5 ppm un metilo base oxígeno que corresponde al éster presente en la posición tres del heterociclo.

Tabla 11. Desplazamientos en RMN de ^{13}C de los ésteres triazolilacetilvalilmetílicos

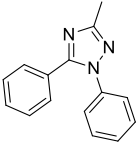
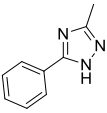
	22a (δ)	22b (δ)	22c (δ)
CO₂Me	172.0	171.9	172.1
CONH	165.6	165.9	165.1
C3-CO₂Me			160.3
C-3	152.9	154.6	154.7
C-5	144.9	161.8	146.6
Cα'	52.2	51.3	52.4
Cα	57.5	57.5	57.8
OMe	52.5	52.4	52.9
C3- CO₂Me			52.5
Cβ	31.1	31.1	31.0
Cγ	19.0	19.1	19.0
Cγ'	17.7	17.7	17.8
-Me		12.0	
Ph		132.1 (C1'), 129.6 (C2'), 128.7 (C4'), 127.5 (C5' C6'), 126.3 (C3')	



Esquema 8. Formación de triazol

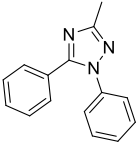
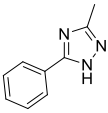
Comparando los desplazamientos de RMN de ¹H (Tabla 13) de los compuestos **21b** y **21d** existen señales muy similares, se observa en 2.5 ppm la señal correspondiente al metilo sustituido en la posición tres del heterociclo, en la región de los aromáticos para el compuesto **21d** y **21b** se observan señales múltiples, mientras para el **21d** integran para 10, para el **21b** integran para 5.

Tabla 13. Desplazamientos en RMN de ¹H de los triazoles 1,3,5 sustituidos

		
	21d	21b
CH₃	2.5	2.5
Ph	7.49-7.32 (10H, m)	8.07 (1H, dd, J=7.1, 1.6 Hz), 7.86-7.79 (1H, m), 7.82 (3H, m).

Al comparar los desplazamientos de RMN de ^{13}C (Tabla 14) de los compuestos **21d** y **21b** se observan señales similares debido a que solo difieren en la sustitución en la posición 1, para el compuesto **21d** se pueden apreciar las señales correspondientes a los dos anillos aromáticos, mientras para el compuesto **21b** se pueden ver un menor número de señales correspondientes al fenilo en la posición cinco además de las absorciones de los carbonos del heterociclo.

Tabla 14. Desplazamientos en RMN de ^{13}C de los triazoles 1,3,5 sustituidos

		
	21d	21b
CH₃	12.5.	14.0
Ph	131.9, 130.2, 129.2, 128.6, 127.5, 126.3, 77.5	138.3, 130.0, 129.5, 128.9, 128.8, 128.6, 128.0, 125.4
C2, C4	160.1, 155.8	160.9, 154.2

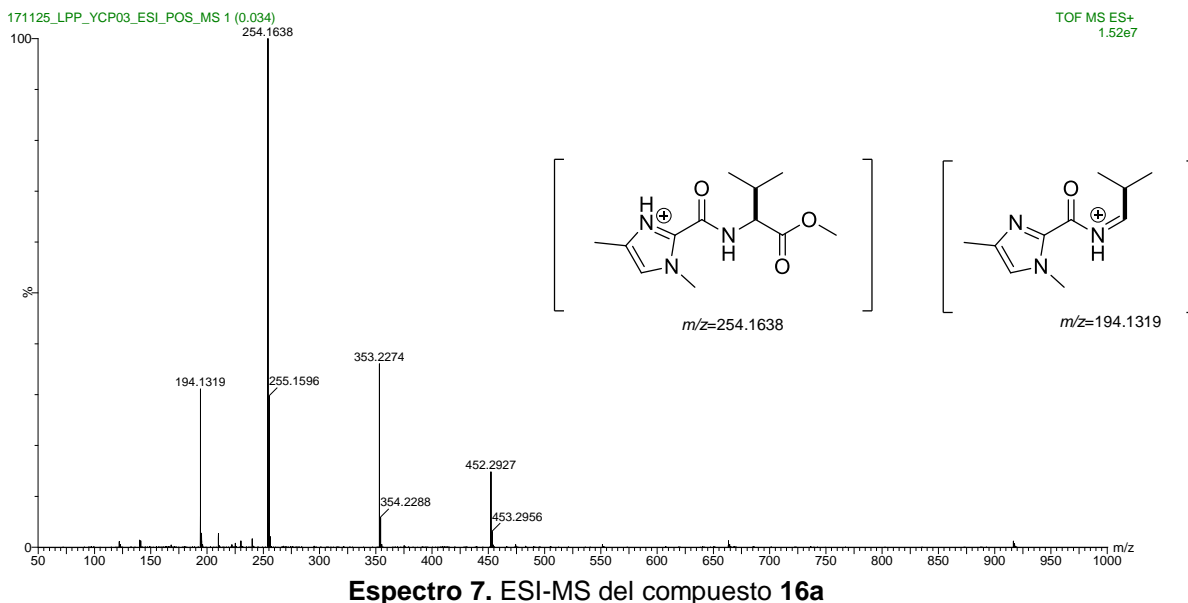
8.2 Espectrometría infrarroja (FTIR)

En la caracterización mediante espectroscopia infrarrojo (IR), se analizaron todos los compuestos y se determinó que el enlace carbonilo del éster presento absorciones en rangos de $1736\text{-}1731\text{ cm}^{-1}$, el enlace amida en el intervalo de $1671\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$, para lo derivados de triazol (**22a-22c**) se observaron las bandas de absorción de los enlaces C=C y -N=N del heterociclo en intervalos de $1551\text{-}1558\text{ cm}^{-1}$ y $1462\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$,⁴⁵ respectivamente. Para los derivados de imidazol (**16a**, **20a-20b**) se observaron las bandas del heterociclo en el rango de $1503\text{-}1508\text{ cm}^{-1}$,⁴⁶ además para el compuesto **20b** se observa la banda de absorción del grupo nitro en 1538 cm^{-1} .

8.3 Espectrometría Masas

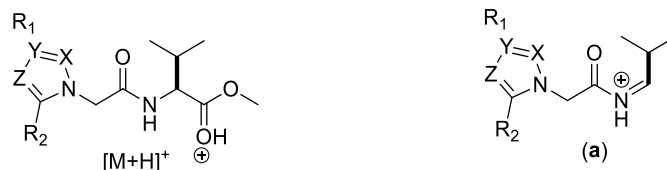
Dentro de los resultados, se obtuvieron fragmentaciones similares entre las familias de compuestos, por lo que se pudieron generalizar los patrones de fragmentación.

En el espectro ESI-MS del compuesto **16a** la masa calculada $[M+H]^+$ es de 254.1460 y la masa obtenida en modo positivo es de 254.1638 (Espectro 7), además, se puede ver como el compuesto se fragmenta en una especie con una relación m/z de 194.1319 que corresponde al ion iminio de la molécula.



Para todos los compuestos sintetizados se observó la formación del ion iminio, por lo tanto, pudieron agruparse (Tabla 15).

Tabla 15. ESI-MS de los compuestos sintetizados



20a; X=Y=Z=C, R₁=R₂=H
20b; X=Y=Z=C, R₁=Me, R₂=NO₂
22a; X=N, Y=C, Z=C, R₁=R₂=H
22b; X=N, Y=C, Z=C, R₁=Me, R₂=Ph
22c; X=N, Y=C, Z=C, R₁=COOMe, R₂=H

20a; X=Y=Z=C, R₁=R₂=H
20b; X=Y=Z=C, R₁=Me, R₂=NO₂
22a; X=N, Y=C, Z=C, R₁=R₂=H
22b; X=N, Y=C, Z=C, R₁=Me, R₂=Ph
22c; X=N, Y=C, Z=C, R₁=COOMe, R₂=H

	FÓRMULA MOLECULAR	MASA CALCULADA	[M+H] ⁺ m/z	[M-CO ₂ Me+ H] ⁺ (a)
16a	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₃	254.1397	254.1638	194.1319
20a	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃	240.1240	240.1353	180.1176
20b	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₅	299.1248	299.1355	239.1139
22a	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃	241.1193	241.1372	181.1146
22b	C ₁₇ H ₂₂ N ₄ O ₃	331.1662		
22c	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₅	299.1320	299.1352	239.1140

8.4 Evaluación antifúngica

Se evaluaron los seis compuestos sintetizados (**16a**, **20a**, **20b**, **22a-22c**), y dos de los ácidos de materia de partida (**23** y **24**, Tabla 16) frente a cepas de hongos filamentosos (*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium temperatum*, *Fusarium falciforme*) y levaduras (*Candida krusei*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*) mediante el método de microdilución en placa. Los resultados observados en la Tabla 15 se reportan en porcentajes de inhibición.

Tabla 16. Porcentajes de inhibición de los compuestos sintetizados

	16a	20a	20b	22a	22b	22c	23	24	FLU	ANF
A. f	44.3	-13.4	-20.6	-1.9	0.23	25.6	5.0	-2.5		67.0
F. t	-15	-11.2	-5.6	-7.5	-3.1	-11.7	-13	6	100.0	
F. f	-20.0	-6.0	3.0	-8.0	-9.0	-5.0	-2.9	9.5		68.0
C. k	-18.7	61.9	21.2	-25.4	22.7	3.4	-7.8	15.1	103.0	67.0
C. g	44.2	87.2	74.3	66.6	71.7	51.1	58.6	53.5	99.6	61.5
C. p	1.5	45.9	14.3	-4.3	24.5	12.8	-6.3	7.8	108.0	73.5
μM	2.5	2.7	2.1	2.6	1.9	2.2	4.5	5.0	2.1	0.7
clogP	1.3	0.4	0.6	-0.11	2.3	-0.56	0.6	-0.18		
MEL	-6.5	-6.2	-7.8	-6.2	-8.0	-6.9	-4.9	-4.7	-7.5	

FLU = Fluconazol; ANF = Anfotericina; MEL= Mejor Energía de pose del Ligando

A. f= *Aspergillus fumigatus*, F.t= *Fusarium temperatum*, F. f=*Fusarium falciforme*, C. k= *Candida krusei*, C. g=*Candida glabrata*, C. p= *Candida parapsilosis*; μM=μmol/L

En la evaluación frente a los hongos filamentosos el compuesto **16a** fue el más activo frente *A. fumigatus* al tener un 44.3% de inhibición, seguido del compuesto **22c** con un 25.6 % de inhibición (Tabla 16). Ninguno de los compuestos presento actividad frente a las cepas de *F. temperatum* y *F. falciforme*.

Los mejores resultados de inhibición del crecimiento fúngico por los compuestos sintetizados son frente a las levaduras, mayormente la cepa de *C. glabrata*, siendo el compuesto **20a** el que mostro mayor actividad antifúngica al ser activo sobre las

tres cepas de levaduras en donde se evaluó. Además, el compuesto **22b** fue el más activo frente a *Candida glabrata* al presentar el mayor porcentaje de inhibición (71.7 %) a una menor concentración (1.93 μM). Comparando ambos compuestos se observó que la adición de un nitrógeno (se incrementa la densidad electrónica) y una mayor lipofilidad o impedimento estérico disminuye la selectividad hacia la inhibición de *C. glabrata* (Fig. 20), además la afinidad enzimática aumenta de -6.2 kcal/mol (**20a**) a -8.0 kcal/mol (**22b**) lo que indica una mejor afinidad del compuesto por el sitio activo de la enzima CYP51.⁴⁷

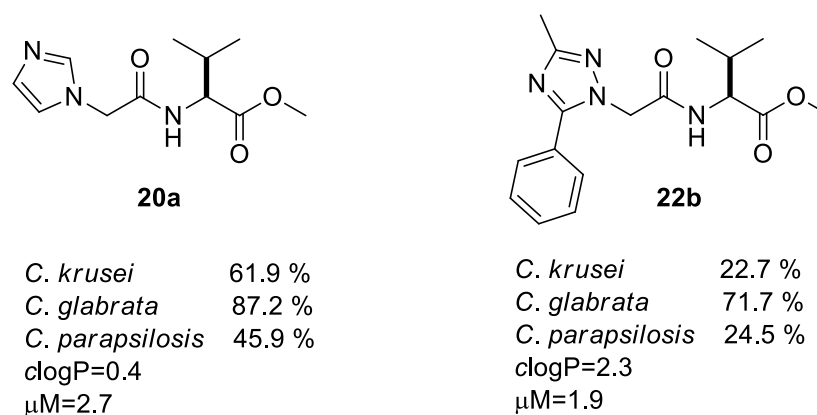


Figura 20. Comparación de la actividad inhibitoria entre el compuesto **20a** y **22b**

Ésteres imidazolilacetilvalilmetílicos

Los dos derivados de imidazol (Fig. 21) mostraron actividad antifúngica frente a las levaduras, siendo el compuesto **20a** el que mostro una mayor actividad al ser activo sobre las tres cepas evaluadas, sin embargo, el compuesto **20b** es el más activo debido a que utiliza menor concentración que **20a** y se mostró selectivo frente a *C. glabrata*. Se observa el efecto de la inserción del grupo nitro con la posibilidad de formar tres puentes de hidrógeno en el sitio activo y con ello aumenta de forma moderada la actividad, además la afinidad enzimática aumenta de -6.2 en **20a** a -7.8 en **20b**.

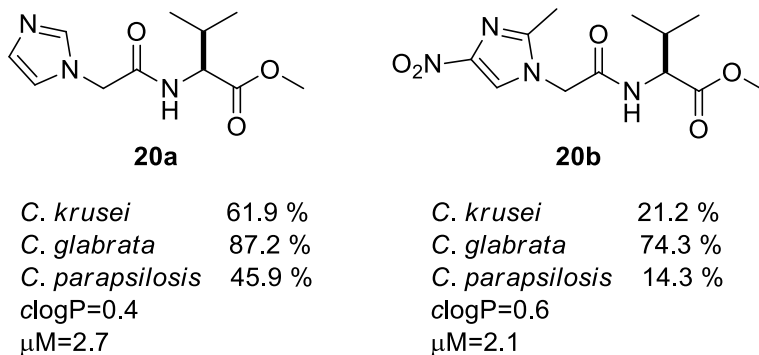


Figura 21. Comparación de la actividad inhibitoria entre los compuestos **20a** y **20b**

Ésteres triazolilacetilvalilmetílicos

Comparando la actividad de los derivados de triazol (Fig. 22), es notorio como al aumentar la lipofilicidad en el anillo de triazol **22b** (2.26) incrementa el porcentaje de inhibición frente a *Candida glabrata* contrastando con el compuesto sin sustituyentes **22a** (-0.10) y el compuesto **22c** (-0.56) en donde la presencia de un sustituyente electroattractor disminuye la actividad (**22b** vs **22c**), esto posiblemente debido a la composición en la membrana fúngica, al ser más lipofílico el compuesto **22b** es más fácil su permeabilidad a través de ella.⁴⁸ De igual forma, se puede mencionar que el anillo aromático también le proporciona lipofilicidad y la nube π para formar enlaces tipo π - π , que podrían ser factores que hicieron este cambio en la selectividad de estos compuestos.

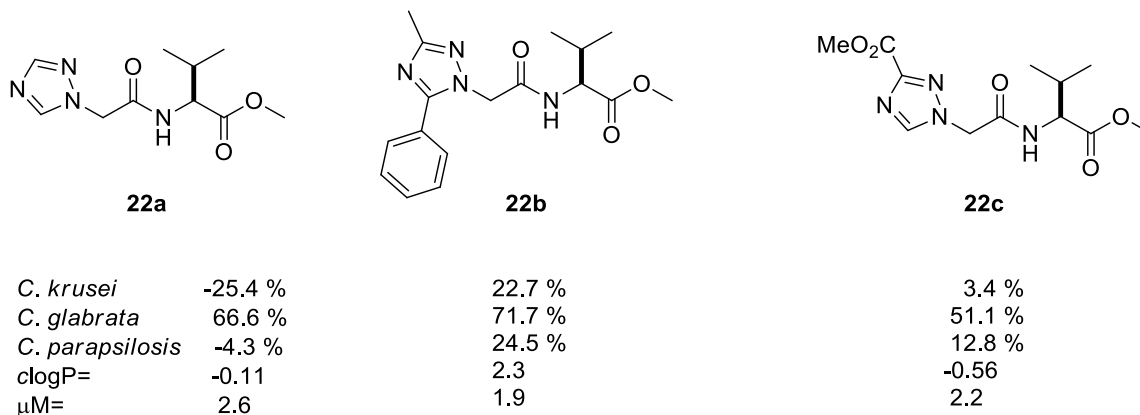


Figura 22. Comparación de la actividad inhibitoria de los compuestos **22a-22c**

Finalmente, comparando la concentración del compuesto **16a** (2.52 μ M) con su materia de partida **23** (4.56 μ M), se aprecia de forma notable como el residuo de amino ácido potencia la actividad del ácido, siendo más activo el compuesto **16a** frente a las cepas de *C. glabrata* y *A. fumigatus* (Fig. 23). Esto probablemente se deba a que se está llenando una cavidad hidrofóbica, donde el grupo isopropilo está insertado, y además se pueden estabilizar con cuatro posibles puentes de hidrógeno a partir del carbonilo y la amida.

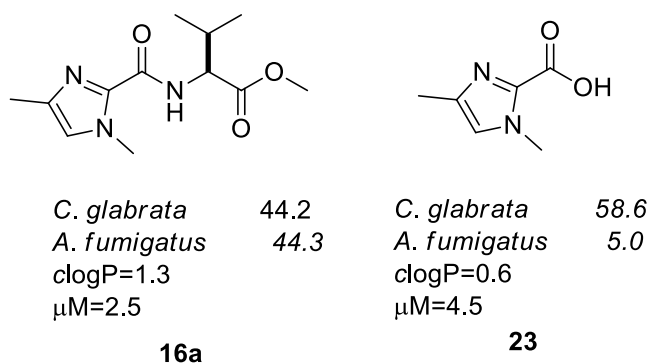


Figura 23. Comparación entre el compuesto **16a** y **23**

8.5 Estudios de acoplamiento molecular

Posteriormente con el objetivo de analizar los datos biológicos obtenidos para los derivados sintetizados, se llevó a cabo un estudio de modelado molecular a fin de investigar la posible interacción de tales compuestos con el citocromo P51, esterol-14 α -desmetilasa (CYP51).

La proteína se extrajo con el ligando voriconazol de la base de datos (Fig. 24) y se eliminó el agua. Para la validación del sitio activo con el programa autodock-vina es necesario obtener el RMSD (desviación media cuadrática de la raíz) menor o igual a 2Å, en esta parte, se probaron diferentes aproximaciones con cajas de 60, 50, 40, 30, 25 y 20 Å, con un total de 1000 modos, con las coordenadas de los aminoácidos que muestran interacción entre el sitio activo y el ligando;

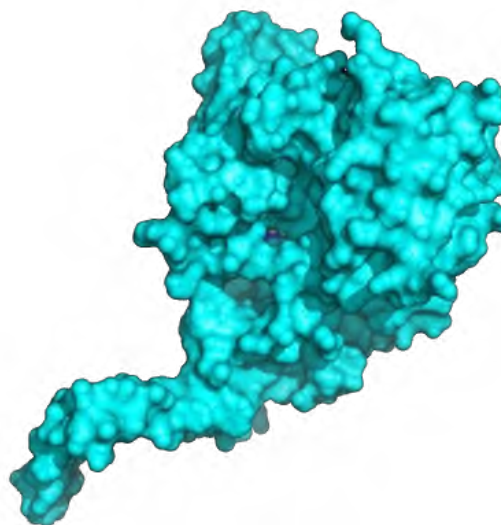
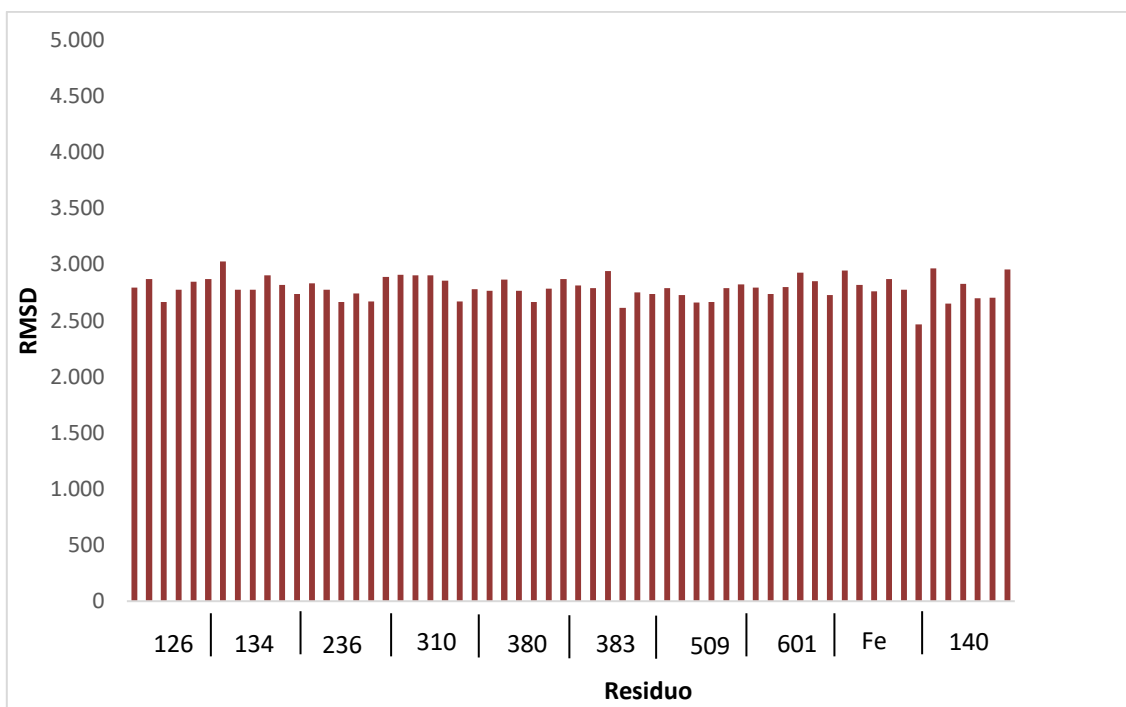


Figura 24. Enzima CYP51 (PDB:5HS1)

el mejor resultado fue con la coordenada con el residuo LEU383 (X=99.164 ,Y=7.494, Z=21.682) en una caja de 30 Å con un RMSD de 2.26 (Fig. 25). Se decidió utilizar este valor de RMSD porque el voriconazol (ligando cristalizado) de forma espacial y de densidad electrónica es similar al cristalizado, como se pueden observar claramente en la Figura 26. Una vez obtenida la validación posteriormente, se realizó la optimización de la geometría de las moléculas, donde los mínimos de energía de todos los compuestos sintetizados y las materias primas fueron evaluados con autodock-vina para encontrar la interacción del ligando con la proteína y optimizados con 1000 conformeros o modos de interacciones, para finalmente determinar el mejor conformero de la molécula y su interacción con el sitio activo de la enzima.

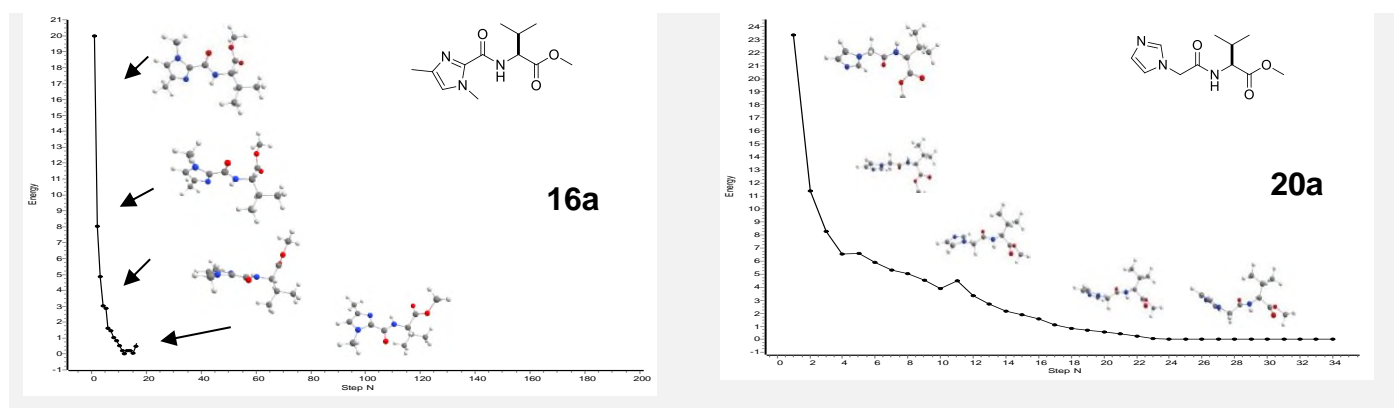


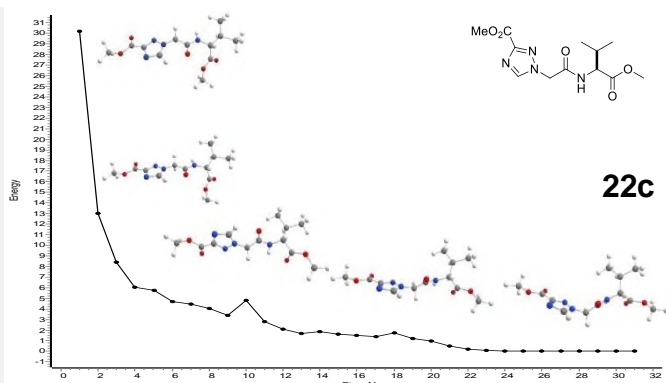
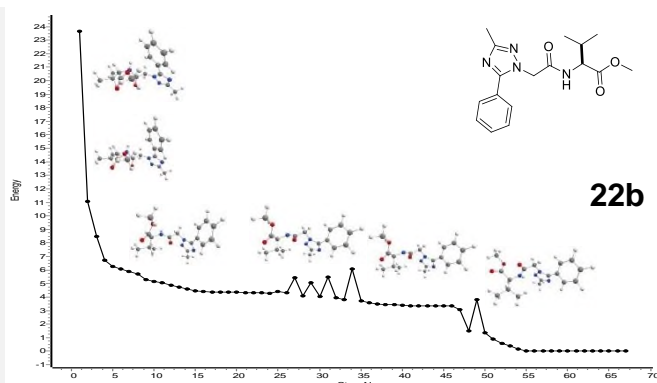
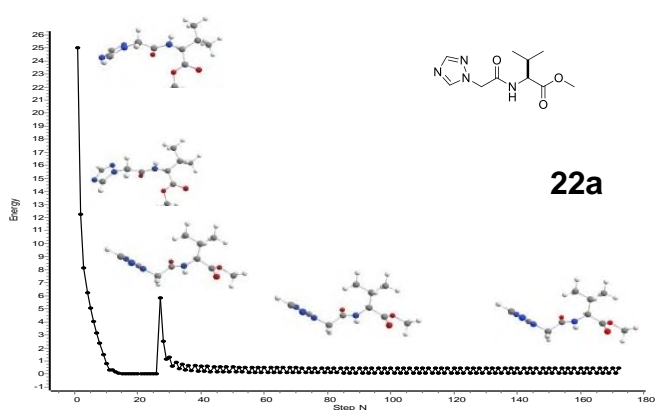
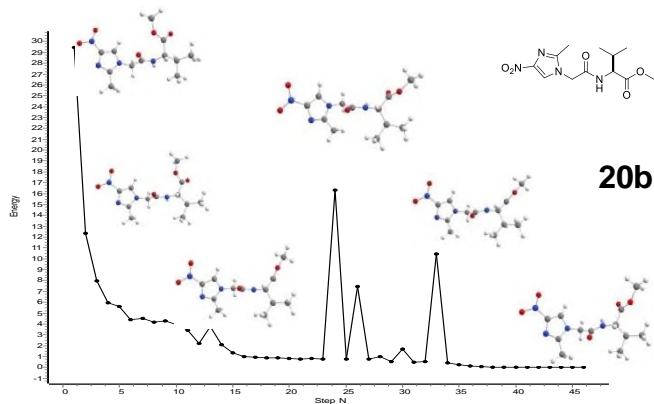
8.5.1 Optimización de la geometría

La optimización de la geometría es un paso importante en el modelado molecular ya que su objetivo es localizar un mínimo de energía potencial superficial de la estructura química y de esta forma obtener la geometría molecular más estable (mínimo global). El cálculo de la optimización de geometría de las estructuras sintetizadas, se llevaron a cabo en el programa Gaussian versión 09, con un nivel de teoría DFT utilizando un funcional híbrido de correlación B3LYP y con un conjunto de base 6-31G(p).

A todos los compuestos se les realizó la optimización de la geometría (Tabla 17), se observa como la conformación y los ángulos de enlace cambian durante la optimización, en un primer punto la energía es la máxima debido a que todos los grupos voluminosos están cercanos; el ángulo diedro entre los protones H_{α} -NH cambia de una conformación -anticlinal a una conformación +anticlinal. Observando la conformación a través del protón H_{α} se ve como la energía disminuye cuando los grupos voluminosos (isopropilo, éster e imidazol) se alejan. Finalmente, las estructuras optimizadas se pueden corroborar de forma experimental a través de las constantes de acoplamiento, la cual proporciona información acerca del ángulo diedro, por mencionar, el ángulo diedro experimental entre $NH-H_{\alpha}$ ($J=8.6$ Hz) es de 150° .

Tabla 17. Curvas de energía de optimización de los compuestos





Este comportamiento se ve en todas las optimizaciones, también se observa que en las curvas de energía los ángulos diedros rotaron con el fin de alejar entre sí los grupos voluminosos y disminuir el impedimento estérico y además por efectos electrónicos. El ángulo diedro entre los carbonilos paso de un ángulo -anticlinal a un ángulo antiperiplanar en las estructuras optimizadas. El ángulo diedro entre el H_{α} - H_{α}' cambio de -anticlinal a +sinclinal, esto se ve reflajado en la conformación que adoptó la molécula en la optimización.

Asimismo, en la optimización de la estructura del compuesto **22a**; el ángulo diedro entre H_{α}' - H_{α} paso de un ángulo -sinclinal a -anticlinal. También, observando el ángulo diedro entre H_{α}' - H_4 paso de una conformación -anticlinal a una antiperiplanar, en la optimización a excepción del compuesto **22b**, en donde el ángulo diedro de los carbonilos mostró una diferencia comparado con los otros compuestos, el ángulo entre ellos se mantuvo como sinperiplanar.

8.5.2 Acoplamiento molecular

Finalmente, obtenida la validación del sitio activo y la optimización de la geometría en los compuestos, se realizó el estudio de acoplamiento molecular, la cual es una técnica computacional utilizada para explorar el posible modo vinculante que se produce entre una pequeña molécula con una proteína o un determinado receptor.⁴⁹ En este caso se realizó la proyección virtual de los compuestos antifúngicos de ambas series contra el modelo de homología de la proteína CYP51. Las enzimas CYP comparten un sitio activo lipofílico enterrado profundo que tiene un cofactor hemo que contiene hierro.

Los compuestos con mayor porcentaje de inhibición: **20a**, **20b** y **22b**, tienen interacciones en común con algunos residuos en el sitio activo (Fig. 27, Tabla 18), como interacciones tipo π -sigma (morado) con el complejo hemoglobina A:601, sigma-sigma con Ile A:139 (rosa), alquil-alquil con Tyr A:140 (rosa). Además, la mayoría de los compuestos mostraron una interacción de puente de hidrógeno con el residuo Gly A:314 (verde), la parte del aminoácido hizo contacto hidrofóbico con grupos alifáticos de las cadenas laterales de los residuos como: Met A: 509, Ile A:139, Tyr A:140, el complejo hemoglobina A:509 y en los compuestos **20a** y **22a** interacción π -sigma con el residuo Tyr A:126.

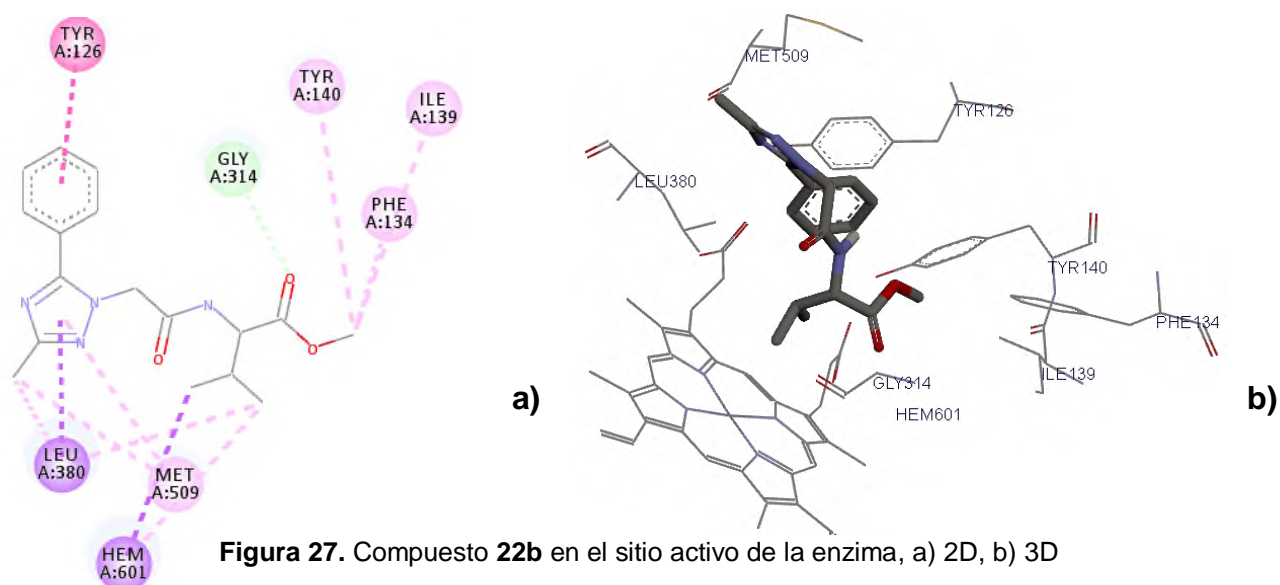
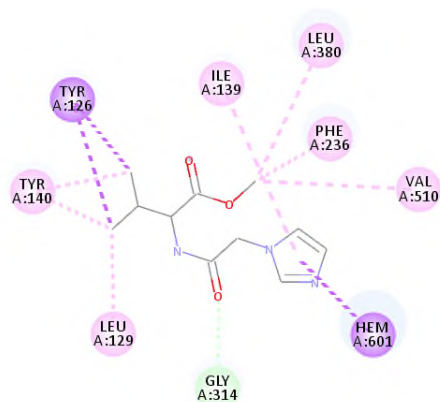


Figura 27. Compuesto **22b** en el sitio activo de la enzima, a) 2D, b) 3D

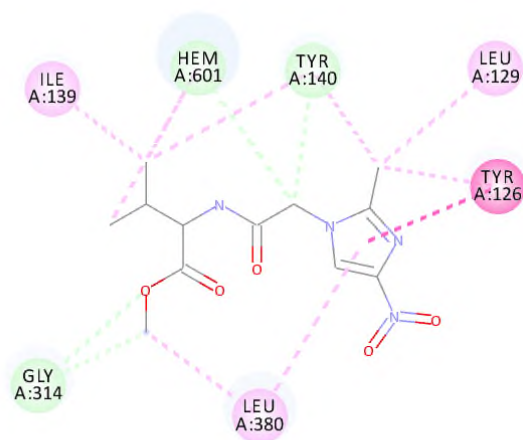
Aquellos compuestos con sustituyentes que proporcionaron lipofilidad a la molécula fueron más activos que los que no tenían sustituyentes o grupos electroattractores; como los compuestos **20b** y **22b**, el anillo de fenilo del compuesto **22b** está situado en una región lipófila e interactúa que los sustituyentes mostraron interacción π - π (Tabla 18) y sigma-sigma. Por otro lado, las interacciones que mostraron los heterociclos en el sitio activo fueron interacciones π - π y π -sigma con los residuos Tyr A:126, el complejo hemoglobina A:601 y Leu A:380

Tabla 18. Interacciones de los compuestos sintetizados en el sitio activo de la enzima CYP51

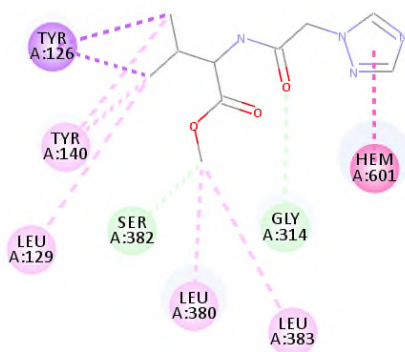
Compuesto **20a** en el sitio activo



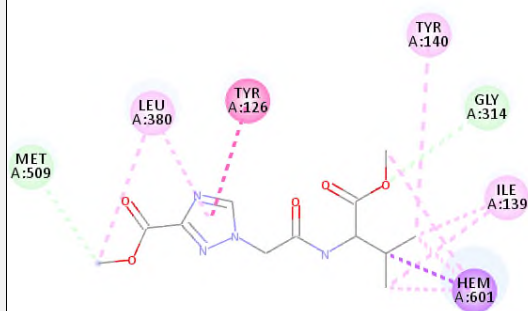
Compuesto **20b** en el sitio activo



Compuesto **22a** en el sitio activo



Compuesto **22c** en el sitio activo



Con base en los datos obtenidos del acoplamiento molecular, se observó que los compuestos (**16a**, **20b**, **22a-22c**) no mostraron la interacción del nitrógeno tres del imidazol y triazol con el átomo de hierro del grupo hemo presente en el sitio activo de la enzima, como se describe en la literatura para los derivados de este tipo de compuestos,⁵⁰⁻⁵³ por lo tanto, se puede proponer que se debe a las interacciones del constituyente del aminoácido con el sitio activo de la enzima y pensar que este tipo de derivados mostrarían una menor toxicidad al coordinarse con el hierro del grupo hemo. Esta interacción se presenta en los fármacos derivados de azoles de uso clínico y conduce a efectos adversos debido al complejo de coordinación que resulta.

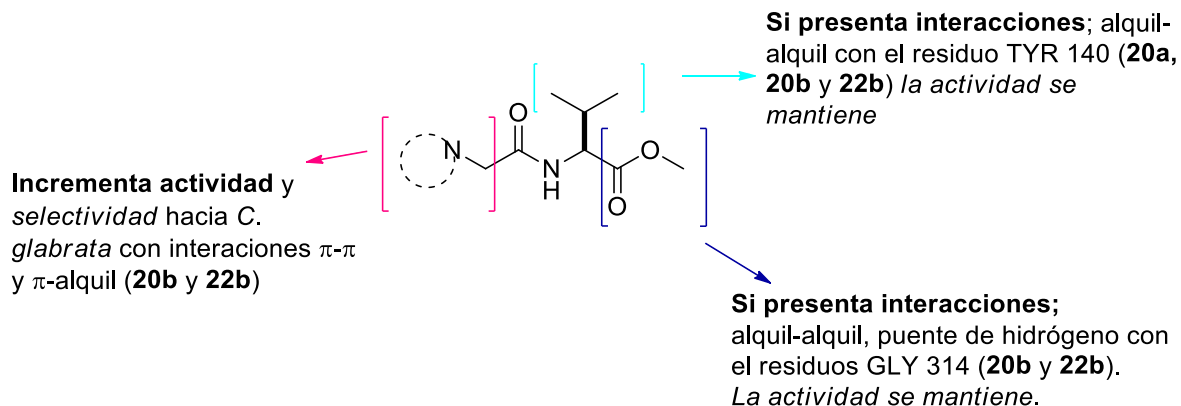


Figura 28. Relación estructura-actividad

En el análisis de la relación entre la actividad biológica-acoplamiento molecular; se observa que la actividad antifúngica se debe a las interacciones alquil-alquil o interacciones π - π y π -alquil entre los compuestos y el sitio activo de la enzima,^{54,55} Además para mantener la actividad fungicida el carbonilo del éster debe tener un puente de hidrógeno con el residuo Gly 314 (**20b** y **22b**), y la parte ramificada del aminoácido debe mostrar interacción alquil-alquil con el residuo Tyr 140 (**20a**, **20b** y **22b**) (Fig. 28).

Finalmente tomando todos los resultados observados en estos posibles modos de interacción de los compuestos sintetizados con el sitio activo de la enzima, podrían ser un punto de partida para la explicación de las actividades fungicidas contra

cepas de *C. glabrata* encontradas en los compuestos **20a** y **22b**, con respecto a la actividad fungistática de fluconazol contra las mismas levaduras. Estos datos muestran que estas nuevas estructuras moleculares presentes en los compuestos **20a** y **22b** son adecuadas, para la generación de análogos antifúngicos con posible.

IX. CONCLUSIONES

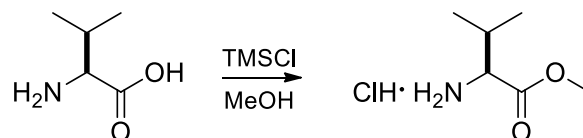
Se sintetizaron cinco compuestos *N*-alquilados (**20a**, **20b**, **22a-22c**) de imidazol y/o triazol con el derivado bromado del éster de valina, con rendimientos del 17% hasta un 85 % y un *N*-acilado **16a**, obtenido mediante acoplamiento de un ácido con el éster de valina con rendimiento 67%, también se sintetizaron dos triazoles **21b** y **21d** 1,3,5-sustituidos con rendimientos de 40 y 45%, respectivamente.

Todos los compuestos sintetizados se evaluaron mediante el método de microdilución en placa, frente a hongos filamentosos (*A. fumigatus*, *F. temperatum* y *F. falciforme*) y levaduras (*C. krusei*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*). Sólo el compuesto **16a** mostró inhibición frente a hongos filamentosos (*A. fumigatus* 44.3%), mientras que todos los compuestos mostraron inhibición frente a levaduras, específicamente *C. glabrata*, siendo los más activos; **20a**, **20b** y **22b**. Los compuestos con sustituyentes lipofílicos (**20b** y **22b**) mostraron mayor actividad fungicida en menor concentración micromolar en *Candida glabrata* comparados con los que no tenían sustituyentes (**20a** y **20b**) o con sustituyentes electroattractores (**22c**). Además, se confirmó que el residuo de aminoácido potencia la actividad biológica de una molécula bioactiva (**16a** vs **23**).

Asimismo, en el docking molecular con la enzima CYP51 se pudo corroborar el tipo de interacciones que mostraron los compuestos más activos, y se puede proponer que para mantener la actividad fungicida la molécula debe tener: (1) tener interacciones en el isopropilo de aminoácido tipo alquil-alquil con el residuo Tyr 140 (**20a**, **20b** y **22b**), (2) mostrar interacción de puente de hidrógeno por parte del éster con el residuo Gly 314 (**20b** y **22b**), además que los sustituyentes en el respectivo heterociclo deben de presentar interacciones tipo π -alquil y π - π con los residuos Tyr 126, el complejo hemoglobina 601 y Leu 380 (**20b** y **22b**). Finalmente, esto permite proponer la hipótesis que este tipo de interacciones podría ser lo que permite una mayor inhibición hacia la cepa de *C. glabrata*. El estudio de esta enzima y las estructuras evaluadas podría contribuir en el diseño de nuevas moléculas bioactivas como agentes antifúngicos frente a levaduras.

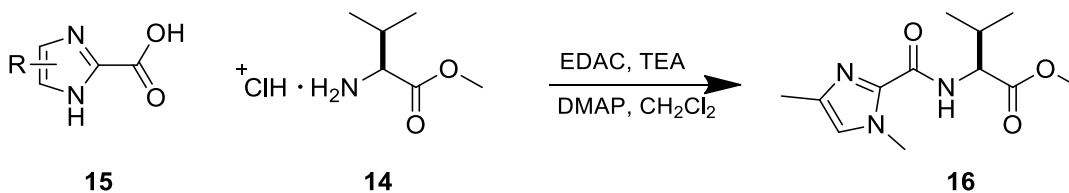
X. PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del éster valilmetílico (**14**)



En un matraz de bola de 50 mL provisto con agitación magnética, se colocó valina (17.15 mmol, 1 eq) y se le agregó cloruro de trimetilsilano (34.14 mmol, 2 eq). 5 minutos después se agregó 5 mL de metanol y se dejó en agitación 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se colocó en el rotavapor y se llevó a sequedad. El producto de reacción se analizó por RMN y ESI-MS y se utilizó sin posterior purificación.⁴¹

(S)-2-(1,4-dimetil-1H-imidazol-2-carboxamida)-3-metilbutanoato de metilo (**16**)



En un matraz de bola de 50 mL acondicionado con agitación magnética se colocó una mezcla del α -aminoéster (0.71 mmol, 1 eq), derivado de ácido (0.71 mmol, 1 eq), dimetilaminopiridina (DMAP catalítico) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC, 1.07 mmol, 1.5 eq), se disolvió en 10 mL diclorometano (CH_2Cl_2) a temperatura ambiente, a la mezcla de reacción se le agregó trietilamina (TEA, 1.42 mmol, 2 eq) en una sola porción. La reacción se dejó en agitación durante toda la noche, a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se diluyó con CH_2Cl_2 (30 mL) y se trató con una solución saturada de cloruro de amonio (NH_4Cl , 10 mL), se extrajo la fase orgánica y la fase acuosa se trató con CH_2Cl_2

(3x20 mL). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se evaporó el disolvente en un rotavapor con alto vacío; a la mezcla de reacción se le realizó una cromatografía en capa fina (CCF) en un sistema de diferentes disolventes orgánicos (las proporciones van a variar en función a la polaridad de cada reacción). El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna en un sistema de hexano/acetona (5:5) y se analizó por RMN.

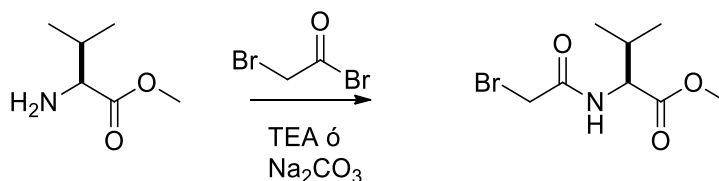
Experimento 2: En un matraz provisto de agitación se colocó el ácido (0.71 mmol, 1 eq), EDAC (1.07 mmol, 1.5 eq), DMAP (catalítico), en CH_2Cl_2 (5 mL) y se mantuvo a una temperatura de 0-4 °C durante 2 h, hasta que se formó el intermediario O-acilisourea, transcurrido ese tiempo se agregó *in situ*, el aminoéster (0.71 mmol, 1 eq) y TEA (1.42 mmol, 2 eq) y se dejó a temperatura ambiente toda la noche, transcurrido ese tiempo se diluyó con CH_2Cl_2 (30 mL) y se trató con una solución saturada de cloruro de amonio (NH_4Cl , 10 mL), se extrajo la fase orgánica y la fase acuosa se trató con CH_2Cl_2 (3x20 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), el disolvente se evaporó en un rotavapor con alto vacío. La mezcla de reacción se analizó por cromatografía en capa fina (CCF) en un sistema de hexano/acetona (5:5). El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna en un sistema de hexano/acetona (5:5) y se analizó por RMN.

Experimento 3: En un matraz provisto de agitación se adicionó el aminoéster (0.71 mmol, 1 eq) y TEA (1.42 mmol, 2 eq) durante 4 horas, hasta el término de la liberación de la amina, posteriormente se hizo una extracción, la fase acuosa se trató con CH_2Cl_2 (3x15 mL) y las fases orgánicas se reunieron y se evaporaron a sequedad. Posteriormente en otro matraz se adicionó la mezcla del ácido (0.71 mmol, 1 eq), EDAC (1.07 mmol, 1.5 eq), DMAP (catalítico), en CH_2Cl_2 (5 mL), la reacción se mantuvo a una temperatura de 0-4 °C durante 2 h, hasta que se terminó la materia prima, después se agregó la amina libre y se dejó en agitación durante 12 h, transcurrido ese tiempo se trató con una solución de cloruro de amonio (NH_4Cl , 10 mL), se extrajo la fase orgánica y la fase acuosa se le realizaron

3 extracciones con CH_2Cl_2 (3x15 mL). Se reunieron las fases orgánicas y se llevaron a sequedad en un rotavapor, posteriormente el producto se purificó mediante cromatografía en columna en un sistema de hexano/acetona (5:5) y se analizó mediante RMN.

Experimento 4: : En un matraz provisto de agitación se colocó el ácido (0.71 mmol, 1 eq), EDAC (1.07 mmol, 1.5 eq), DMAP (catalítico), en CH_2Cl_2 (5 mL) y se mantuvo a una temperatura de 0-4 °C durante 2 h, hasta que se formó el intermediario O-acilisourea, transcurrido ese tiempo se agregó *in situ*, el aminoéster (0.71 mmol, 1 eq) y TEA (1.42 mmol, 2 eq) y se dejó a temperatura ambiente durante 24 h, transcurrido ese tiempo se diluyó con CH_2Cl_2 (30 mL) y se trató con una solución saturada de cloruro de amonio (NH_4Cl , 10 mL), se extrajo la fase orgánica; la fase acuosa se trató con CH_2Cl_2 (3x20 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), el disolvente se evaporó en un rotavapor con alto vacío. La mezcla de reacción se analizó por cromatografía en capa fina (CCF) en un sistema de hexano/acetona (5:5). El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna y se analizó por RMN.

(S)- 2-(2-bromoacetamida)-3-metilbutanoato de metilo (**20**)



Experimento 6: En un matraz provisto de agitación se adicionó la mezcla del aminoéster (1.19 mmol, 1 eq), TEA (2.4 mmol, 2 eq) y el bromuro de bromoacetilo (1.3 mol, 1.1 eq) en CH_2Cl_2 (8 mL) y se dejó en agitación durante toda la noche. Se hizo un tratamiento con Na_2CO_3 y una extracción con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se reunieron y se concentraron, posteriormente se purificó por cromatografía en

columna en un sistema de hexano/AcOEt (7:3). Finalmente, el producto purificado se analizó por RMN.

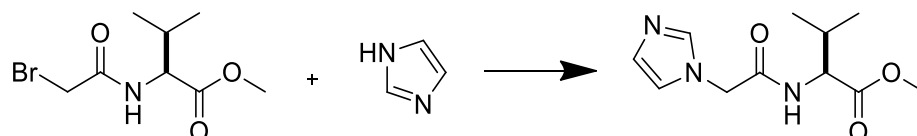
Experimento 7: En un matraz provisto de agitación se adicionó la mezcla del aminoéster (1.19 mmol, 1 eq), TEA (3.57 mmol, 3 eq) y el bromuro de bromoacetilo (1.3 mol, 1.1 eq) en CH_2Cl_2 (8 mL) y se dejó en agitación durante toda la noche. Se hizo un tratamiento con Na_2CO_3 y una extracción con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se reunieron y se concentraron, posteriormente se purificó por cromatografía en columna en un sistema de hexano/AcOEt (7:3). Finalmente se analizó por RMN.

Experimento 8: En un matraz provisto de agitación se adicionó la mezcla de aminoéster (1.19 mmol, 1 eq), Na_2CO_3 (2.39 mmol, 2 eq) en CH_2Cl_2 (8 mL), la reacción se enfrió entre 0-4 °C y posteriormente se adicionó el bromuro de bromoacetilo (1.3 mmol, 1.1 eq), la reacción se mantuvo así durante 2 horas, posteriormente se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se trató con agua (15 mL) y se le hicieron tres extracciones de CH_2Cl_2 (15 mL), las fases orgánicas se reunieron y se concentraron, posteriormente, se purificaron por cromatografía en columna en un sistema de hexano/AcOEt (7:3).

Experimento 9: En un matraz provisto de agitación se adicionó la mezcla del aminoéster (1.19 mmol, 1 eq), Na_2CO_3 (2.39 mmol, 2 eq) y el bromuro de bromoacetilo (1.3 mmol, 1.1 eq), la reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se hizo un tratado con agua y 3 extracciones con 15 mL de CH_2Cl_2 , se concentraron las fases orgánicas y se purificaron mediante cromatografía en columna en un sistema de hexano/AcOEt (7:3).

Experimento 10: En un matraz provisto de agitación se adicionó la mezcla del aminoéster (1.19 mmol, 1 eq), Na_2CO_3 (2.39 mmol, 2 eq) y el bromuro de bromoacetilo (1.3 mmol, 1.1 eq) en un sistema de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (3:2), la reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se hizo un tratado con agua y 3 extracciones con CH_2Cl_2 de 15 mL, las fases orgánicas se concentraron y se purificaron mediante cromatografía en columna en un sistema de hexano/AcOEt (7:3).

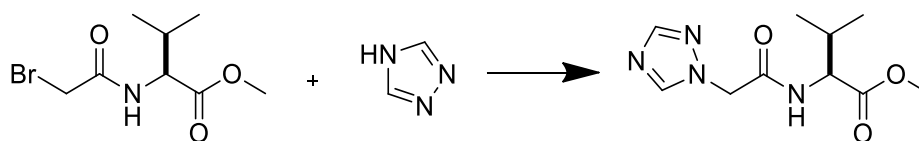
(S)- 2-(2-(1*H*-imidazol-1-il)acetamido)-3-metilbutanoato de metilo (**20**)



Experimento 11: En un matraz provisto de agitación se adiciono la mezcla del α -bromoamida (0.99 mmol, 1 eq), imidazol, (1.08 mmol, 1.1 eq), Na_2CO_3 (1.98 mmol, 2 eq) en CH_2Cl_2 (5 mL), se mantuvo a agitación durante 24 h a temperatura ambiente. ³⁴ Transcurrido ese tiempo se diluyo con CH_2Cl_2 (10 mL), y se hizo un tratamiento con agua y 3 extracciones con CH_2Cl_2 (3x15 mL), las fases orgánicas se reunieron y se purificaron mediante cromatografía en columna en un sistema AcOEt/metanol (8:2).

Experimento 12: En un matraz provisto de agitación se adicionó la mezcla del α -bromoamida (0.99 mmol, 1 eq), imidazol, (1.08 mmol, 1.1 eq), Na_2CO_3 (1.98 mmol, 2 eq) en acetonitrilo (7 mL), se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se diluyó con CH_2Cl_2 (10 mL), se trató con agua y se le realizaron 3 extracciones con CH_2Cl_2 (3x15 mL), las fases orgánicas se reunieron y se purificaron mediante cromatografía en columna en un sistema AcOEt/metanol (8:2).

(S)- 2-(2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)acetamido)-3-metilbutanoato de metilo (**22**)

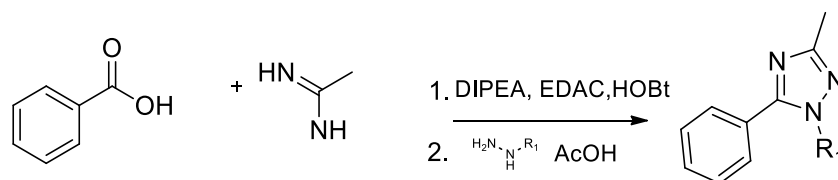


Experimento 13: En un matraz provisto de agitación se adicionó la mezcla del α -bromoamida (0.99 mmol, 1 eq), triazol, (1.08 mmol, 1.1 eq), Na_2CO_3 (1.98 mmol, 2 eq) en acetonitrilo (7 mL), se mantuvo a agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se diluyó con CH_2Cl_2 (10 mL), se hizo un tratamiento con agua y 3 extracciones con CH_2Cl_2 (3x15 mL), las fases orgánicas se reunieron y se purificaron mediante cromatografía en columna en un sistema AcOEt/metanol (8:2).

Experimento 14: En un matraz provisto de agitación se adicionó la mezcla del α -bromoamida (0.99 mmol, 1 eq), triazol, (1.08 mmol, 1.1 eq), Na_2CO_3 (1.98 mmol, 2 eq) en acetonitrilo (7 mL), se mantuvo a agitación durante 6 h a 60 °C. Transcurrido ese tiempo se diluyó con CH_2Cl_2 (10 mL), y se trató con agua (20 mL) y 3 extracciones con CH_2Cl_2 (3x15 mL), las fases orgánicas se reunieron y se purificaron mediante cromatografía en columna.

Experimento 15: En un matraz provisto de agitación se adicionó la mezcla del α -bromoamida (0.99 mmol, 1 eq), triazol, (1.08 mmol, 1.1 eq), Na_2CO_3 (1.98 mmol, 2 eq) en DMSO (7 mL), se mantuvo a agitación durante 6 h a 60 °C. Finalmente, se diluyó con CH_2Cl_2 (10 mL), y se trató con agua (20 mL) y 3 extracciones con hexano/AcOEt (1:9) (3x15 mL), las fases orgánicas se reunieron y se purificaron mediante cromatografía en columna.

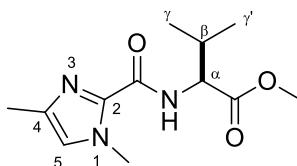
Síntesis de 1,2,4 triazoles 1,3,5 sustituidos (26)



Experimento 16: En un matraz provisto de agitación se agregó una mezcla de ácido benzoico (8.25 mmol, 1 eq), acetamidina (12.38 mmol, 1.5 eq), EDAC (9.07 mmol, 1.1 eq), HOBt (9.07 mmol, 1.1 eq), DIPEA (24.95 mmol, 3 eq) en 30 mL de DMF y se mantuvo en agitación durante 6 h a temperatura ambiente, posteriormente se

adicionó ácido acético (82.56 mmol, 10 eq) y la hidrazina correspondiente (12.38 mmol, 1.5 eq), la reacción se calentó hasta 80 °C y se mantuvo a temperatura constante durante 5 h, posteriormente se diluyó con hexano/AcOEt (1:9) 50 mL, la reacción se trató con una solución saturada de NaHCO₃ (50 mL). Se extrajo la fase orgánica y la fase acuosa se trató con hexano/AcOEt (1:9) (3x50 mL). Las fases orgánicas se reunieron y concentraron en un rotavapor. Finalmente, se el producto se purificó por cromatografía en columna en un sistema hexano/AcOEt (5:5) y se analizó mediante RMN.

(S)-2-(1,4-dimetil-1H-imidazol-2-carboxamida)-3-metilbutanoato de metilo (**16a**)



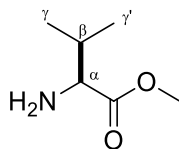
El compuesto **16a** se sintetizó mediante la metodología del experimento 4, se purificó mediante cromatografía en columna en un sistema hexano/acetona (1:1) y se obtuvo un aceite amarillo con un rendimiento del 67 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.58 (1H, s, H-4), 6.34 (1H, d, $J_{\text{NH-H}\alpha}$ =8.6 Hz, NH), 4.72 (1H, dd, $J_{\text{H}\alpha\text{-NH}}$ =8.6 Hz, $J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$ =4.6 Hz, H α), 3.83 (3H, s, 4-Me), 3.79 (3H, s, OMe), 2.53 (3H, s, 1-Me), 2.29 (1H, dh, $J_{\text{H}\beta\text{-H}\alpha}$ =4.7 Hz, $J_{\text{H}\beta\text{-H}\gamma}$ =6.8 Hz, H β), 1.02 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta}$ =6.8 Hz, H γ), 0.98 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma'\text{-H}\beta}$ =6.8 Hz, H γ').

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ: 172.6 (CO₂Me), 160.8 (CON), 139.6 (C-2, C-4), 122.7 (C-5), 57.2 (C α), 52.5 (OMe), 34.6 (1-Me), 31.4 (C β), 19.2 (C γ), 18.0 (C γ'), 14.7 (4-Me).

IR (cm⁻¹) = 1734 (CO₂Me), 1646 (CONH), 1556, 1508

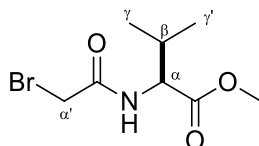
ESI-MS: 252.1638 [M+H]⁺, 194.1319 [M+H-CO₂Me]⁺

(S)-2-amino-3-metilbutanoato de metilo (14)

El compuesto **14** se sintetizó mediante la general para el éster de valina, se utilizó sin posterior purificación con un rendimiento del 90%. Se obtuvo como un polvo semiblanco.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.90 (1H, d, $J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}=4.4$ Hz, H_α), 3.76 (3H, s, OMe), 2.41 (1H, dh, $J_{\text{H}\beta\text{-H}\alpha}=7.0$ Hz, $J_{\text{H}\beta\text{-H}\gamma}=4.4$ Hz, H_β), 1.09 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta}=7.1$ Hz, H_γ), 1.07 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta}=6.8$ Hz, H'_γ).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ : 168.9 (CO_2Me), 58.7 (C_α), 53.0 (OMe), 30.0 (C_β), 18.5 (C_γ), 18.4 (C'_γ).

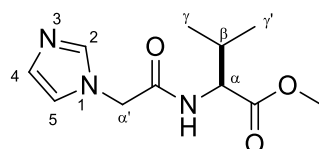
(S)-2-(2-bromoacetamida)-3-metilbutanoato de metilo (18)

El compuesto **18** se obtuvo mediante la metodología del experimento 9, y se purificó en un sistema de disolventes hexano/AcOEt (7:3). Se obtuvo como un sólido blanco, con un rendimiento del 66 %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.10 (1H, d, $J_{\text{NH-H}\alpha}=8.5$ Hz, NH), 4.77 (3H, s, $\text{H}_{\alpha'}$), 4.54 (1H, dd, $J_{\text{H}\alpha\text{-NH}}=8.8$ Hz, $J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}=4.9$ Hz, H_α), 3.77 (3H, s, OMe), 2.22 (1H, dh, $J_{\text{H}\beta\text{-H}\gamma}=6.8$ Hz, $J_{\text{H}\beta\text{-H}\alpha}=4.9$ Hz, H_β), 0.97 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta}=6.9$ Hz, H_γ), 0.94 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta}=6.9$ Hz, H'_γ).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ : 171.9 (CO_2Me), 165.8 (CON), 57.7 (C_α), 52.4 (OMe), 31.3 ($\text{C}_{\alpha'}$), 28.9 (C_β), 18.9 (C_γ), 17.7 ($\text{C}_{\gamma'}$).

(S)-2-(2-(1H-imidazol-1-il)acetamida)-3-metilbutanoato de metilo (**20a**)



El compuesto **20a** se sintetizó mediante la metodología del experimento 12, se purificó mediante cromatografía en columna en un sistema AcOEt/metanol (8:2), y se obtuvo como un aceite amarillo con un rendimiento del 77 %.

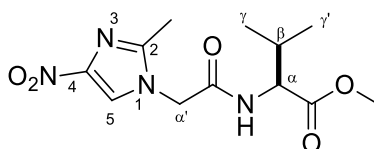
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.64 (1H, m), 7.42 (1H, d, $J_{\text{NH-H}\alpha}$ =8.6 Hz), 7.14 – 7.05 (2H, m), 4.74 (2H, s, $\text{H}_{\alpha'}$), 4.50 (1H, dd, $J_{\text{H}\alpha\text{-NH}}$ =8.6 Hz, $J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$ =5.1 Hz, H_α), 3.72 (3H, s, OMe), 2.22 – 2.11 (1H, m, H_β), 0.91 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta}$ =7.1 Hz, H_γ), 0.85 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma'\text{-H}\beta}$ =6.9 Hz, $\text{H}_{\gamma'}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.1 (CO_2Me), 167.0 (CON), 138.1 (C-2), 129.4 (C-4), 120.2 (C-5), 57.6 (C_α), 52.4 (OMe), 49.9 ($\text{C}_{\alpha'}$), 30.9 (C_β), 19.1 (C_γ), 17.9 ($\text{C}_{\gamma'}$).

IR (cm^{-1}) = 1737 (CO_2Me), 1670 (CONH), 1538 (NO₂), 1503.

ESI-MS: 240.1353 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 180.1176 [$\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2\text{Me}$]⁺.

(S)-2-(2-(2-metil-4-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida)-3-metilbutanoato de metilo (**20b**)



El compuesto **20b** se sintetizó mediante la metodología del experimento 12, se purificó mediante cromatografía en columna en un sistema hexano/AcOEt: (3:7), y se obtuvo como un polvo blanco con un rendimiento del 44 %.

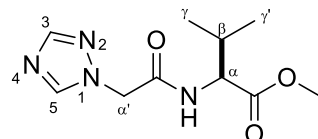
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.83 (1H, s, H-5), 7.10 (1H, d, $J_{\text{NH-H}\alpha}$ = 8.4 Hz, NH), 4.77 (2H, s, $\text{H}_{\alpha'}$), 4.55 (1H, dd, $J_{\text{H}\alpha\text{-NH}}$ = 8.4 Hz, $J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$ = 5.1 Hz, H_{α}), 3.75 (3H, s, OMe), 2.43 (3H, s, 2-Me) 2.27 – 2.16 (1H, m, H_{β}), 0.95 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta}$ = 6.8 Hz, H_{γ}), 0.90 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma'\text{-H}\beta}$ = 6.8 Hz, $\text{H}_{\gamma'}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.1 (CO_2Me), 165.3 (CON), 146.3 (C-4), 146.2 (C-2), 121.6 (C-5), 58.0 (C_{α}), 52.5 (OMe) 49.4 ($\text{C}_{\alpha'}$), 31.1 (C_{β}), 19.1 (C_{γ}), 17.9 ($\text{C}_{\gamma'}$), 13.0 (2-Me).

IR (cm^{-1}) = 1750 (CO_2Me), 1667 (CONH), 1540.

ESI-MS: 299.1355 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 239.1139 [$\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2\text{Me}$] $^+$.

(S)-2-(2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)acetamido)-3- metilbutanoato de metilo (**22a**)



El compuesto **22a** se sintetizó mediante la metodología del experimento 14, se purificó mediante cromatografía en columna en un sistema AcOEt/metanol (95:5) y se obtuvo como un aceite amarillo con un rendimiento del 85%.

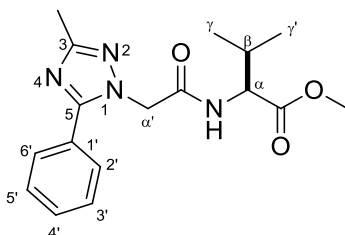
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.28 (1H, s, H-3), 8.07 (1H, s, H-5), 7.14 (1H, d, $J_{\text{NH-H}\alpha}$ = 8.6 Hz, NH), 4.96 (2H, s, $\text{H}_{\alpha'}$), 4.53 (1H, dd, $J_{\text{H}\alpha\text{-NH}}$ = 8.6 Hz, $J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$ = 4.9 Hz, H_{α}), 3.73 (3H, s, OMe), 2.17 (1H, dh, $J_{\text{H}\beta\text{-H}\gamma}$ = 6.9 Hz, $J_{\text{H}\beta\text{-H}\alpha}$ = 4.9 Hz, H_{β}), 0.90 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta}$ = 6.9 Hz, H_{γ}), 0.86 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma'\text{-H}\beta}$ = 6.9 Hz, $\text{H}_{\gamma'}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.0 (CO_2Me), 165.6 (CON), 152.9 (C-3), 144.9 (C-5), 57.5 (C_α), 52.5 (OMe), 52.2 ($\text{C}_{\alpha'}$), 31.1 (C_β), 19.0 (C_γ), 17.7 ($\text{C}_{\gamma'}$).

IR (cm^{-1}) = 1735 (CO_2Me), 1671 (CONH), 1548, 1509, 1440.

ESI-MS: 241.1372 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 181.1146 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2\text{Me}]^+$.

(S)-2-(2-(3-metil-5-fenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)acetamida)3-metilbutanoato de metilo (**22b**)



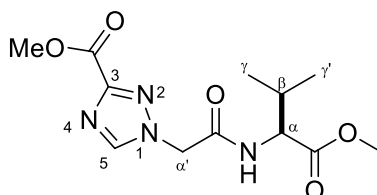
El compuesto **22b** se sintetizó mediante la metodología del experimento 14, se purificó mediante cromatografía en columna en un sistema hexano/ AcOEt (7:3), y se obtuvo como un aceite amarillo rendimiento del 17%.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.07 (1H, dd, $J=7.1$ Hz, 1.6 Hz), 7.86 – 7.79 (1H, m), 7.43-7.38 (3H, m), 6.37 (1H, d, $J_{\text{NH}-\text{H}_\alpha}=8.6$ Hz), 4.86 (2H, s, $\text{H}_{\alpha'}$), 4.53 (1H, dd, $J_{\text{H}_\alpha-\text{NH}}=8.6$ Hz, $J_{\text{H}_\alpha-\text{H}_\beta}=4.9$ Hz, H_α), 3.71 (3H, s, OMe), 2.53 (3H, s, 3-Me), 2.18 (1H, dh, $J_{\text{H}_\beta-\text{H}_\gamma}=6.9$ Hz, $J_{\text{H}_\beta-\text{H}_\alpha}=4.8$ Hz, H_β), 0.91 (3H, d, $J_{\text{H}_\gamma-\text{H}_\beta}=6.9$ Hz, H_γ), 0.84 (3H, d, $J_{\text{H}_{\gamma'}-\text{H}_\beta}=6.9$ Hz, $\text{H}_{\gamma'}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ : 171.9 (CO_2Me), 165.9 (CON) 161.8 (C-5), 154.6 (C-3), 132.1 (C-1'), 129.6 (C-2'), 128.7 (C-4'), 127.5 (C-5' C-6'), 126.3 (C-3'), 57.5 (C_α), 52.4 (OMe), 51.3 ($\text{C}_{\alpha'}$), 31.1 (C_β), 19.1 (C_γ), 17.7 ($\text{C}_{\gamma'}$), 12.0 (3-Me).

IR (cm^{-1}) = 1737 (CO_2Me), 1666 (CONH), 1521.

(S)-2-(2-(3-metoxicarbonil-1H-1,2,4-triazol-1-il)acetamida)-3-metilbutanoato de metilo(**22c**)



El compuesto **22c** se sintetizó mediante la metodología del experimento 14, se purificó mediante cromatografía en columna en un sistema hexano: AcOEt/MeOH (6:3.5:0.5), y se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 57 %.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.42 (1H, s, H-5), 7.39 (1H, d, $J_{\text{NH-H}\alpha}=8.4$ Hz, NH), 5.17–5.06 (2H, m, $\text{H}_{\alpha'}$), 4.46 (1H, dd, $J_{\text{H}\alpha\text{-NH}}=8.5$ Hz, $J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}=5.1$ Hz, H_{α}), 3.92 (3H, s, OMe), 3.66 (3H, s, 3-OMe), 2.15 – 2.03 (1H, m, H_{β}), 0.85 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma\text{-H}\beta}=6.8$ Hz, H_{γ}), 0.81 (3H, d, $J_{\text{H}\gamma'\text{-H}\beta}=6.8$ Hz, $\text{H}_{\gamma'}$).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 172.1 (CO_2Me), 165.1 (3- CO_2Me), 160.3 (CON), 154.7 (C-5), 146.6 (C-3), 57.8 (C_{α}), 52.9 (OMe), 52.5 (3-OMe), 52.4 ($\text{C}_{\alpha'}$), 31.0 (C_{β}), 19.0 (C_{γ}), 17.8 ($\text{C}_{\gamma'}$).

IR (cm^{-1}) = 1730 (CO_2Me), 1665 (CONH), 1551, 1462, 1212.

ESI-MS: 299.1352 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 239.1140 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2\text{Me}]^+$.

XI. REFERENCIAS

1. Manzano-Gayosso, P.; Méndez-Tovar, L. J.; Hernández-Hernández, F.; López-Martínez, R. *Gac. Med. Mex.* **2008**, *144*, 23–26.
2. Espinel-Ingroff, A. *Rev. Iberoam. Micol.* **2008**, *25*, 101–106.
3. Enoch, D. A.; Ludlam, H. A.; Brown, N. M. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 809–818.
4. Gregorí Valdés, B. S. *Rev. Cuba. Farm.* **2005**, *39*, 15–30.
5. Prakasha, K. C.; Raghavendra, G. M.; Harisha, R.; Gowda, C. D. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2011**, *3*, 120–125.
6. Al-harbi, R. A. K.; Abdel-rahman, A. A. *Acta Pol. Pharm.* **2012**, *69*, 917–925.
7. Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136–147.
8. Pontón, J. *Rev. Iberoam. Micol.* **2008**, *25*, 78–82.
9. Valiante, V.; Macheleidt, J.; Föge, M.; Brakhage, A. A. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–12.
10. Diomedi P., A. *Rev. Chil. Infect.* **2004**, *21*, 89–101.
11. Belloso, W. H. *Rev. Hosp. Ital. B. Aires* **2009**, *29*, 102–111.
12. Gago Badenas, F. Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. In *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía I. Diseño de Medicamentos.*; 1994; pp. 253–327.
13. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *46*, 3–25.
14. Ghersi, D.; Sanchez, R. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *74*, 417–424.

15. Reddy, A.; Srinivas, P.; Priyadarshini, S.; Kumar, P. P.; Pradeep, H. N.; Sastry, G. N. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2007**, *8*, 329–51.
16. Padilla-Zuñiga, J. A.; Dominguez-Rojo, A. *Mensaje Bioquim.* **2002**, *XXVI*, 129–145.
17. Schulz-Gasch, T.; Stahl, M. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 231–239.
18. Velásquez, M.; Drosos, J.; Gueto, C.; Márquez, J.; Vivas-Reyes, R. *Rev. Colomb. Química* **2013**, *42*, 101–124.
19. Espinel-ingroff, A.; Cantón Lacasa, E.; Martín Mazuelos, E. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). In *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*; Revista Iberoamericana de Micología, 2004; p. 15a–1–15a–17.
20. Alman, A. A.; Jadhav, P. S.; Chimkode, R. M. *Int. J. Pharm. Pharm. Res.* **2017**, *10*, 354–366.
21. Verma, A.; Joshi, S.; Singh, D. *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1–12.
22. Shalini, K.; Sharma, P.; Kumar, N. *Chem. Sin.* **2010**, *1*, 36–47.
23. Bhatnagar, A.; Sharma, P. K.; Kumar, N. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **2011**, *3*, 268–282.
24. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10837–10838.
25. Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. *Nature* **2011**, *480*, 471–479.
26. Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
27. Moussebois, C. H.; Heremans, J. F.; Osinski, P.; Rennerts, W. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1340–1343.
28. Hameurlaine, A.; El-Sayed, W. A.; Abdel-Rahman, A. A. H. *Monatshefte fur Chemie* **2008**, *139*, 1507–1511.

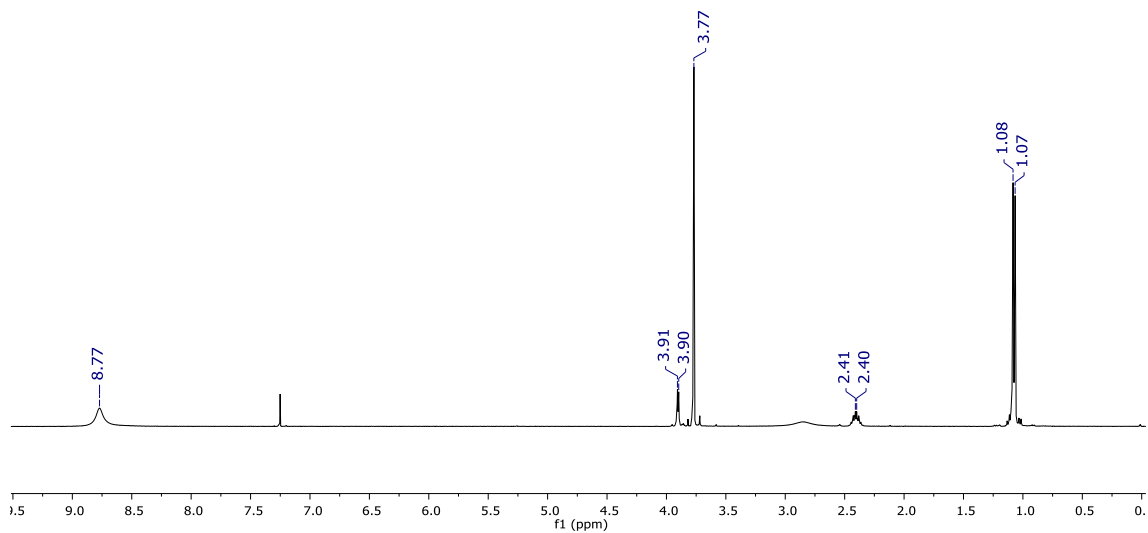
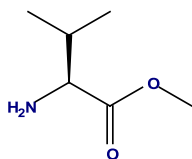
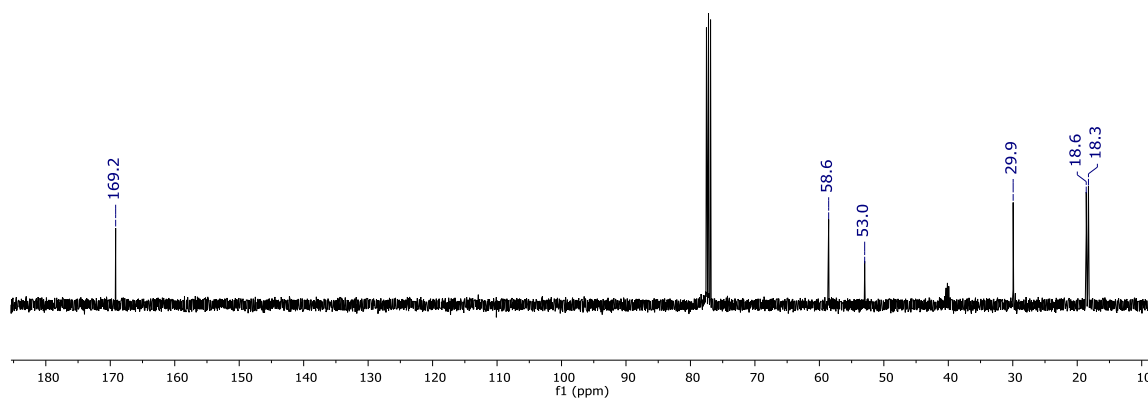
29. Gathergood, N.; Kümmeler, K. *Green Chem.* **2016**, *18*, 4374–4392.
30. Hernández-Fernández, E.; Sánchez-Lara, P. P.; Ordóñez, M.; Ramírez-Marroquín, O. A.; Avalos-Alanís, F. G.; López-Cortina, S.; Jiménez-Pérez, V. M.; Ibarra-Rivera, T. R. *Tetrahedron Asymmetry* **2015**, *26*, 73–78.
31. Abdel-Wahab, S. M.; Abdelsamii, Z. K.; Abdel-Fattah, H. A.; El-Etrawy, A. S.; Georghiou, P. E. *Int. J. Pharm. Chem.* **2016**, *6*, 149–159.
32. Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.
33. Sheehan, J.; Cruickshank, P.; Boshart, G. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525–2528.
34. Coleman, D.; Špulák, M.; Garcia, M. T.; Gathergood, N. *Green Chem.* **2012**, *14*, 1350–1356.
35. Banfi, E.; Scialino, G.; Zampieri, D.; Mamolo, M. G.; Vio, L.; Ferrone, M.; Fermiglia, M.; Paneni, M. S.; Pricl, S. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 76–84.
36. El Rayes, S. M. *Molecules* **2010**, *15*, 6759–6772.
37. Hasan, A.; Thomas, N. F.; Gopil, S. *Molecules* **2011**, *16*, 1297–1309.
38. Castellano, S.; Stefancich, G.; Chillotti, A.; Poni, G. *Farmaco* **2003**, *58*, 563–568.
39. Rani, N.; Sharma, A.; Gupta, G. K.; Singh, R. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2013**, *13*, 1626–1655.
40. Chiguils-Pérez, Y. Síntesis de *N*-acilaminoésteres, *N*-acilaminoácidos y *N*-ftaloilaminoácidos con potencial actividad antifúngica. Universidad del Papaloapan, 2017.
41. Li, J.; Sha, Y. *Molecules* **2008**, *13*, 1111–1119.
42. Castanedo, G. M.; Seng, P. S.; Blaquiere, N.; Trapp, S.; Staben, S. T. *J. Org.*

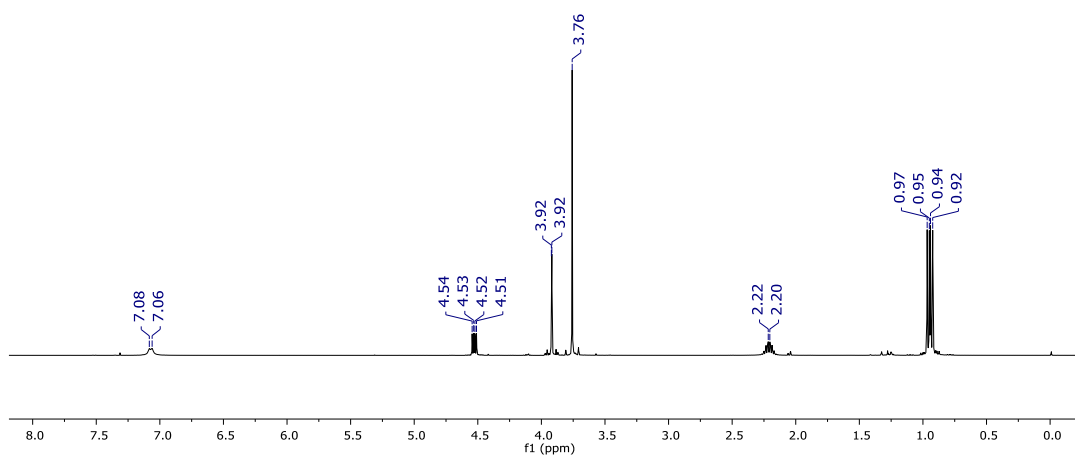
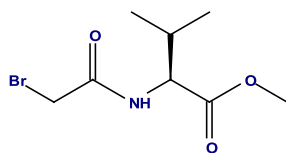
- Chem.* **2011**, *76*, 1177–1179.
43. Rodríguez Hurtado, A. Búsqueda de actividad antimicrobiana en *N*-acilaminoésteres, dipéptidos y derivados del ácido 3-fenilláctico, Instituto Politécnico Nacional, 2015.
44. Suárez, A. *An. Quím.* **2012**, *108*, 306–313.
45. Trivedi, M. K.; Tallapragada, R. M.; Branton, A.; Trivedi, D.; Nayak, G.; Jana, S. *J. Mol. Pharm. Org. Process Res.* **2015**, *3*, 2–6.
46. Trivedi, M. K.; Trivedi, D.; Branton, A.; Gunin, S.; Gopal, N.; Jana, S. *Nat. Prod. Chem. Res.* **2015**, *3*, 2–8.
47. Karunakar, P.; Krishnamurthy, V.; Girija, C. R.; Krishna, V. *Int. J. Pharma. Bio Sci.* **2013**, *4*, 912–921.
48. Navarrete-Vázquez, G.; Molina-Salinas, G. M.; Duarte-Fajardo, Z. V.; Vargas-Villarreal, J.; Estrada-Soto, S.; González-Salazar, F.; Hernández-Núñez, E.; Said-Fernández, S. *Bioorganic Med. Chem.* **2007**, *15*, 5502–5508.
49. Abrigach, F.; Rokni, Y.; Takfaoui, A.; Khoutoul, M.; Doucet, H.; Asehrou, A.; Touzani, R. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *103*, 653–661.
50. Song, J.; Zhang, S.; Lu, L. *Fungal Biol. Rev.* **2018**, 1–12.
51. Hargrove, T. Y.; Kim, K.; de Nazaré Correia Soeiro, M.; da Silva, C. F.; da Gama Jaen Batista, D.; Batista, M. M.; Yazlovitskaya, E. M.; Waterman, M. R.; Sulikowski, G. A.; Lepesheva, G. I. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2012**, *2*, 178–186.
52. Doğan, İ. S.; Saraç, S.; Sari, S.; Kart, D.; Eşsiz Gökhan, Ş.; Vural, İ.; Dalkara, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *130*, 124–138.
53. Mellado, E.; Garcia-Effron, G.; Alcázar-Fuoli, L.; Melchers, W. J. G.; Verweij, P. E.; Cuenca-Estrella, M.; Rodríguez-Tudela, J. L. *Antimicrob. Agents*

Chemother. **2007**, *51*, 1897–1904.

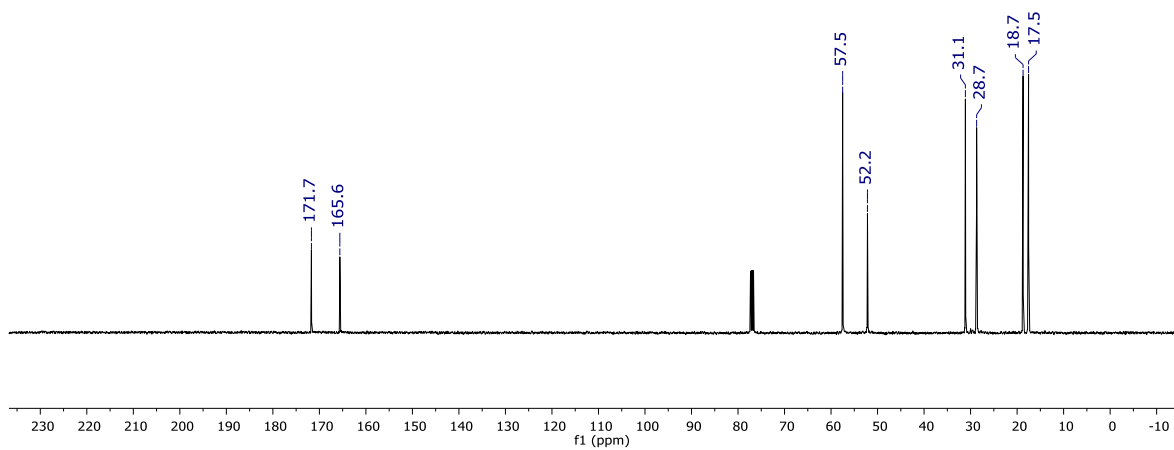
54. Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R.; Navarrete-Vázquez, G.; Soria-Arteche, O.; Hernández-Hernández, M.; Yépez-Mulia, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3135–3141.
55. Gutiérrez-Lara, E. J.; Navarrete-Vázquez, G.; Sánchez-López, A.; Centurión, D. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *814*, 313–323.

XII. ANEXO

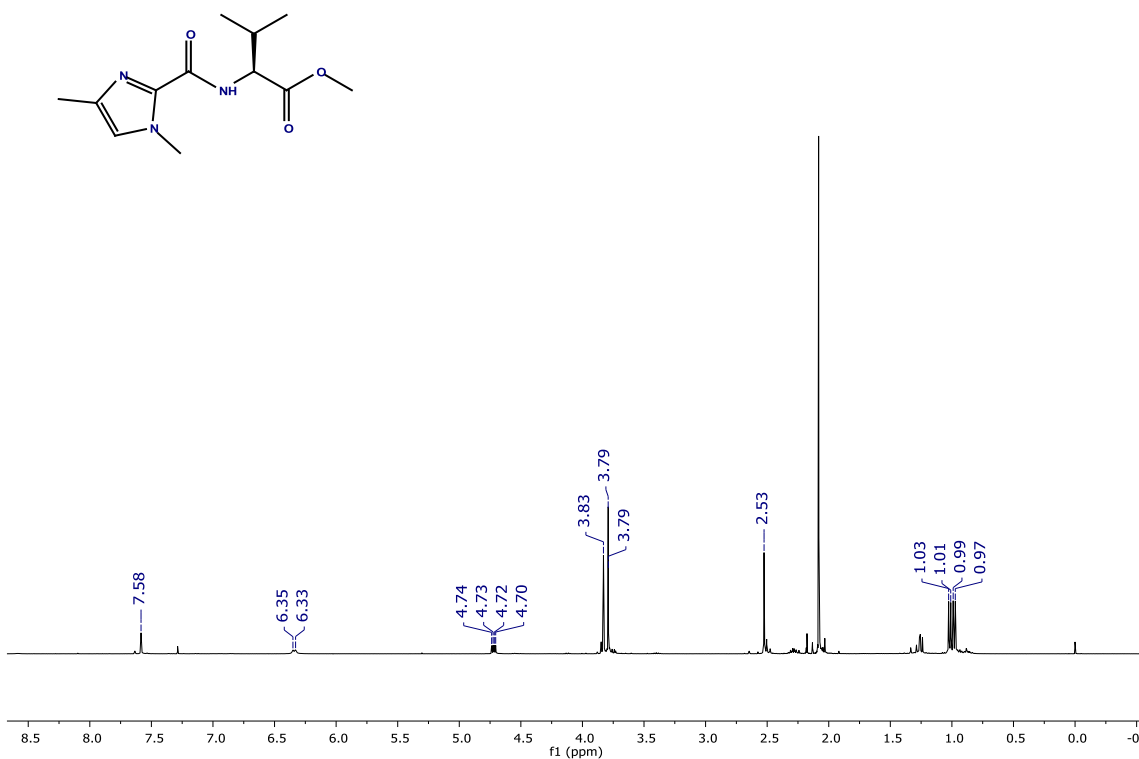
Espectro de RMN de ¹H del compuesto 14Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 14



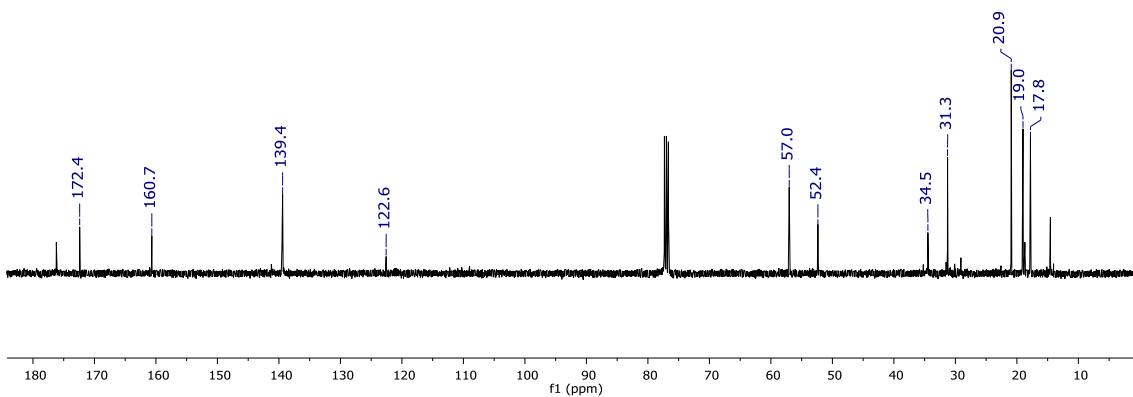
Espectro de RMN de ^1H del compuesto **18**



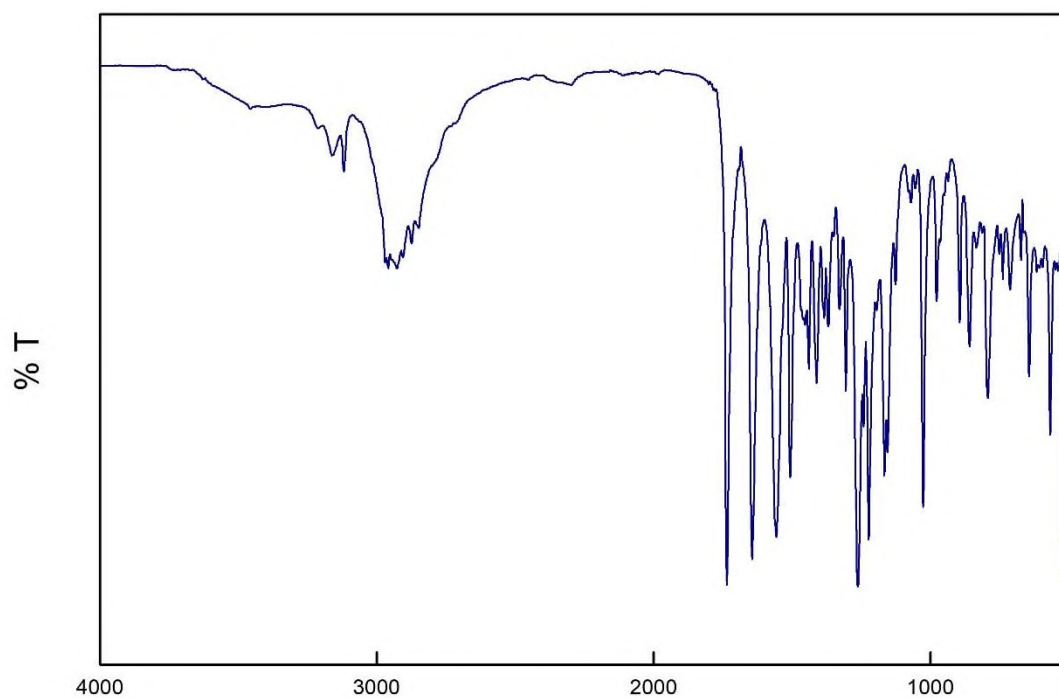
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **18**



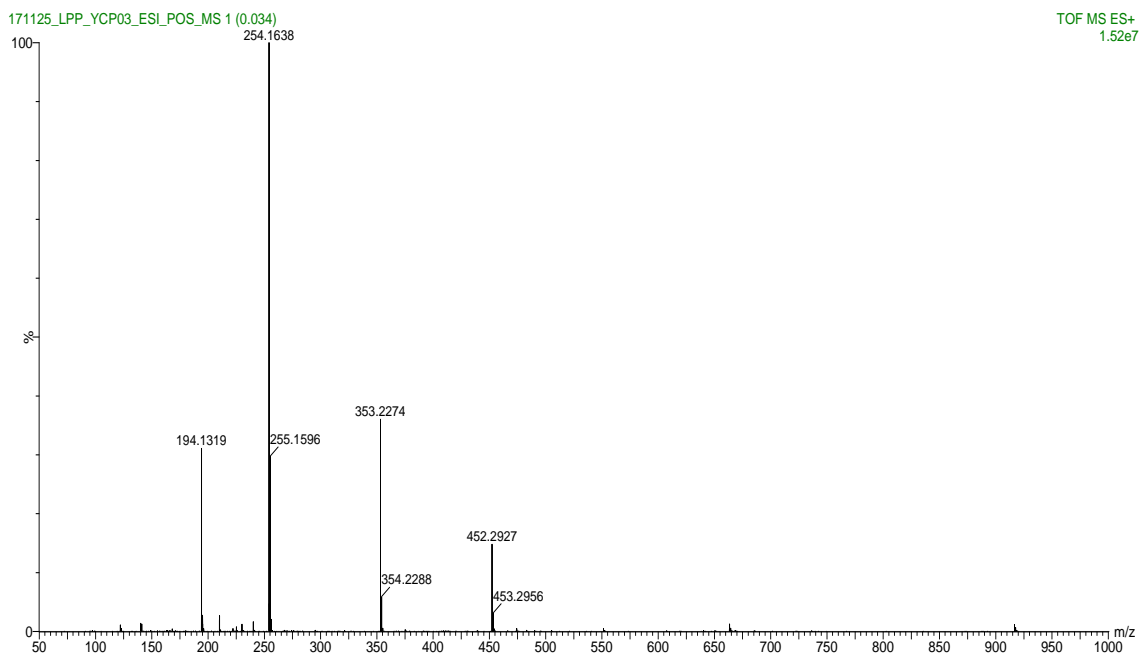
Espectro de RMN de ¹H del compuesto 16



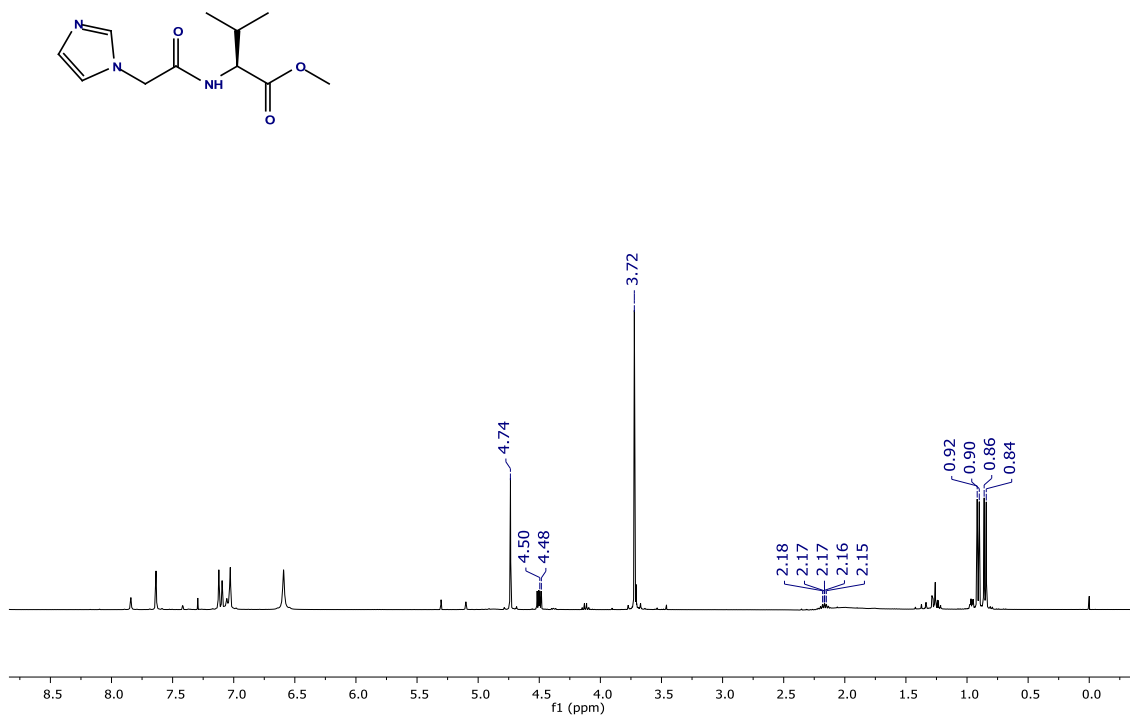
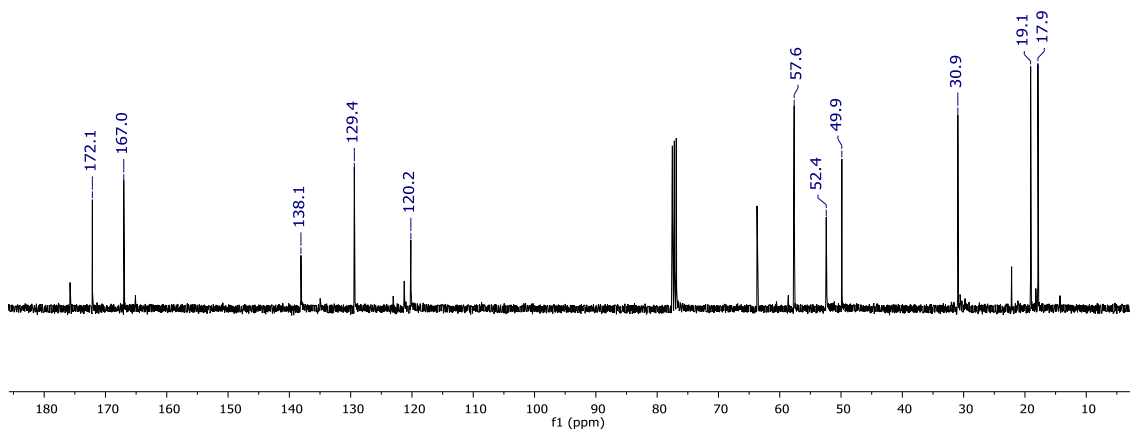
Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 16

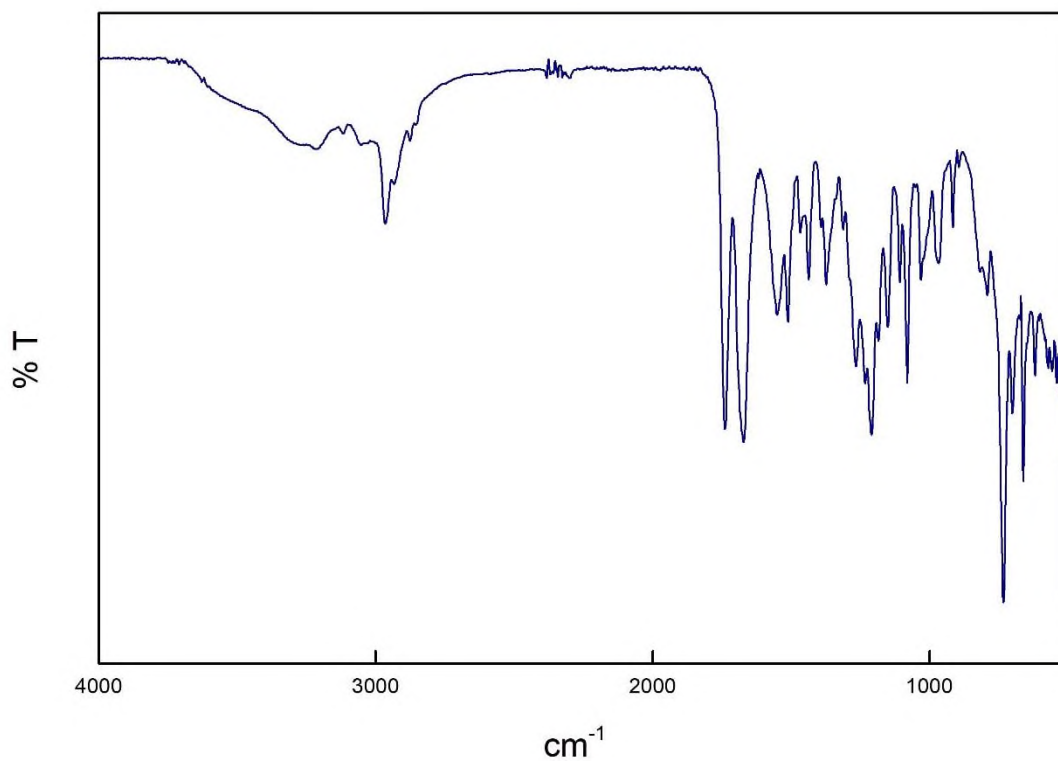


Espectro de IR del compuesto 16

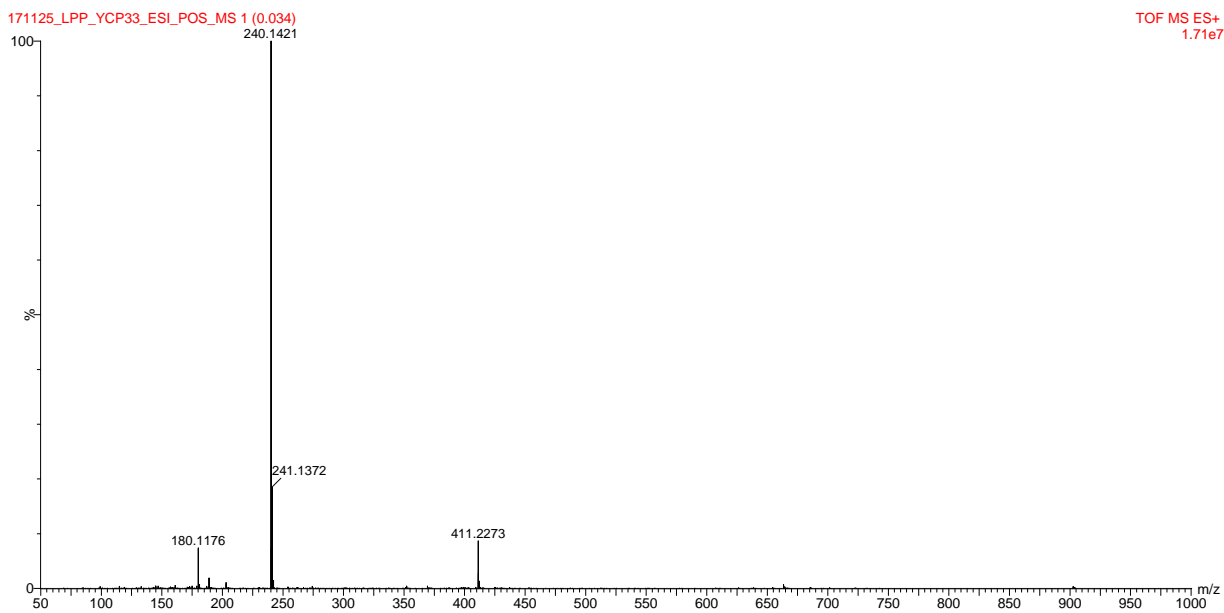


Espectro de ESI-MS del compuesto 16

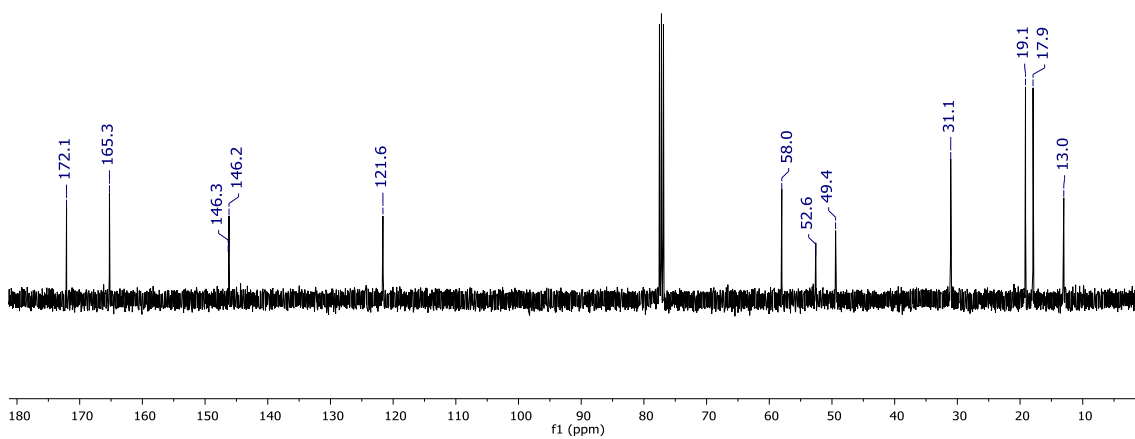
Espectro de RMN de ¹H del compuesto 20aEspectro de RMN de ¹³C del compuesto 20a

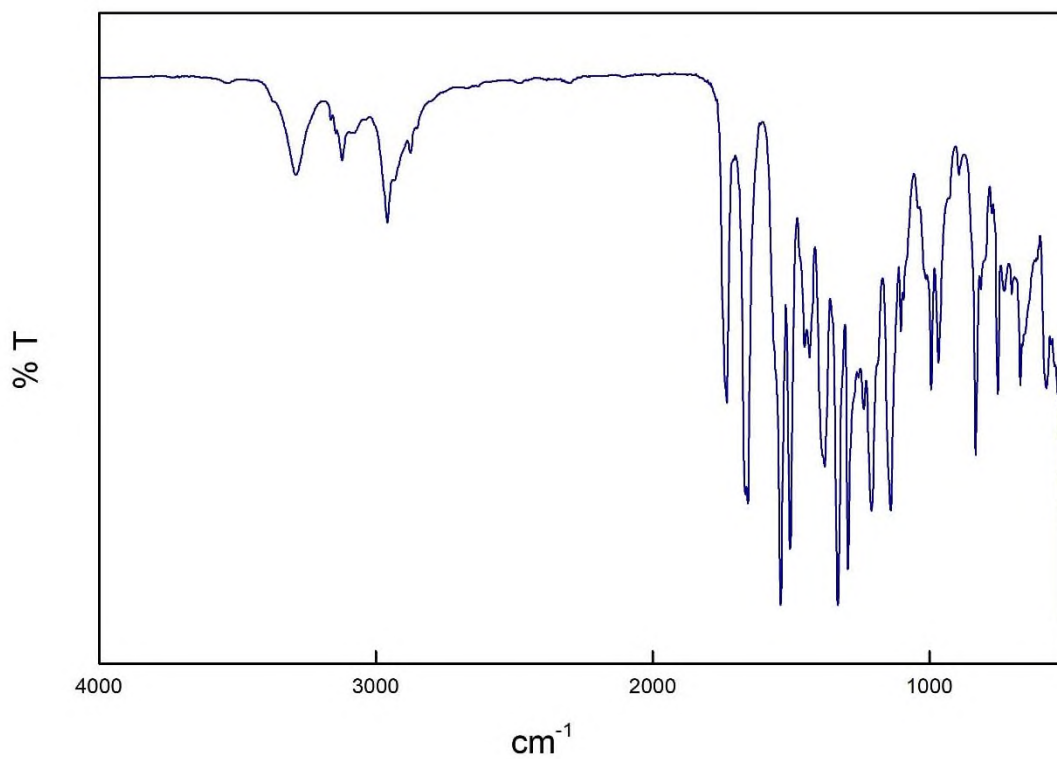
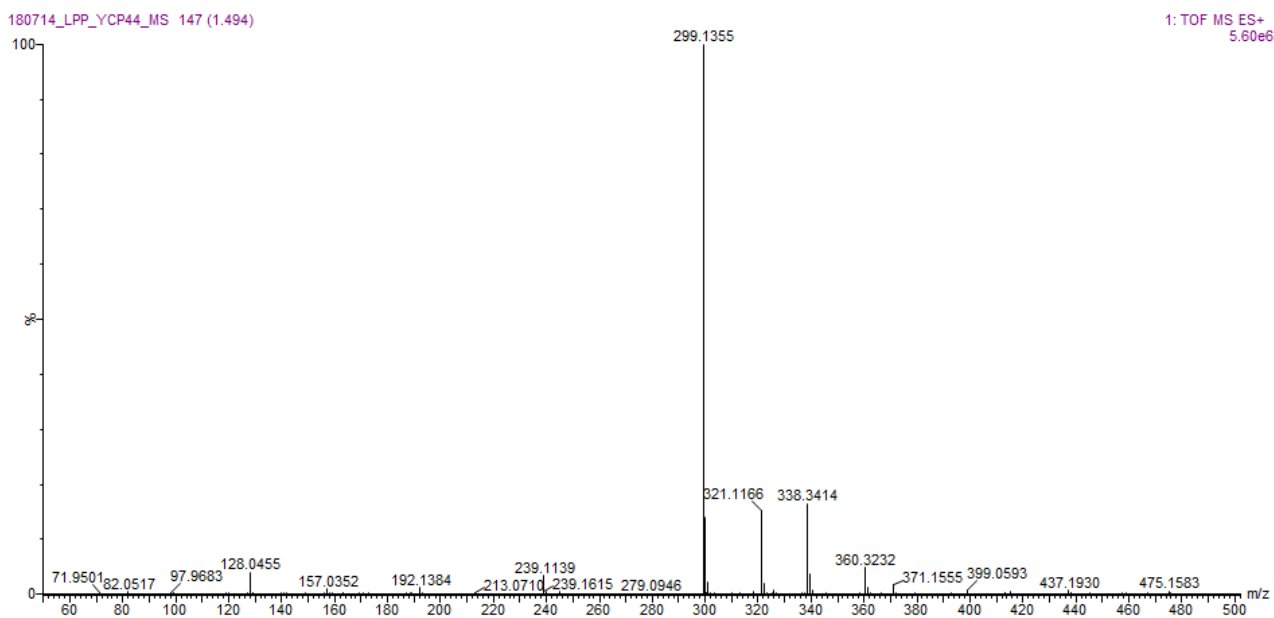


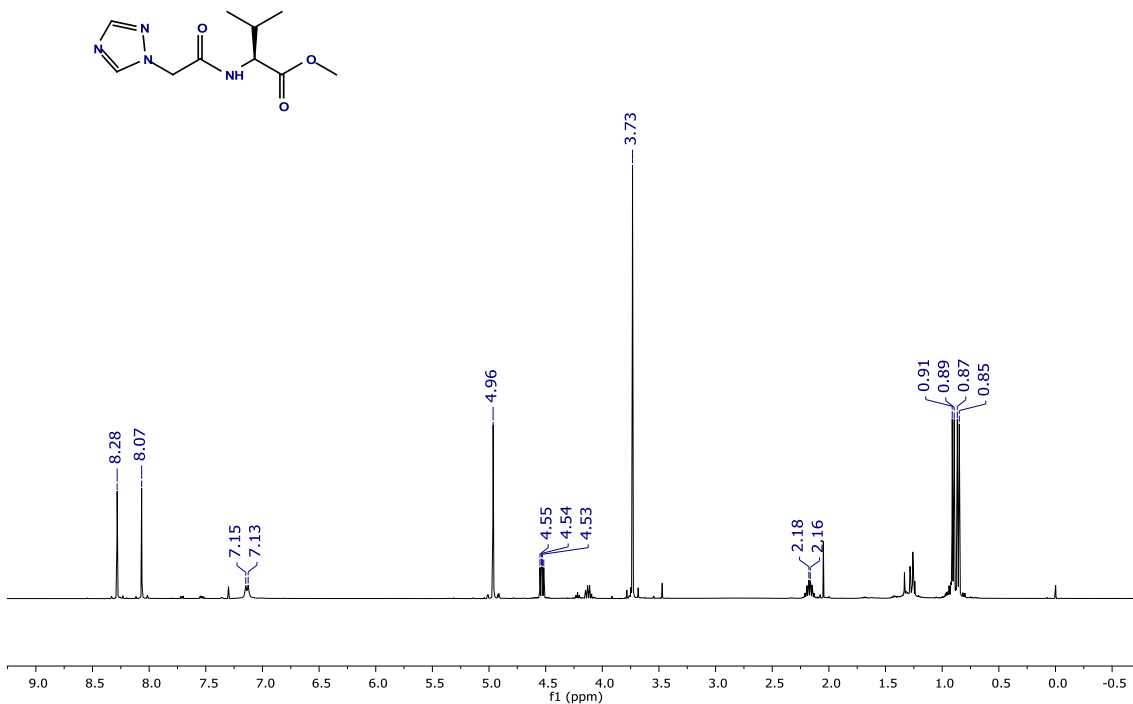
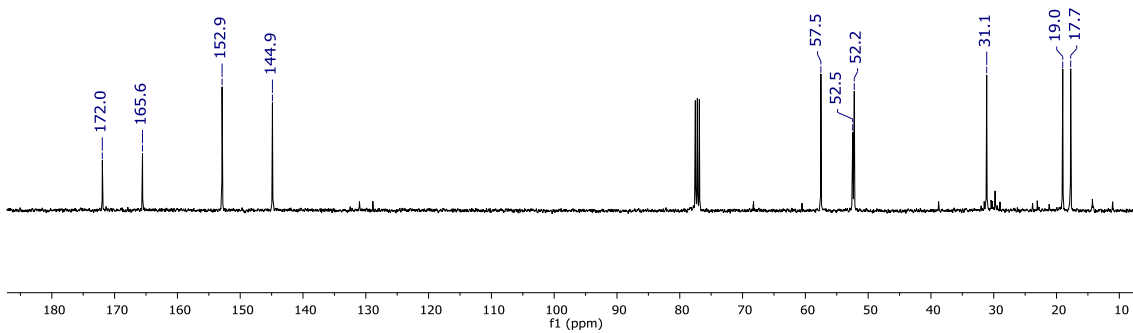
Espectro de IR del compuesto **20a**

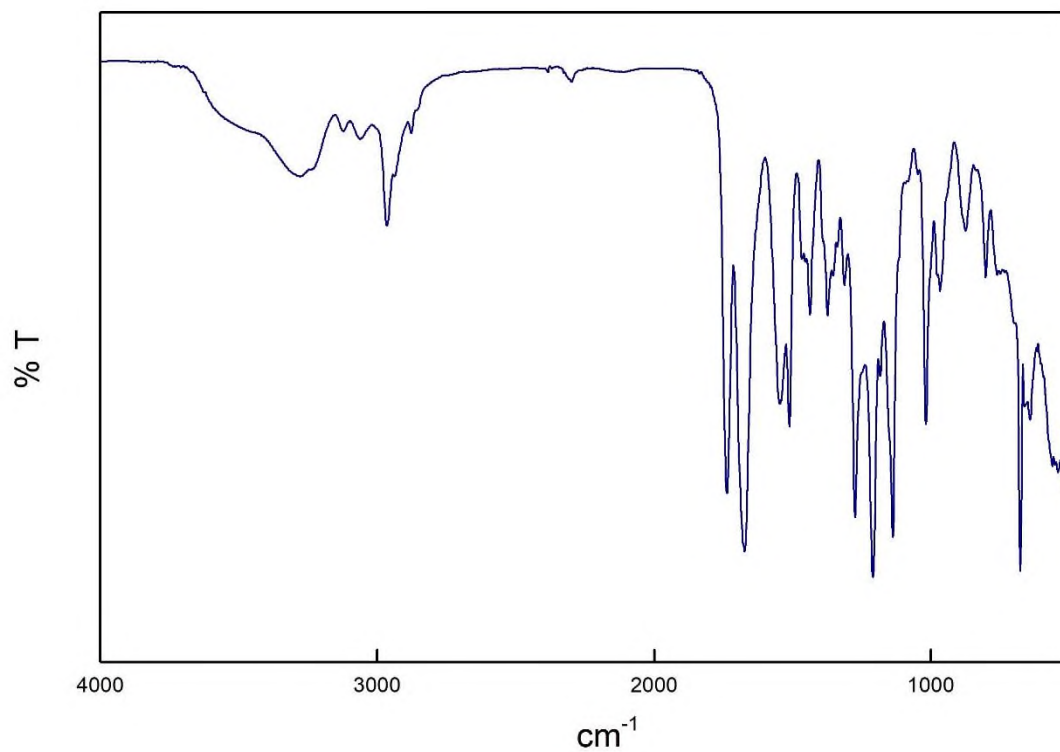
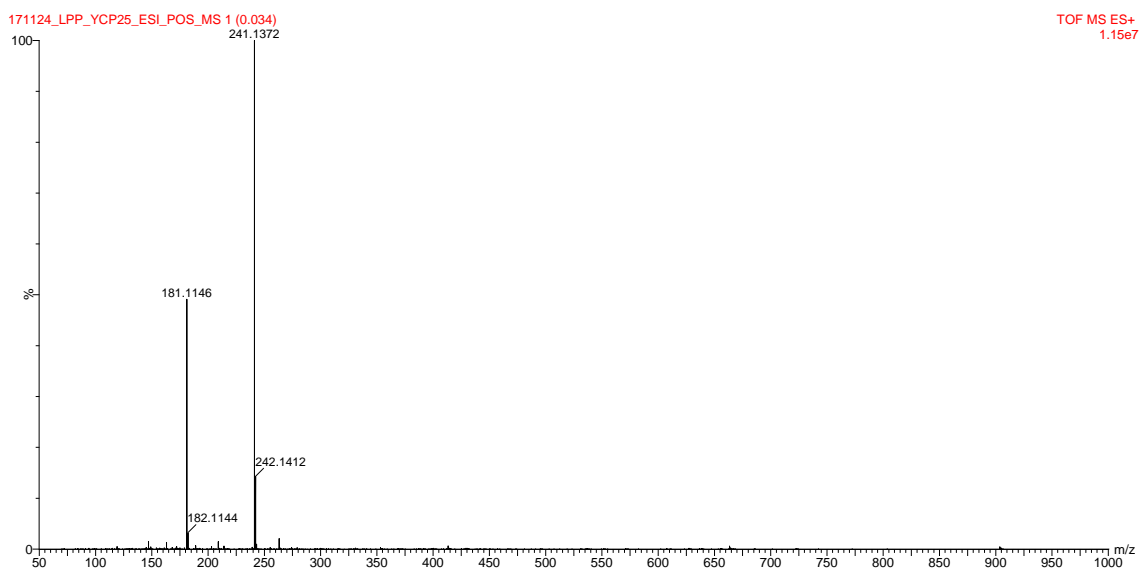


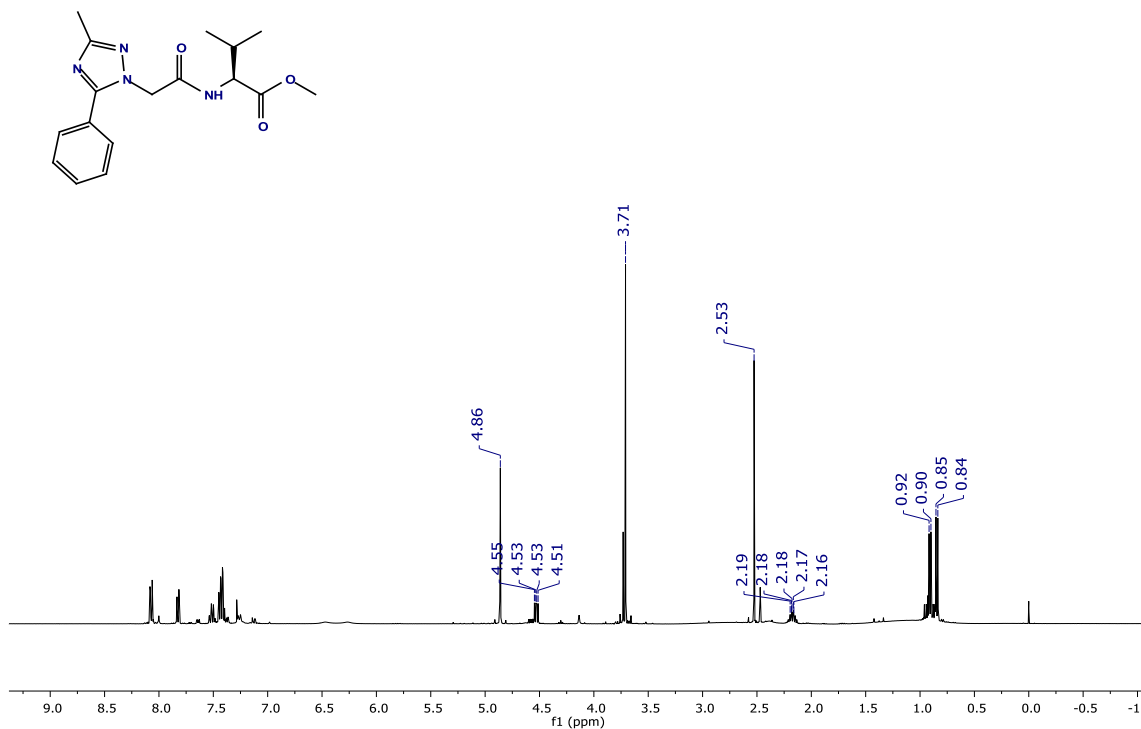
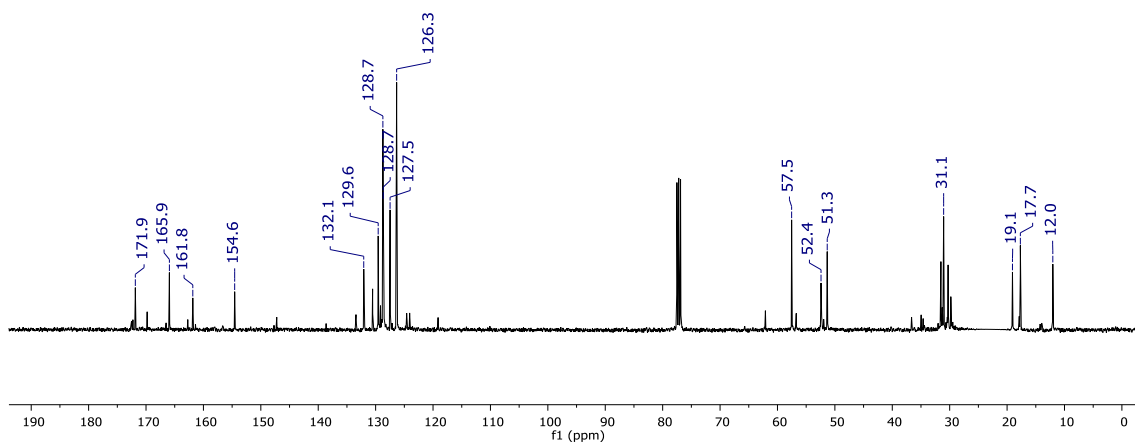
Espectro ESI-MS del compuesto **20a**

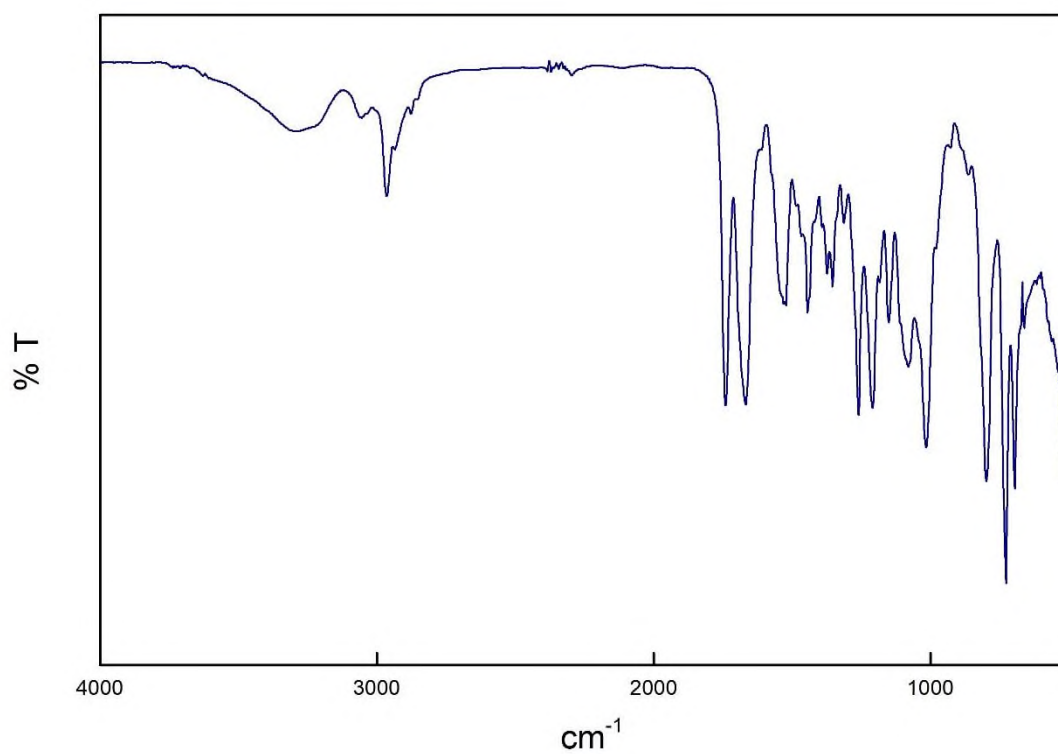
Espectro de RMN de ¹H del compuesto **20b**Espectro de RMN de ¹³C del compuesto **20b**

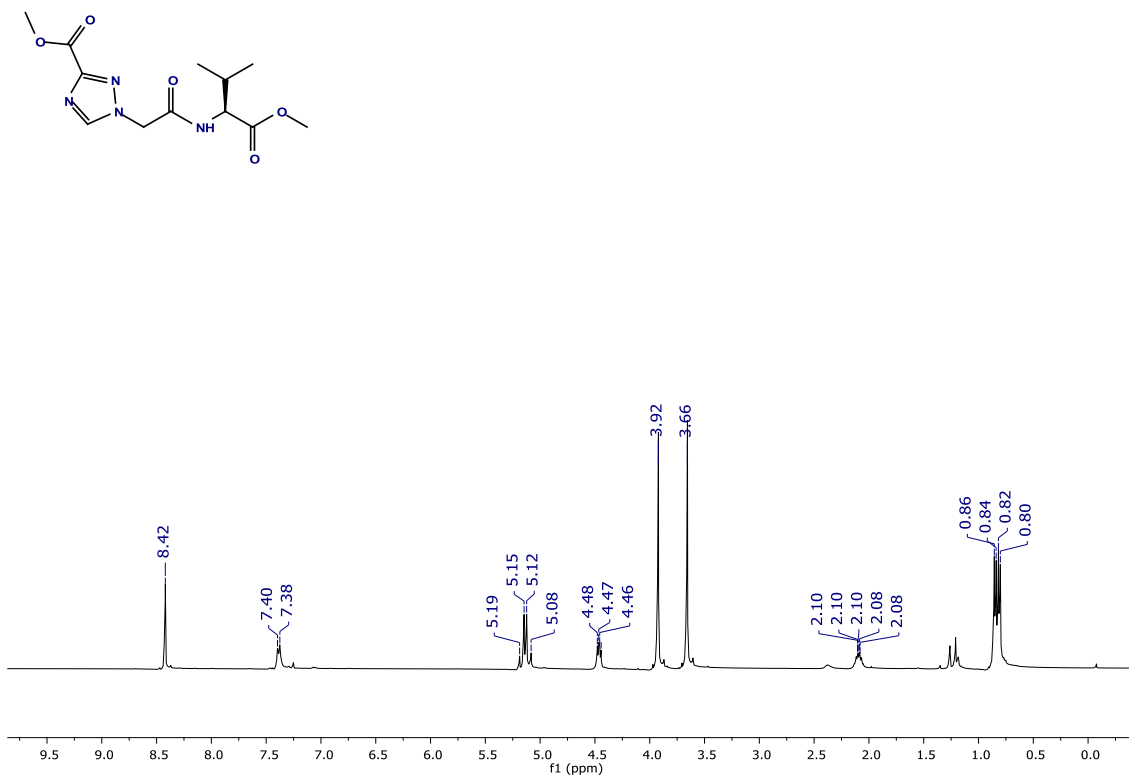
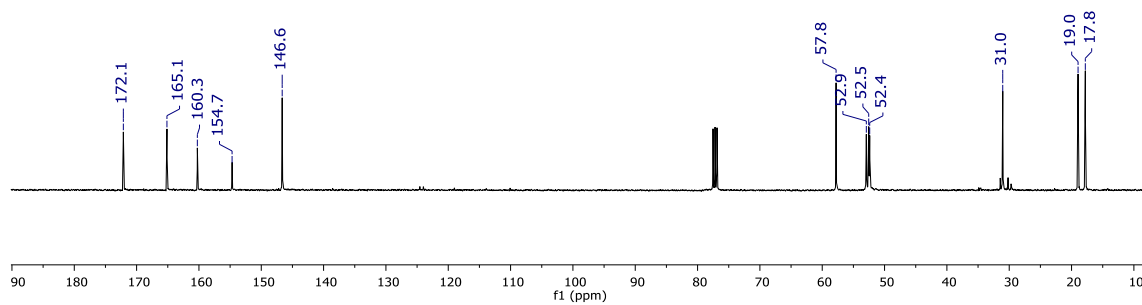
Espectro de IR del compuesto **20b**Espectro de ESI-MS del compuesto **20b**

Espectro de RMN de ¹H del compuesto 22aEspectro RMN de ¹³C del compuesto 22a

Espectro de IR del compuesto **22a**Espectro de ESI-MS del compuesto **22a**

Espectro de RMN de ^1H del compuesto **22b**Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **22b**

Espectro de IR del compuesto **22b**

Espectro de RMN de ^1H del compuesto **22c**Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **22c**

