



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe de servicio social

Síntesis y evaluación *in vitro* de derivados pirazólicos del ácido glicirretínico como inhibidores de la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B para el tratamiento de la diabetes tipo 2

Presenta:

Hannya Valeria Mendoza Mota

Matrícula:

2212030112

Asesor interno
Dr. Juan Francisco Cortés Benítez
No. Económico: 42603

Asesor externo
**M. en C.F. Ledy Cheyenne De la Cruz
Martínez**
Número de cédula: 12708577

Agradecimientos

A Dios, por haber puesto en orden todo lo que necesitaba para llevar a cabo mi servicio social, mi carrera universitaria y mi vida en general.

A mi mamá, por su valentía, esfuerzo y dedicación. Por todo el amor y cuidado que ha tenido conmigo y el apoyo que nunca duda en brindarme. Los valores y disciplina que me inculcó desde pequeña no han sido en vano y siempre será mi ejemplo a seguir.

A mis hermanas, por hacerme reír y sentirme tranquila aun cuando nadie más puede conseguirlo. Sin esos ánimos, no podría vivir mi día a día.

Al resto de mi familia, por sus oraciones y sus bendiciones. Su apoyo ha sido fundamental a lo largo de mi vida.

Al Dr. Francisco Cortés, por abrirme las puertas del laboratorio N-015 y darme la oportunidad de aprender. Por ser un guía y un excelente profesor durante toda mi carrera universitaria, y permitirme ser parte de su equipo de investigación.

A Ledy, por ser mi Sensei en todo momento, y que, aunque tenga su agenda llena de pendientes, siempre se da el tiempo de tener un pendiente más conmigo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por los aprendizajes, las convivencias y por hacer tan ameno el ambiente de trabajo, las risas nunca faltaron.

Agradecimientos al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT, proyecto: CF-2023-I-186) por el apoyo brindado.

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. Resumen | 4 |
| 2. Introducción | 5 |
| 3. Planteamiento del problema y justificación | 5 |
| 4. Objetivo general | 6 |
| 5. Objetivos específicos..... | 6 |
| 6. Antecedentes | 6 |
| 6.1 Prevalencia y mortalidad de la diabetes | 6 |
| 6.2 Diabetes tipo 2 (DT2)..... | 6 |
| 6.3 Ácido glicirretínico (AG) | 7 |
| 6.4 Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B)..... | 8 |
| 6.5 Inhibición de PTP1B..... | 9 |
| 6.6 AG y su actividad inhibidora de PTP1B | 10 |
| 7. Materiales y métodos | 11 |
| 7.1 Síntesis de intermediarios..... | 12 |
| 7.1.1. Síntesis del ácido glicirretínico (AG)..... | 12 |
| 7.1.2 Preparación del reactivo de Jones..... | 12 |
| 7.1.3. Síntesis del ácido 3-oxoglicirretínico | 12 |
| 7.1.4. Síntesis del ácido 2-formil-3-hidroxi-2-en..... | 13 |
| 7.2 Síntesis de compuestos finales | 14 |
| 7.2.1. Obtención de los derivados pirazólicos (metodología A)..... | 14 |
| 7.2.2. Obtención de los derivados pirazólicos (metodología B)..... | 14 |
| 7.2.3. Condiciones de reacción y purificación y constantes espectroscópicas y espectrométricas para los compuestos 5a-5h..... | 14 |
| 7.3 Ensayo de inhibición <i>in vitro</i> de los compuestos 5a-5h sobre PTP1B..... | 16 |
| 8. Resultados y discusión | 17 |
| 8.1 Síntesis orgánica..... | 17 |
| 8.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)..... | 18 |
| 8.3 Ensayo de actividad <i>in vitro</i> | 19 |
| 9. Conclusiones | 21 |
| 10. Referencias..... | 22 |
| 11. Anexos..... | 25 |

1. Resumen

La diabetes tipo 2 (DT2) se asocia con resistencia a la insulina y disfunción de las células β pancreáticas, provocando hiperglucemia crónica y complicaciones cardiovasculares. En los últimos años, ha destacado la búsqueda de nuevos compuestos con potencial terapéutico para su tratamiento, debido a que su prevalencia y mortalidad han aumentado considerablemente en las últimas décadas, especialmente en México. Entre las estrategias terapéuticas emergentes se encuentra la inhibición de la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B), enzima que regula negativamente la vía de señalización de la insulina y la leptina. La inhibición de esta enzima ha demostrado mejorar la homeostasis de la glucosa y la reducción de la adiposidad en modelos animales, convirtiéndola en un blanco terapéutico atractivo.

El ácido glicirretínico (AG) es un triterpenoide pentacíclico con diversas actividades biológicas (efectos antiinflamatorios, antitumorales, antibacterianos, antivirales y antioxidantes) e inhibidor de PTP1B. Se ha visto que la incorporación de heterociclos nitrogenados en su esqueleto ha permitido mejorar su actividad farmacológica. Estudios previos han reportado que derivados indólicos y *N*-fenilpirazólicos del AG presentan una inhibición más potente de PTP1B que el propio AG. Por este motivo, el presente trabajo busca ampliar la biblioteca de derivados pirazólicos con mejoras en solubilidad acuosa y potencia inhibitoria sobre PTP1B.

Se sintetizaron ocho derivados pirazólicos del AG, los cuales fueron caracterizados mediante análisis fisicoquímicos (punto de fusión y factor de retención), espectroscópicos (RMN de ^1H y ^{13}C) y espectrométricos (HRMS ESI-MS). Los rendimientos de reacción van del 15 al 48%, debido a la naturaleza electrónica de los sustituyentes y a las condiciones de reacción, lo que sugiere la necesidad de optimizar la ruta de síntesis con cambios en el disolvente o en las temperaturas de reacción.

Asimismo, los compuestos obtenidos (**5a-5h**) se evaluaron mediante un ensayo enzimático colorimétrico contra PTP1B, en donde, todos los compuestos demostraron ser inhibidores más potentes que el AG. Sin embargo, los resultados de solubilidad acuosa predicha por Swissadme, no fueron mejores que los antes reportados. Pese a esto, se obtuvo un compuesto *hit*, que mostró ser más potente y una mejor relación solubilidad-lipofilia que los controles utilizados. Estos resultados permiten destacar la importancia de la modificación estructural en la mejora de los inhibidores de PTP1B.

2. Introducción

La diabetes es una enfermedad común y cada vez más prevalente de gran preocupación para la salud pública, con 536.6 millones de casos diagnosticados en todo el mundo en el 2021.¹ Mientras que, en México, la diabetes afecta al 11% de la población y es la segunda causa de muerte.¹ El tipo más común, es la diabetes tipo 2 (DT2). La DT2 es una enfermedad metabólica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre, conocidos como hiperglucemia. El desarrollo de la DT2 se debe principalmente a la combinación entre la resistencia a la insulina y/o la secreción insuficiente de insulina de las células β pancreáticas. Lo que impide una regulación adecuada de la glucosa en el cuerpo, llevando a complicaciones a largo plazo si no hay un manejo adecuado de la enfermedad.^{2,3,4,5}

Se han estudiado numerosas vías y dianas moleculares para desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la DT2. Actualmente, existen fármacos disponibles para el tratamiento de la DT2, sin embargo, muchos de ellos han reportado efectos secundarios que van desde leves a severos. Por lo tanto, es importante desarrollar fármacos seguros y eficaces para revertir el curso de sus complicaciones.^{5,6,7}

En el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de la DT2, los productos naturales han sido fundamentales. Entre ellos, el ácido glicirretínico (AG), extraído del regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), el cuál mostró actividad antidiabética importante en estudios con roedores.⁸ El AG interactúa con múltiples dianas terapéuticas, incluida la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B). Se ha reportado que la inhibición de PTP1B es prometedora para tratar la DT2, debido a que PTP1B regula negativamente las vías de señalización de insulina y leptina, lo que promueve la progresión de la DT2 y obesidad, respectivamente.⁹ Por ello, el AG se ha convertido en un candidato atractivo para modificaciones químicas destinadas a aumentar su actividad inhibidora sobre PTP1B. Por ende, en este trabajo se describe la síntesis de ocho derivados pirazólicos del AG y su evaluación *in vitro* sobre PTP1B.^{10,11}

3. Planteamiento del problema y justificación

De los tres tipos principales de diabetes (tipo 1, 2 y gestacional), la diabetes tipo 2 (DT2), o diabetes no dependiente de insulina, es la más común y comprende el 90-95% de todos los casos.¹ Múltiples fármacos han demostrado ser eficaces para el control de la DT2, no obstante, existen muchos informes en los que presentan efectos secundarios, incluyendo trastornos digestivos (como náuseas y diarrea), anemia, neuropatía, hipoglucemia, riesgo cardiovascular y cáncer de vejiga, lo que hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos más seguros y eficaces.^{2,9,10}

Una opción atractiva para ello, son los inhibidores de PTP1B, los cuales pueden servir como mimetizadores y/o agentes sensibilizadores de la insulina. Sin embargo, el desarrollo de inhibidores de PTP1B sigue siendo un desafío porque el dominio catalítico altamente conservado de la familia de las PTP's promueve que estos inhibidores sean menos selectivos, aumentando así su toxicidad. Debido a esto, actualmente no hay fármacos contra PTP1B aprobados o disponibles comercialmente, impulsando así la investigación constante en el desarrollo de inhibidores potentes y específicos para esta proteína.^{11,12}

4. Objetivo general

Sintetizar derivados pirazólicos del ácido glicirretínico y determinar su actividad inhibitoria *in vitro* sobre la enzima PTP1B.

5. Objetivos específicos

- Sintetizar ocho derivados pirazólicos del ácido glicirretínico.
- Caracterizar los ocho compuestos finales mediante sus propiedades fisicoquímicas (factor de retención y punto de fusión), espectroscópicas (Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C) y espectrométricas (espectrometría de masas).
- Determinar la actividad inhibitoria *in vitro* sobre PTP1B de las moléculas finales sintetizadas mediante un ensayo enzimático colorimétrico.

6. Antecedentes

6.1 Prevalencia y mortalidad de la diabetes

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre, que con el tiempo conduce a daños en el corazón, la vasculatura, los ojos, los riñones y los nervios.³

En 2021, la diabetes fue la causa directa de 1,6 millones de muertes a nivel global y el 47% de todas las muertes por diabetes se produjeron antes de los 70 años. Otras 530,000 muertes por enfermedad renal fueron causadas por la diabetes, y el 11% de las muertes cardiovasculares por hiperglucemia. En 2022, el 14% de los adultos de 18 años o más vivían con diabetes, un aumento respecto del 7% en 1990. Más de la mitad (59%) de los adultos de 30 años o más que vivían con diabetes no se medicaban.²²

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (FID), México ocupa el 7º lugar en el mundo en cuanto al número de personas que viven con diabetes. Adicionalmente, datos del Instituto Nacional de Salud Pública indican que la prevalencia de diabetes en México es de 18.3% (12.8 millones de adultos). Asimismo, es la segunda causa de muerte en el país, debido a que durante las últimas tres décadas, la mortalidad atribuible a la diabetes aumentó a 77%. En 2020, durante la pandemia por COVID-19, México experimentó una de las tasas más altas de mortalidad (un aumento del 46.5% con respecto a años anteriores). Los informes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) sugirieron que el exceso de muertes en México durante 2020 fue atribuible a causas no relacionadas con COVID-19, incluidas las enfermedades cardiovasculares y la diabetes.^{23,24}

6.2 Diabetes tipo 2 (DT2)

La diabetes tipo 2 (DT2) representa alrededor del 90 al 95 % de todos los casos diagnosticados de diabetes y se desarrolla con mayor frecuencia en adultos de mediana edad y mayores. Fisiopatológicamente, la DT2 se origina por un mal funcionamiento de los mecanismos de retroalimentación entre la acción de la insulina y la secreción de insulina dando lugar a niveles anormalmente altos de glucosa en sangre. En el caso de la disfunción de las células β pancreáticas, la secreción de insulina se reduce, lo que limita la capacidad del cuerpo para mantener los niveles fisiológicos de glucosa. Por otro lado, la resistencia a la insulina (IR) contribuye a aumentar la

producción de glucosa en el hígado y a disminuir la captación de glucosa tanto en músculo, hígado y tejido adiposo. Aunque ambos procesos tienen lugar al principio de la patogénesis y contribuyen al desarrollo de la enfermedad, la disfunción de las células β pancreáticas suele ser más grave que la IR. Sin embargo, cuando están presentes tanto la disfunción de las células β pancreáticas como la IR, la hiperglucemia se amplifica y conduce a la progresión de la DT2.^{2,3}

Se sabe que aproximadamente el 75% de las personas obesas desarrollan DT2. La obesidad (particularmente con índice de masa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m²) es un factor de riesgo importante debido a que un mayor porcentaje de grasa corporal abdominal y mecanismos inflamatorios derivados del tejido adiposo, como la liberación de ácidos grasos libres, así como los estilos de vida sedentarios y dietas hipercalóricas han cuadruplicado la prevalencia de la enfermedad. La DT2 aumenta en un 15% su mortalidad por complicaciones como la enfermedad cardiovascular, elevando el riesgo de cardiopatía coronaria y accidente cerebrovascular.^{2,3,4}

Debido a la patogenia compleja de la DT2, se han encontrado numerosas vías y dianas moleculares para desarrollar nuevos fármacos para su tratamiento. Actualmente, hay distintas clases de fármacos sintéticos con efectos antidiabéticos orales disponibles para tratar a los pacientes que padecen DT2. Estos se clasifican según sus mecanismos de acción: inhibidores de la α -glucosidasa, secretagogos de insulina, agonistas del receptor del péptido-1 similar al glucagón, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), etc.^{5,6,7,14} Sin embargo, muestran muchas limitaciones, entre ellas las reacciones secundarias indeseables como: aumento de peso, hipoglucemia, retención de líquidos e insuficiencia cardíaca, que limitan sus aplicaciones. Numerosos estudios han indicado que los productos naturales se han convertido en una fuente esencial de agentes bioactivos para el descubrimiento de nuevos fármacos para tratar la DT2, con la ventaja de que sus componentes activos poseen propiedades antidiabéticas con menos toxicidad y efectos adversos.⁸ Algunos de ellos son los flavonoides (naringenina, apigenina), polifenoles (ácido gálico, ácido cinámico), alcaloides (cafeína, tetrandrina) y terpenoides (ácido usólico, ácido glicirretínico).⁸

6.3 Ácido glicirretínico (AG)

El ácido glicirretínico (AG) se produce cuando se hidroliza la glicirricina. La glicirricina o también denominada ácido glicirricico (GL), es un componente de sabor dulce empleado como agente edulcorante y emulsionante en la industria alimentaria. Este proviene del extracto (de un 10 a 25 por ciento) de la raíz de *Glycyrrhiza glabra*, misma que contiene más de 20 tipos de triterpenoides y más de 300 flavonoides.¹⁷ Cuando se ingiere, GL en sí no se absorbe bien. Las bacterias en el tracto digestivo la degradan a AG. El AG es un triterpenoide pentacíclico con un ácido carboxílico en C-30 y una estructura química básica con cinco anillos (**Figura 1**), los cuales han sido muy

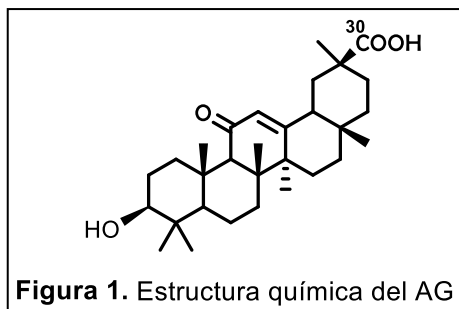


Figura 1. Estructura química del AG

interesantes debido a que, tanto el AG como sus derivados, han demostrado actividades farmacológicas beneficiosas, incluyendo propiedades antivirales, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antifúngicas y hepatoprotectoras.^{8,16,17} Asimismo, ha demostrado una notable actividad antidiabética *in vivo* en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina. Con una dosis oral de 100 mg/kg, mejorando los niveles de glucosa e insulina en sangre en comparación con la glibenclamida (600 μ g/kg/peso corporal).^{6,13,16}

Diversos estudios han descrito que AG tiene la capacidad de interactuar con múltiples proteínas, entre ellas la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B), donde reportaron su potente actividad inhibitora y selectividad en esta enzima.²⁵

6.4 Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B)

PTP1B es una de las principales fosfatasa de tirosina proteica no receptora (PTP). Su estructura está conformada por tres dominios: un dominio catalítico N-terminal (1–300), un dominio regulador (301–400) y un dominio C-terminal (401–435) responsable de dirigir la enzima a la membrana del retículo endoplasmático (RE). Los tres dominios desempeñan un papel fundamental en la regulación de PTP1B.²⁶ También posee un mecanismo catalítico que implica una cisteína nucleofílica (Cys215) con un pKa bajo, esencial para la hidrólisis del éster de fosfato. Este mecanismo ocurre en dos pasos: primero, la cisteína ataca el grupo fosfato del sustrato, formando un intermediario fosfoenzimático; luego, una molécula de agua, activada por el aspartato, hidroliza ese intermediario, regenerando la enzima y liberando fosfato inorgánico³³ (**Figura 2**).

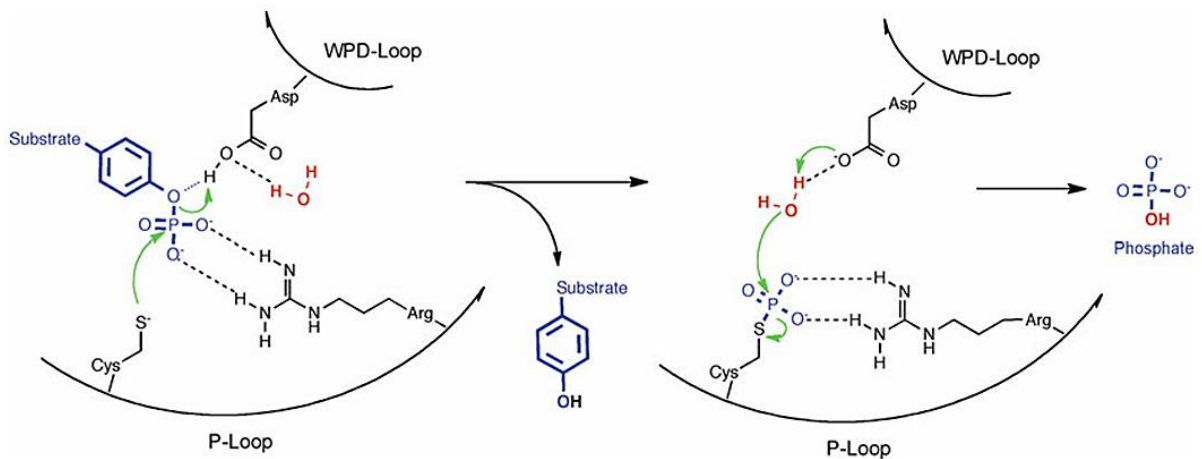


Figura 2. El mecanismo catalítico de PTP1B.³³

La actividad de PTP1B está regulada a través de múltiples mecanismos, que a menudo operan simultáneamente. Estos incluyen la oxidación reversible, la fosforilación de serina y tirosina, la sumoilación y la proteólisis (**Figura 3**). La oxidación reversible, particularmente en la cisteína 215, inhibe temporalmente la actividad enzimática de PTP1B, influenciada por la oxidación inducida por peróxido de hidrógeno que altera la conformación de la enzima, impactando su interacción con sustratos como el receptor de insulina. La fosforilación de serina y tirosina, catalizada por AKT y quinasas tipo CDC, modula aún más la actividad de PTP1B. La escisión por enzimas calpaínas activa PTP1B en plaquetas, mientras que la proteólisis por calpaínas puede activar o desactivar PTP1B en diferentes tipos celulares. La sumoilación, mediada por proteínas SUMO, regula PTP1B al reducir su actividad enzimática, afectando particularmente las interacciones con sustratos del receptor de insulina. Comprender estos mecanismos reguladores es crucial para dilucidar posibles estrategias para modular eficazmente la actividad de PTP1B.¹⁸

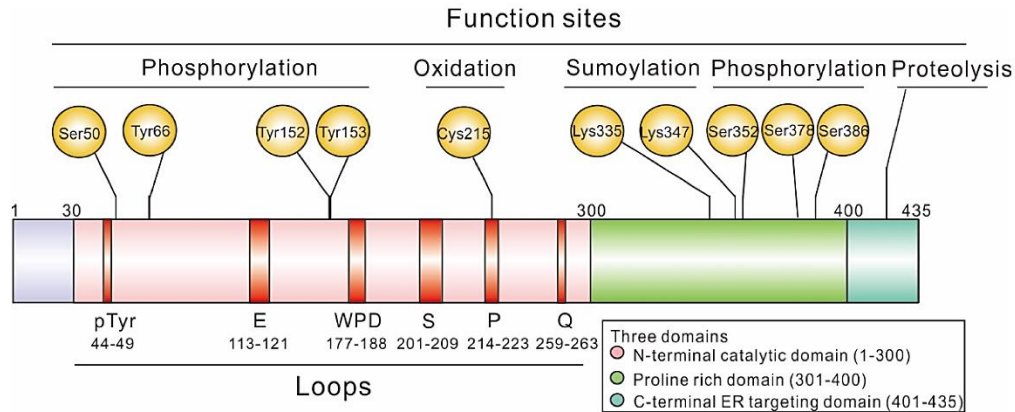


Figura 3. Representación esquemática de las estructuras de dominio de PTP1B.²⁶

6.5 Inhibición de PTP1B

PTP1B se ha asociado con varias enfermedades clave, como la obesidad, la DT2, las enfermedades cardiovasculares, el síndrome de Rett, diferentes tipos de cáncer, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la esteatohepatitis no alcohólica, la enfermedad de Alzheimer, la sepsis, la leucemia, la artritis, la función renal, la apnea del sueño y otras.¹⁸

Asimismo, se reconoce como un importante regulador negativo de numerosas cascadas de señalización de relevancia metabólica como las vías de la insulina y leptina, o diferentes vías de señalización de relevancia oncogénica, como las cascadas EGFR y JAK/STAT. En el caso de la señalización de la insulina, PTP1B desfosforila al receptor de insulina así como sus sustratos. En la señalización de la leptina desfosforila a JAK2, un efector descendente del receptor de leptina. Esto da como resultado la inhibición de la síntesis de la hormona estimulante del apetito, el neuropéptido Y.^{18,26}

De esta manera, los altos niveles de PTP1B, particularmente en el hipotálamo, están asociados con la resistencia a la insulina y la leptina. Los ratones *knock out* de PTP1B mostraron una homeostasis de la glucosa mejorada, una ganancia de peso reducida y un menor gasto de energía. Por este motivo, la reducción de la actividad hipotalámica de PTP1B permite mejorar la sensibilidad a la leptina y a la insulina que la de otros tejidos, reduciendo eficazmente la adiposidad y mejorando el metabolismo de la glucosa. Por lo tanto, PTP1B desempeña papeles tanto negativos como positivos en diferentes vías de señalización convirtiéndola en un objetivo terapéutico y, su inhibición, en una estrategia atractiva para tratar tanto la diabetes como la obesidad, lo que representa una ventaja sobre los tratamientos existentes hasta la fecha.^{7,9,15}

En las últimas décadas se han identificado o diseñado y sintetizado numerosos inhibidores de PTP1B a partir de fuentes naturales, varios de los cuales han llegado a ensayos clínicos en humanos. Los inhibidores de PTP1B se pueden clasificar en varias categorías generales, como: a) Moléculas pequeñas, las cuales funcionan uniéndose al sitio activo de PTP1B impidiendo su actividad (ej. el ertiprotafib: el primer fármaco inhibidor de PTP1B reportado y JTT-551). b) Moléculas alostéricas, que se unen a un sitio de PTP1B fuera del sitio activo y actúan cambiando la conformación de PTP1B (ej. La trodusquemina). c) Inhibidores de péptidos. Estos imitan el sustrato de PTP1B y se unen al sitio activo de la enzima (ej. el péptido D-A-D-E-pY-L), entre otros (**Figura 4**).¹⁸

Sin embargo, los principales retos asociados al proceso de descubrimiento de fármacos y desarrollo de agentes terapéuticos eficaces frente a la actividad de PTP1B han sido la especificidad, la selectividad y la biodisponibilidad.¹⁸ Un ejemplo de ello, es el efecto de competencia con la proteína tirosina fosfatasa de células T (TCPTP) que tiene mucha similitud estructural con PTP1B.²⁷

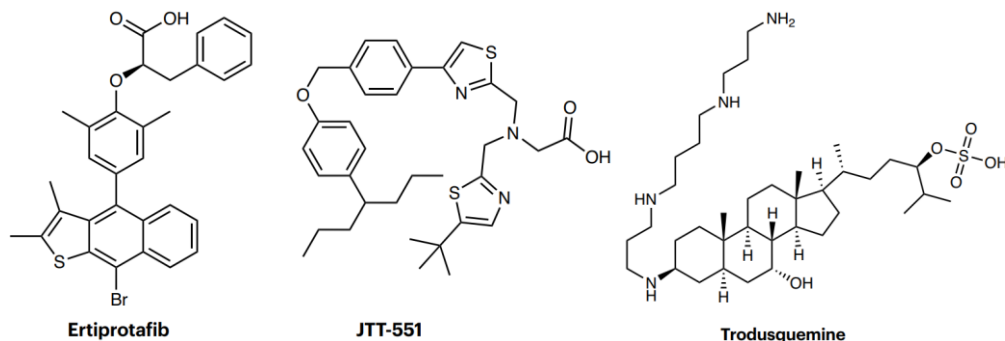


Figura 4. Estructura química de ejemplos de inhibidores de PTP1B.¹⁸

6.6 AG y su actividad inhibidora de PTP1B

La estructura del AG ha sufrido alteraciones químicas significativas, con la finalidad de mejorar sus acciones farmacológicas, especialmente su especificidad, selectividad y los efectos citotóxicos.^{17,19} Se ha reportado que la semisíntesis de triterpenos sustituidos con heterociclos nitrogenados fusionados al anillo A es una estrategia para mejorar la actividad inhibidora de PTP1B. Un ejemplo de ello es la fusión de heterociclos de indol o *N*-fenilpirazol en el anillo A del ácido maslínico (AM, triterpeno de tipo olenano). Esta estrategia ha mejorado drásticamente la potencia de este triterpenoide, produciendo inhibidores de PTP1B más potentes que otros heterociclos como tiazol, pirimidina, quinazolina y pirazina. Por lo tanto, el AG ha sido un blanco atractivo para esta estrategia.^{7,20}

En un estudio recientemente publicado por el grupo de trabajo del Dr. Francisco Cortés Benítez, se reportó la síntesis y evaluación de derivados indólicos y *N*-fenilpirazólicos fusionados al anillo A del AG.⁷ Estos compuestos se evaluaron contra la PTP1B para determinar su capacidad para inhibir la formación de *p*-nitrofenol a partir de *p*-nitrofenilfosfato. Se observó que la fusión de estos heterociclos al esqueleto de AG produjo inhibidores más potentes de PTP1B (valores de CI_{50} de 10.1 a 2.5 μM) con una potencia de 6 a 25 veces mejor que AG ($CI_{50} = 62.0 \mu\text{M}$) (**Figura 5**).

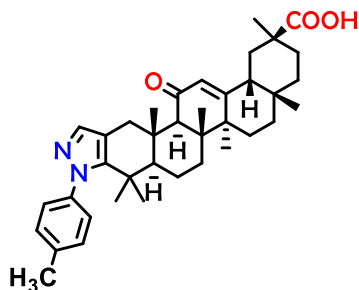


Figura 5. Compuesto con clave interna FC-122

PTP1B: $CI_{50} = 2.1 \mu\text{M}$

Posee mejor actividad antidibética a 52 mg/kg que la Glibenclamida y Acarbosa pero no mejor a la Pioglitazona en ratas diabetizadas con STZ.^{6,7}

De igual manera, presentaron un mejor efecto inhibitor contra PTP1B que el mostrado por los controles positivos, ácido ursólico ($CI_{50} = 5.6 \mu\text{M}$), carbenoxolona ($CI_{50} = 69.7 \mu\text{M}$) y claramina ($CI_{50} = 13.7 \mu\text{M}$). Sin embargo, a pesar de su importante potencia contra PTP1B, se esperaba que fueran mejores agentes antidiabéticos *in vivo*. Esto se pudo atribuir a su alta lipofilia, contribuyendo a su baja solubilidad en agua y mala absorción oral.⁶

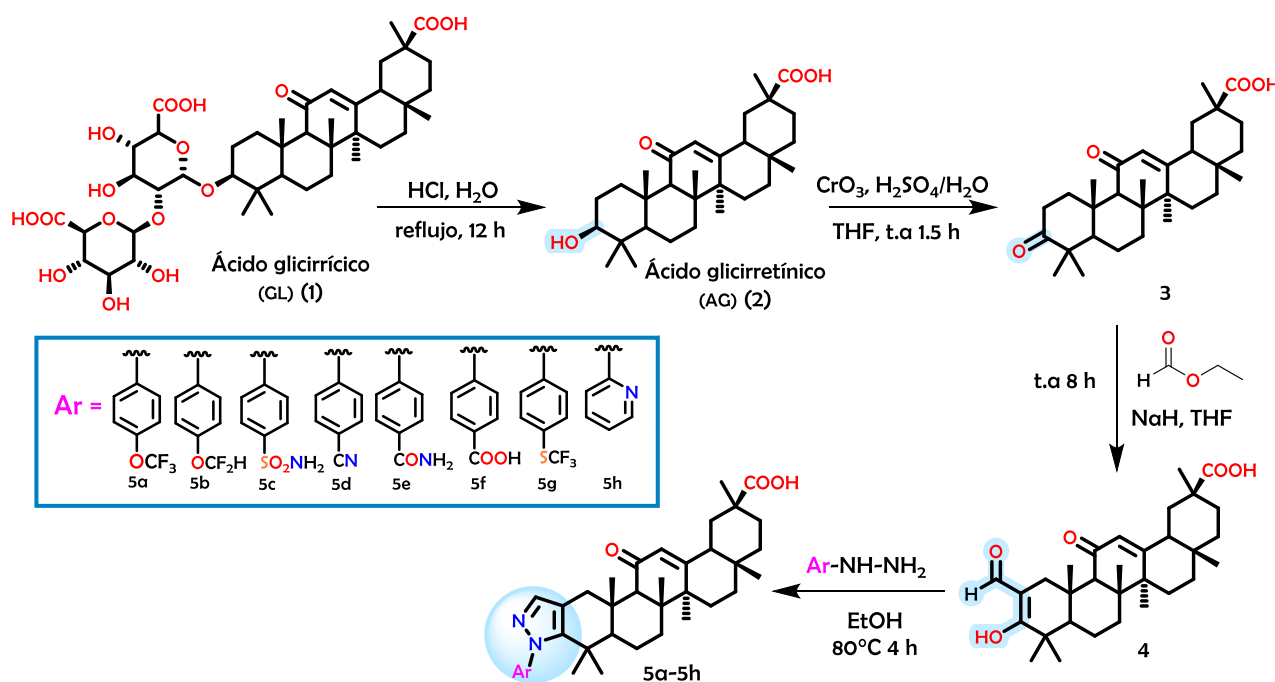
La solubilidad acuosa y la lipofilia, son las principales propiedades fisicoquímicas que se combinan con el fin de mejorar la selección de nuevos agentes bioactivos. La baja solubilidad en agua a menudo

conduce a una mala absorción, incluso si la tasa de permeación es alta porque la penetración del compuesto farmacológico a través de la membrana intestinal es proporcional al gradiente de la concentración del fármaco entre el lumen del intestino y la sangre. Además, concentraciones altas de compuestos farmacológicos poco solubles en el cuerpo pueden conducir a la cristalización y alta toxicidad en el cuerpo. Por otro lado, la lipofilia se caracteriza tradicionalmente por el logaritmo del coeficiente de partición en el sistema 1-octanol/agua ($\text{Log } P$) y tiene un efecto significativo tanto en el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico como en la toxicología.³⁰

Por este motivo, lograr el equilibrio adecuado entre solubilidad y lipofilia es fundamental. Las moléculas lipofílicas pueden mostrar una mayor unión a las proteínas diana, pero podrían presentar dificultades de solubilidad acuosa y exposición sistémica. Por el contrario, los compuestos altamente solubles en agua pueden carecer de suficiente afinidad por sus dianas.³¹

Con este antecedente, este trabajo pretende ampliar la biblioteca de compuestos pirazólicos fusionados al anillo A del AG, a través de su síntesis y evaluación *in vitro* sobre PTP1B para observar probables cambios en su potencia y solubilidad acuosa-lipofilia al incluir nuevos sustituyentes que contengan grupos con mayor polaridad que los antes reportados.

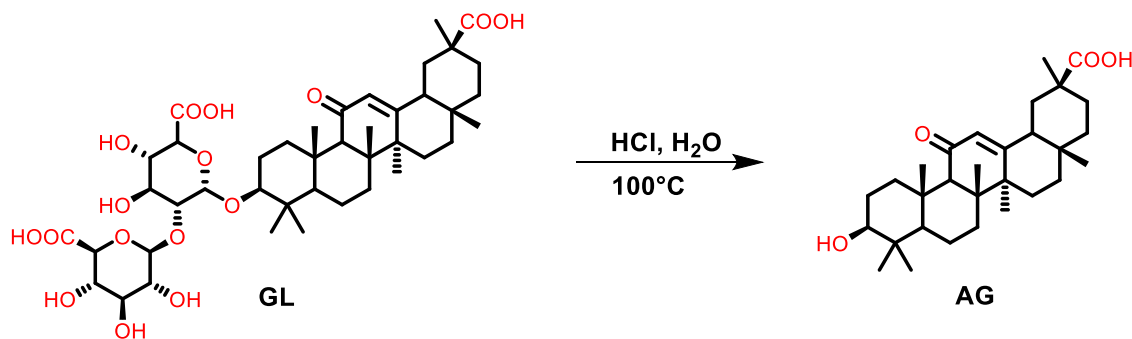
7. Materiales y métodos



Esquema 1. Ruta general de síntesis, reactivos y condiciones para la obtención de los derivados pirazólicos **5a-5h** del AG.

7.1 Síntesis de intermediarios

7.1.1. Síntesis del ácido glicirretínico (AG)



Esquema 2. Síntesis del ácido glicirretínico

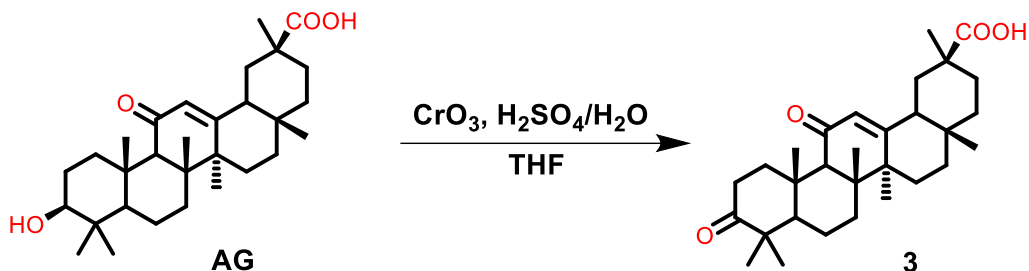
En un matraz bola de 500 mL, se colocó 10.0 g (12.15 mmol) de ácido glicirrónico, 125 mL de agua y 26 mL de HCl concentrado. Luego, se calentó a reflujo a 100°C. La reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (CCF) con una fase eluyente de Hexano:AcOEt (60:40). Después de 12 h, la reacción finalizó y se dejó enfriar a temperatura ambiente para favorecer la precipitación. Posteriormente, la mezcla de reacción se filtró a vacío, obteniéndose un sólido color marrón oscuro, que se dejó secar durante toda la noche.

Una vez que el sólido estuvo totalmente seco, se disolvió en 150 mL de cloroformo caliente con agitación constante y enseguida se filtró a vacío. Posteriormente, el disolvente se evaporó con ayuda del rotavapor hasta la formación de un líquido viscoso. Enseguida, se agregó 150 mL de MeOH y se calentó con agitación constante hasta que disminuyó el volumen de MeOH a 50 mL. Enseguida se agregaron gotas de agua hasta observar su precipitación. Finalmente, el precipitado obtenido se filtró a vacío. Se obtuvo 6.96 g de un sólido color blanco (rendimiento de reacción: 86%), **Esquema 2**.

7.1.2 Preparación del reactivo de Jones

En un vaso de precipitado de 100 mL, se disolvió cuidadosamente 12.5 g (125 mmol) de CrO₃ con 37.5 mL de H₂O y 12.5 mL de H₂SO₄ hasta obtener una solución homogénea.

7.1.3. Síntesis del ácido 3-oxoglicirretínico



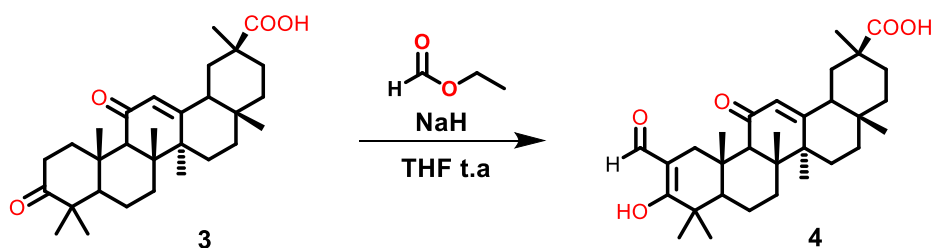
Esquema 3. Reacción de oxidación del ácido glicirretínico

Se colocó 10.0 g (21.24 mmol) de AG en un matraz bola de 500 mL con 100 mL de THF en un baño de hielo y se mantuvo en agitación constante hasta alcanzar una temperatura de 5°C y se agregó gota a gota 16 mL (84.95 mmol, 4.0 eq) del reactivo de Jones con ayuda de un embudo

de adición de líquidos. Al término de la adición, se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente. La reacción se monitoreó mediante CCF con Hexano:AcOEt (60:40). Dos horas después, se evaporó el THF en un rotavapor hasta observar el sólido. Posteriormente, se añadieron 250 mL de agua y el sólido se filtró a vacío y se lavó con agua.

Una vez que el sólido se secó, se trasvasó a un vaso de precipitado de 600 mL y se agregó 200 mL de CH₂Cl₂. La mezcla se calentó y se agitó constantemente. Luego se añadió aproximadamente 150 mL de MeOH hasta la obtención de una solución que se mantuvo en agitación y calentamiento hasta observar la precipitación de un sólido. Se añadieron gotas de agua para su completa precipitación. Finalmente, el precipitado se filtró a vacío y se obtuvo 9.75 g de un sólido color blanco (rendimiento de reacción: 98%), **Esquema 3**.

7.1.4. Síntesis del ácido 2-formil-3-hidroxi-2-en



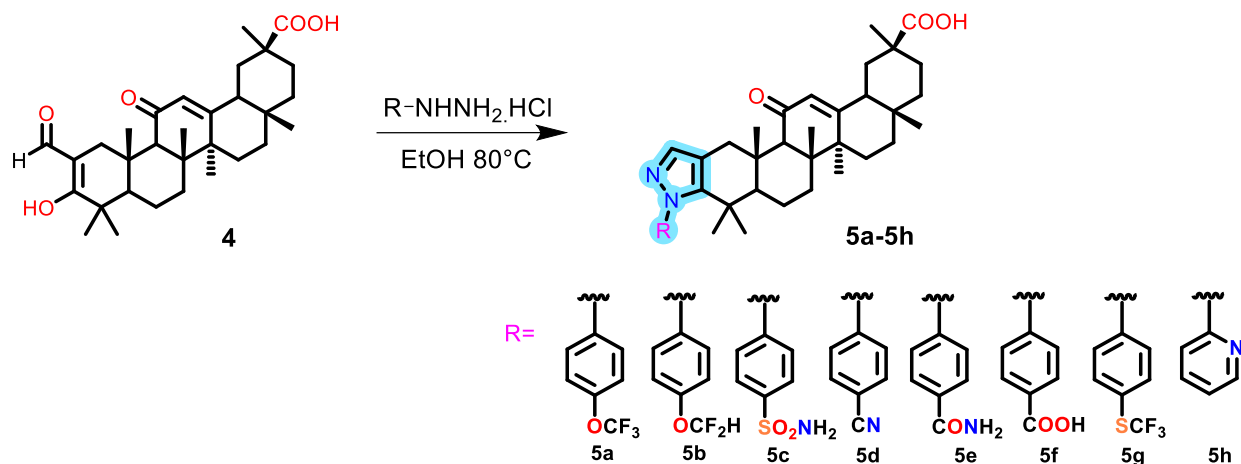
Esquema 4. Síntesis del compuesto 1,3-dicarbonilo por medio de una condensación de Claisen

En un matraz bola de 100 mL, se colocó 2.0 g (4.26 mmol) del compuesto **3** y 64 mL de THF anhidro. A esta solución, se adicionó 880 mg (21.55 mmol, 5.0 eq) de NaH al 60% y se mantuvo en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se agregó 3.2 mL (39.68 mmol) de formiato de etilo poco a poco durante 30 minutos. La reacción se mantuvo con atmósfera de N₂ en agitación constante durante 18 h. La reacción se monitoreó mediante CCF con Hexano:AcOEt (60:40). Posteriormente, se removió cuidadosamente el THF en un rotavapor y se colocó el matraz en un baño de hielo y se agregó 100 mL de HCl 1M para remover el exceso de NaH. El precipitado obtenido se filtró al vacío y se obtuvo un sólido color salmón.

El sólido obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (CC) con una fase móvil de Hexano:AcOEt (70:30) para obtener 1.25 g de un sólido color blanco (rendimiento de reacción: 59%), **Esquema 4**.

7.2 Síntesis de compuestos finales

7.2.1. Obtención de los derivados pirazólicos (metodología A)



Esquema 5. Reacción de ciclo condensación para la síntesis de los derivados pirazólicos

En un matraz bola de 25 mL se colocó 200 mg (0.4 mmol) del compuesto **4**, 1.1 eq de clorhidrato de arilhidrazina (respectivamente para cada compuesto final) y 5 mL de EtOH. Posteriormente la mezcla de reacción se calentó a reflujo ($80^\circ C$). La reacción se monitoreó mediante CCF con Hexano:AcOEt. Después de 2 a 12 h, el disolvente se evaporó en un rotavapor y la mezcla de reacción se purificó mediante CC con una fase eluyente de Hexano:AcOEt y luego se recrystalizó con CH_2Cl_2 , AcOEt y Hexano. Una vez que el compuesto precipitó, se filtró a vacío y se lavó con Hexano caliente. El rendimiento de reacción fue del 15 al 48%, **Esquema 5**.

7.2.2. Obtención de los derivados pirazólicos (metodología B)

En un matraz bola de 25 mL se colocó 200 mg (0.04 mmol) del compuesto **4**, 1.7 eq de clorhidrato de arilhidrazina (respectivamente para cada compuesto final) y 4 mL de DMF. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 4-6 h y se monitoreó mediante CCF con Hexano:AcOEt (60:40). Luego, la mezcla de reacción se goteó en un vaso de precipitado con hielo y solución de salmuera, y se dejó en reposo hasta la obtención de un precipitado que se filtró a vacío.

Una vez que el sólido se secó, se disolvió en 60 mL de CH_2Cl_2 y AcOEt (50:50), la mezcla se calentó y se agitó hasta su total disolución. Luego, se agregaron 2 cucharaditas de carbón activado en las mismas condiciones durante 10 minutos. Enseguida se filtró sobre celita y se lavó con la misma mezcla de disolventes. El agua madre recuperada se agitó y se calentó hasta un volumen final de 15 mL y se agregó Hexano gota a gota hasta la obtención de un precipitado que se filtró a vacío. El rendimiento de reacción fue del 31 al 69%.

7.2.3. Condiciones de reacción, purificación, constantes espectroscópicas y espectrométricas para los compuestos **5a-5h**

Compuesto 5a: 2.5 h de reacción, purificación mediante CC en un sistema Hexano:AcOEt (80:20). Rendimiento 15% (método A), 31% (método B). RMN de 1H (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ_H 12.21 (bs, 1H), 7.54 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.57 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 2.59 (s, 1H), 2.18 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 2.15 – 2.05 (m, 2H), 1.99 (s, 1H), 1.83 – 1.75 (m, 2H), 1.74 – 1.64 (m, 3H), 1.54 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 1.42 (d, $J = 11.9$ Hz, 2H), 1.38

(s, 3H), 1.33 – 1.22 (m, 3H), 1.18 (dd, $J = 17.2, 10.1$ Hz, 2H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.78 (s, 3H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ 198.58, 177.67, 170.16, 148.26, 145.39, 141.16, 138.15, 131.11, 127.41, 120.01 (q, $J = 256.86$ Hz), 121.12, 113.88, 59.53, 53.37, 48.08, 44.65, 43.08, 40.77, 37.51, 36.82, 34.19, 31.58, 31.26, 30.35, 29.22, 28.46, 27.80, 26.17, 25.82, 22.85, 22.47, 17.85, 15.40. HRMS (ESI-MS) m/z para $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. 653.3561; encontrado 653.3564.

Compuesto 5b: 8 h de reacción, purificación mediante CC en un sistema Hexano:AcOEt (70:30). Rendimiento 30% (método A). RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} 12.21 (bs, 1H), 7.44 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.36 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.28 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.50 (s, 1H), 3.57 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 2.59 (s, 1H), 2.18 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 2.10 (td, $J = 12.6, 4.1$ Hz, 2H), 1.99 (s, 1H), 1.83 – 1.75 (m, 2H), 1.75 – 1.66 (m, 3H), 1.54 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 1.42 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 1.38 (s, 3H), 1.32 – 1.23 (m, 3H), 1.18 (dd, $J = 17.2, 10.0$ Hz, 2H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.78 (s, 3H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} 198.57, 177.66, 170.13, 150.94, 145.24, 138.99, 137.86, 130.78, 127.42, 118.41, 118.25, 116.20, 116.20 (q, $J = 258.20$ Hz), 114.14, 113.67, 59.55, 53.42, 48.07, 44.65, 43.07, 40.78, 37.50, 36.87, 34.21, 31.58, 31.27, 30.36, 29.19, 28.46, 27.81, 26.17, 25.82, 22.85, 22.41, 17.86, 15.40. HRMS (ESI-MS) m/z para $\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. 635.3655; encontrado 635.3668.

Compuesto 5c: 8 h de reacción, purificación mediante CC en un sistema Hexano:AcOEt (30:70). Rendimiento 27% (método A), 69% (método B). RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} 7.93 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.53 (bs, 2H), 7.37 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.58 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 2.60 (s, 1H), 2.19 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 2.15 – 2.06 (m, 2H), 1.83 – 1.75 (m, 2H), 1.70 (m, 3H), 1.54 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 1.42 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 1.38 (s, 3H), 1.35 – 1.26 (m, 3H), 1.22 – 1.16 (m, 2H), 1.10 (s, 6H), 1.06 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.78 (s, 3H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} 198.53, 177.64, 170.13, 145.43, 144.88, 144.42, 138.36, 129.66, 127.42, 126.16, 114.07, 67.37, 59.52, 53.40, 48.05, 44.64, 43.06, 40.78, 38.08, 37.49, 36.82, 34.23, 31.56, 31.19, 30.36, 29.81, 29.32, 28.41, 27.81, 26.17, 25.81, 23.21, 22.85, 22.40, 17.90, 17.86, 15.38. HRMS (ESI-MS) m/z para $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. 648.3466; encontrado 648.3462.

Compuesto 5d: 4 h de reacción, purificación mediante CC en un sistema Hexano:AcOEt (60:40). Rendimiento 24% (método A), 43% (método B). RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} 12.21 (bs, 1H), 7.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.58 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 2.60 (s, 1H), 2.19 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 2.13 – 2.07 (m, 2H), 1.99 (s, 1H), 1.83 – 1.75 (m, 2H), 1.74 – 1.66 (m, 3H), 1.54 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 1.42 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.38 (s, 3H), 1.32 – 1.22 (m, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.78 (s, 3H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} 198.54, 177.65, 170.16, 146.11, 145.60, 138.69, 132.96, 130.07, 127.40, 118.14, 114.30, 111.86, 59.52, 53.37, 48.07, 44.64, 43.07, 40.77, 37.48, 36.79, 34.21, 31.57, 31.23, 30.35, 29.32, 28.46, 27.80, 26.17, 25.81, 22.85, 22.61, 17.89, 17.82, 15.41. HRMS (ESI-MS) m/z para $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. 594.3690; encontrado 594.3689.

Compuesto 5e: 12 h de reacción, purificación mediante CC en un sistema CH_2Cl_2 :MeOH (95:5). Rendimiento 33% (método A), 60% (método B). RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} 12.21 (bs, 1H), 8.04 (m, $J = 86.6$ Hz, 3H), 7.44 (m, 4H), 5.50 (s, 1H), 3.57 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H), 2.59 (s, 1H), 2.19 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H), 2.10 (s, 2H), 1.92 (s, 1H), 1.75 (d, $J = 53.5$ Hz, 5H), 1.52 (s, 2H), 1.38 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.78 (s, 3H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} 198.58, 177.63, 170.15, 167.08, 145.28, 144.52, 138.04, 134.66, 128.83, 127.84, 127.40, 113.83, 59.54, 53.43, 48.06, 44.64, 43.06, 40.76, 37.49, 36.87, 34.23,

31.56, 31.25, 30.36, 29.24, 28.46, 27.81, 26.16, 25.81, 22.86, 22.46, 17.86, 15.40. HRMS (ESI-MS) m/z para $C_{38}H_{50}N_3O_4^+$ $[M + H]^+$ calc. 612.3796; encontrado 612.3795.

Compuesto 5f: 4 h de reacción, purificación mediante CC en un sistema Hexano:AcOEt (50:50). Rendimiento 23% (método A), 46% (método B). RMN de 1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H 13.03 (bs, 1H), 12.43 (bs, 1H), 8.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.58 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 2.60 (s, 1H), 2.19 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 2.14 – 2.06 (m, 3H), 1.79 (dd, $J = 19.5, 12.3$ Hz, 2H), 1.74 – 1.66 (m, 3H), 1.53 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 1.42 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 1.38 (s, 3H), 1.22 – 1.16 (m, 2H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.78 (s, 3H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ_C 198.58, 177.67, 170.16, 166.58, 145.87, 145.38, 138.27, 131.25, 129.68, 129.20, 127.42, 114.00, 59.55, 53.43, 48.08, 44.66, 40.78, 37.51, 36.85, 34.24, 31.58, 31.26, 30.36, 29.28, 28.47, 27.81, 26.18, 25.82, 22.86, 22.50, 17.87, 15.42. HRMS (ESI-MS) m/z para $C_{38}H_{49}N_2O_5^+$ $[M + H]^+$ calc. 613.3636; encontrado 613.3636.

Compuesto 5g: 4 h de reacción, purificación mediante CC en un sistema Hexano:AcOEt (70:30). Rendimiento 15% (método A). RMN de 1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H 12.19 (bs, 1H), 7.85 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.58 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 2.60 (s, 1H), 2.19 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 2.10 (dd, $J = 12.4, 9.1$ Hz, 2H), 1.85 – 1.74 (m, 2H), 1.75 – 1.65 (m, 3H), 1.54 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 1.42 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.38 (s, 3H), 1.35 – 1.15 (m, 5H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.78 (s, 3H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ_C 198.55, 177.65, 170.15, 145.47, 144.83, 138.43, 136.40, 130.47, 129.52 (q, $J = 307.95$ Hz), 127.41, 124.00, 114.10, 59.52, 53.36, 48.07, 44.64, 43.07, 40.77, 37.49, 36.80, 34.21, 31.57, 31.25, 30.35, 29.26, 28.46, 27.80, 26.16, 25.81, 22.84, 22.52, 17.84, 15.40. HRMS (ESI-MS) m/z para $C_{38}H_{48}F_3N_2O_3S^+$ $[M + H]^+$ calc. 669.3332; encontrado 669.3331.

Compuesto 5h: 6 h de reacción, purificación mediante lavados con EtOH frío. Rendimiento 48% (método A). RMN de 1H (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 11.74 (bs, 1H), 7.88 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.02 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.69 – 6.64 (m, 1H), 5.94 (s, 1H), 3.41 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 2.44 (s, 1H), 2.38 – 2.33 (m, 1H), 2.10 – 1.95 (m, 5H), 1.87 (dd, $J = 13.3, 9.6$ Hz, 1H), 1.73 – 1.66 (m, 1H), 1.56 – 1.41 (m, 6H), 1.36 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 0.86 (s, 3H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ_C 198.72, 177.68, 170.21, 163.60, 156.47, 147.91, 145.17, 137.87, 127.38, 114.29, 105.45, 99.01, 59.32, 51.61, 48.11, 44.55, 43.07, 41.31, 40.79, 37.77, 37.54, 35.65, 31.57, 31.19, 30.39, 28.44, 27.85, 26.14, 25.83, 22.90, 20.37, 18.33, 17.95, 15.20. HRMS (ESI-MS) m/z para $C_{36}H_{50}N_3O_4^+$ $[M + H]^+$ calc. 588.3796; encontrado 588.3800.

7.3 Ensayo de inhibición *in vitro* de los compuestos 5a-5h sobre PTP1B

Se realizó un ensayo enzimático colorimétrico para la inhibición de los compuestos **5a-5h** sobre PTP1B. Los compuestos **5a-5h** y los controles positivos (AG, ácido ursólico y FC-122) se disolvieron en DMSO y se tomaron alícuotas de 0-10 μ L, con 85 μ L de una solución madre de enzima en buffer de Tris (50 mM) y 5 μ L de una solución de sustrato *p*-nitrofenilfosfato (pNPP, 10 mM). Posteriormente se incubaron durante 15 min a 37° C y se determinaron las absorbancias a una λ de 405 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.²¹ El porcentaje de inhibición se graficó como función de las concentraciones del inhibidor. El valor de CI_{50} se calculó por un análisis de regresión usando la siguiente ecuación (OriginPro 2018):

$$\%PTP1B = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{i}{CI_{50}}\right)^s}$$

Donde % PTP1B es el porcentaje de inhibición, A_{100} es la inhibición máxima, i es la concentración del inhibidor, CI_{50} es la concentración requerida para inhibir la actividad de la enzima en un 50% y s es el grado cooperatividad.²¹

8. Resultados y discusión

8.1 Síntesis orgánica

Se obtuvieron ocho compuestos derivados del ácido glicirretínico y se caracterizaron por punto de fusión, factor de retención (R_f), espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (RMN de 1H) y de carbono (RMN de ^{13}C), así como espectrometría de masas (HRMS ESI-MS). La asignación de las señales de RMN de 1H y ^{13}C y los espectros completos para cada compuesto pueden consultarse en la sección de anexos (**Espectro 1–16**). Las principales características fisicoquímicas y los rendimientos de reacción de cada compuesto se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de 5a-5h, así como los rendimientos del último paso de reacción

| Compuesto | Punto de fusión | Sistema de CCF | R_f | Apariencia | Rendimiento | |
|-----------|-----------------|---|-------|-------------------|-------------|----------|
| | | | | | Método A | Método B |
| 5a | 275-280 °C | Hexano: AcOEt (50:50) | 0.42 | Polvo blanco | 15% | 31% |
| 5b | 240-246 °C | Hexano: AcOEt (50:50) | 0.47 | Polvo blanco | 30% | ND |
| 5c | 250-255 °C | CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10) | 0.50 | Polvo beige | 27% | 69% |
| 5d | 273-278 °C | Hexano: AcOEt (40:60) | 0.50 | Polvo amarillento | 24% | 43% |
| 5e | >300 °C | CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10) | 0.375 | Polvo blanco | 33% | 60% |
| 5f | 278-280 °C | CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10) | 0.35 | Polvo blanco | 23% | 46% |
| 5g | >300 °C | Hexano: AcOEt (50:50) | 0.375 | Polvo amarillento | 15% | ND |
| 5h | 228-230 °C | Hexano: AcOEt (50:50) | 0.375 | Polvo beige | 48% | ND |

(ND) No Determinado

Como se puede observar, el paso de ciclación para la formación de los derivados pirazólicos presentó rendimientos que van del 15% al 48%, a diferencia de los pasos previos de reacción que mostraron buenos rendimientos (60 al 98%). El compuesto **5h** mostró el mejor rendimiento (48%), mientras que los derivados **5a** y **5g** fueron los menos eficientes (15%).

Uno de los factores determinantes en la eficiencia de la ciclación se puede atribuir al efecto electrónico de los sustituyentes. Los grupos electroattractores como $-NO_2$, $-CN$, $-COOH$, $-SO_2NH_2$ reducen la densidad electrónica en los sitios reactivos, disminuyendo la eficiencia de la ciclación y por ende, obtener un bajo rendimiento. Por el contrario, el grupo piridina, debido a su posible interacción electrónica favorable, facilitó la ciclación, obteniendo el mayor rendimiento de reacción

Las condiciones de reacción también jugaron un papel importante, ya que el etanol es un disolvente prótico polar, y su uso pudo haber afectado la solubilidad. Además, la temperatura de reflujo a 80°C generó la formación de los distintos subproductos observados en la cromatografía de capa fina, dificultando la purificación de los compuestos finales.

Se ha reportado que, en la síntesis de derivados de pirazol, el uso de disolventes polares apróticos como N,N-Dimetilformamida (DMF), N-metil-2-pirrolidona (NMP) o Dimetilacetamida (DMAc) permite obtener mejores rendimientos, buena regioselectividad y se pueden realizar a temperatura ambiente.²⁸

Por este motivo, se decidió optimizar este paso de reacción para la obtención de los compuestos finales. Para ello se utilizó DMF como disolvente polar aprótico, y un ajuste en la temperatura de reacción (a temperatura ambiente), como ya se ha descrito anteriormente. Estas modificaciones permitieron mejorar el rendimiento final, debido a que con el uso de EtOH como disolvente los rendimientos fueron del 15 al 48%, y con DMF fueron 2 veces mayor, logrando rendimientos del 31 al 69%. Asimismo, la ausencia de un reflujo minimizó la formación de subproductos no deseados, facilitando la purificación de los compuestos.

8.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La secuencia de reacciones empleada en este trabajo permitió obtener la serie **5a-5h**. Sin embargo, era necesario confirmar que el heterociclo pirazol estuviera fusionado al anillo A de **AG**. Por lo tanto, para obtener una asignación completa de los átomos de H y C, se realizó un análisis de los compuestos (**Figura 6**) mediante espectros de RMN de ¹H y ¹³C.

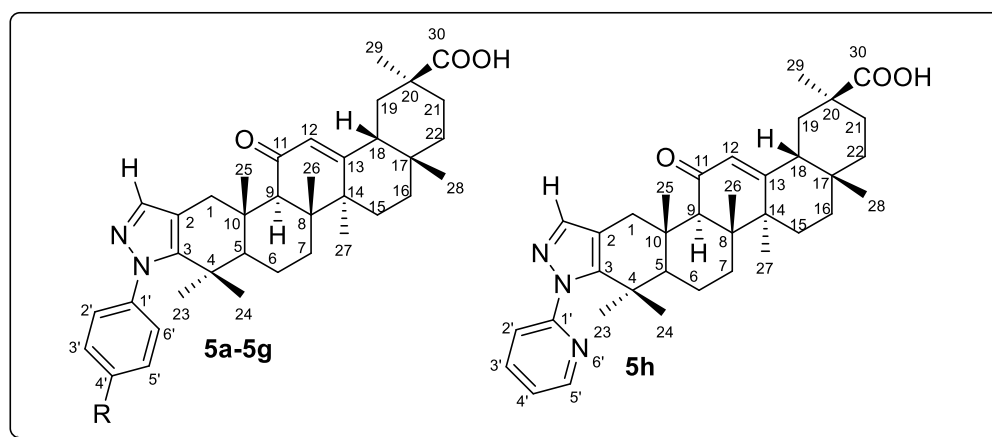


Figura 6. Numeración de carbono utilizada para la asignación de señales de RMN de ¹H y RMN de ¹³C.

Para todos los derivados pirazólicos sintetizados, los datos de desplazamiento químico del esqueleto de **AG** concuerdan con estudios previos.⁷ Por ejemplo, el singulete observado a desplazamientos de 12.20 a 12.22 ppm corresponde al hidrógeno del -COOH en posición 30 (a 11.74 ppm en el derivado **5h**). La señal del protón vinílico (H-12) se encontró a 5.5 ppm y a 5.94 para **5h**. En desplazamientos más bajos (0.78 a 1.38 ppm), los siete singuletes que integran para tres protones cada uno se asignaron a los siete metilos presentes en el esqueleto (de 0.86 a 1.31 ppm para **5h**).

Sin embargo, hay algunas señales representativas en la región aromática de 7.28 a 8.05 ppm. Los dos dobletes que integran para un protón característicos de un patrón *para* sustituido se

asignaron al anillo de fenilo: $J = 8.8$ y 8.5 Hz para **5a**, $J = 8.8$ y 8.7 Hz para **5b**, $J = 9.08$ y 8.7 Hz para **5c**, $J = 8.45$ y 8.43 Hz para **5d**, $J = 8.32$ y 8.32 Hz para **5f** y $J = 8.10$ y 8.21 Hz para **5g**. Mientras que un singulete de 7.32 a 7.40 ppm correspondió al anillo de pirazol. Para **5h**, se asignaron dos dobletes ($J = 4.69$ y 8.57 Hz) para H-2' y H-5' respectivamente, dos señales a 7.59 (H-4') y a 6.66 (H-3') y un singulete a 7.45 ppm correspondiente al anillo de pirazol. Asimismo, se asignaron señales para los hidrógenos de algunos sustituyentes, tales como una señal triple a 7.36 ppm ($J = 73.71$ Hz) de $-OCF_2H$ para **5b** y un singulete a 7.53 ppm de $-SO_2NH_2$ para **5c**.

De igual manera, las señales del esqueleto de **AG** observadas en los espectros de RMN de ^{13}C coinciden con las anteriormente reportadas.⁷ Por ejemplo, en desplazamientos de 198.53 a 198.78 ppm se encuentra la señal de C-11, de 177.63 a 177.68 ppm a C-30 y de 127.38 a 127.42 a C-12. En desplazamientos menores, en un rango de 30.39 a 15.20 ppm se obtuvieron siete señales asignadas a los CH_3 -23 al 29. En la región aromática, el CH-pirazol se observó a desplazamientos de 137 y 138 ppm, mientras que las señales del fenilo (C-1' a C'6) en una región de 145 a 113 ppm. También se obtuvieron señales propias de los sustituyentes, por ejemplo, señales cuádruples a 120.01 ppm ($J = 256.86$ Hz) de $-OCF_3$ para **5a** y a 129.52 ppm ($J = 307.95$ Hz) de $-SCF_3$ para **5g** y una señal triple a 116.20 ppm ($J = 258.26$ Hz) de $-OCF_2H$ para **5b**.

8.3 Ensayo de actividad *in vitro*

Se realizó la evaluación de la actividad inhibitoria del AG y los compuestos **5a-5h** sobre la enzima $hPTP1B_{1-400}$ mediante un ensayo enzimático colorimétrico (**Tabla 2**). Se realizaron distintas evaluaciones de los compuestos **5a-5h** en un rango de concentración de $0-50$, $0-20$ y $0-10$ μM para obtener la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) (**Gráfico 1**).

Tabla 2. Resultados de la actividad inhibitoria sobre PTP1B y valores de solubilidad acuosa y coeficiente de reparto octanol-agua determinados en SwissADME

| Compuesto | $CI_{50} \pm D.S$ (μM) | Solubilidad acuosa (mg/mL) | $\text{Log } p_{o/w}$ |
|-----------------------|----------------------------------|---|-----------------------|
| 5a | 2.2 ± 0.15 | 1.23×10^{-7} | 7.49 |
| 5b | 6.1 ± 0.58 | 2.24×10^{-7} | 7.18 |
| 5c | 1.4 ± 0.18 | 4.92×10^{-6} | 5.39 |
| 5d | 6.8 ± 0.16 | 1.55×10^{-6} | 6.37 |
| 5e | 10.3 ± 0.50 | 4.91×10^{-6} | 5.75 |
| 5f | ND | 1.89×10^{-6} | 6.13 |
| 5g | 2.0 ± 0.04 | 4.58×10^{-8} | 7.97 |
| 5h | 5.1 ± 0.02 | 3.95×10^{-6} | 5.95 |
| AG | 29.0 ± 0.36 | 3.32×10^{-4} | 5.16 |
| Ácido ursólico | 5.6 ± 0.31 | 2.69×10^{-5} | 5.87 |
| FC-122 | 2.1 ± 0.14 | 6.87×10^{-7} | 6.93 |

(ND) No Determinado

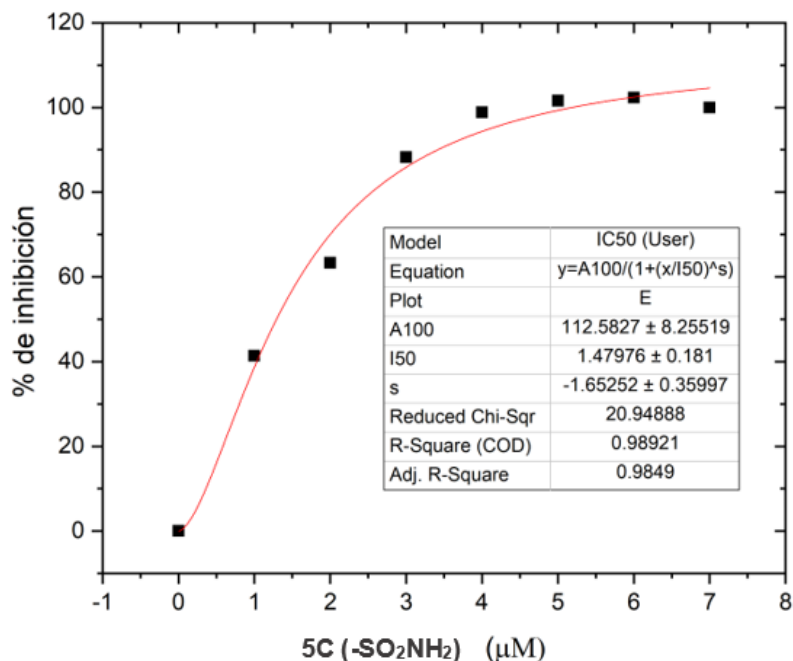


Gráfico 1. Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de **5c** en un rango de concentración de 0 a 7 μ M.

Con los datos anteriores, es evidente que la actividad inhibitoria sobre PTP1B, es proporcional al valor del Log P , así pues, el derivado **5e** con una amida como sustituyente (Log $P = 5.75$), demostró la menor potencia contra PTP1B de todos los derivados y mayor solubilidad acuosa que el FC-122 de acuerdo con SwissADME. En cambio, el compuesto **5g** con un trifluorometilitio (Log $P = 7.97$) como sustituyente, fue el segundo compuesto más potente de toda la serie, tres veces más potente que el ácido ursólico, equipotente al FC-122 y con menor solubilidad acuosa que el FC-122. Es probable que el sitio donde se unen estos compuestos en la PTP1B tenga residuos de carácter hidrofóbico, lo que favorece la interacción con los grupos lipofílicos de los compuestos **5a** y **5g**, principalmente. Por otra parte, los compuestos **5d**, **5e** y **5h** presentaron mejor solubilidad acuosa y un valor de Log P más bajo que FC-122, pero al realizar una comparación entre sus resultados de CI_{50} , su potencia es de 3 a 5 veces menor que la del FC-122 contra PTP1B.

No obstante, el compuesto **5c** con una sulfonamida como sustituyente fue el más potente de la serie (*hit*) en la inhibición de PTP1B, con un CI_{50} de 1.4 μ M, superando a otros compuestos como **5a** ($CI_{50} = 2.2 \mu$ M) y **5g** ($CI_{50} = 2.0 \mu$ M). Además, **5c** mostró ser ligeramente más potente que el FC-122, cuatro veces más potente que el ácido ursólico y 20 veces más que el AG. Esto se puede atribuir a que este grupo permite la formación de puentes de hidrógeno con residuos clave en el sitio donde se esté uniendo a PTP1B.

Adicional a esto, **5c** presentó la mayor solubilidad acuosa calculada en comparación con el resto de compuestos y que el control FC-122. Esto sugiere que **5c** permite que el compuesto esté más disponible en el medio biológico, favoreciendo su interacción con la enzima. Con respecto al Log P , de acuerdo con las reglas de Lipinski, una de las propiedades biofísicas requeridas para un candidato a fármaco oralmente activo es un valor de log $P < 5$. Pese a que Lipinski excluyó explícitamente los productos naturales de estas reglas, a menudo permiten establecer correlaciones entre la potencia, la solubilidad y el valor de log P .³² Por ende, el compuesto **5c** tiene el

log P más cercano a 5 (5.39) indicando una lipofilia moderada en comparación con **5a** (Log P = 7.49) y **5g** (Log P = 7.97), lo que sugiere que la incorporación de grupos polares y/o voluminosos como la sulfonamida es una estrategia efectiva en el diseño de inhibidores de PTP1B.

Por otro lado, el estudio de los dominios estructurales de PTP1B ha permitido desarrollar estrategias de inhibición dirigidas a la enzima. El dominio catalítico (PTP1B₁₋₃₀₀) es el sitio objetivo para desarrollar inhibidores competitivos, bidentados y alostéricos, y el dominio regulador (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀) es un segundo sitio diana de inhibición alostérica. Asimismo, la forma completa de *h*PTP1B es la que se encuentra *in vivo* en el espacio citosólico, y parece que la región no estructurada juega un papel importante en la modulación de la actividad de la enzima.²⁹

Debido a lo antes mencionado, se realizó el ensayo de inhibición enzimática, de los compuestos más potentes **5c** y **5g** sobre la enzima PTP1B en su forma corta (*h*PTP1B₁₋₂₈₅) y en su forma larga (*h*PTP1B₁₋₄₀₀).

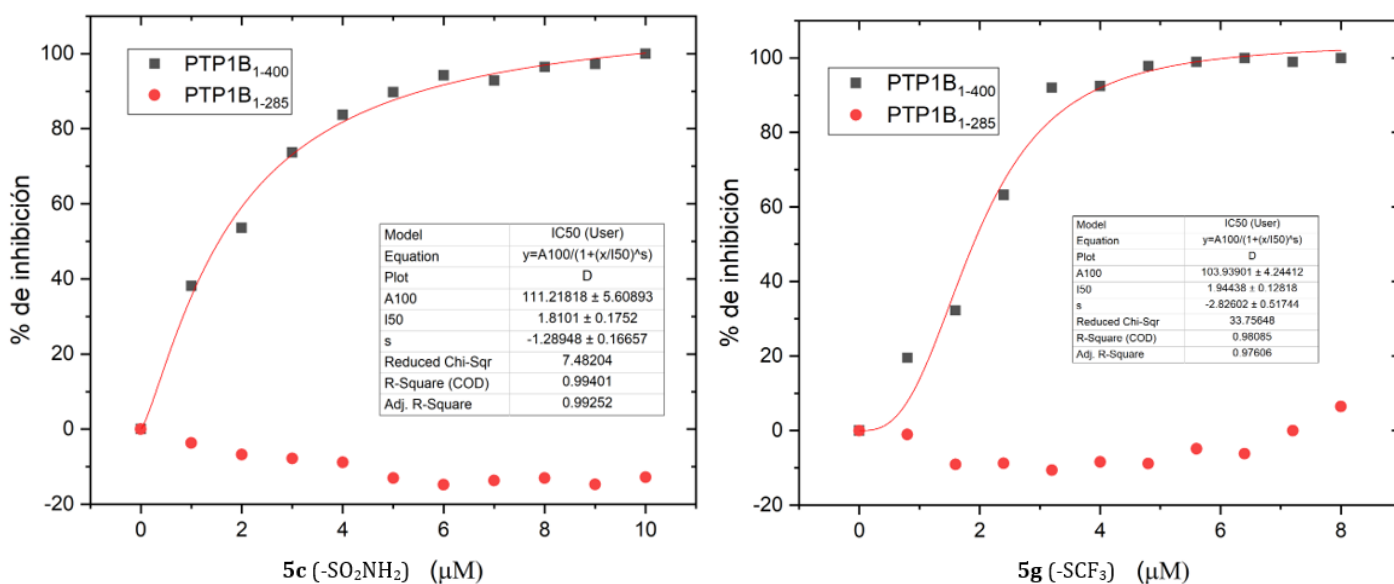


Gráfico 2. Ensayo de inhibición enzimática de los compuestos **5c** (izquierda) y **5g** (derecha) utilizando las variantes *h*PTP1B₁₋₂₈₅ y *h*PTP1B₁₋₄₀₀

Los resultados indicaron que la inhibición varía dependiendo de la longitud de la *h*PTP1B utilizada para realizar el ensayo de actividad (forma corta o larga), ya que no hubo inhibición sobre *h*PTP1B₁₋₂₈₅ en un rango de concentración de 0-10 µM por parte de los compuestos **5c** y **5g**. En cambio, sobre *h*PTP1B₁₋₄₀₀, se obtienen los valores de CI_{50} anteriormente calculados (**Gráfico 2**). Esto indica que si el rango de concentración hubiera sido más amplio (ej. 0-50 µM) al utilizar *h*PTP1B₁₋₂₈₅, los valores de CI_{50} serían mayores que los obtenidos con *h*PTP1B₁₋₄₀₀.

Por lo tanto, utilizar la enzima en su forma completa (incluyendo la parte no estructurada, *h*PTP1B₁₋₄₀₀), que es la que se encuentra *in vivo*, influye positivamente en el cálculo de este parámetro y es crucial para obtener resultados de inhibición fiables.²⁹

9. Conclusiones

Se realizó la síntesis de ocho derivados del ácido glicirretínico (con rendimientos globales de reacción del 10-33%) y se caracterizaron por punto de fusión, factor de retención, RMN de ¹H,

^{13}C y espectrometría de masas. La ruta de síntesis empleada y la optimización del último paso de reacción permitió obtener los compuestos finales con mejores rendimientos de reacción.

Los compuestos **5a-5h** demostraron ser inhibidores más potentes que el AG en la evaluación *in vitro* y solo el derivado **5c** con un grupo sulfonamida como sustituyente, demostró ser el derivado más potente de la serie (*hit*), así como el que tiene una mayor solubilidad acuosa calculada y un valor de log *P* moderado. Este compuesto además mostró ser más potente que el FC-122 así como cuatro veces más potente que el ácido ursólico (compuesto de referencia).

Estos resultados resaltan la relevancia de la modificación estructural en la optimización de inhibidores de PTP1B y su potencial en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

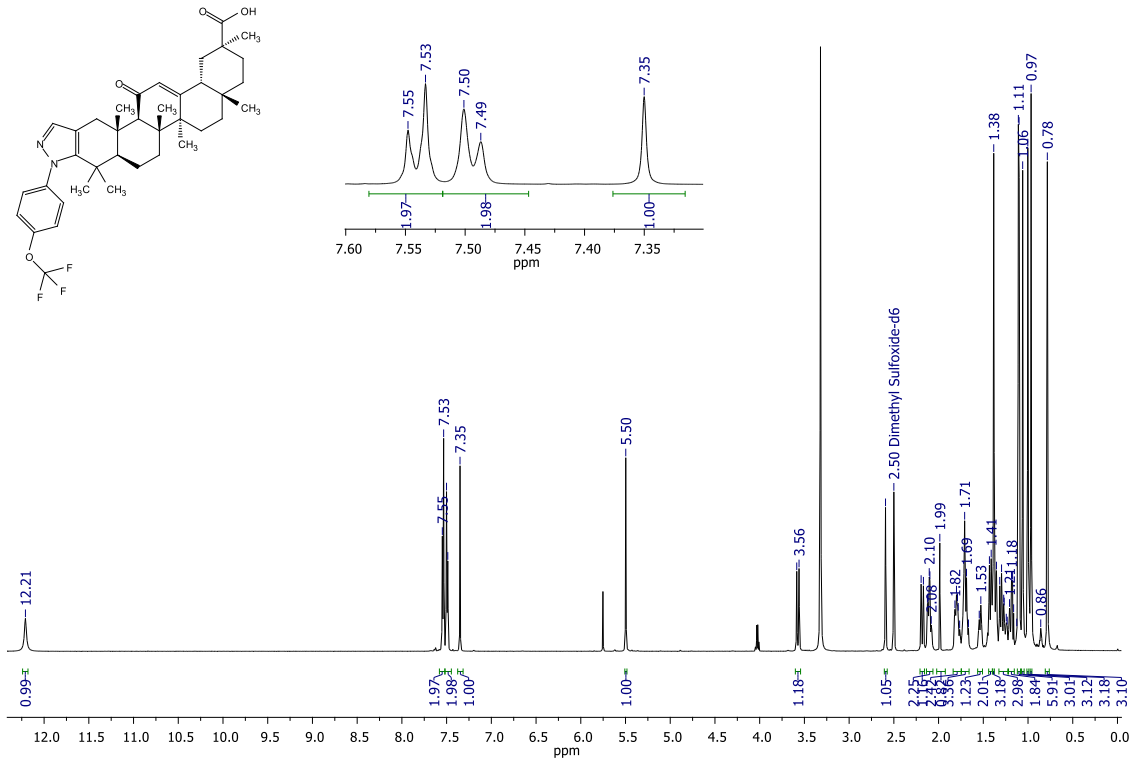
10. Referencias

1. Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., ... & Magliano, D. J. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 183, 109119.
2. Tripathi, B. K., & Srivastava, A. K. (2006). Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit*, 12(7), 130-47.
3. Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., ... & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6275.
4. Jones, R. M. (Ed.). (2012). *New therapeutic strategies for type 2 diabetes: small molecule approaches* (Vol. 27). Royal Society of Chemistry.
5. Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V. S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., ... & Mirza, W. (2017). Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. *Frontiers in endocrinology*, 8, 6.
6. Álvarez-Almazán, S., Solís-Domínguez, L. C., Duperou-Luna, P., Fuerte-Gómez, T., González-Andrade, M., Aranda-Barradas, M. E., ... & Cortés-Benítez, F. (2023). Anti-diabetic activity of glycyrrhetic acid derivatives FC-114 and FC-122: scale-up, in silico, in vitro, and in vivo studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12812.
7. De-la-Cruz-Martínez, L., Duran-Becerra, C., González-Andrade, M., Páez-Franco, J. C., Germán-Acacio, J. M., Espinosa-Chávez, J., ... & Cortés-Benítez, F. (2021). Indole- and pyrazole-glycyrrhetic acid derivatives as PTP1B inhibitors: Synthesis, in vitro and in silico studies. *Molecules*, 26(14), 4375.
8. Xu, L., Li, Y., Dai, Y., & Peng, J. (2018). Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacological research*, 130, 451-465.
9. Picardi, P. K., Calegari, V. C., de Oliveira Prada, P., Contin Moraes, J., Araujo, E., Gomes Marcondes, M. C. C., ... & Abdalla Saad, M. J. (2008). Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology*, 149(8), 3870-3880.
10. Liu, R., Mathieu, C., Berthelet, J., Zhang, W., Dupret, J. M., & Rodrigues Lima, F. (2022). Human protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): from structure to clinical inhibitor perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7027.
11. Liu, Z., Gao, H., Zhao, Z., Huang, M., Wang, S., & Zhan, J. (2023). Status of research on natural protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as potential antidiabetic agents: Update. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 157, 113990.
12. Villamar-Cruz, O., Loza-Mejía, M. A., Arias-Romero, L. E., & Camacho-Arroyo, I. (2021). Recent advances in PTP1B signaling in metabolism and cancer. *Bioscience Reports*, 41(11), BSR20211994.

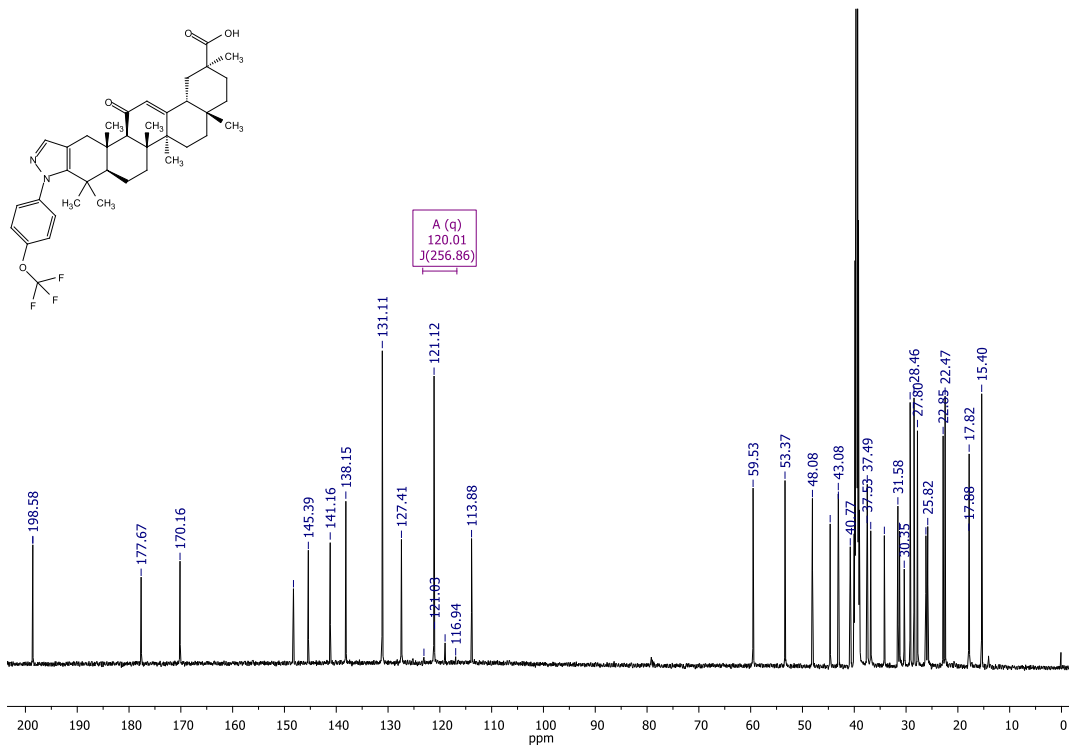
13. Kalaiarasi, P., & Pugalendi, K. V. (2009). Antihyperglycemic effect of 18 β -glycyrrhetic acid, aglycone of glycyrrhizin, on streptozotocin-diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 606(1-3), 269-273.
14. Wang, L. J., Jiang, B., Wu, N., Wang, S. Y., & Shi, D. Y. (2015). Natural and semisynthetic protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors as anti-diabetic agents. *RSC Advances*, 5(60), 48822-48834.
15. Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., ... & Kennedy, B. P. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 283(5407), 1544-1548.
16. Kowalska, A., & Kalinowska-Lis, U. (2019). 18 β -Glycyrrhetic acid: its core biological properties and dermatological applications. *International journal of cosmetic science*, 41(4), 325-331.
17. Shinu, P., Gupta, G. L., Sharma, M., Khan, S., Goyal, M., Nair, A. B., ... & Altaweel, A. A. A. (2023). Pharmacological features of 18 β -glycyrrhetic acid: A pentacyclic triterpenoid of therapeutic potential. *Plants*, 12(5), 1086.
18. Delibegović, M., Dall'Angelo, S., & Dekeryte, R. (2024). Protein tyrosine phosphatase 1B in metabolic diseases and drug development. *Nature Reviews Endocrinology*, 20(6), 366-378.
19. Hussain, H., Green, I. R., Shamraiz, U., Saleem, M., Badshah, A., Abbas, G., ... & Irshad, M. (2018). Therapeutic potential of glycyrrhetic acids: a patent review (2010-2017). *Expert opinion on therapeutic patents*, 28(5), 383-398.
20. Qiu, W. W., Shen, Q., Yang, F., Wang, B., Zou, H., Li, J. Y., ... & Tang, J. (2009). Synthesis and biological evaluation of heterocyclic ring-substituted maslinic acid derivatives as novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(23), 6618-6622.
21. Díaz-Rojas, M., Raja, H., González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., & Mata, R. (2021). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*. *Phytochemistry*, 184, 112664.
22. World Health Organization (2024). Diabetes. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
23. Bello-Chavolla OY, Antonio-Villa NE, ... & Seiglie JA. (2022). Diabetes Related Excess Mortality in Mexico: A Comparative Analysis of National Death Registries Between 2017-2019 and 2020. *Diabetes Care*. 1;45(12):2957-2966
24. Paniagua-Herrera, D. (2024). The health care situation of people living with diabetes in Mexico. *Diabetes*.
25. Na, M.; Cui, L.; Min, B.S.; Bae, K.; Yoo, J.K.; Kim, B.Y.; Oh, K.; Ahn, J.S. (2006). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of triterpenes isolated from *Astilbe koreana*. *Bioorganic Med. Chem.* 16, 3273–3276
26. Liu, R., Mathieu, C., Berthelet, J., Zhang, W., Dupret, J. M., & Rodrigues Lima, F. (2022). Human protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): from structure to clinical inhibitor perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7027.
27. Sharma, B., Xie, L., Yang, F., Wang, W., Zhou, Q., Xiang, M., ... & Deng, W. (2020). Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 199, 112376.
28. Karrouchi, K., Radi, S., Ramli, Y., Taoufik, J., Mabkhot, Y. N., Al-Aizari, F. A., & Ansar, M. H. (2018). Synthesis and pharmacological activities of pyrazole derivatives: A review. *Molecules*, 23(1), 134.
29. Coronell-Tovar, A., Cortés-Benítez, F., & González-Andrade, M. (2023). The importance of including the C-terminal domain of PTP1B1-400 to identify potential antidiabetic inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 2170369.
30. Sharapova, A., Ol'khovich, M., Blokhina, S., & Perlovich, G. L. (2022). Experimental examination of solubility and lipophilicity as pharmaceutically relevant points of novel bioactive hybrid compounds. *Molecules*, 27(19), 6504.
31. Guibelondo, Dex Marco. (2024). Balancing Act: Optimizing Physicochemical Properties for Successful Drug Discovery. *Pharma Features*.

32. Beutler, J. A. (2019). Natural products as a foundation for drug discovery. *Current protocols in pharmacology*, 86(1), e67.
33. Tautz, L., Critton, D. A., & Grotegut, S. (2013). Protein tyrosine phosphatases: structure, function, and implication in human disease. *Phosphatase Modulators*, 179-221.

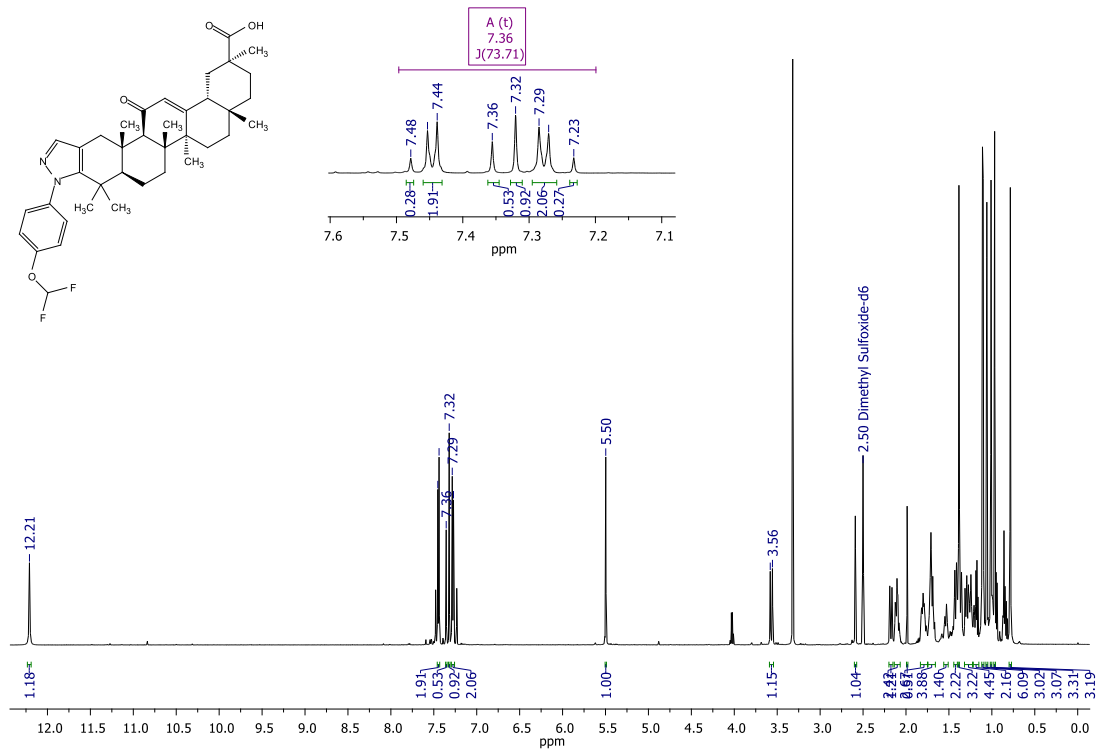
11. Anexos



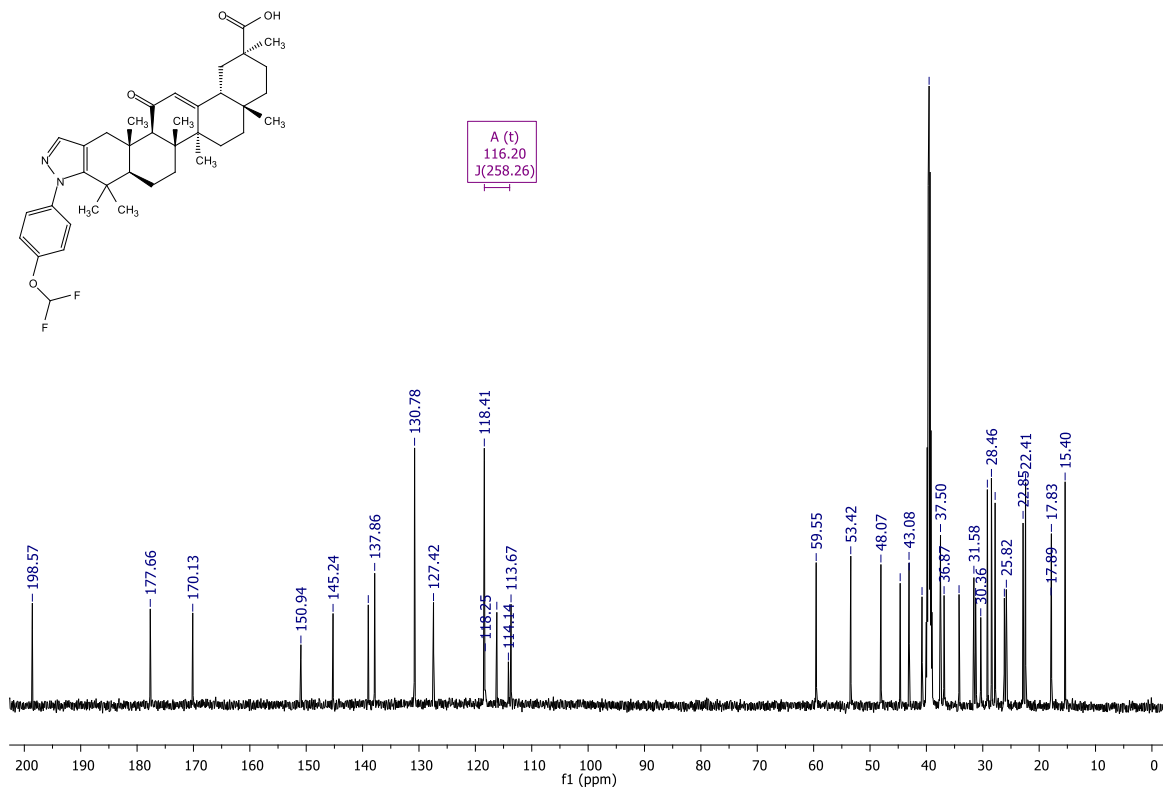
Espectro 1. RMN de ¹H (600 MHz) del compuesto **5a** en DMSO-d₆



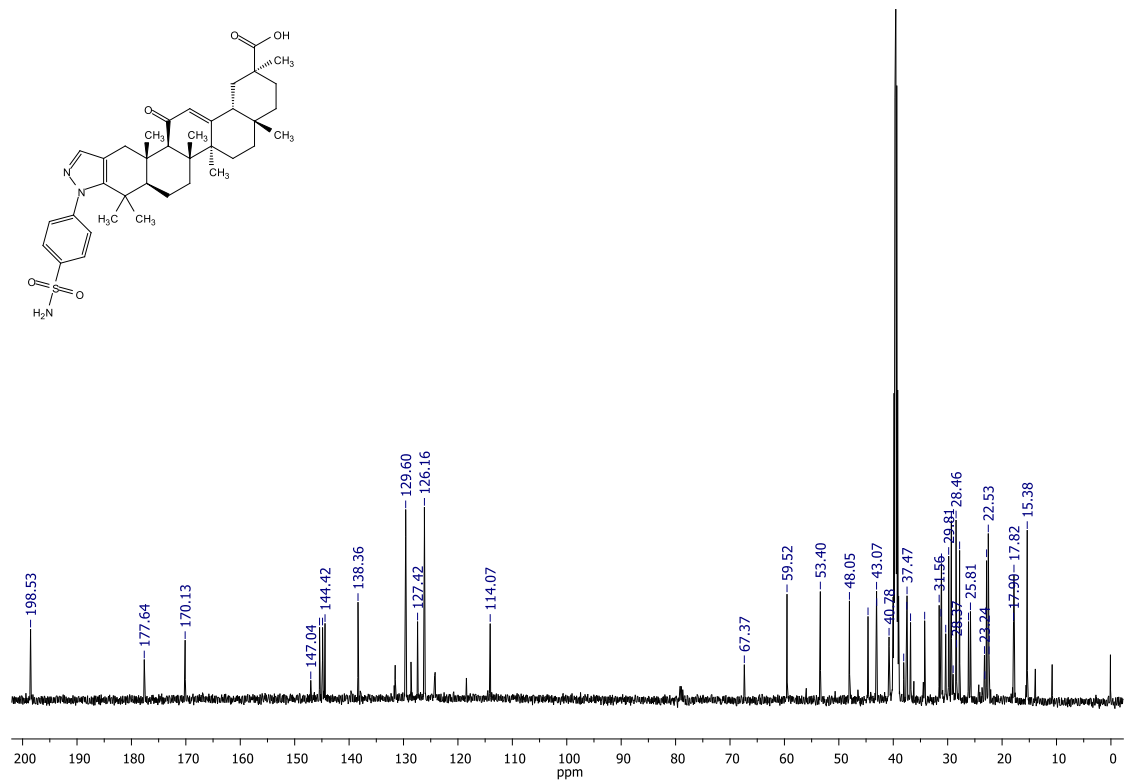
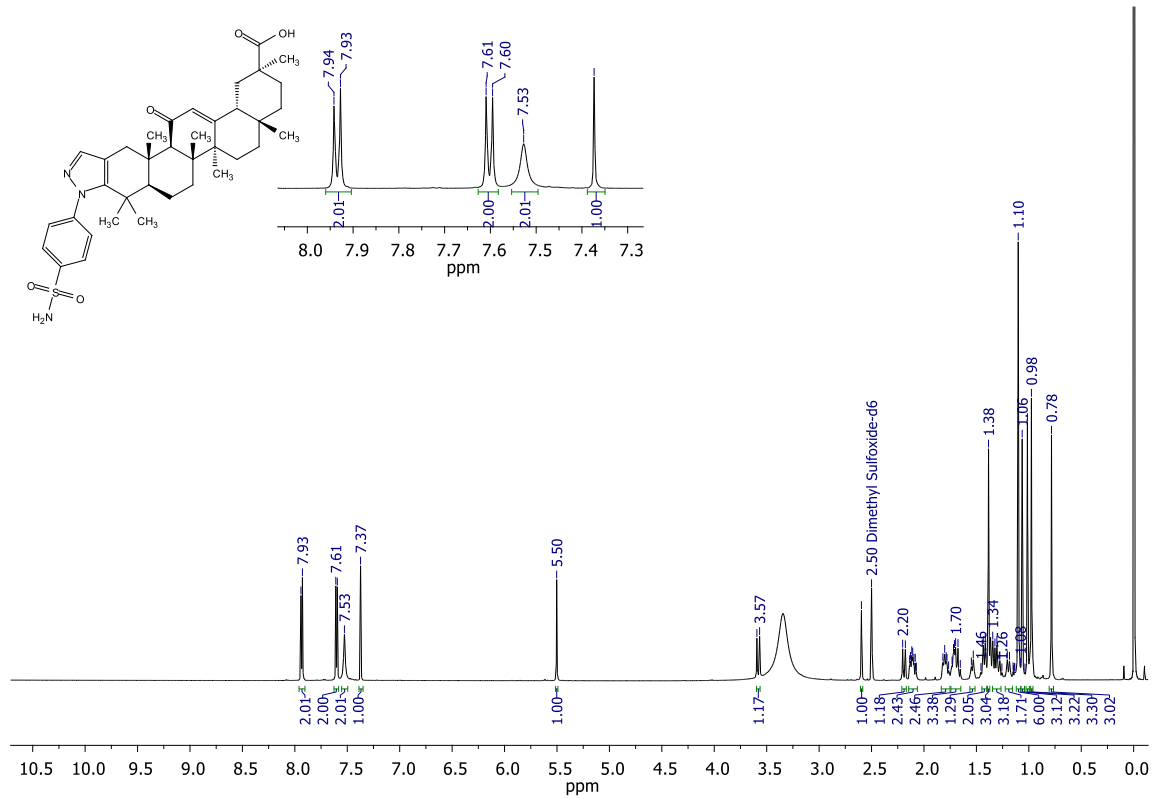
Espectro 2. RMN de ¹³C (151 MHz) del compuesto **5a** en DMSO-d₆

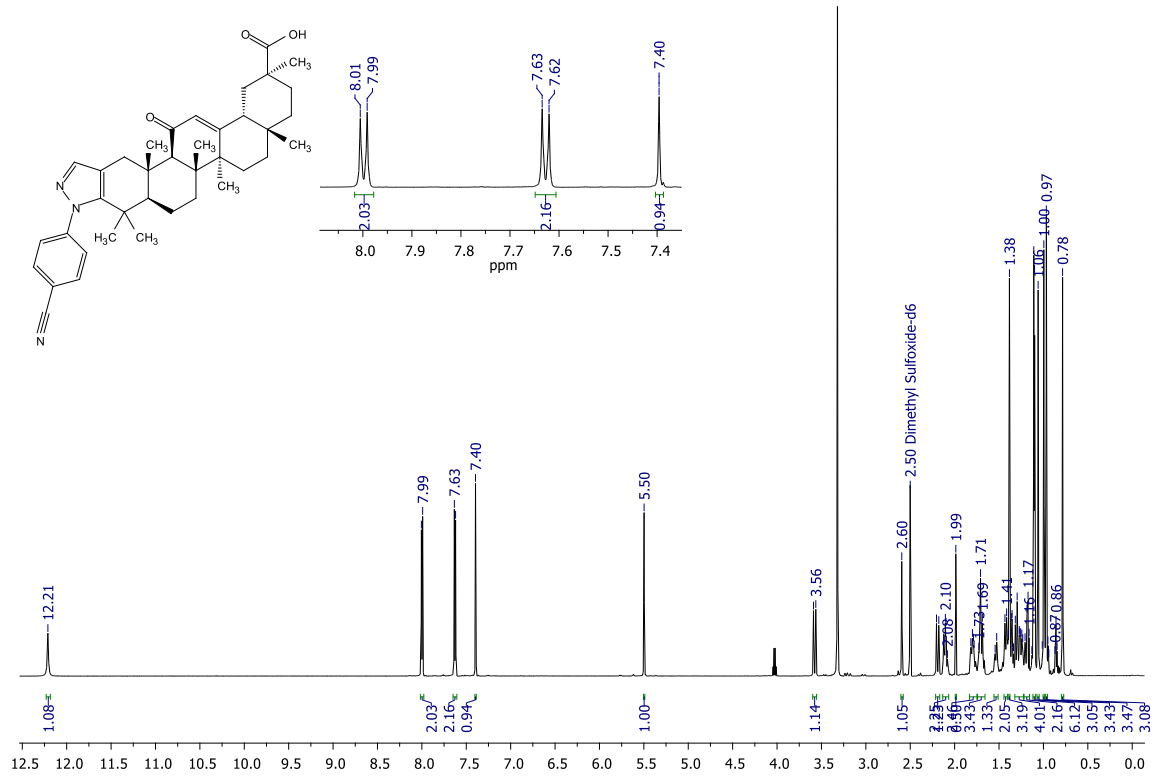


Espectro 3. RMN de ^1H (600 MHz) del compuesto **5b** en $\text{DMSO-}d_6$

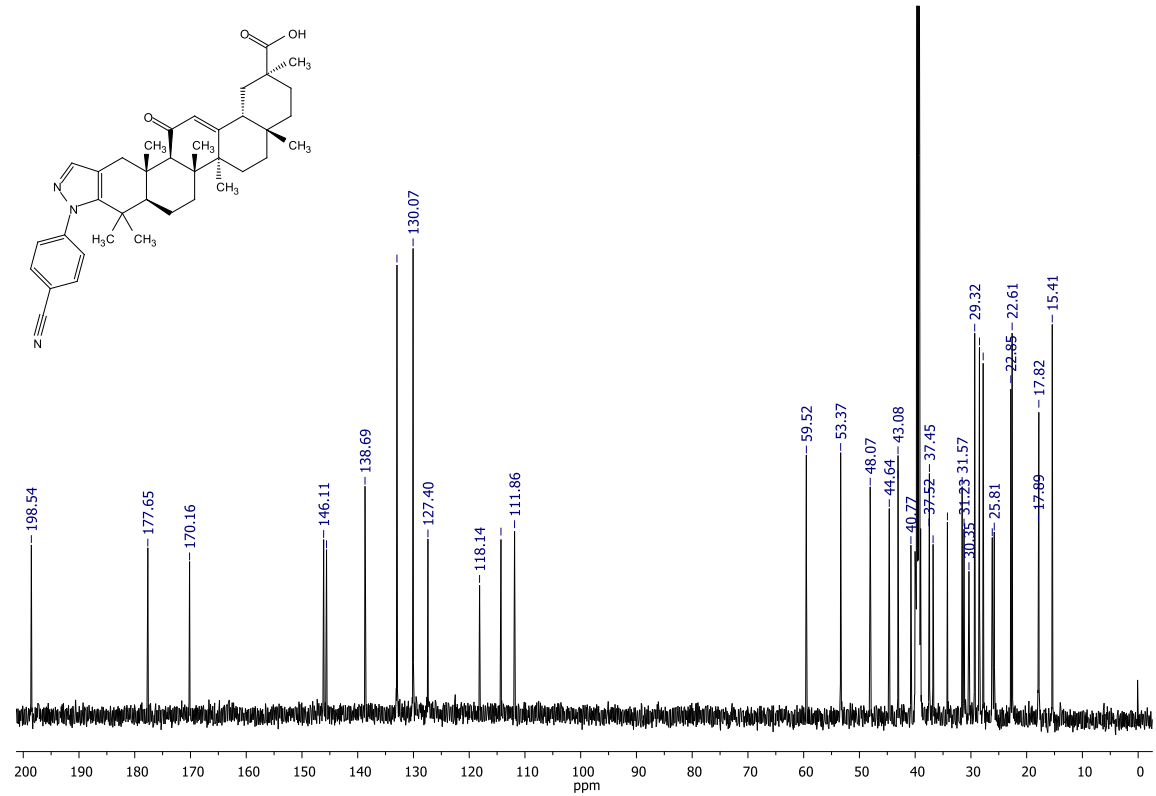


Espectro 4. RMN de ^{13}C (151 MHz) del compuesto **5b** en $\text{DMSO-}d_6$

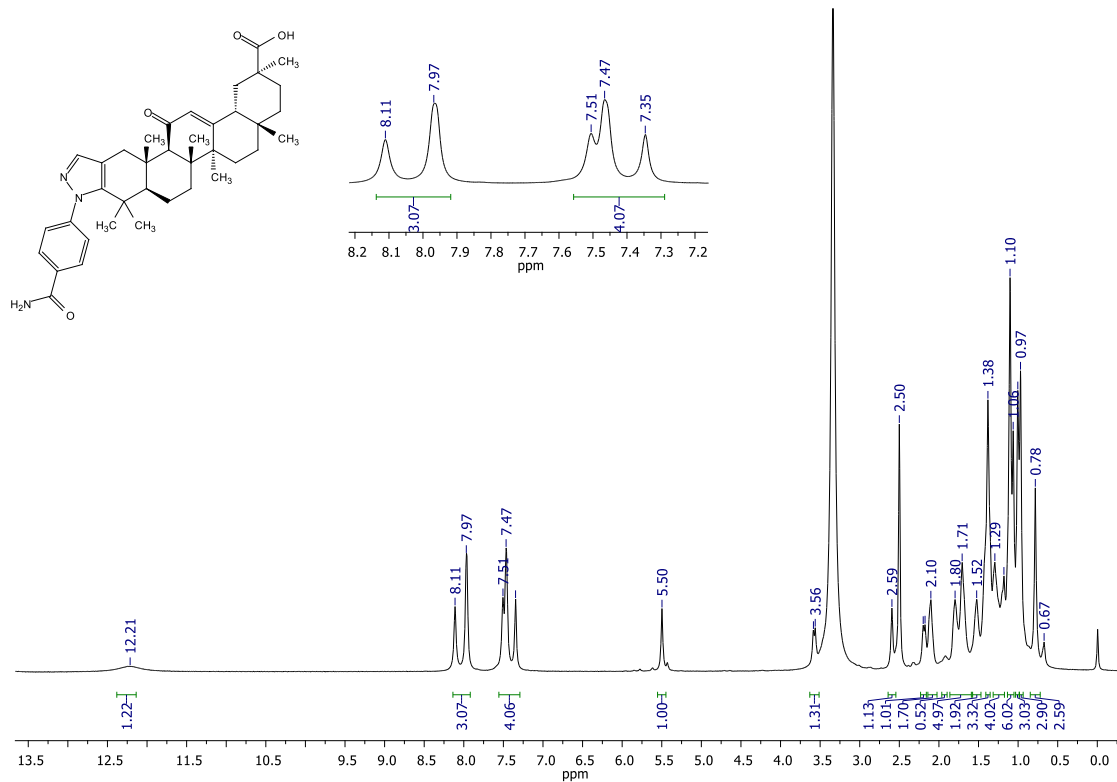




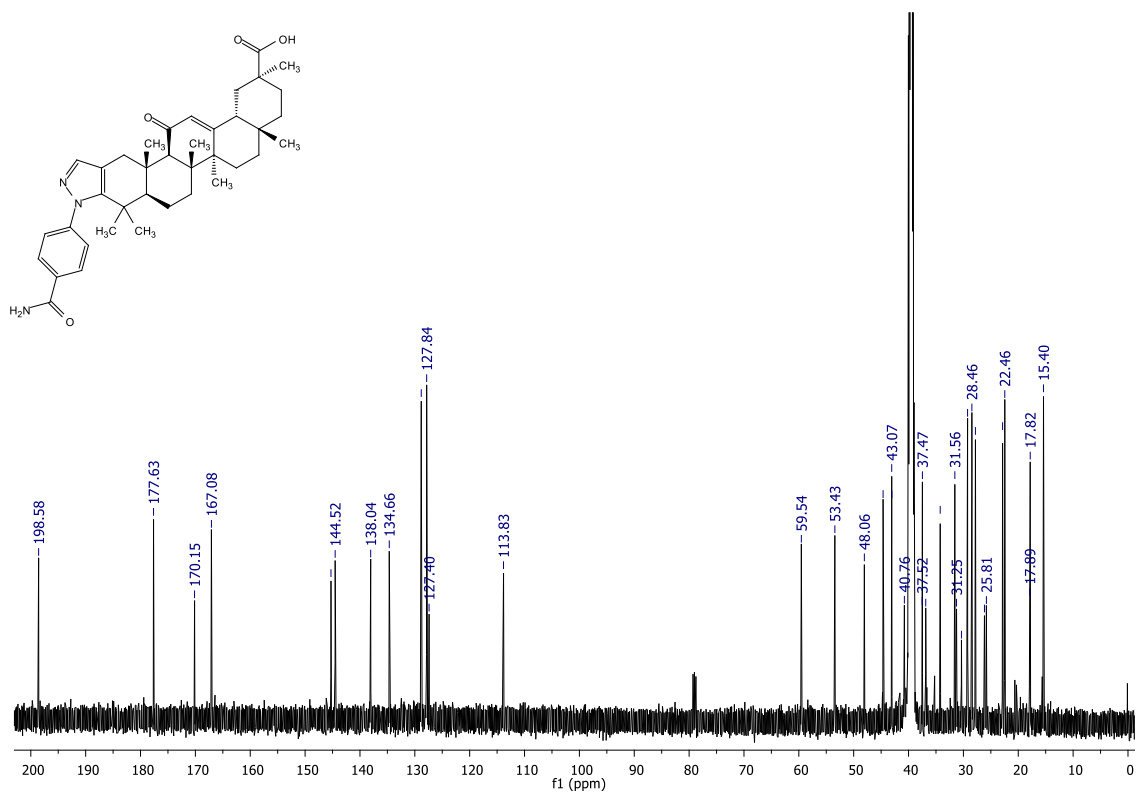
Espectro 7. RMN de ¹H (600 MHz) del compuesto 5d en DMSO-d₆



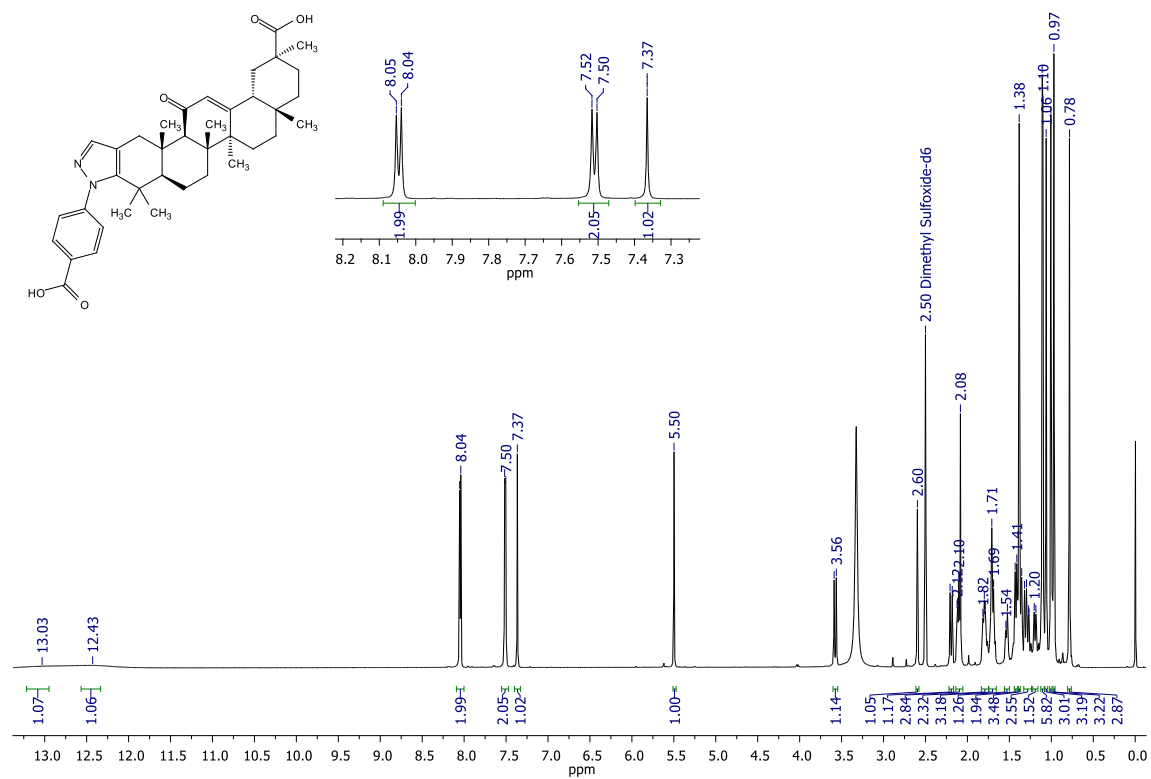
Espectro 8. RMN de ¹³C (151 MHz) del compuesto 5d en DMSO-d₆



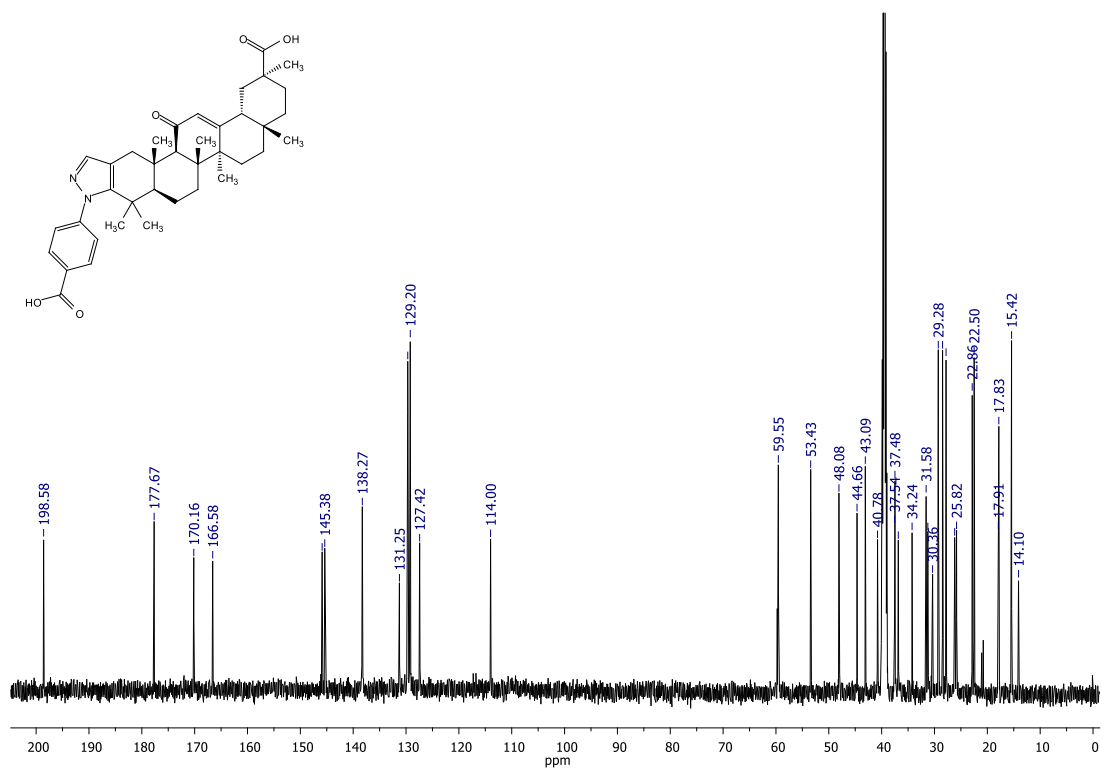
Espectro 9. RMN de ^1H (600 MHz) del compuesto **5e** en $\text{DMSO-}d_6$



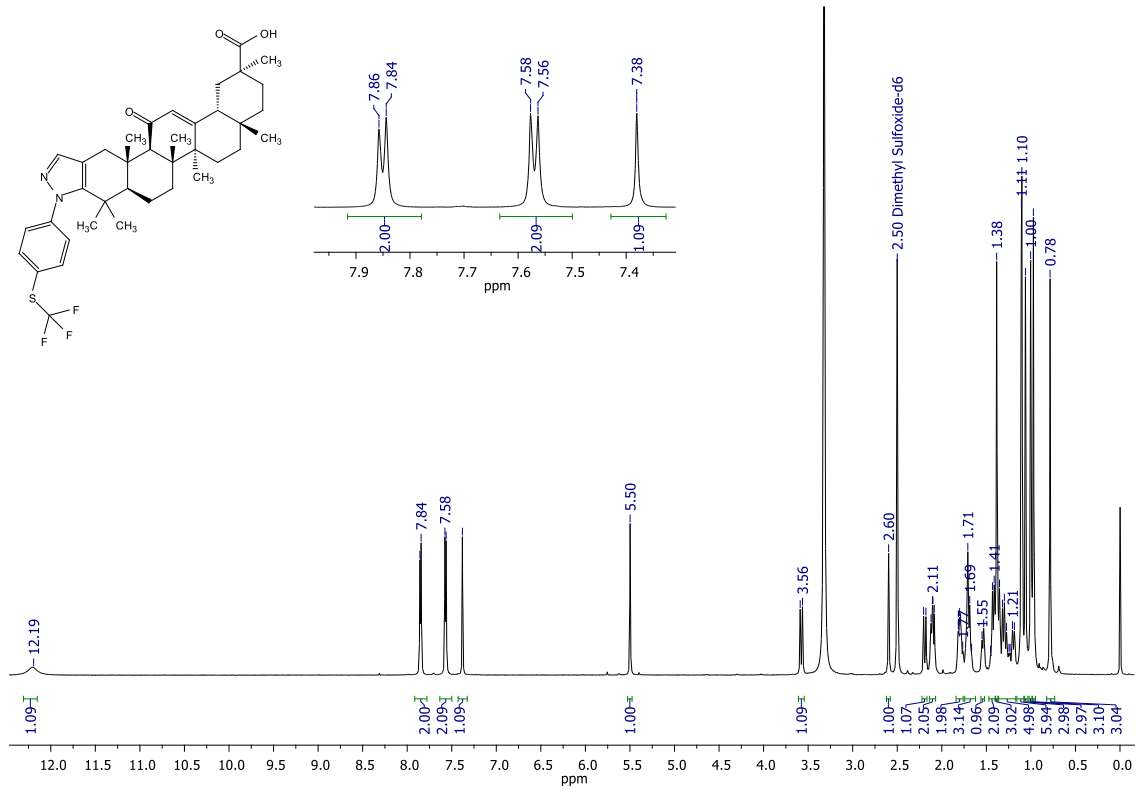
Espectro 10. RMN de ^{13}C (151 MHz) del compuesto **5e** en $\text{DMSO-}d_6$



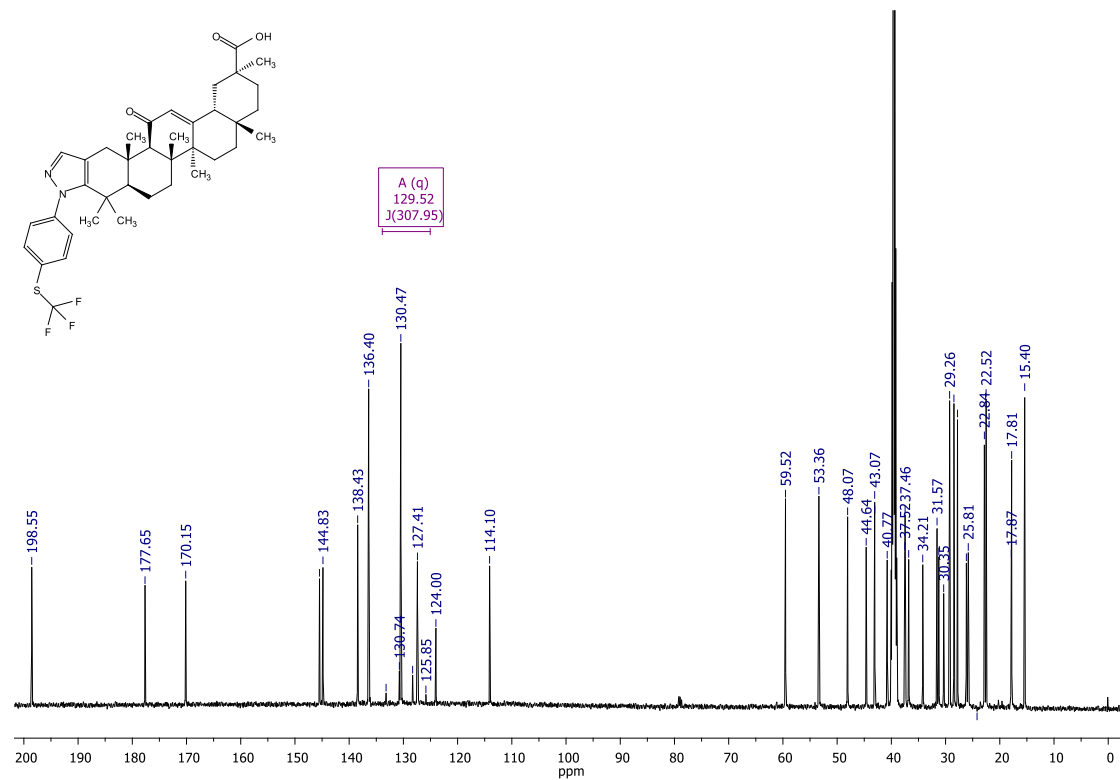
Espectro 11. RMN de ¹H (600 MHz) del compuesto **5f** en DMSO-d₆



Espectro 12. RMN de ¹³C (151 MHz) del compuesto **5f** en DMSO-d₆



Espectro 13. RMN de ^1H (600 MHz) del compuesto **5g** en $\text{DMSO-}d_6$



Espectro 14. RMN de ^{13}C (151 MHz) del compuesto **5g** en $\text{DMSO-}d_6$

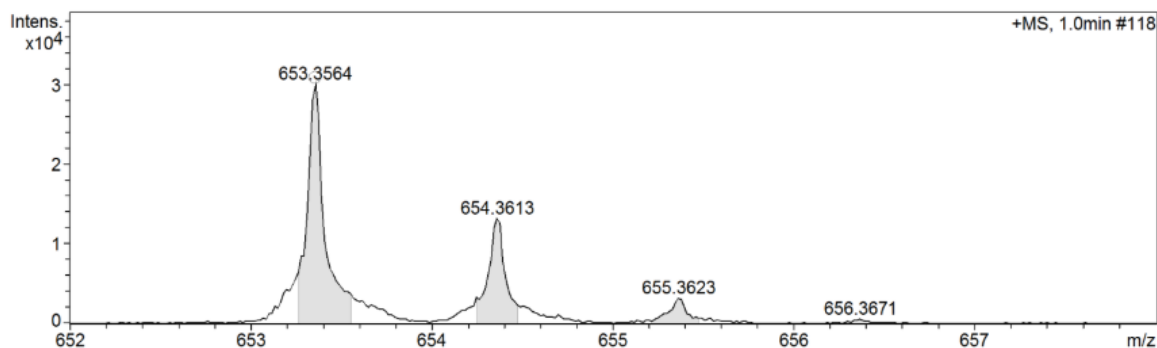
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

| | | | |
|---------------|--|------------------|-----------------------|
| Analysis Name | D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240819_C-71.d | Acquisition Date | 8/21/2024 5:13:33 AM |
| Method | Tune Low extendido.m | Operator | Admin |
| Sample Name | 20240819_C-71 | Instrument | micrOTOF 213750.00410 |
| Comment | | | |

Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------|----------|----------------------|----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 0.5 Bar |
| Focus | Active | | | Set Dry Heater | 150 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set Capillary | 4500 V | Set Dry Gas | 4.0 l/min |
| Scan End | 3000 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Divert Valve | Waste |



| Meas. m/z | # | Ion Formula | Sum Formula | m/z | err [ppm] | err [mDa] | z | mSigma | # mSigma | e ⁻ Conf |
|-----------|---|--------------|--------------|----------|-----------|------------|----|--------|----------|---------------------|
| 653.3564 | 1 | C38H48F3N2O4 | C38H47F3N2O4 | 653.3561 | -0.5 | 0.3 | 1+ | 8.5 | 1 | even |

Espectro 3. Fórmula del espectro de masas del compuesto 5a

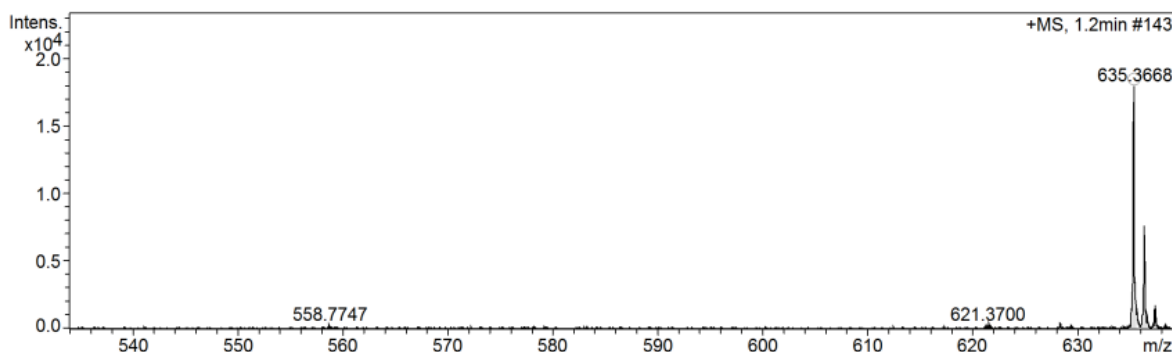
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

| | | | |
|---------------|--|------------------|-----------------------|
| Analysis Name | D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240819_C-70.d | Acquisition Date | 8/21/2024 4:55:55 AM |
| Method | Tune Low extendido.m | Operator | Admin |
| Sample Name | 20240819_C-70 | Instrument | micrOTOF 213750.00410 |
| Comment | | | |

Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------|----------|----------------------|----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 0.5 Bar |
| Focus | Active | | | Set Dry Heater | 150 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set Capillary | 4500 V | Set Dry Gas | 4.0 l/min |
| Scan End | 3000 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Divert Valve | Waste |



| Meas. m/z | # | Ion Formula | Sum Formula | m/z | err [ppm] | err [mDa] | z | mSigma | # mSigma | e ⁻ Conf |
|-----------|---|--------------|--------------|----------|-----------|------------|----|--------|----------|---------------------|
| 635.3668 | 1 | C38H49F2N2O4 | C38H48F2N2O4 | 635.3655 | -2.0 | 1.3 | 1+ | 8.5 | 1 | even |

Espectro 4. Fórmula del espectro de masas del compuesto 5b

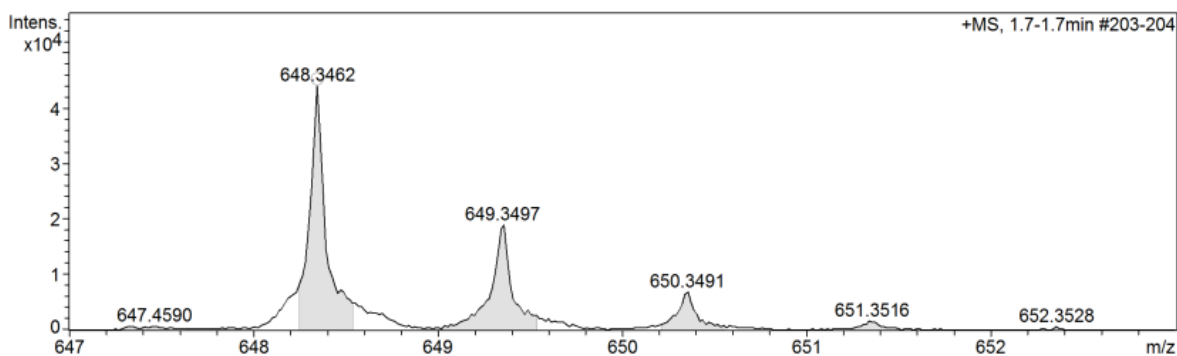
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

| | | | |
|---------------|--|------------------|-----------------------|
| Analysis Name | D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240820_C-84.d | Acquisition Date | 8/22/2024 3:46:28 AM |
| Method | Tune Low extendido.m | Operator | Admin |
| Sample Name | 20240820_C-84 | Instrument | micrOTOF 213750.00410 |
| Comment | | | |

Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------|----------|----------------------|----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 0.5 Bar |
| Focus | Active | | | Set Dry Heater | 150 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set Capillary | 4500 V | Set Dry Gas | 4.0 l/min |
| Scan End | 3000 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Divert Valve | Waste |



| Meas. m/z | # | Ion Formula | Sum Formula | m/z | err [ppm] | err [mDa] | z | mSigma | # mSigma | e ⁻ Conf |
|-----------|---|---------------|-------------|-----------|-----------|------------|----|--------|----------|---------------------|
| 648.3462 | 1 | C37H50N3O5S | C37H49N3O5S | 648.3466 | 0.5 | 0.3 | 1+ | 7.9 | 2 | even |
| 1295.6805 | 1 | C74H99N6O10S2 | | 1295.6859 | 4.1 | 5.4 | 1+ | 89.0 | 5 | even |

Espectro 5. Fórmula del espectro de masas del compuesto 5c

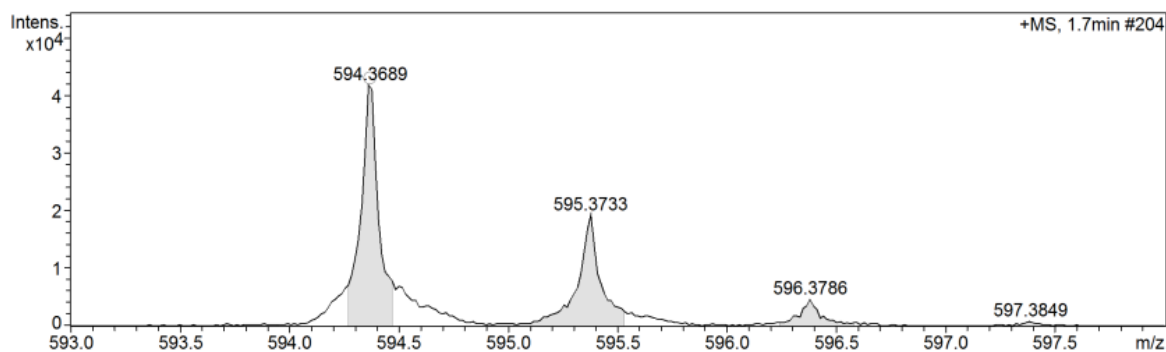
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

| | | | |
|---------------|--|------------------|-----------------------|
| Analysis Name | D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240820_C-86.d | Acquisition Date | 8/22/2024 4:03:36 AM |
| Method | Tune Low extendido.m | Operator | Admin |
| Sample Name | 20240820_C-86 | Instrument | micrOTOF 213750.00410 |
| Comment | | | |

Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------|----------|----------------------|----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 0.5 Bar |
| Focus | Active | | | Set Dry Heater | 150 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set Capillary | 4500 V | Set Dry Gas | 4.0 l/min |
| Scan End | 3000 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Divert Valve | Waste |



| Meas. m/z | # | Ion Formula | Sum Formula | m/z | err [ppm] | err [mDa] | z | mSigma | # mSigma | e ⁻ Conf |
|-----------|---|-------------|-------------|----------|-----------|------------|----|--------|----------|---------------------|
| 594.3689 | 1 | C38H48N3O3 | C38H47N3O3 | 594.3690 | 0.2 | 0.1 | 1+ | 18.3 | 1 | even |

Espectro 6. Fórmula del espectro de masas del compuesto 5d

Mass Spectrum SmartFormula Report

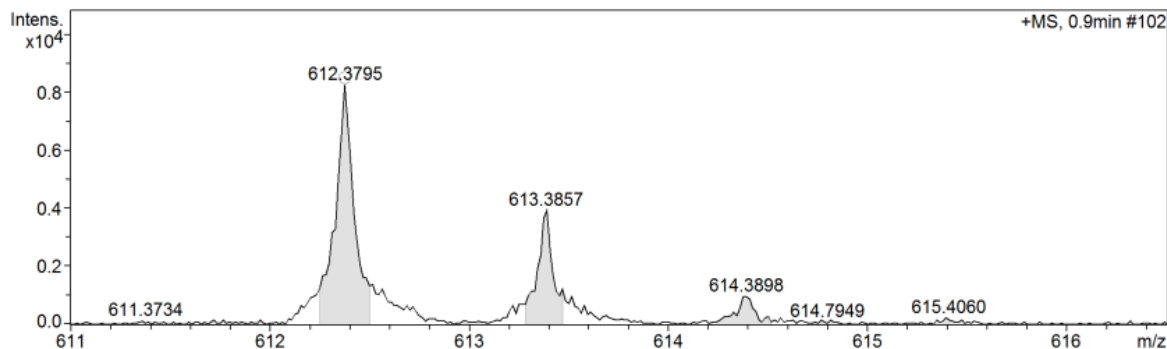
Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240820_C-88.d
Method Tune Low extendido.m
Sample Name 20240820_C-88
Comment

Acquisition Date 8/22/2024 4:16:29 AM
Operator Admin
Instrument micrOTOF 213750.00410

Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------|----------|----------------------|----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 0.5 Bar |
| Focus | Active | | | Set Dry Heater | 150 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set Capillary | 4500 V | Set Dry Gas | 4.0 l/min |
| Scan End | 3000 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Divert Valve | Waste |



| Meas. m/z | # | Ion Formula | Sum Formula | m/z | err [ppm] | err [mDa] | z | mSigma | # mSigma | e ⁻ Conf |
|-----------|---|-------------|-------------|----------|-----------|------------|----|--------|----------|---------------------|
| 612.3795 | 1 | C38H50N3O4 | C38H49N3O4 | 612.3796 | 0.2 | 0.1 | 1+ | 26.5 | 1 | even |

Espectro 7. Fórmula del espectro de masas del compuesto **5e**

Mass Spectrum SmartFormula Report

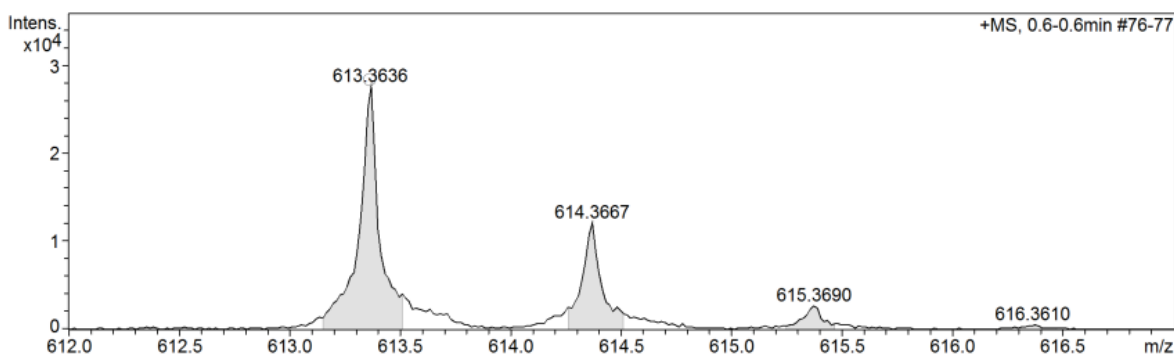
Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240822_C-89.d
Method Tune Low extendido.m
Sample Name 20240822_C-89
Comment

Acquisition Date 8/23/2024 3:59:24 AM
Operator Admin
Instrument micrOTOF 213750.00410

Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------|----------|----------------------|----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 0.5 Bar |
| Focus | Active | | | Set Dry Heater | 150 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set Capillary | 4500 V | Set Dry Gas | 4.0 l/min |
| Scan End | 3000 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Divert Valve | Waste |



| Meas. m/z | # | Ion Formula | Sum Formula | m/z | err [ppm] | err [mDa] | z | mSigma | # mSigma | e ⁻ Conf |
|-----------|---|-------------|-------------|----------|-----------|------------|----|--------|----------|---------------------|
| 613.3636 | 1 | C38H49N2O5 | C38H48N2O5 | 613.3636 | -0.1 | 0.0 | 1+ | 10.4 | 1 | even |

Espectro 8. Fórmula del espectro de masas del compuesto **5f**

Mass Spectrum SmartFormula Report

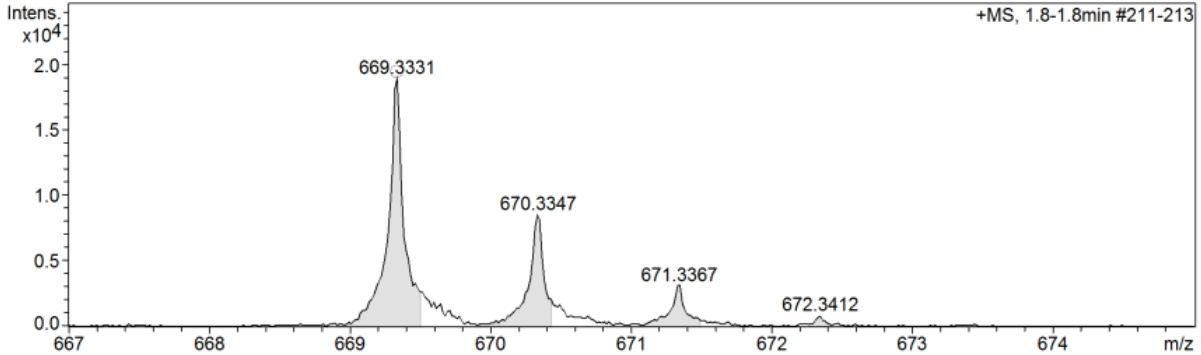
Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240822_C-91.d
Method Tune Low extendido.m
Sample Name 20240822_C-91
Comment

Acquisition Date 8/23/2024 4:33:48 AM
Operator Admin
Instrument micrOTOF 213750.00410

Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------|----------|----------------------|----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 0.5 Bar |
| Focus | Active | | | Set Dry Heater | 150 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set Capillary | 4500 V | Set Dry Gas | 4.0 l/min |
| Scan End | 3000 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Divert Valve | Waste |



| Meas. m/z | # | Ion Formula | Sum Formula | m/z | err [ppm] | err [mDa] | z | mSigma | # mSigma | e ⁻ | Conf |
|-----------|---|---------------|---------------|----------|-----------|------------|----|--------|----------|----------------|------|
| 669.3331 | 1 | C38H48F3N2O3S | C38H47F3N2O3S | 669.3332 | 0.2 | 0.1 | 1+ | 16.4 | 1 | even | |

Espectro 9. Fórmula del espectro de masas del compuesto **5g**

Mass Spectrum SmartFormula Report

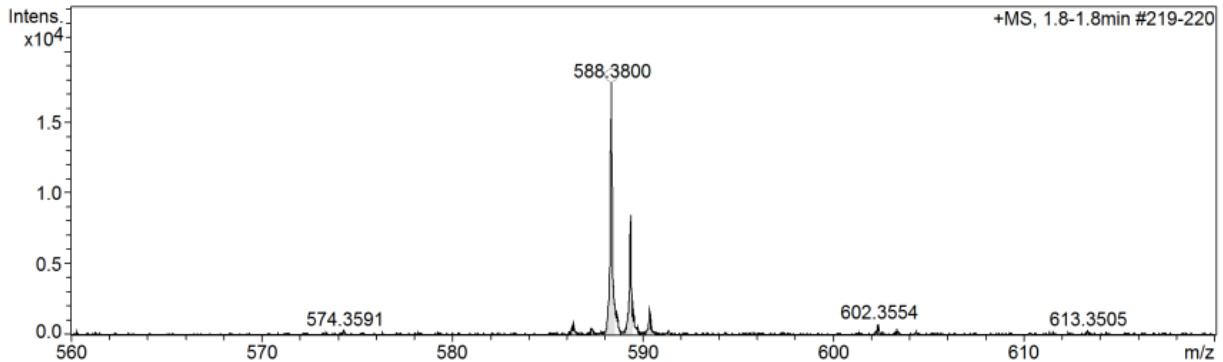
Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240822_C-90.d
Method Tune Low extendido.m
Sample Name 20240822_C-90
Comment

Acquisition Date 8/23/2024 4:15:41 AM
Operator Admin
Instrument micrOTOF 213750.00410

Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------|----------|----------------------|----------|------------------|-----------|
| Source Type | ESI | Ion Polarity | Positive | Set Nebulizer | 0.5 Bar |
| Focus | Active | | | Set Dry Heater | 150 °C |
| Scan Begin | 50 m/z | Set Capillary | 4500 V | Set Dry Gas | 4.0 l/min |
| Scan End | 3000 m/z | Set End Plate Offset | -500 V | Set Divert Valve | Waste |



| Meas. m/z | # | Ion Formula | Sum Formula | m/z | err [ppm] | err [mDa] | z | mSigma | # mSigma | e ⁻ | Conf |
|-----------|---|-------------|-------------|----------|-----------|------------|----|--------|----------|----------------|------|
| 588.3800 | 1 | C36H50N3O4 | C36H49N3O4 | 588.3796 | -0.7 | 0.4 | 1+ | 34.5 | 1 | even | |

Espectro 10. Fórmula del espectro de masas del compuesto **5h**



Asesor interno
Dr. Juan Francisco Cortés Benítez
No. Económico: 42603



Asesor externo
**M. en C.F. Ledy Cheyenne De la Cruz
Martínez**
Número de cédula: 12708577